

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-507255  
(P2008-507255A)

(43) 公表日 平成20年3月13日(2008.3.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B063
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B064
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C084

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 350 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-503099 (P2007-503099)  
 (86) (22) 出願日 平成17年3月11日 (2005.3.11)  
 (85) 翻訳文提出日 平成18年9月11日 (2006.9.11)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/008377  
 (87) 国際公開番号 W02005/105841  
 (87) 国際公開日 平成17年11月10日 (2005.11.10)  
 (31) 優先権主張番号 60/552, 184  
 (32) 優先日 平成16年3月12日 (2004.3.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 597018381  
 ヒューマン ジノーム サイエンスーズ,  
 インコーポレイテッド  
 Human Genome Sciences, Inc.  
 アメリカ合衆国 メリーランド 20850,  
 ロックビル, シャディー グローブ  
 ロード 14200  
 9410 Key West Avenue,  
 Rockville, Maryland 20850,  
 United States of America

(74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) HDGNR10

(57) 【要約】

本発明は、ヒトGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) HDGNDR10 と呼ばれる新規のヒトタンパク質およびこのタンパク質をコードする単離されたポリヌクレオチドに関する。本発明はまた、ヒトGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) HDGNDR10 に結合するヒト抗体、およびこれらの抗体をコードするポリヌクレオチドに関する。ヒトGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) HDGNDR10 およびヒト抗ヒトGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) HDGNDR10 抗体を生成するためのベクター、宿主細胞、抗体、および組換え方法もまた提供される。本発明はさらに、この新規のヒトタンパク質およびこれらの新規のヒト抗体に関連する疾患、障害、および/または状態を診断および処置するために有用な診断および治療方法に関する。

```

10          30          50
GTGACATGGTCTTTTCATGAAATTCGCCAAGAGGACAGGCTCCATCTAGTGGACAG
70          90
GGAGCTAGCAGCAAAAGCTTCCCTTCACTAGGAACTTCAATGCTTGGCCAAAGAGAG
130        150
TTAATTCATGTAGACATCTATGTAGCAATTAATAACCTATGATGATATAAACAGTTT
190        210
GCATTCATGCAAGGCAACTAAATACATTTAGAGACTTTATAAAGATCACTTTTATTTA
250        270
TGCCAGGGTGGAAACAGATGATGATCAAGTGTCAAGTCCATCTATGATCAATTAAT
310        330
TATACATCGAGCCCTGGCCAAAATCAATGTAGAGCAAAJOCAGGCGCCCTCGCTG
370        390
Y T S E P C P K I N Y K Q I A A R L L P
430        450
CGCCTCTACTCAGCTGGTGTTCATCTTGGTTTGTGGGCAACATGCTGGTCACTCATC
490        510
P L Y S L Y F I F G F Y G H M L Y I L I
550        570
CTGATAAAGTCCCAAGGCTGGAGAGCATGACATGACATGCTAECCTGCTCAACCTGG
590        610
L I N C O R L E S M T D I Y L L N L A I
650        670
TCTGACCTGTTTTCTTCTTACTGTCCTCTGCTGGCTCATGCTATGCTGGGAGGAGT
690        710
S D L F F L L T V P F W A H Y A A A Q W
750        770
GACTTTGAAATACAATGTGTCACCTCTGACAGGCTCTATTTTATAGCCTTCTCTCT
810        830
D F G N T M C Q L L T G L Y F I G F F S
870        890
GAACTCTTTCATCATCTCTGACAAATGATAGTACCTGGCTATGCTGATCACTGGTGC
930        950
G I F F I L L L T I D R Y L A I Y H A V
990        1010
TTTGGTTTAAAGGCAAGGCGGACCTTTGGGGTGGTGGACAGTGTGATCACTGGTGC
1050       1070
F A L K A R T V F F G V V T S V I T W Y
1110       1130
GTGGCTGTCTTGGCTCTCTCCGAGATCATCTTACCGAATCTCAAAAAGAGGCTT
1170       1190
V A V F A S L P G I I F T R S Q K E G L
1230       1250
CATTACAGCTGGCAGCTCATTTTCCATCAGTCAATCAATCTGAAAGAAATTCGAG
1290       1310
H Y T C S S H F P Y S Q Y Q F W K H F Q
1350       1370
ACATTAAGATAGTCACTCTGGGCTGGTCTGCGCTGCTGTCATGCTGATCTGCTAC
1410       1430
T L X I V I L G L V L P L L V M V I C Y
1470       1490
TGGGAACTGTAATAACTCTGCTTGGTGTGAAATGAGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
1530       1550
S G I L K T L L R C R H E X K R H R A V
    
```

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体であって、該抗体は第一アミノ酸配列および第二アミノ酸配列からなり、該第一アミノ酸配列は、ATCC受託番号PTA-5861において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のVHドメインのアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を含有し、そして該第二アミノ酸配列は、ATCC受託番号PTA-5861において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のVLドメインのアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を含有する、抗体。

10

## 【請求項 2】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体であって、該抗体は第一アミノ酸配列および第二アミノ酸配列からなり、該第一アミノ酸配列は、配列番号76のアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を含有し、そして該第二アミノ酸配列は、配列番号80のアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を含有する、抗体。

20

## 【請求項 3】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体であって、該抗体は、以下：

(a) ATCC受託番号PTA-5861において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のVHドメインのアミノ酸配列；

(b) ATCC受託番号PTA-5860において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のVHドメインのアミノ酸配列；

(c) ATCC受託番号PTA-5859において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のVHドメインのアミノ酸配列；

(d) ATCC受託番号PTA-4053において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のVHドメインのアミノ酸配列；および

(e) ATCC受託番号PTA-4054において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のVHドメインのアミノ酸配列；

からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を含有する、抗体。

30

## 【請求項 4】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体であって、該抗体は、配列番号76または配列番号72のアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を含有する、抗体。

40

## 【請求項 5】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体であって、該抗体は、以下：

(a) ATCC受託番号PTA-5861において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のVLドメインのアミノ酸配列；

(b) ATCC受託番号PTA-5860において受託されたハイブリドーマ細胞株に

50

よって発現される抗体のV Lドメインのアミノ酸配列；

(c) ATCC受託番号PTA-5859において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のV Lドメインのアミノ酸配列；

(d) ATCC受託番号PTA-4053において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のV Lドメインのアミノ酸配列；および

(e) ATCC受託番号PTA-4054において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のV Lドメインのアミノ酸配列；

からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を含有する、抗体。

10

【請求項6】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体であって、該抗体は、以下：

(a) 配列番号80；

(b) 配列番号78；および

(c) 配列番号74；

からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を含有する、抗体。

【請求項7】

20

請求項3に記載される抗体であって、該抗体はさらに、以下：

(a) ATCC受託番号PTA-5861において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のV Lドメインのアミノ酸配列；

(b) ATCC受託番号PTA-5860において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のV Lドメインのアミノ酸配列；

(c) ATCC受託番号PTA-5859において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のV Lドメインのアミノ酸配列；

(d) ATCC受託番号PTA-4053において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のV Lドメインのアミノ酸配列；および

(e) ATCC受託番号PTA-4054において受託されたハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のV Lドメインのアミノ酸配列；

30

からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または少なくとも100%同一であるアミノ酸配列を含有する、抗体。

【請求項8】

請求項4に記載の抗体であって、該抗体はさらに、以下：

(a) 配列番号80；

(b) 配列番号78；および

(c) 配列番号74；

からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を含有する、抗体。

40

【請求項9】

請求項1～8にいずれか1項に記載の抗体であって、該抗体はさらに、以下：

(a) IgM定常ドメイン；

(b) IgG定常ドメイン；および

(c) IgA定常ドメイン

からなる群より選択される免疫グロブリン重鎖定常ドメインを含有する、抗体。

【請求項10】

前記免疫グロブリン重鎖定常ドメインが、ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインである、

50

請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 1 1】

前記ヒト免疫グロブリン重鎖定常ドメインが、I g G 1 定常ドメイン、I g G 2 定常ドメイン、I g G 3 定常ドメイン、および I g G 4 定常ドメインからなる群より選択される、請求項 1 0 に記載の抗体。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、該抗体はさらに、以下：

- ( a ) 定常ドメイン；および
- ( b ) 定常ドメイン

からなる群より選択される免疫グロブリン軽鎖定常ドメインを含有する、抗体。

10

【請求項 1 3】

前記免疫グロブリン軽鎖定常ドメインがヒト免疫グロブリン軽鎖定常ドメインである、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、ここで、前記 G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリペプチドが、以下：

- ( a ) N 末端細胞外領域；
- ( b ) 細胞外ループ 1 ；
- ( c ) 細胞外ループ 2 ；
- ( d ) 細胞外ループ 3 ；および
- ( e ) 全長 C C R 5 レセプター

からなる群より選択される、抗体。

20

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、該抗体がウエスタンブロットまたは E L I S A において、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) に免疫特異的に結合する、抗体。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、ここで、該抗体は、以下：

- ( a ) F a b フラグメント；
- ( b ) F a b ' フラグメント；
- ( c ) F ( a b ' ) 2 フラグメント；
- ( d ) F d ；
- ( e ) 単鎖 F v ；
- ( f ) ジスルフィド結合された F v ；
- ( g ) モノクローナル抗体；
- ( h ) ヒト抗体；および
- ( i ) ヒト化抗体

からなる群より選択される、抗体。

30

【請求項 1 7】

前記抗体が  $4 \times 10^{-9}$  M 以下の解離定数 (  $K_D$  ) を有する、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。

40

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、ここで、該抗体は、以下：

- ( a ) 少なくとも  $10^{-3}$  / 秒のオフレート；および
- ( b ) 少なくとも  $10^{-4}$  / 秒のオフレート

からなる群より選択される、オフレートを有する、抗体。

【請求項 1 9】

前記抗体が異種性ポリペプチドと融合される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 2 0】

50

前記異種性ポリペプチドがヒト血清アルブミンである、請求項 19 に記載の抗体。

【請求項 21】

前記抗体が検出可能な標識と繋がれるかまたは結合体化される、請求項 1 ~ 20 に記載の抗体。

【請求項 22】

前記検出可能な標識が放射性標識である、請求項 21 に記載の抗体。

【請求項 23】

前記放射性標識が、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>In、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>177</sup>Lu、<sup>166</sup>Ho または <sup>153</sup>Sm である、請求項 22 に記載の抗体。

【請求項 24】

前記検出可能な標識が、酵素、蛍光標識、発光標識または生物発光標識である、請求の 21 に記載の抗体。

【請求項 25】

前記抗体がビオチン化される、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 26】

前記抗体が G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアンタゴニストである、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の抗体であって、ここで、該抗体は、以下：

- (a) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の中和；
- (b) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞へのエオタキシンの結合の阻害；
- (c) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞に対するエオタキシン誘導性化学走性の阻害；
- (d) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞への RANTES の結合の阻害；
- (e) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞に対する RANTES 誘導性化学走性の阻害；
- (f) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞への MCP-1 の結合の阻害；
- (g) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞に対する MCP-1 誘導性化学走性の阻害；
- (h) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞への MCP-2 の結合の阻害；
- (i) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞に対する MCP-2 誘導性化学走性の阻害；
- (j) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞への MCP-3 の結合の阻害；
- (k) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞に対する MCP-3 誘導性化学走性の阻害；
- (l) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞への MIP-1 の結合の阻害；
- (m) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞に対する MIP-1 誘導性化学走性の阻害；
- (n) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞への MIP-1 の結合の阻害；
- (o) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞に対する MIP-1 誘導性化学走性の阻害；
- (p) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現の下方制御；および
- (q) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現の上方制御

10

20

30

40

50

からなる群より選択される、活性を有する、抗体。

【請求項 28】

前記抗体が G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニストである、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、ここで該抗体が、以下：

(a) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞に対する HIV の結合の阻害；および

(b) G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞に対する HIV 感染の阻害

10

からなる群より選択される活性を有する、抗体。

【請求項 30】

前記抗体が、治療剤または細胞傷害剤と結合体化される、請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の抗体であって、ここで、前記治療剤または細胞傷害剤が、代謝拮抗物質、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗脈管形成剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、毒素、またはアポトーシス剤である、抗体。

【請求項 32】

抗体であって、以下：

(a) ATCC 受託番号 PTA - 5861 において受託されたハイブリドーマ細胞株；

(b) ATCC 受託番号 PTA - 5860 において受託されたハイブリドーマ細胞株；

(c) ATCC 受託番号 PTA - 5859 において受託されたハイブリドーマ細胞株；

(d) ATCC 受託番号 PTA - 4053 において受託されたハイブリドーマ細胞株；

および

(e) ATCC 受託番号 PTA - 4054 において受託されたハイブリドーマ細胞株；

からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株のいずれか 1 つにより発現される抗体と、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 上の同じエピトープに結合する、抗体

20

。

【請求項 33】

第一アミノ酸配列および第二アミノ酸配列からなる抗体と、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 上の同じエピトープに結合する抗体であって、ここで、該第一アミノ酸配列および第二アミノ酸配列が、以下：

(a) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含有する第一アミノ酸配列、および配列番号 80 のアミノ酸配列を含有する第二アミノ酸配列；

(b) 配列番号 72 のアミノ酸配列を含有する第一アミノ酸配列、および配列番号 74 のアミノ酸配列を含有する第二アミノ酸配列；

(c) 配列番号 72 のアミノ酸配列を含有する第一アミノ酸配列、および配列番号 80 のアミノ酸配列を含有する第二アミノ酸配列；ならびに

(d) 配列番号 76 のアミノ酸配列を含有する第一アミノ酸配列、および配列番号 78 のアミノ酸配列を含有する第二アミノ酸配列；

30

40

からなる群より選択される、抗体。

【請求項 34】

薬学的に受容可能なキャリア中の、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 35】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体の、少なくとも VH ドメインまたは少なくとも VL ドメインをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 36】

請求項 35 のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 37】

50

請求項 3 6 に記載のベクターまたは請求項 3 5 に記載のポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

【請求項 3 8】

請求項 1 ~ 2 0 および請求項 3 2 または請求項 3 3 のいずれか 1 項に記載の抗体を発現するように操作された、細胞株。

【請求項 3 9】

前記細胞が N S O 細胞または C H O 細胞である、請求項 3 8 に記載の細胞株。

【請求項 4 0】

請求項 3 8 または請求項 3 9 に記載の細胞株からの発現によって取得可能な、抗体。

【請求項 4 1】

抗体を作製する方法であって、以下：

( a ) 請求項 3 5 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる抗体を発現する工程；および

( b ) 該抗体を回収する工程

を包含する、方法。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 に記載の方法により取得可能な、抗体。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 3 4、請求項 4 0 または請求項 4 2 のいずれか 1 項に記載の抗体の、薬学的組成物の製造のための使用であって、該組成物は、以下

( a ) 炎症と関係した疾患または障害；

( b ) 免疫細胞の不完全または異常な化学走性と関係した疾患または障害；

( c ) 不完全または異常な T 細胞 - 抗原提示細胞相互作用と関係した疾患または障害；

( d ) 感染性疾患；

( e ) 自己免疫疾患；

( f ) 慢性関節リウマチ

( g ) 宿主対移植片疾患；

( h ) 移植片対宿主疾患；

( i ) クローン病；

( j ) ヴェグナー性肉芽種症；

( k ) 神経変性障害；

( l ) ウイルス感染；

( m ) H I V 感染；

( n ) 初期 H I V 感染；

( o ) サイトメガロウイルス感染；

( p ) ポックスウイルス感染；

( q ) ニューモシスティスカリニ感染；

( r ) カボシ肉腫；

( s ) 異常な G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) 発現と関係した疾患または障害；

( t ) G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) 機能の欠損と関係した疾患または障害；

( u ) 異常な G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) リガンド発現と関係した疾患または障害；および

( v ) G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) リガンド機能の欠損と関係した疾患または障害

からなる群より選択される疾患または障害の処置または予防のためである、使用。

【請求項 4 4】

前記薬学的組成物がヒトにおける投与のためである、請求項 4 3 に記載の使用。

【請求項 4 5】

10

20

30

40

50

前記薬学的組成物が、化学療法剤または抗レトロウイルス剤と併用しての抗体の投与のためである、請求項 4 3 または請求項 4 4 に記載の使用。

【請求項 4 6】

前記薬学的組成物が抗レトロウイルス剤をさらに含む、請求項 4 3 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 4 7】

G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドの発現を検出するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 請求項 1 ~ 3 4、請求項 4 0 または請求項 4 2 のいずれか 1 項に記載の抗体を使用して、個体由来の生物学的サンプル中の G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドの発現についてアッセイする工程；および

(b) 該 G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドのレベルと、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドの標準レベルとを比較する工程

を包含する、方法。

【請求項 4 8】

癌または他の過増殖性障害を検出、診断、予測またはモニタリングする方法であって、以下：

(a) 請求項 1 ~ 3 4、請求項 4 0 または請求項 4 2 のいずれか 1 項に記載の抗体を使用して、個体由来の生物学的サンプル中の G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドの発現をアッセイする工程；および

(b) 該 G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドのレベルと、標準的な G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドのレベルとを比較する工程、

を包含する、方法。

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 3 4、請求項 4 0 または請求項 4 2 のいずれか 1 項に記載の抗体を備える、キット。

【請求項 5 0】

コントロール抗体を備える、請求項 4 9 に記載のキット。

【請求項 5 1】

単離された抗体またはそのフラグメントであって、該単離された抗体またはそのフラグメントは、以下：

(a) 以下からなる群より選択されるハイブリドーマによって発現される、VHCDR 1 ドメイン、VHCDR 2 ドメインまたは VHCDR 3 ドメインのアミノ酸配列：

(i) ATCC 受託番号 PTA - 5861

(ii) ATCC 受託番号 PTA - 5860

(iii) ATCC 受託番号 PTA - 5859；

(iv) ATCC 受託番号 PTA - 4053；または

(v) ATCC 受託番号 PTA - 4054；

および

(b) 以下からなる群より選択されるハイブリドーマによって発現される、VLCDR 1 ドメイン、VLCDR 2 ドメインまたは VLCDR 3 ドメインのアミノ酸配列：

(i) ATCC 受託番号 PTA - 5861

(ii) ATCC 受託番号 PTA - 5860

(iii) ATCC 受託番号 PTA - 5859；

(iv) ATCC 受託番号 PTA - 4053；または

(v) ATCC 受託番号 PTA - 4054；

からなる群より選択される第二アミノ酸配列と少なくとも 95% 同一である第一アミノ酸配列を含み、

10

20

30

40

50

ここで、該抗体またはそのフラグメントが G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) に免疫特異的に結合する、単離された抗体またはそのフラグメント。

【請求項 5 2】

単離された抗体またはそのフラグメントであって、該単離された抗体またはそのフラグメントは、以下：

( a ) 配列番号 7 6 または配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 ドメイン、V H C D R 2 ドメインまたは V H C D R 3 ドメインのアミノ酸配列；

および

( b ) 以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む V L C D R 1 ドメイン、V L C D R 2 ドメインまたは V L C D R 3 ドメインのアミノ酸配列；

( i ) 配列番号 8 0 ；

( i i ) 配列番号 7 8 ；または

( i i i ) 配列番号 7 4 ；

からなる群より選択される第二アミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一である第一アミノ酸配列を含み、

ここで、該抗体またはそのフラグメントが G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) に免疫特異的に結合する、単離された抗体またはそのフラグメント。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ファミリーのメンバーであるポリペプチドをコードする新規のヒト遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、ヒト G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) H D G N R 1 0 ( 本明細書中では、「G タンパク質ケモカインレセプター」または「H D G N R 1 0」と言及される) と名付けられた新規のヒトポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明はまた、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリペプチド、ならびに同一物を生成するためのベクター、宿主細胞、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリペプチドに対する抗体、および組換え方法に関する。免疫系および H I V 感染に関連する疾患、障害、および / または状態を検出するための診断方法、ならびにこのような疾患、障害、および / または状態を処置、防止、および / または診断するための治療方法もまた提供される。本発明はさらに、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) 活性のアゴニストおよびアンタゴニストを同定するためのスクリーニング方法に関する。G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) はまた、C C R 5 としても公知である。

【背景技術】

【0002】

医学的に重要な多数の生物学的プロセスが、G タンパク質および / またはセカンドメッセンジャー ( 例えば、c A M P ) を含むシグナル伝達経路に参与するタンパク質により媒介されることは、十分に確立されている ( 非特許文献 1 ) 。本明細書中では、これらのタンパク質を、G タンパク質を用いた経路に参与するタンパク質または P P G タンパク質という。これらのタンパク質のいくつかの例は、G P C レセプター ( 例えば、アドレナリン作用性薬剤およびドーパミンに対する G P C レセプター ( 非特許文献 2 ; 非特許文献 3 ; 非特許文献 4 ) 、G タンパク質それ自体、エフェクタータンパク質 ( 例えば、ホスホリパーゼ C 、アデニルシクラーゼ、およびホスホジエステラーゼ ) 、ならびにアクチュエータータンパク質 ( a c t u a t o r p r o t e i n ) ( 例えば、プロテインキナーゼ A およびプロテインキナーゼ C ) ( 非特許文献 5 ) を含む。

【0003】

例えば、シグナル伝達の 1 つの形態では、ホルモン結合の効果は、細胞内における酵素アデニル酸シクラーゼの活性化である。ホルモンによる酵素の活性化は、ヌクレオチド G T P の存在に依存し、そして G T P はまた、ホルモン結合に影響を与える。G タンパク質は、ホルモンレセプターをアデニル酸シクラーゼに連結させる。G タンパク質は、ホルモ

10

20

30

40

50

ンレセプターにより活性化されると、GTPを結合GDPに変換することが示された。次いで、GTP保有形態は、活性化されたアデニル酸シクラーゼに結合する。GTPのGDPへの加水分解は、Gタンパク質それ自体により触媒され、Gタンパク質を基底の不活性な形態に戻す。従って、Gタンパク質は、シグナルをレセプターからエフェクターに中継する中間物として、およびシグナルの持続時間を制御する時計としての2つの役割を果たす。

#### 【0004】

Gタンパク質共役レセプターの膜タンパク質遺伝子スーパーファミリーは、7つの推定膜貫通ドメインを有するものとして特徴づけられている。このドメインは、細胞外または細胞質ループにより結合された膜貫通ヘリックスを表すと考えられる。Gタンパク質共役レセプターは、ホルモン、ウイルス、増殖因子および神経レセプターのような広範囲の生物学的に活性なレセプターを含む。

10

#### 【0005】

Gタンパク質共役レセプターは、少なくとも8つの開放性の親水性ループと結合する、約20~30アミノ酸のこれらの7つの保存された疎水性の範囲を含むものとして特徴づけられている。共役レセプターのGタンパク質ファミリーは、精神病および神経学的な疾病の治療に用いる神経弛緩薬に結合するドーパミンレセプターを含む。このファミリーのメンバーの他の例は、カルシトニン、アドレナリン作用性、エンドセリン、cAMP、アデノシン、ムスカリン様、アセチルコリン、セロトニン、ヒスタミン、トロンピン、キニン、卵胞刺激ホルモン、オプシン、内皮分化遺伝子1レセプターおよびロドプシン、臭気物質、サイトメガロウイルスレセプターなどを含む。

20

#### 【0006】

Gタンパク質共役レセプターは、ヘテロ三量体のGタンパク質により種々の細胞内の酵素、イオンチャンネルおよびトランスポーターに細胞内で結合し得る（非特許文献6を参照のこと）。異なるGタンパク質のサブユニットは好ましくは、細胞内で種々の生物学的機能を調節するための特定のエフェクターを刺激する。Gタンパク質共役レセプターの細胞質残基のリン酸化は、いくつかのGタンパク質共役レセプターのGタンパク質共役の調整のための重要な機構として同定された。Gタンパク質共役レセプターは、哺乳動物宿主内において多くの部位で見出される。

30

#### 【0007】

ケモカインは、インタークリンサイトカイン（intercrine cytokine）としてもいわれるが、構造的および機能的に関連したサイトカインのサブファミリーである。これらの分子は8~10kdのサイズである。一般的に、ケモカインは20%~75%のアミノ酸レベルの相同性を示し、そして2つのジスフィルド結合を形成する4つの保存されたシステイン残基により特徴付けられる。最初の2つのシステイン残基の配置に基づいて、ケモカインは、およびの2つのサブファミリーに分類される。サブファミリーにおいて、最初の2つのシステインは1アミノ酸により分離され、そして今後「C-X-C」サブファミリーといわれる。サブファミリーにおいて、この2つのシステインは隣接した位置にあり、それゆえ、「C-C」サブファミリーといわれる。このように、このファミリーの少なくとも9つの異なったメンバーがヒトにおいて同定されている。

40

#### 【0008】

インタークリンサイトカインは、多岐にわたる種々の機能を示す。顕著な特徴は、単球、好中球、Tリンパ球、好塩基球、および腺維芽細胞を含む、異なる細胞型の走化性移動を誘導する能力である。多くのサイトカインは前炎症性活性を有し、そして炎症性反応の間に複数の段階に参与する。これらの活性は、ヒスタミン放出の刺激、リソソーム酵素およびロイコトリエンの放出、標的免疫細胞の内皮細胞への接着性の増大、補体タンパク質の結合の増強、顆粒細胞接着分子および補体レセプターの発現誘導、および呼吸バーストを含む。炎症におけるそれらの関連に加えて、あるケモカインは他の活性を示すことが示唆されてきた。例えば、マクロファージ炎症性タンパク質1（MIP-1）は、造血幹細

50

胞の増殖を抑制し得、血小板因子4 (PF-4)は、内皮細胞増殖の潜在的阻害剤であり、インターロイキン8 (IL-8)は、ケラチノサイトの増殖を促進し、そしてGROはメラノーマ細胞のオートクリン増殖因子である。

【0009】

広範な生物学的活性において、ケモカインが、リンパ球のさまよい (trafficking)、創傷治癒、造血調節ならびにアレルギー、喘息および関節炎のような免疫学的疾病を含む多数の生理学的小および疾病状態において、関与することは驚くべきことではない。

【0010】

従って、免疫系調節を調節するポリペプチドに対する必要性が存在する。というのも、このような調節の混乱は、免疫系に関する疾患、障害、および/または状態に関わり得るからである。従って、このような疾患、障害、および/または状態の検出、防止、改善または矯正に役割を果たし得る、このようなヒトポリペプチドの同定および特徴付けに対する必要性が存在する。

10

【0011】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5)は、免疫系の細胞 (例えば、マクロファージ (ランゲルハンス細胞のような未成熟樹状細胞を含む)、およびT細胞 (Th0およびTh1エフェクター細胞を含む))において発現される、7回膜貫通Gタンパク質共役レセプターである。Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5)はまた、中枢神経系 (CNS)の小グリア細胞、星状細胞、神経細胞、および脈管内皮細胞においても検出されている。Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5)はまた、慢性関節リウマチ患者の滑液における単球およびT細胞においても発現され、そして他の形態の関節炎においても関係している。

20

【0012】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5)のリガンドとして、MIP-1、MIP-1、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、RANTES、およびエオタキシンが挙げられる。CCR5はまた、HIVに対する主要なコエフェクターであり、そしてまた、他の感染因子 (例えば、他のウイルス)によっても認識されてその細胞への浸入を可能にし得る。CCR5遺伝子の変異を有する特定の個体が、ウイルスに複数回曝したにもかかわらず、HIV感染に対して耐性であったことが、近年発見された。この変異は、細胞表面でのCCR5の発現を排除していた (非特許文献7)。

30

【0013】

近年、HIVは、世界の主要な致死性感染疾患であり、1999年に260万人の死者を出した。HIV感染が原因の死者の数は、増え続けており; 1999年において、世界中で560万のHIV感染の新たな症例および3,360万の生存感染者が存在した。現在は、HIVを処置するための薬物が開発されているが、1/5もの数の患者が、1年間の薬物レジメンの後に、処置が成功せずに終わっている (成功は、血清中に検出可能なHIV RNAが存在しない (それは、50コピー/mlのHIV-1 RNAと等量かそれより低い) ことと規定される)。HIVを効果的に処置するためのこれらの薬物レジメンの不活性の理由は、いくつも存在する。: 特定の薬物の使用が、薬物耐性HIV株の発生を引き起こす; いくらかの個体が、特定の薬物にたいして寛容であるか、またはその薬物が副作用を有する; 患者が、複雑な投薬レジメンに従うことに困難を有する; およびその薬物が、体内のHIVの蓄積に接近できないかもしれない。従って、当該分野で、改善されたHIVワクチンおよびHIV治療を開発する必要性が残っている。

40

【非特許文献1】Lefkowitz, Nature, 351: 353-354 (1991)

【非特許文献2】Kobilka, B. K.ら, PNAS, 84: 46-50 (1987)

【非特許文献3】Kobilka, B. K.ら, Science, 238: 650-656 (1987)

50

【非特許文献4】Bunzow, J. R. ら, Nature, 336: 783 - 787 (1988)

【非特許文献5】Simon, M. I. ら, Science, 252: 802 - 8 (1991)

【非特許文献6】Johnson ら, Endoc., Rev., 10: 317 - 331 (1989)

【非特許文献7】Liu ら, Cell 86: 1 (1996)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0014】

10

(発明の要旨)

本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の新規のポリヌクレオチドおよびそのコードされたポリペプチドに関する。さらに、本発明は、このポリペプチドおよびポリヌクレオチドを生成するためのベクター、宿主細胞、抗体、ならびに組換え方法および合成方法に関する。このポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関連する疾患、障害および/または状態を検出するための診断方法、このような疾患、障害、および/または状態を処置、防止、および/または診断するための治療方法もまた提供される。本発明はさらに、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の結合パートナーを同定するためのスクリーニング方法に関する。

【0015】

20

本発明の1つの局面に従って、新規の成熟レセプターポリペプチド、ならびに生物学的に活性であり、診断的または治療的に有用なそれらのフラグメント、アナログおよび誘導体が提供される。本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドは、ヒト起源である。

【0016】

本発明の別の局面に従って、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドをコードする単離された核酸分子が提供される。この核酸分子は、mRNA、DNA、cDNA、ゲノムDNA、ならびにそれらのアンチセンスアナログおよび生物学的に活性であり、診断的または治療的に有用なそれらのフラグメントを含む。

【0017】

30

本発明のさらなる局面に従って、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドを組換え技術により生成するためのプロセスが提供される。この組換え技術は、本発明のレセプターポリペプチドをコードする核酸配列を含む、組換え原核宿主細胞および/または真核宿主細胞を、上記のポリペプチドの発現の促進およびその後の上記ポリペプチドの回収を促進する条件下で培養する工程を包含する。

【0018】

本発明のなおさらなる局面に従って、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに結合する抗体が提供される。本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドがあるいはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリペプチドフラグメントまたは改変体に免疫特異的に結合する抗体(抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含むか、あるいはそれらからなる分子を含む)を含む。特に、本発明は、ヒトGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントあるいは改変体(例えば、配列番号2のそれらかまたは寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドのそれら)に免疫特異的に結合する抗体(抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含むか、あるいはそれらからなる分子を含む)を含む。

40

【0019】

本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはそのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する1つ以上の抗体またはそのフラグメントもしくは改変体、あるいは関連分子の治療有効量を哺乳動物、好ましくはヒトに投与する工程を包含

50

する疾患または障害を防止、処置、または改善するための方法および組成物に関する。特定の実施形態において、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）機能またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）リガンド機能もしくは異常なGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）リガンド発現と関連する疾患または障害を防止、処置、または改善するための方法および組成物に関し、この方法は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはそのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する1つ以上の抗体またはそのフラグメントもしくは改変体、あるいは関連分子の治療有効量を哺乳動物、好ましくはヒトに投与する工程を包含する。高度に好ましい実施形態において、本発明は、HIV感染および/またはHIV感染に関連する状態を防止、処置、または改善するための抗体ベースの方法および組成物に関する。本発明の抗体を用いて処置、防止、または改善され得る他の疾患および障害として、免疫疾患（例えば、自己免疫障害（例えば、多発硬化症、グレーブス病、および慢性関節リウマチ）、神経変性障害（例えば、アルツハイマー病）、炎症障害（例えば、ぜん息、アレルギー障害、または炎症性腎臓疾患（例えば、糸球体腎炎）、感染疾患（例えば、肝炎感染、ヘルペスウイルス感染、および他のウイルス感染）、および増殖障害が挙げられるがこれらに限定されない。

10

**【0020】**

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはそのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する1つ以上の抗体またはそのフラグメントもしくは改変体、あるいは関連する分子の治療有効量を動物、好ましくはヒトに投与する工程を包含する、疾患または障害を検出、診断、または予測するための方法および組成物に関する。特定の実施形態において、本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）機能またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）リガンド機能もしくは異常なGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）リガンド発現と関連する疾患または障害を検出、診断、または予測するための方法および組成物に関し、この方法は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはそのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する1つ以上の抗体またはそのフラグメントもしくは改変体、あるいは関連分子の治療有効量を哺乳動物、好ましくはヒトに投与する工程を包含する。高度に好ましい実施形態において、本発明は、HIV感染および/またはHIV感染に関連する状態を検出、診断、または予測するための抗体ベースの方法および組成物に関する。本発明の抗体を用いて検出、診断、または予測され得る他の疾患および障害として、免疫疾患（例えば、自己免疫障害（例えば、多発硬化症、グレーブス病、および慢性関節リウマチ）、神経変性障害（例えば、アルツハイマー病）、炎症（例えば、ぜん息、アレルギー障害、または炎症性腎臓疾患（例えば、糸球体腎炎）、感染疾患（例えば、肝炎感染、ヘルペスウイルス感染、および他のウイルス感染）、および増殖障害が挙げられるがこれらに限定されない。

20

30

**【0021】**

本発明の別の実施形態は、細胞におけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の発現をモニターするための診断ツールとしての本発明の抗体の使用を包含する。

**【0022】**

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチド（例えば、配列番号2、または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチド）に免疫特異的に結合する抗体を発現する細胞系を包含する。

40

**【0023】**

さらに、本発明は、そのような細胞系によって発現される抗体をコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらの細胞系によって発現される抗体をコードするアミノ酸配列を包含する。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはそのフラグメントもしくは改変体に特異的に結合する、本発明の抗体発現細胞系によって発現されたそのいずれか1つのアミノ酸配列を有するこれらの抗体のフラグメントまたは改変体を含むか、あるいはそれらからなる分子（例えば、重鎖、VHドメイン、VH CDR、軽鎖、VLドメイ

50

ン、またはV L C D R)もまた、本発明に包含され、これらの抗体および/または分子をコードする核酸分子も同様に包含される。高度に好ましい実施形態において、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)またはそのフラグメントおよび改変体の細胞外領域/ドメインに結合する抗体、もしくはそのフラグメントまたは改変体を包含する。

**【0024】**

本発明者らは、Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチド(例えば、配列番号2または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチド)に免疫特異的に結合する抗体を発現するハイブリドーマ細胞系を作製した。従って、本発明は、以下の表2によって列挙されるこれらの細胞系を包含する。これらは、表2に列挙される日付でアメリカンタイプカルチャーコレクション(「ATCC」)に寄託され、そして表2で特定されるATCC受託番号を与えられた。ATCCは、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USAに位置する。ATCC寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタベスト条約の条項に拠ってなされた。

10

**【0025】**

さらに、本発明は、これらの細胞株によって発現される抗体をコードするポリヌクレオチド、ならびにこれらの細胞株によって発現される抗体をコードするアミノ酸配列を含む。Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)またはそのフラグメントもしくは変異体に免疫特異的に結合する、これらの抗体(例えば、表2において参照される1つ以上の細胞株によって発現されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つのアミノ酸配列を有する、H鎖、VHドメイン、VH C D R、L鎖、VLドメインまたはV L C D R)のフラグメントまたは変異体を含有する、あるいは代替的にそれらから成る分子もまた、これらの抗体および/または分子をコードする核酸分子として、本発明によって含まれる。非常に好ましい実施形態において、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)またはそのフラグメントおよび変異体の細胞外領域/ドメインに結合する、抗体またはそれらのフラグメントもしくは変異体を含む。

20

**【0026】**

本発明はまた、検出可能な標識(例えば、酵素、蛍光標識、発光標識または生物発光標識)に連結される抗体であって、Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチドを結合する抗体を提供する。本発明はまた、治療薬または細胞毒薬に連結されるGタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチドを結合する抗体を提供する。本発明はまた放射活性物質に連結される抗体であって、Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチドを結合する抗体を提供する。

30

**【0027】**

本発明はさらに、Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)発現細胞に結合する、それらに入る/それらと融合する(感染する)、および/またはそれらを複製する、H I Vの能力を阻害または消滅させる抗体を提供する。本発明の非常に好ましい実施形態において、本発明の坑Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)抗体は、H I V感染および/またはH I V感染に関連した状態の処置、予防または回復のために使用される。他の非常に好ましい実施形態において、本発明の坑Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)抗体は、個々に単独でかまたは他の治療化合物(特に、坑レトロウイルス薬)と組み合わせて、H I V感染および/またはH I V感染に関連した状態の処置、予防または回復するために投与される。

40

**【0028】**

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)アゴニストまたはGタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)アンタゴニストのいずれかとして作用する、Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチドを結合する抗体を提供する。特定の実施形態において、本発明の抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)発現細胞の走化性を刺激する。他の特定の実施形態において、本発明の抗体は、G

50

タンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に結合するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）リガンドを阻害する。他の特定の実施形態において、本発明の抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現をアップレギュレートする。

【0029】

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現をダウンレギュレートする抗体を提供する。なお別の特定の実施形態において、本発明の抗Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）内在化を促進することによって、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現をダウンレギュレートする。

【0030】

本発明はさらに、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）リガンド（例えば、MIP1 - MIP - 1、MCP - 1、MCP - 2、MCP - 3、MCP - 4、RANTESおよびEotaxin）のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現細胞に対する結合を阻害するか、または消滅させる抗体を提供する。

【0031】

本発明の抗体は、診断目的または治療目的のために使用され得る。1つの実施形態において、本発明の抗体を使用して、HIV感染に対する感受性を診断し、そしてさらに特に、HIVのCCR5指向性株に対する感受性を診断する。CCR5はHIVに対する細胞表面レセプターとして作用し、これによってHIVが細胞中への侵入を開始するので、低CCR5発現の個体またはCCR5発現を欠いた個体は、本発明の抗体を使用して決定される場合、HIV感染に対する感受性がより低い。別の実施形態において、本発明の抗体は、HIV感染を処置または予防するため、治療的または予防的に投与され得る。なお別の局面において、本発明の抗体は、移植片拒絶を処置または予防するため、治療的または予防的に投与され得る。

【0032】

本発明はまた、一般的に単離された、本発明の抗体をコードする核酸分子（例えば、抗体フラグメントまたはその変異体を含むか、または代替的にそれらからなるscFv、VHドメインまたはVLドメインのような分子を含む）を提供する。本発明はまた、本発明の抗体およびその子孫をコードする核酸分子（例えば、抗体フラグメントまたはその変異体を含むか、または代替的にそれらからなるscFv、VHドメインまたはVLドメインのような分子を含む）と形質転換される宿主細胞を提供する。本発明はまた、本発明の抗体（抗体フラグメントまたはその変異体を含むか、または代替的にそれらからなる分子を含む）を産生する方法を提供する。本発明はさらに、核酸分子から本発明の抗体（抗体フラグメントまたはその変異体を含むか、または代替的にそれらからなる分子を含む）を発現する方法を提供する。本発明のこれらおよび他の局面は、以下にさらに詳細に記載される。

【0033】

別の実施形態において、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはそれらのフラグメント、変異体もしくは誘導体を含むか、または代替的にそれらからなるワクチンを提供する。

【0034】

本発明の別の局面に従って、本発明Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドに結合し、かつそれらの活性を活性化させるかまたは阻害する化合物をスクリーニングする方法が提供される。

【0035】

本発明のなお別の実施形態に従って、造血、創傷治癒、凝固、新脈管形成を刺激する際に、固形腫瘍、慢性感染、白血病、T細胞媒介自己免疫疾患、寄生感染、乾癬を処置するために、および増殖因子活性を刺激するために、有用である、本発明のレセプターポリペプチドに結合し、かつそれを活性化させる宿主に化合物を投与するプロセスが提供される。

。

10

20

30

40

50

## 【0036】

本発明の別の局面に従って、ポリペプチドの過少発現またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに関するリガンドの過少発現に関連する状態を処置するために、本発明のレセプターポリペプチドを、遺伝子療法を介して投与方法が提供される。

## 【0037】

本発明のなお別の実施形態に従って、アレルギー、アテローム発生、アナフィラキシー、悪性腫瘍、慢性炎症および急性炎症、ヒスタミンおよびIgE媒介アレルギー反応、プロスタグランジン非依存性発熱(prostaglandin-independent fever)、骨髄不全、珪肺症、サルコイドーシス、リウマチ様動脈炎、ショック症候群および好酸球過剰症候群の予防および/または処置に有用である、本発明のレセプターポリペプチドに結合し、かつそれらの活性化を阻害する宿主に化合物を投与するプロセスが提供される。

10

## 【0038】

本発明のなお別の局面に従って、本発明のポリヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズするのに十分な長さの核酸分子を含有する核酸プローブが提供される。

## 【0039】

本発明のなお別の局面に従って、このようなポリペプチドをコードする核酸配列における変異体に関連した疾患を検出するための、およびレセプターポリペプチドの可溶性形成の変質レベルを検出するための、診断アッセイが提供される。

20

## 【0040】

本発明のなおさらなる局面に従って、科学的調査、DNA合成およびDNAベクターの製造に関連したインピットロでの目的のために、このようなレセプターポリペプチド、またはこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを利用するためのプロセスが提供される。

## 【0041】

本発明のこれらのおよび他の局面は、本明細書中の教示から当業者に明らかでなければならぬ。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0042】

(詳細な説明)

本発明の1つの局面に従って、図1の推定アミノ酸(配列番号2)を有する成熟ポリペプチド、またはATCC受託番号97183として寄託されたクローン(1995年6月1日)によってコードされる成熟ポリペプチドをコードする、単離された核酸(ポリヌクレオチド)が提供される。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のオープンリーディングフレームを含む、寄託されたクローンのサンプルは、ATCCから得られ、かつ再配列される。この再配列クローンからの配列データは、配列番号21および22に示される。配列番号21は、5の位置(配列番号1のヌクレオチド320、433、442、646および1289)における配列番号1とは異なる。配列番号22は、5の位置(アミノ酸残基21、59、62、130および344)における配列番号2とは異なる。

30

40

## 【0043】

本発明のポリヌクレオチドは、ヒト単球由来のゲノムライブラリーにおいて発見された。このポリヌクレオチドは、構造的にはGタンパク質連結レセプターファミリーに関連する。このポリヌクレオチドは、352のアミノ酸残基のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含有する。このタンパク質は、347のアミノ酸ストレッチにわたって70.1%の同一性および82.9%の類似性を有するヒトMCP-1レセプター(配列番号9)に対して最も高い程度の相同性を示す。

## 【0044】

本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド配列、HDGNR10寄託クローン(ATCC受託番号97183)の配列番号21のヌクレオチド配列および/また

50

はそれらのフラグメント、変異体もしくは誘導体を含むがこれらに限定されない。

【0045】

本発明のポリヌクレオチドは、RNA形態またはDNA形態であり得、このDNAは、cDNA、ゲノムDNAおよび合成DNAを含む。DNAは、二本鎖または一本鎖であり得、そして一本鎖は、コード鎖であり得るか、または非コード鎖（アンチセンス鎖）であり得る。成熟ポリペプチドをコードするコード配列は、図1に示されるコード配列（配列番号1）もしくは寄託されたクローンのコード配列と同一であり得るか、またはコード配列が遺伝子コードの重複性もしくは変質の結果として、図1のDNA（配列番号1）もしくは寄託されたクローンと同様な成熟ポリペプチドをコードする、異なるコード配列であり得る。

10

【0046】

図1の成熟ポリペプチドまたは寄託されたクローンによりコードされる成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、以下を含み得る：成熟ポリペプチドのコード配列のみ；成熟ポリペプチドのコード配列およびさらなるコード配列（例えば、膜内外（TM）ドメインまたは細胞内ドメイン）；成熟ポリペプチドのコード配列（および必要に応じて、さらなるコード配列）ならびに非コード配列（例えば、イントロンまたは成熟ポリペプチドのコード配列の5'および/または3'の非コード配列）。

【0047】

従って、用語「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、ポリペプチドのコード配列のみを含むポリヌクレオチド、ならびにさらなるコード配列および/または非コード配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

20

【0048】

本発明はさらに、図1の推定アミノ酸配列を有するポリペプチド、または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチドの、フラグメント、アナログおよび誘導体をコードする、本明細書中上記のポリヌクレオチドの改変体に関する。このポリヌクレオチドの改変体は、このポリヌクレオチドの天然に存在する対立遺伝子改変体またはこのポリヌクレオチドの天然には存在しない改変体であり得る。

【0049】

従って、本発明は、図1に示されるのと同じ成熟ポリペプチド（配列番号2）、または寄託されたクローンによりコードされる成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびにこのようなポリヌクレオチドの改変体（この改変体は、図1のポリペプチド（配列番号2）、または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチドのフラグメント、誘導体もしくはアナログをコードする）を包含する。このようなヌクレオチド改変体は、欠失改変体、置換改変体および付加改変体または挿入改変体を含む。

30

【0050】

本明細書中上記のように、ポリヌクレオチドは、図1に示されるコード配列（配列番号1）、または寄託されたクローンのコード配列の天然に存在する対立遺伝子改変体であるコード配列を有し得る。当該分野において公知であるように、対立遺伝子改変体は、1以上のヌクレオチドの置換、欠失または付加を有し得るポリヌクレオチド配列の代替形態であり、コードされたポリペプチドの機能を実質的に変化させない。

40

【0051】

このポリヌクレオチドはまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドの可溶性形態をコードし得る。このポリペプチドは、TMおよび本発明の全長ポリペプチドの細胞内ドメインから切断されたポリペプチド細胞外部分である。

【0052】

本発明のポリヌクレオチドはまた、本発明のポリペプチドの精製を可能にするマーカ配列にインフレーム（in frame）で融合されたコード配列を有し得る。このマーカ配列は、pQE-9ベクターにより供給されるヘキサヒスチジンタグであり得、細菌宿主の場合にはマーカに融合された成熟ポリペプチドの精製を提供するか、あるいは例えば、マーカ配列は、哺乳動物宿主（例えば、COS-7細胞）が使用される場合、ヘ

50

マグルチニン(HA)タグであり得る。HAタグは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応する(Wilson, I.ら、Cell、37:767(1984))。

【0053】

用語「遺伝子」とは、ポリペプチド鎖の生成に關与するDNAのセグメントを意味する；それはコード領域の前および後の領域(リーダーおよびトレイラー)、ならびに個々のコードセグメント(エキソン)の間に介在する配列(イントロン)を含む。

【0054】

本発明の全長遺伝子のフラグメントは、全長cDNAを単離し、かつこの遺伝子に対する高度な配列類似性を有するか、または生物学的活性が類似している、他のcDNAを単離するために、cDNAライブラリーについてのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。この型のプローブは、好ましくは、少なくとも30塩基を有し、例えば、50以上の塩基を含み得る。このプローブをまた、使用して、全長転写物に対応するcDNAクローン、ならびに調節領域およびプロモーター領域、エキソンおよびイントロンを含む完全遺伝子を含むゲノムクローン(単数または複数)を同定し得る。スクリーニングの例は、公知のDNA配列を使用して遺伝子のコード領域を単離し、オリゴヌクレオチドプローブを合成する工程を包含する。本発明の遺伝子の配列と相補的な配列を有する標的化オリゴヌクレオチドを使用して、ヒトcDNA、ゲノムDNAまたはmRNAのライブラリーをスクリーニングして、どのライブラリーメンバーがこのプローブにハイブリダイズするかを決定し得る。

10

20

【0055】

本発明はさらに、少なくとも70%、好ましくは少なくとも90%、そしてより好ましくは少なくとも95%の配列間の同一性が存在する場合、本明細書中上記の配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに關する。本発明は、詳細には、ストリンジェントな条件下で、本明細書中上記のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドに關する。本明細書中で使用される場合、熟語「ストリンジェントな条件」は、少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%の配列間の同一性が存在する場合にのみ、ハイブリダイゼーションが起こることを意味する。好ましい実施形態において、本明細書中上記のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドは、實質的に、図1のDNA(配列番号1)もしくは寄託されたクローンによってコードされる成熟ポリペプチドと同様な生物学的機能または活性のいずれかを維持するポリペプチドをコードする。

30

【0056】

あるいは、このポリヌクレオチドは、少なくとも20塩基、好ましくは少なくとも30塩基、そしてより好ましくは少なくとも50塩基を有し得、このポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズし、そして本明細書中上記のように、それと同一性を有し、活性を維持してもよいしなくてもよい。例えば、このようなポリヌクレオチドは、配列番号1または寄託されたクローンのポリヌクレオチドのための(例えば、ポリヌクレオチドの再生のための)プローブとして、または診断プローブもしくはPCRプライマーとして用いられ得る。

【0057】

従って、本発明は、配列番号2のポリペプチドをコードするか、または寄託されたクローンによってコードされるポリヌクレオチド、ならびにそのフラグメント(このフラグメントは、少なくとも30塩基、好ましくは少なくとも50塩基を有する)に対して、かつこのようなポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、そしてより好ましくは少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドに關する。

40

【0058】

本明細書中に参照される寄託物は、特許手続の目的のために、Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Micro-organismsの条件下で維持され

50

る。これらの寄託物は、単に当業者に便利なように提供され、そして寄託物が、米国特許法第 112 条 35 において要求されるという承認ではない。寄託された物質に含まれるポリヌクレオチドの配列、およびそれによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、本明細書中に参考として援用され、そして本明細書中の配列のいずれかの記載との任意の矛盾する事象において制御される。ライセンスは、寄託された物質を作製または販売するために必要とされ得、そしてそのようなライセンスは本明細書により付与されない。

【0059】

本発明はさらに、図 1 の推定アミノ酸（配列番号 2）を有するか、または寄託されたクローンによってコードされるアミノ酸配列（配列番号 22）を有する G タンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチド、ならびにこのようなポリペプチドのフラグメント、アナログおよび誘導体に関する。

10

【0060】

図 1 のポリペプチド、または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドを参照する場合、用語「フラグメント」、「誘導体」および「アナログ」とは、このようなポリペプチドと同様な生物学的機能または活性（すなわち、G タンパク質ケモカインレセプター（CCR5）としての機能）を実質的に保持するか、または G タンパク質ケモカインレセプター（CCR5）として機能しないポリペプチド（例えば、可溶性形態のレセプター）にもかかわらず、リガンドもしくはレセプターを結合する能力を保持するかのいずれかのポリペプチドを意味する。アナログは、活性化性熟ポリペプチドを産生ためのプロタンパク質部分の切断によって活性化され得るプロタンパク質を含む。

20

【0061】

本発明のポリペプチドは、組換えポリペプチド、天然ポリペプチドまたは合成ポリペプチド、好ましくは、組換えポリペプチドであり得る。

【0062】

図 1 のポリペプチド（配列番号 2）もしくは寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドのフラグメント、誘導体もしくはアナログは、(i) アミノ酸残基の 1 つ以上が保存アミノ酸残基もしくは非保存アミノ酸残基（好ましくは保存アミノ酸残基）で置換されたものであっても良いし、そしてこのような置換されたアミノ酸残基は、遺伝子コードによりコードされたものであっても、もしくはそうでなくてもよく、または (ii) アミノ酸残基の 1 つ以上が置換基を含むものであってもよく、または (iii) 成熟ポリペプチドが、ポリペプチドの半減期を延長する化合物のような別の化合物（例えば、ポリエチレングリコール）と融合されたものでよく、または (iv) さらにアミノ酸がポリペプチドの精製のために、成熟ポリペプチドと融合されたものでよく、または (v) ポリペプチドのフラグメントが可溶性（つまり、なお一層膜結合ではなく、膜結合レセプターにリガンドを結合する）であつてもよい。このようなフラグメント、誘導体およびアナログは、本明細書における教示から当業者の範囲内であるとみなされる。

30

【0063】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、好ましくは、単離した形態で提供され、好ましくは均質に精製される。

【0064】

本発明のポリペプチドとしては、配列番号 2 のポリペプチド（特に、成熟ポリペプチド）または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチド、ならびに配列番号 2 のポリペプチドに対して、もしくは寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドに対して少なくとも 70% 類似性（好ましくは、70% 同一性）、そしてより好ましくは配列番号 2 のポリペプチドに対して、または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドに対して 90% 類似性（より好ましくは、90% 同一性）、そしてさらにより好ましくは配列番号 2 のポリペプチドに対して 95% 類似性（さらにより好ましくは、少なくとも 90% 同一性）を有するポリペプチドが挙げられる。そしてまた、そのようなポリペプチドの部分も挙げられ、このようなポリペプチドの部分は、一般的に、少なくとも 30 アミノ酸、およびより好ましくは少なくとも 50 アミノ酸を含む。

40

50

## 【 0 0 6 5 】

当該分野において公知のように、2つのポリペプチド間の「類似性」は、ポリペプチドの、第2のポリペプチドの配列に対するアミノ酸配列およびその保存的アミノ酸置換を比較することによって決定される。

## 【 0 0 6 6 】

本発明のフラグメントまたはポリペプチドの一部分は、対応する全長ポリペプチドをペプチド合成によって生成するために用いられ得る。従って、このフラグメントは、全長ポリペプチドを生成するための中間体として用いられ得る。本発明のフラグメントまたはポリヌクレオチドの一部分は、本発明の全長ポリヌクレオチドを合成するために使用され得る。

10

## 【 0 0 6 7 】

用語「遺伝子」とは、ポリペプチド鎖の生成に關与するDNAのセグメントを意味する；それはコード領域の前および後の領域（リーダーおよびトレイラー）、ならびに個々のコードセグメント（エキソン）の間に介在する配列（イントロン）を含む。

## 【 0 0 6 8 】

用語「単離された」とは、物質がその元々の環境（例えば、天然に生じる場合、その天然の環境）から取り出されていることを意味する。例えば、生存動物中に存在する天然に生じるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されていないが、天然系において共存する物質のいくつかまたはすべてより分離した同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。そのようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部であり得、そして/またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、組成物の一部であり得、そして、そのようなベクターまたは組成物が、それらの天然の環境の一部ではないという点でなお単離され得る。

20

## 【 0 0 6 9 】

本発明のポリペプチドとしては、配列番号2のポリペプチドまたは寄託されたクローンによってコードされるポリペプチド（特に、成熟ポリペプチド）、ならびに配列番号2のポリペプチドに対して、または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドに対して少なくとも70%類似性（好ましくは、少なくとも70%同一性）、そしてより好ましくは配列番号20のポリペプチドに対して少なくとも90%類似性（より好ましくは、少なくとも90%同一性）、そしてさらにより好ましくは少なくとも95%類似性（さらにより好ましくは、少なくとも95%同一性）を有するポリペプチドが挙げられる。そしてまた、そのようなポリペプチドの部分も挙げられ、このようなポリペプチドの部分は、一般的に、少なくとも30アミノ酸、およびより好ましくは少なくとも50アミノ酸を含む。

30

## 【 0 0 7 0 】

当該分野において公知のように、2つのポリペプチド間の「類似性」は、1つのポリペプチドの、第2のポリペプチドの配列に対するアミノ酸配列およびその保存的アミノ酸置換を比較することによって決定される。

## 【 0 0 7 1 】

本発明のフラグメントまたはポリペプチドの一部分は、対応する全長ポリペプチドをペプチド合成によって産生するために用いられ得る。従って、このフラグメントは、全長ポリペプチドを産生するための中間体として用いられ得る。本発明のフラグメントまたはポリヌクレオチドの一部分は、本発明の全長ポリヌクレオチドを合成するために使用され得る。

40

## 【 0 0 7 2 】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターで遺伝子操作された宿主細胞、および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生に関する。

## 【 0 0 7 3 】

宿主細胞は、一般的に、本発明のベクター（これは、例えば、クローニングベクターまたは発現ベクターであり得る）で操作される（形質導入されるかまたは形質転換されるか

50

またはトランスフェクトされる)。このベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態であり得る。操作された宿主細胞は、プロモーターの活性化、形質転換体の選択または本発明の遺伝子の増幅に適切に改変された従来の栄養培地において培養され得る。温度、pHなどのような培養条件は、発現について選択された宿主細胞を用いて以前に使用された培養条件であり、そして当業者に明らかである。

#### 【0074】

本発明のポリヌクレオチドは、組換え技術によりポリペプチドを産生するために使用され得る。従って、例えば、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現するための種々の発現ベクターのいずれか1つに含まれ得る。このようなベクターには、染色体DNA配列、非染色体DNA配列および合成DNAの配列（例えば、SV40の誘導體；細菌プラスミド；ファージDNA；バキュロウイルス；酵母プラスミド；プラスミドおよびファージDNAの組み合わせ由来のベクター、ウイルスDNA（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、家禽ポックスウイルスおよび仮性狂犬病））が含まれる。しかし、宿主において複製可能であり、そして生存可能である限り、任意の他のベクターも使用され得る。

10

#### 【0075】

適切なDNA配列は、種々の手順によりベクター中に挿入され得る。一般的に、DNA配列は、当該分野において公知の手順により、適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。このような手順および他のものは、当業者の範囲内であると見なされる。

#### 【0076】

発現ベクターにおけるDNA配列は、mRNAの合成を指向する適切な発現制御配列（プロモーター）と作動可能に連結される。このようなプロモーターの代表的な例として、以下が挙げられ得る：LTRのプロモーターまたはSV40プロモーター、E. coli lacまたはtrp、ファージP<sub>L</sub>プロモーター、および原核生物細胞もしくは真核生物細胞またはそれらのウイルスにおいて遺伝子の発現を制御することが公知の他のプロモーター。発現ベクターはまた、翻訳の開始のためのリボゾーム結合部位、および転写ターミネーターを含む。ベクターはまた、発現を増幅するために適切な配列を含み得る。

20

#### 【0077】

さらに、発現ベクターは、好ましくは1つ以上の選択マーカー遺伝子（例えば、真核生物細胞培養のためのジヒドロ葉酸還元酵素またはネオマイシン耐性、あるいは例えば、E. coliにおけるテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性）を含み、形質転換された宿主細胞の選択のための表現型の特徴を提供する。

30

#### 【0078】

本明細書中上記のような適切なDNA配列を含むベクターおよび適切なプロモーターまたは制御配列は、宿主がタンパク質を発現することを可能にするために適切な宿主を形質転換するために使用され得る。

#### 【0079】

適切な宿主の代表的な例としては、以下が挙げられ得る：E. coli、Streptomyces、Salmonella typhimuriumのような細菌細胞；酵母細胞のような真菌細胞；DrosophilaおよびSpodoptera Sf9のような昆虫細胞；CHO細胞、COS細胞、またはBowes黒色腫細胞のような動物細胞、アデノウイルス、植物細胞など。適切な宿主の選択は、本明細書中の教示から当業者の範囲内であると見なされる。

40

#### 【0080】

より詳細には、本発明はまた、上に広範に記載されるように一つ以上の配列を含む組換え構築物を含む。この構築物は、正方向または逆方向で、本発明の配列が挿入されたベクター（例えば、プラスミドまたはウイルスベクター）を含む。この実施態様の好ましい局面において、この構築物は、例えば、この配列と作動可能に連結されたプロモーターを含む調節配列をさらに含む。多数の適切なベクターおよびプロモーターが当業者に公知であり、そして市販されている。以下のベクターが、例示のために提供される。細菌：pQE70、pQE60、pQE-9（Qiagen）、pbs、pD10、phagescr

50

ipt、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A (Stratagene); ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5 (Pharmacia)。真核生物：pWLEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL (Pharmacia)。しかし、任意の他のプラスミドまたはベクターは、それらが宿主において複製可能かつ生存可能である限り使用され得る。

#### 【0081】

プロモーター領域は、選択マーカーを有するCAT (クロラムフェニコールトランスフェラーゼ) ベクターまたは他のベクターを用いて任意の所望の遺伝子から選択され得る。2つの適切なベクターは、PKK232-8およびPCM7である。特定の名づけられた細菌プロモーターは、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、 $P_R$ 、 $P_L$ およびtrpが含まれる。真核生物プロモーターは、以下を含む：CMV前初期プロモーター、HSVチミジンキナーゼプロモーター、SV40初期プロモーターおよびSV40後期プロモーター、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスメタロチオネイン-Iプロモーター。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、十分に当該分野の通常のレベル内である。

10

#### 【0082】

さらなる実施態様において、本発明は、上記の構築物を含む宿主細胞に関する。この宿主細胞は、高等真核生物細胞 (例えば、哺乳動物細胞) または下等真核生物細胞 (例えば、酵母細胞) であり得るか、あるいは宿主細胞は、原核生物細胞 (例えば、細菌細胞) であり得る。宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、またはエレクトロポレーションにより達成され得る (Davis, L.ら、Basic Methods In Molecular Biology (1986))。

20

#### 【0083】

宿主細胞中のこの構築物を従来の様式で使用して、組換え配列によりコードされる遺伝子産物を産生する。あるいは、本発明のポリペプチドは、従来のペプチド合成機により合成的に産生され得る。

#### 【0084】

成熟タンパク質が、適切なプロモーターの制御下で哺乳動物細胞、酵母、細菌、または他の細胞において発現され得る。細胞を含まない翻訳系もまた利用して、本発明のDNA構築物に由来するRNAを使用してそのようなタンパク質を産生し得る。原核生物宿主および真核生物宿主で用いる適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor, N.Y.、(1989) (この開示は、本明細書中に参考として援用される) に記載されている。

30

#### 【0085】

高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写は、ベクターへのエンハンサー配列の挿入により増加される。エンハンサーは、その転写を増加するためにプロモーター上で作用する、通常、約10~300bpのDNAのcis作用性のエレメントである。例としては、100~270bpの複製起点の後側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。

40

#### 【0086】

一般的に、組換え発現ベクターは、宿主細胞の形質転換を可能にする複製起点および選択マーカー (例えば、E.coliのアンピシリン耐性遺伝子およびS.cerevisiae TRP1遺伝子) ならびに下流の構造配列の転写を指向する高発現遺伝子に由来するプロモーターを含む。このようなプロモーターは、例えば、とりわけ3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、 $\alpha$ -因子、酸性ホスファターゼ、または熱ショックタンバ

50

ク質のような糖分解酵素をコードするオペロンに由来し得る。異種構造配列は、翻訳の開始配列および終結配列、および好ましくは細胞周辺腔または細胞外の培地中への翻訳されたタンパク質の分泌を指向し得るリーダー配列と適切な段階で構築される。必要に応じて、異種配列は、所望の特性（例えば、安定化、または発現された組換え産物の精製の単純化）を与えるN末端識別ペプチドを含む融合タンパク質をコードし得る。

【0087】

細菌を使用するための有用な発現ベクターは、機能的なプロモーターを用いて読むことが可能な段階（operable reading phase）において適切な翻訳の開始および終結のシグナルとともに所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を挿入することにより構築される。ベクターは、一つ以上の表現型選択マーカー、およびベクターの保持を保証し、そして必要であれば、宿主中での増幅を提供する複製起点を含む。形質転換に適切な真核生物宿主は、E. coli、Bacillus subtilis、Salmonella typhimuriumならびにPseudomonas属、Streptomyces属、およびStaphylococcus属の種々の種が含まれるが、選択のために他の宿主もまた利用され得る。

10

【0088】

限定することなく、代表的な例として、細菌を使用するための有用な発現ベクターは、周知のクローニングベクターpBR322（ATCC 37017）の遺伝的エレメントを含む市販のプラスミド由来の選択マーカーおよび細菌の複製起点を含み得る。このような市販のベクターには、例えば、pKK223-3（Pharmacia Fine Chemicals、Uppsala、Sweden）およびGEM1（Promega Biotech、Madison、WI、USA）を含む。これらのpBR322の「骨格（backbone）」部分は、適切なプロモーターおよび発現される構造配列と組み合わせられる。

20

【0089】

適切な宿主株の形質転換および適切な細胞密度までの宿主株の増殖に続いて、選択されたプロモーターは、適切な手段（例えば、温度シフト、または化学誘導）により誘導され、そして細胞は、さらなる期間培養される。

【0090】

代表的に、細胞は、遠心分離により回収し、物理的手段または科学的手段により破壊し、そして得られた粗抽出物はさらなる精製のために保持される。

30

【0091】

タンパク質の発現に使用される微生物細胞は、任意の簡便な方法（凍結-解凍のサイクル、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む）により破壊され得、このような方法は当業者に周知である。

【0092】

種々の哺乳動物細胞培養系もまた使用され、組換えタンパク質を発現し得る。哺乳動物発現系の例は、サルの腎臓線維芽細胞のCOS-7株（Gluzman（Cell 23：175（1981））により記載される）、および適合可能なベクターを発現し得る他の細胞株（例えば、C127細胞株、3T3細胞株、CHO細胞株、HeLa細胞株、およびBHK細胞株）を含む。哺乳動物発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサーを含み、そして任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列、および5'隣接非転写配列もまた含む。SV40スプライス部位およびポリアデニル化部位に由来するDNA配列を使用して、要求される非転写ゲノムエレメントを提供し得る。

40

【0093】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドは、組換え細胞培養物から硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンもしくはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーお

50

よびレクチンクロマトグラフィーを含む方法により、回収および精製され得る。タンパク質を再び折り畳む工程は、必要であれば、成熟タンパク質の完全なコンフィギュレーションに使用され得る。最終的に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が、最後の精製段階において使用され得る。

【0094】

本発明のポリペプチドは、天然の精製産物、または化学合成手順の産物であり得るか、あるいは原核生物宿主または真核生物宿主（例えば、培養物中の細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞）から組換え技術により産生され得る。組換え産物手順において使用される宿主に依存して、本発明のポリペプチドは、グリコシル化され得るか、または非グリコシル化であり得る。本発明のポリペプチドはまた、最初のメチオニンアミノ酸残基を含み得る。

10

【0095】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、ヒト疾患に対する処置および診断を発見するための調査薬および物質として用いられ得る。

【0096】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）は、本発明のレセプターポリペプチドを活性化させる化合物（アゴニスト）または活性を阻害する化合物（アンタゴニスト）をスクリーニングするためのプロセスにおいて用いられ得る。

【0097】

一般的に、このようなスクリーニング手順は、本発明のレセプターポリペプチドをその表面で発現する、適切な細胞を供給する工程を包含する。このような細胞には、哺乳動物、酵母、*drosophila*または*E. coli*由来の細胞が挙げられる。詳細には、本発明のレセプターをコードするポリヌクレオチドは、細胞をトランスフェクトするために用いられ、それによって、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を発現する。次いで、結合、刺激作用または機能的応答の阻害を観察するために、この発現したレセプターは、試験化合物と接触される。

20

【0098】

1つのこのようなスクリーニング手順は、トランスフェクトされて本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を発現するメラニン保有細胞の使用を包含する。このようなスクリーニング技術は、1992年2月6日に公開された、PCT WO 92 / 01810に記載される。

30

【0099】

従って、このようなアッセイは、例えば、本発明のレセプターポリペプチドの活性化を阻害する化合物についてスクリーニングするために使用され得る。このアッセイは、レセプターをコードするメラニン保有細胞をレセプターリガンドおよびスクリーニングされた化合物の両方と接触させることによる。リガンドによって生成されるシグナルの阻害は、その化合物が、レセプターに対する潜在的なアンタゴニスト（つまり、レセプターの活性を阻害する）であることを示す。

【0100】

このスクリーニングは、このような細胞を、スクリーニングされた化合物と接触させて、このような化合物がシグナルを生成するか否か（つまり、レセプターを活性化させる）を決定することによって、レセプターを活性化させる化合物を決定するために用いられ得る。

40

【0101】

他のスクリーニング技術には、レセプター活性化によって引き起こされる細胞外pH変化を測定する系においてGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を発現する細胞（例えば、トランスフェクトされたCHO細胞）の使用が含まれる（例えば、*Science* 246:181-296（1989年10月）に記載されるように）。例えば、化合物は、本発明のレセプターポリペプチドを発現する細胞と接触され得、そしてセカンドメッセンジャー応答（例えば、シグナル伝達またはpH変化）が測定され得、潜在的な化

50

合物がこのレセプターを活性化するかまたは阻害するかを決定し得る。

【0102】

別のこのようなスクリーニング技術は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）をコードするRNAをXenopus卵母細胞に導入して、そのレセプターを一過性に発現する工程を包含する。次いで、そのレセプター卵母細胞は、レセプターリガンドと接触され得、そして化合物がスクリーニングされ得、続いてレセプターの活性化を阻害すると考えられている化合物についてのスクリーニングの場合、カルシウムシグナルの阻害または活性化の検出が行われ得る。

【0103】

別のスクリーニング技術は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を発現する工程を包含し、ここでこのレセプターは、ホスホリパーゼCまたはDに連結されている。このような細胞の代表的な例には、内皮細胞、平滑筋細胞、胚腎臓細胞などが含まれる。このスクリーニングは、ホスホリパーゼセカンドシグナルから、レセプターの活性化またはレセプターの活性化の阻害の検出により、本明細書中上記のように達成され得る。

【0104】

別の方法は、その表面にレセプターを有する細胞への標的化リガンドの結合の阻害を決定することによって、本発明のアンタゴニストのレセプターポリペプチドの活性を阻害する化合物をスクリーニングする工程を包含する。このような方法は、細胞がその表面にレセプターを発現するように、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）をコードするDNAで真核生物細胞をトランスフェクトする工程、および公知のリガンドの標的化形成の存在化で細胞を化合物と接触させる工程を包含する。このリガンドは、例えば、放射能によって標的化され得る。レセプターに結合する標的化リガンドの量は、例えば、レセプターの放射能を測定することによって測定される。この化合物が、レセプターに結合する標的化リガンドの減少によって決定されるようなレセプターに結合する場合、レセプターへの標的化リガンドの結合は阻害される。

【0105】

抗体、またはいくつかの場合においてオリゴペプチドは、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に結合することによって、そしてセカンドメッセンジャー応答を起こす（initiating）ことによって、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を活性化し得る。抗体は、一般的には、抗体の抗原結合部位に関連した特異的な決定因子を認識する坑イディオタイプ抗体を含有する。潜在的なアゴニスト化合物はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のリガンドと密接に関連するタンパク質（例えば、リガンドのフラグメント）を含む。

【0106】

抗体、またはいくつかの場合においてオリゴペプチドは、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に結合することによるが、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性化が妨げられるようにセカンドメッセンジャー応答の誘発を欠くことによって、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を拮抗し得る。抗体は、一般的には、抗体の抗原結合部位に関連した特異的な決定因子を認識する坑イディオタイプ抗体を含有する。潜在的なアンタゴニスト化合物はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のリガンドと密接に関連するタンパク質（例えば、生物学的機能を欠落し、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）への結合の場合、応答を誘発しないリガンドのフラグメント）を含む。

【0107】

アンチセンス技術の使用を介して調製される、アンチセンス構築物を用いて、三重らせん形成、またはアンチセンスDNAもしくはRNAによる（これらの両方法は、ポリヌクレオチドのDNAまたはRNAへの結合に基づく）遺伝子発現を制御するために使用され得る。例えば、ポリヌクレオチド配列の5'コード部分（これは本発明の成熟ポリペプチドをコードする）を使用して、約10～40塩基対の長さのアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計する。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に關与する遺伝子の領域と相

10

20

30

40

50

補的であるように設計され(三重らせん - Leeら、Nucl. Acids Res.、6:3073(1979); Cooneyら、Science、241:456(1988); および Dervanら、Science、251:1360(1991))、これによってGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の転写および産生を妨げる。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、mRNAにインビボでハイブリダイズし、そしてmRNA分子のGタンパク質連結レセプターへの翻訳を妨げる(アンチセンス - Okano, J. Neurochem.、56:560(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression、CRC Press、Boca Raton、FL(1988))。アンチセンスRNAまたはDNAがインビボで発現されてGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の産生を阻害するように、上記のオリゴヌクレオチドはまた細胞に送達され得る。

10

**【0108】**

正常な生物学的活性を妨げるようリガンドから隔絶されるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に結合する低分子(例えば、小さなペプチドまたはペプチド様分子)はまた、本発明のレセプターポリペプチドの活性化を阻害するために使用され得る。

**【0109】**

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の可溶性形態(例えば、レセプターのフラグメント)は、本発明のポリペプチドに対するリガンドに結合することによって、およびリガンドがGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の膜境界と相互作用するのを防ぐことによって、レセプターの活性化を阻害するために使用され得る。

20

**【0110】**

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に結合し、かつそれを活性化させる化合物は、造血、創傷治癒、凝固、新脈管形成を刺激するために、固形腫瘍、慢性感染、白血病、T細胞媒介自己免疫疾患、寄生感染、乾癬を処置するために、および増殖因子活性を刺激するために用いられ得る。

**【0111】**

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に結合し、かつそれを阻害する化合物は、アレルギー、アテローム発生、アナフィラキシー、悪性腫瘍、慢性炎症および急性炎症、ヒスタミンおよびIgE媒介アレルギー反応、プロスタグランジン非依存性発熱(prostaglandin-independent fever)、骨髄不全、珪肺症、サルコイドーシス、リウマチ様動脈炎、ショック症候群および好酸球過剰症候群を処置するために用いられ得る。

30

**【0112】**

この化合物は、適した薬学的キャリアと組み合わせ用いられ得る。このような化合物は、治療学的に有効量の化合物および薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤を含有する。このようなキャリアとしては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、ブドウ糖、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。この処方物は、投与の様式に適合させるべきである。

**【0113】**

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の成分の1つ以上が充填された1つ以上の容器を含む製薬パック(pack)またはキットを提供する。このような容器と共に、薬剤または生物学的製品の製造、使用または販売を管理する政府機関により規定される様式の注意書が付属し得る。このような注意書は、ヒトへの投与についての製造、使用、または販売の機関による認可を反映している。さらに、本発明の薬学的組成物は、他の治療学的化合物と共に用いられ得る。

40

**【0114】**

薬学的組成物は、局所、静脈内、腹腔内、筋内、皮下、鼻内、または皮内経路によってのような便宜上の様式で投与され得る。薬学的組成物は、特定の徴候の処置および/または予防に有効である量で投与される。一般に、この薬学的組成物は、少なくとも約10μ

50

g / k g 体重の量で投与され、そしてほとんどの場合、それらは、一日当たり約 8 m g / k g 体重を超えない量で投与される。ほとんどの場合、投薬量は、投与経路、徴候などを考慮して、1日当たり約 10 μ g / k g から約 1 m g / k g 体重である。

【0115】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドならびにポリペプチドであるアンタゴニストおよびアゴニストはまた、そのようなポリペプチドのインビボでの発現によって、本発明に従って使用され得る。これは、しばしば「遺伝子治療」として呼ばれる。

【0116】

従って、例えば、患者由来の細胞は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(DNAまたはRNA)を用いてエキソビボで操作され得る。その操作された細胞は次いで、そのポリペプチドで処置されるべき患者に提供される。そのような方法は、当該分野において周知である。例えば、細胞は、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルス粒子の使用により当該分野で公知の手順によって操作され得る。

10

【0117】

同様に、細胞は、例えば当該分野で公知の手順によって、インビボでのポリペプチドの発現のために、インビボで操作され得る。当該分野で公知のように、本発明のポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルス粒子を産生するための産生細胞は、インビボでの細胞の操作およびそのポリペプチドのインビボでの発現のために患者に投与され得る。そのような方法による、本発明のポリペプチドを投与するためのこれらおよび他の方法は、本発明の教示から当業者に明らかであるべきである。例えば、細胞操作のための発現ビヒクルは、レトロウイルス(例えば、適切な送達ビヒクルと組み合わせた後インビボで細胞を操作するために使用され得るアデノウイルス)以外であり得る。

20

【0118】

本明細書中の上記に記載されるレトロウイルスプラスミドベクターが由来し得るレトロウイルスとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：モロニーマウス白血病ウイルス；脾壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルスのようなレトロウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全症ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス(Myeloproliferative Sarcoma Virus)、および乳癌ウイルス。1つの実施形態において、レトロウイルスプラスミドベクターは、モロニーマウス白血病ウイルスに由来する。

30

【0119】

このベクターは、1つ以上のプロモーターを含む。用いられ得る適切なプロモーターとしては、レトロウイルスLTR；SV40プロモーター；およびヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(Millerら、Biotechniques 7：980-990(1989)に記載)、または任意の他のプロモーター(例えば、細胞プロモーター(例えば、ヒストン、p01 I I I、および -アクチンプロモーターが挙げられるがこれらには限定されない真核生物細胞プロモーター))が挙げられるがこれらに限定されない。利用され得る他のウイルスプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ(TK)プロモーター、およびB19パルボウイルスプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。適切なプロモーターの選択は、本明細書中に含まれる教示から当業者に明らかである。

40

【0120】

本発明のポリペプチドをコードする核酸配列は、適切なプロモーターの制御下にある。用いられ得る適切なプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター)；または異種プロモーター(例えば、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター)；RSウイルス(RSV)プロモーター；誘導性プロモーター(例えば、MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーター)；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ApoA Iプロモーター；ヒトグロビンプロモーター；ウイルスチミジンキナーゼプロモーター(例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ

50

プロモーター) ; レトロウイルスLTR (本明細書中上記に記載されるような改変されたレトロウイルスを含む) ; b - アクチンプロモーター ; およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられる。プロモーターはまた、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を制御するネイティブなプロモーターであり得る。

#### 【0121】

このレトロウイルスプラスミドベクターを使用して、パッケージング細胞株を形質導入し、プロデューサー細胞株を形成する。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞株の例としては、その全体が本明細書中で参考として援用される、Miller、Human Gene Therapy、1 : 5 ~ 14 (1990) にて記載されるようなPE501、PA317、- 2、- AM、PA12、T19 - 14X、VT - 19 - 17 - H2、CRE、CRIP、GP + E - 86、GP + envAM12およびDAN細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。このベクターは、当該分野で公知の任意の手段により、パッケージング細胞を形質導入し得る。そのような手段としては、エレクトロポレーション、リボソームの使用、およびCaPO<sub>4</sub>沈殿が挙げられるが、これらに限定されない。1つの代替法において、このレトロウイルスプラスミドベクターをリボソームにカプセル化するか、または脂質に結合させて、次いで宿主に投与し得る。

10

#### 【0122】

このプロデューサー細胞株は、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生する。次いで、そのようなレトロウイルスベクター粒子を使用して、インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、真核生物細胞を形質導入し得る。この形質導入された真核生物細胞は、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を発現する。形質導入され得る真核生物細胞としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない : 胚幹細胞、胚癌細胞ならびに造血細胞、肝細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、ケラチノサイト、子宮内膜細胞、および気管支の上皮細胞。

20

#### 【0123】

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に結合し得ることが公知ではないリガンドが、このようなレセプターに結合し得るか否かを決定するための方法を提供し、この方法は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に対するリガンドの結合が可能な条件下で、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を発現する哺乳動物細胞をリガンドと接触させる工程、レセプターに結合するリガンドの存在を検出する工程およびそれによってそのリガンドがGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に結合するか否かを決定する工程、を包含する。アゴニストおよび/またはアンタゴニストを検出するための本明細書中上記に記載される系はまた、このレセプターに結合するリガンドを決定するために使用され得る。

30

#### 【0124】

本発明はまた、このレセプターをコードするmRNAの存在を検出することによって、細胞表面上の本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの発現を検出する方法を提供する。この方法は、細胞から全mRNAを得る工程およびそのようにして得られたmRNAを少なくとも10ヌクレオチドの核酸分子(ハイブリダイズする条件下で、このレセプターをコードする核酸分子の配列中に含まれる配列と特異的にハイブリダイズし得る)を含む核酸プローブに接触させる工程、プローブにハイブリダイズするmRNAの存在を検出する工程、およびそれによってその細胞によるレセプターの発現を検出する工程。

40

#### 【0125】

本発明はまた、本発明のレセプターポリペプチドに関するレセプターを同定する方法を提供する。これらの関連するレセプターは、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに対する相同性によって同定されるか、低いストリンジェンシーの交差ハイブリダイゼーションによって同定されるか、または関連する天然のリガンドまたは関連する合成リガンドと相互作用するレセプターおよび/もしくは本発明のケモカインレセプターポリペプチドの遺伝子的遮断または薬理的遮断の後に同様の挙動が現れ

50

るレセプターを同定することによって同定され得る。

【0126】

遺伝子のフラグメントは、本発明の遺伝子に高い配列類似性を有するか、または同様の生物学的活性を有する他の遺伝子を単離するためのcDNAライブラリーのためのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。この型のプローブは、少なくとも20塩基、好ましくは少なくとも30塩基そして最も好ましくは少なくとも50塩基以上である。このプローブはまた、全長の転写物に対応するcDNAクローンまたは本発明の完全な遺伝子(調節領域およびプロモーター領域、エキソンおよびイントロンを含む)を含むゲノムクローンを同定するために使用され得る。この型のスクリーニングの例は、オリゴヌクレオチドプローブを合成するための既知のDNA配列を使用することによって、この遺

10

【0127】

本発明はまた、例えば、遺伝的欠損遺伝子に起因するいくつかの疾患の診断としての本発明の遺伝子の使用を考慮する。これらの遺伝子は、欠損遺伝子の配列を正常な遺伝子の配列と比較することによって、検出され得る。続いて、「変異」遺伝子が異常なレセプター活性に関連することを実証し得る。さらに、現在のところ変異を定義または同定するための別の手段である機能アッセイ系(例えば、HEK293細胞のレセプター欠損株にお

20

【0128】

本発明の遺伝子に変異を保有する個体は、種々の技術により、DNAレベルで検出され得る。診断のための核酸は、患者の細胞(血液、尿、唾液、組織生検および剖検材料に由来する細胞が含まれるが、これらに限定されない)から得られ得る。ゲノムDNAは、検出に直接使用され得るか、または分析前に、PCRを用いることにより酵素的に増幅され得る(Saikira, Nature, 324:163-166(1986))。RNAまたはcDNAもまた同様の目的のために使用され得る。例として、本発明の核酸に相補的なPCRプライマーを使用して、本発明遺伝子の変異を同定および分析し得る。例えば、欠失および挿入は、正常な遺伝子型と比較した際に、増幅産物のサイズの変化により検出され得る。点変異は、放射性標識された本発明のRNAまたは代替的に、放射性標識された本発明のアンチセンスDNA配列に対して、増幅されたDNAがハイブリダイズすることにより同定され得る。完全に一致した配列は、RNase A消化または融解温度の差異によって、一致しなかった二重鎖から区別され得る。このような診断は、出生前の試験または新生児の試験にとってさえも特に有用である。

30

【0129】

参照遺伝子と「変異体」との間の配列の差異もまた、直接的なDNA配列決定(direct DNA sequencing)法によって明らかにされ得る。さらに、クローニングされたDNAセグメントは、特定のDNAセグメントを検出するためのプローブとして用いられ得る。このような方法の感度は、PCRと併用する場合に多いに増強され得る。例えば、配列決定プライマーは、改変PCRによって作製された、二本鎖PCR産物または一本鎖鋳型分子と共に使用される。配列の決定は、放射性標識ヌクレオチドを用いる従来の手順によってか、または蛍光タグを用いる自動配列決定手順によって行われる。

40

【0130】

DNA配列の差異に基づく遺伝的試験は、変性剤を含むか、または含まないゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動度における変化の検出により達成され得る。特定の位置での配列変化はまた、核プロテクションアッセイ(例えば、RNaseおよびS1プ

50

ロテクション、または化学的切断方法)により明らかにされ得る(例えば、C o t t o n  
ら、P N A S、85:4397-4401(1985))。

【0131】

さらに、いくつかの疾患は、mRNAにおける変化によって検出され得る遺伝子発現の  
変化の結果であるか、またはそれによって特徴付けられる。あるいは、本発明の遺伝子は  
、このタイプのレセプターと結合する機能の疾患を示す個体を同定するための参照として  
有用であり得る。

【0132】

本発明はまた、種々の組織におけるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリ  
ペプチドの可溶性形態のレベルの変化を検出するための診断アッセイに関する。宿主由  
来10のサンプル中の可溶化レセプターポリペプチドのレベルを検出するために用いられるア  
ッセイは、当業者に周知であり、そしてラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウェ  
スタンブロットアッセイ、および好ましくはELISAアッセイが挙げられる。

【0133】

ELISAアッセイは、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド  
の抗原、好ましくはモノクローナル抗体に特異的な抗体を調製する工程を最初を含む。さ  
らに、レポーター抗体が、モノクローナル抗体に対して調製される。レポーター抗体に、  
検出可能な試薬(例えば、放射能、蛍光またはこの実施例において西洋ワサビペルオキシ  
ダーゼ酵素)が結合される。サンプルは、宿主から除去されて、そしてサンプル中でタン  
パク質を結合する固体支持体(例えば、ポリスチレンディッシュ)上でインキュベートされ  
20る。次いで、ディッシュ上の任意の遊離タンパク質結合部位は、ウシ血清アルブミンの  
ような非特異的タンパク質とインキュベートすることによって被膜される。次に、モノク  
ローナル抗体は、モノクローナル抗体が、ポリスチレンディッシュに結合した任意のGタ  
ンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質に結合する時間の間、ディッシュ  
中でインキュベートされる。全ての未結合モノクローナル抗体は、緩衝液で洗浄される。  
西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したレポーター抗体は、ここで、ディッシュ中に配置  
され、その結果レポーター抗体の、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タン  
パク質に結合した任意のモノクローナル抗体への結合を生じる。次いで、未結合のレポ  
ーター抗体は洗浄される。次いで、ペルオキシダーゼ基質は、ディッシュに添加され、そし  
て所定の期間に発色した色の量が、標準曲線と比較した場合、患者サンプルの所定の容量  
30に存在するGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質の量の測定値であ  
る。

【0134】

本発明の配列はまた、染色体同定に有用である。この配列は、個々のヒト染色体上の特  
定の位置に特異的に標的化され、そしてその位置とハイブリダイズし得る。さらに、染色  
体における特定の部位を同定することへの必要性が現在存在する。実際の配列データ(反  
復多型性)に基づく染色体マーキング試薬は現在、染色体位置をマークするにはほとん  
ど利用可能ではない。本発明に従う染色体へのDNAのマッピングは、それらの配列を、  
疾患に関連した遺伝子と関連づけることにおいて重要な第一段階である。

【0135】

手短には、配列は、クローンからPCRプライマー(好ましくは、15~25bp)を  
調製することにより、染色体にマッピングされ得る。寄託されたクローンのDNAのコン  
ピューター分析を用いて、ゲノムDNAにおいて1より多いエキソンにまたがらず、従っ  
て、増幅プロセスを複雑化しないプライマーを迅速に選択する。次いで、これらのプライ  
マーは、個々のヒト染色体を含有する体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのため  
に用いられる。このプライマーに対応するヒト遺伝子を含有するこれらのハイブリッドの  
みが増幅フラグメントを産生する。

【0136】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは特定のDNAを特定の染色体に対応させるた  
めの迅速な手順である。同じオリゴヌクレオチドプライマーを用いる本発明を使用し、準  
40

10

20

30

40

50

局在化 (sublocalization) は、特定の染色体由来のフラグメントのパネルまたは同類の手法における大きいゲノムクローンのプールで達成され得る。その染色体にマッピングするために同様に用いられ得る他のマッピングストラテジーは、インサイチュハイブリダイゼーション、標識フローソート (labeled flow-sorted) 染色体でのプレスクリーニング、および染色体特異的 cDNA ライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる前選択を含む。

【0137】

中期染色体スプレッド (spread) に対する DNA クローンの蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH) を用いて、一工程で、正確な染色体位置を提供し得る。この技術は、少なくとも 50 または 60 塩基を有する DNA と共に用いられ得る。(この技術の概説については、Verma ら、Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988) を参照のこと)。

10

【0138】

一旦、配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体上の配列の物理的な位置は、遺伝子マップデータと相関づけられ得る。このようなデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Library からオンラインで入手可能である) に見出される。次いで、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子と疾患との間の関係が、連鎖解析 (物理的に隣接した遺伝子の同時遺伝) によって同定される。

20

【0139】

次に、罹患個体と非罹患個体との間での cDNA またはゲノム配列における差異を決定することが必要である。変異がいくつかまたは全ての罹患個体において認められるが、いずれの正常個体にも認められない場合、その変異は、疾患の原因因子である可能性が高い。

【0140】

物理的マッピングおよび遺伝子マッピング技術の現在の解像度であれば、疾患と関連する染色体領域に正確に位置決めされる cDNA は、50 ~ 500 の潜在的な原因遺伝子の 1 つであり得る (これは、1 メガベースマッピング解像度および 20 kb あたり 1 遺伝子と仮定する)。

30

【0141】

ポリペプチド、それらのフラグメントまたは他の誘導體、もしくはそれらのアナログ、あるいはそれらを発現する細胞は、それらに対する抗体を生成するための免疫原として用いられ得る。これらの抗体は、例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。本発明はまた、キメラ抗体、単鎖抗体、およびヒト化抗体、ならびに Fab フラグメント、あるいは Fab 発現ライブラリーの生成物を含む。当該分野で公知の種々の手順が、このような抗体およびフラグメントの生成のために用いられ得る。

【0142】

本発明の配列に対応するポリペプチドに対して生成された抗体は、このポリペプチドの動物への直接注射によってか、または動物、好ましくは非ヒトへのこのポリペプチドの投与によって獲得され得る。次いでこのようにして獲得された抗体は、そのポリペプチド自体と結合する。この様式において、このポリペプチドのフラグメントのみをコードする配列でさえも、ネイティブポリペプチド全体に結合する抗体を生成するために用いられ得る。次いでこのような抗体が用いられて、このポリペプチドを発現する組織からこのポリペプチドを単離され得る。

40

【0143】

モノクローナル抗体の調製のためには、連続した細胞株培養によって産生される抗体を提供する任意の技術が使用され得る。例としては、ハイブリドーマ技術 (Kohler および Milstein, Nature 256: 495 - 497 (1975))、トリオ

50

ーマ (trioma) 技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozborら、Immunology Today 4:72 (1983))、およびヒトモノクローナル抗体を産生するEBV-ハイブリドーマ技術 (Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985)、77-96頁)が挙げられる。

【0144】

単鎖抗体の産生のために記載された技術 (米国特許第4,946,778号)は、本発明の免疫原性ポリペプチド産物に対する単鎖抗体を産生するために適応され得る。また、トランスジェニックマウスは、本発明の免疫原性ポリペプチド産物に対するヒト化抗原を発現するために用いられ得る。

10

【0145】

本発明は、以下の実施例に関してさらに記載される；しかし、このような実施例に限定されないことが理解されるべきである。別に特定されない限り、全ての部分または量は、重量による。

【0146】

以下の実施例の理解を容易にするために、特定の頻出の方法および/または用語が記載される。

【0147】

「プラスミド」は、前の小文字pならびに/もしくはそれに続く大文字および/または数字によって示される。本明細書中の開始プラスミドは、他に言及されない限り、市販されているか、制限なく公的に利用可能であるか、または公開されている手順に従って市販のプラスミドから構築され得る。さらに、記載されるプラスミドと等価のプラスミドが、当該分野において公知であり、そして当業者に明らかである。

20

【0148】

DNAの「消化」とは、DNAにおける特定の配列にてのみ作用する制限酵素を用いたDNAの触媒分解切断をいう。本明細書中で使用される種々の制限酵素は市販されており、そしてそれらの反応条件、補因子、および他の必要条件が、当業者に公知であるように使用された。分析目的のために、代表的には1 $\mu$ gのプラスミドまたはDNAフラグメントを、約20 $\mu$ lの緩衝溶液中の約2単位の酵素とともに使用する。プラスミド構築のためにDNAフラグメントを単離する目的のために、代表的には、5~50 $\mu$ gのDNAを、より大きな容量中に20~250単位の酵素を用いて消化する。適切な緩衝液および特定の制限酵素のための基質の量は、製造業者により特定されている。37で約1時間のインキュベーション時間を通常使用するが、供給業者の説明書に従って変化し得る。消化の後、反応をポリアクリルアミドゲル上で直接的に電気泳動し、所望のフラグメントを単離する。

30

【0149】

切断されたフラグメントのサイズ分離を、Goeddel, D.ら、Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980)により記載される8%ポリアクリルアミドゲルを用いて実行する。

【0150】

「オリゴヌクレオチド」とは、一本鎖ポリデオキシヌクレオチドまたは化学的に合成され得る2つの相補的なポリデオキシヌクレオチド鎖のいずれかをいう。そのような合成オリゴヌクレオチドは、5'リン酸を有さず、従って、キナーゼの存在下でATPを用いてリン酸を付加しないと別のオリゴヌクレオチドと結合しない。合成オリゴヌクレオチドは、脱リン酸していないフラグメントに結合する。

40

【0151】

「連結」とは、2本鎖の核酸フラグメント間でホスホジエステル結合を形成するプロセスをいう (Maniatis, T.ら、同書、146頁)。他に提供されなければ、連結は、(連結されるべきDNAフラグメントとほぼ等しいモル量の0.5 $\mu$ g当たり10単位のT4DNAリガーゼ(「リガーゼ」)で公知の緩衝液および条件を用いて達成され得

50

る。

【0152】

他に言及することがない限り、形質転換は、Graham, F. および Van der Eb, A., *Virology*, 52: 456 ~ 457 (1973) の方法に記載されるように実施した。

【0153】

本発明において、「単離された（単離した）」とは、そのもとの環境（例えば、それが天然に存在する場合は天然の環境）から取り出された物質をいい、したがって、その天然の状態から「人間の手によって」変更されている。例えば、単離されたポリヌクレオチドは、ベクターまたは組成物の一部であり得るか、あるいは細胞中に含まれ得、そしてなお「単離されている」。なぜなら、そのベクター、組成物、または特定の細胞は、そのポリヌクレオチドのもとの環境ではないからである。用語「単離された」は、ゲノムライブラリーまたは cDNA ライブラリー、丸ごとの細胞全体または mRNA 調製物、ゲノム DNA 調製物（電気泳動により分離されたもの、およびプロットヘトランスファーされたものを含む）、せん断された全細胞ゲノム DNA 調製物、あるいは当該分野が、本発明のポリヌクレオチド / 配列の識別する特徴を示さない他の組成物を、いわない。

10

【0154】

本発明において、「分泌」または「可溶性」Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）タンパク質とは、ER、分泌小胞、または細胞外間隙にシグナル配列の結果として指向され得るタンパク質、ならびにシグナル配列を必ずしも含まないが細胞外間隙に放出される Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）タンパク質をいう。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）分泌タンパク質が、細胞外間隙に放出される場合、この Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）分泌タンパク質は、「成熟」Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）タンパク質を生成するために細胞外プロセッシングを受け得る。細胞外間隙への放出は、エキソサイトーシスおよびタンパク質分解切断を含む、多くの機構によって生じ得る。分泌または可溶性 Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）タンパク質の例は、本明細書中に記載される Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）の一部を含むか、あるいはそれらからなるフラグメントを含む。好ましい分泌または可溶性フラグメントは細胞外ループ、細胞内ループ、N末端細胞外ドメイン、または C末端細胞内ドメイン、もしくはそれらのフラグメントを含む。さらなる好ましい分泌または可溶性フラグメントは、本明細書中に記載されるような Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）のエピトープを含む。

20

30

【0155】

本明細書中で使用される場合、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）「ポリヌクレオチド」とは、配列番号 1 に含まれる核酸配列を有する分子、または ATCC に寄託されたクローンの中に含まれる Gタンパク質ケモカインレセプター DNA をいう。例えば、この Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）ポリヌクレオチドは、5' および 3' 非翻訳配列、シグナル配列を伴うかまたは伴わないコード領域、分泌タンパク質コード領域、ならびにこの核酸配列のフラグメント、エピトープ、ドメイン、および改変体を含む、全長ゲノム配列のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、本明細書で使用される場合、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR）「ポリペプチド」とは、広く定義される本発明のポリヌクレオチドから生成される翻訳されたアミノ酸配列を有する分子をいう。

40

【0156】

特定の実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも 15 の、少なくとも 30 の、少なくとも 50 の、少なくとも 100 の、少なくとも 125 の、少なくとも 500 の、または少なくとも 1000 の連続するヌクレオチドであるが、300 kb 未満、200 kb 未満、100 kb 未満、50 kb 未満、15 kb 未満、10 kb 未満、7.5 kb 未満、5 kb 未満、2.5 kb 未満、2.0 kb 未満、または 1 kb 未満の長さである。さらなる実施形態においては、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書中に開示されたコード配列の一部を含むが、任意のイントロンの全てまたは一部を含むわけではない

50

。別の実施形態においては、コード配列を含むポリヌクレオチドは、ゲノムの隣接遺伝子のコード配列（すなわち、ゲノムにおける目的のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR）遺伝子に対する5'または3'）を含まない。他の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、1000、500、250、100、50、25、20、15、10、5、4、3、2または1以上のゲノム隣接遺伝子のコード配列を含まない。

#### 【0157】

配列番号1の配列のオープンリーディングフレームを含む代表的プラスミドが、1995年6月1日にアメリカンタイプカルチャーコレクション（「ATCC」）に寄託され、そして、ATCC受託番号97183を与えられた。ATCCは、10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110 - 2209, USAに位置する。ATCC寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に拠って行われた。

10

#### 【0158】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）「ポリヌクレオチド」はまた、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1に含まれる配列、またはその相補体、もしくは寄託されたクローンに含まれる配列にハイブリダイズし得るポリヌクレオチドを含む。「ストリンジентなハイブリダイゼーション条件」とは、50%ホルムアミド、5×SSC（750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%デキストラン硫酸、および20μg/ml変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中での42℃での一晚のインキュベーション、続いて0.1×SSC中で約65℃にてフィルターを洗浄することをいう。

20

#### 【0159】

より低いストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件でGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドにハイブリダイズする核酸分子もまた含まれる。ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーおよびシグナル検出の変更は、主として、ホルムアミド濃度（より低い百分率のホルムアミドが、低下したストリンジエンシーを生じる）；塩条件、または温度の操作を通じて達成される。例えば、より低いストリンジエンシー条件は、6×SSPE（20×SSPE = 3M NaCl；0.2M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>；0.02M EDTA、pH7.4）、0.5% SDS、30%ホルムアミド、100μg/mlサケ精子プロッキングDNAを含む溶液中、37℃で一晩のインキュベーション；次いで1×SSPE、0.1% SDSを用いた50℃での洗浄を含む。さらに、さらにより低いストリンジエンシーを達成するために、ストリンジентなハイブリダイゼーション後に行われる洗浄は、より高い塩濃度（例えば、5×SSC）で行われ得る。

30

#### 【0160】

上記の条件におけるバリエーションが、ハイブリダイゼーション実験においてバックグラウンドを抑制するために使用される代替的なプロッキング試薬の含有および/または置換によって達成され得ることに留意のこと。代表的なプロッキング試薬としては、デンハルト試薬、BLOTTING、ヘパリン、変性サケ精子DNA、および市販の特許処方物が挙げられる。特異的なプロッキング試薬の含有は、適合性の問題に起因して、上記のハイブリダイゼーション条件の改変を必要とし得る。

40

#### 【0161】

もちろん、ポリA+配列（例えば、配列表に示されるcDNAの任意の3'末端ポリA+領域（tract））に、またはT（もしくはU）残基の相補的ストレッチにのみハイブリダイズするポリヌクレオチドは、「ポリヌクレオチド」の定義に包含されない。なぜなら、このようなポリヌクレオチドは、ポリ（A）ストレッチまたはその相補体を含む任意の核酸分子（例えば、プライマーとしてオリゴdTを用いて生成される、事実上任意の二本鎖cDNAクローン）にハイブリダイズするからである。

#### 【0162】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドは、任意のポリリボ

50

ヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドから構成され得、これは、非改変RNAもしくは非改変DNAまたは改変RNAもしくは改変DNAであり得る。例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、ならびに一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であるRNA、一本鎖、またはより代表的には二本鎖もしくは一本鎖領域と二本鎖領域との混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子から構成され得る。さらに、このGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドは、RNAもしくはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含む、三本鎖領域から構成され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドはまた、安定性のために、または他の理由のために改変された、1つ以上の改変された塩基またはDNA骨格もしくはRNA骨格を含み得る。「改変された」塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような普通でない塩基が挙げられる。種々の改変が、DNAおよびRNAに対して行われ得；したがって、「ポリヌクレオチド」は、化学的、酵素的、または代謝的に改変された形態を含む。

10

20

30

40

50

### 【0163】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドは、ペプチド結合または改変されたペプチド結合(すなわち、ペプチドアイソスター(isostere))によって互いに連結した、アミノ酸から構成され得、そして遺伝子がコードする20個のアミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドは、翻訳後プロセッシングのような天然のプロセス、または当該技術分野で周知の化学的改変技術のいずれかによって、改変され得る。このような改変は、基本テキスト、およびより詳細な研究論文、ならびに多くの研究文献に十分記載される。改変は、そのペプチド骨格、そのアミノ酸側鎖、およびそのアミノ末端またはそのカルボキシル末端を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドのどこにでも生じ得る。同じ型の改変が、所定のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチド中のいくつかの部位で、同じ程度または種々の程度で存在し得ることが理解される。また、所定のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドは、多くの型の改変を含み得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドは、例えばユビキチン化の結果として、分枝状であり得、そしてこのGタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドは、分枝を含むかまたは含まずに、環状であり得る。環状、分枝状および分枝した環状の、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドは、天然の翻訳後プロセスから生じ得るか、または合成方法によって作製され得る。改変としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol)の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 $\gamma$ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、ペグ化(pegylation)、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA媒介付加(例えば、アルギニル化)、およびユビキチン化が挙げられる。(例えば、PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES、第2版、T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS、B.C. Johnson編、Academic Press, New York、1-12頁(1983); Seiffterら、Meth Enzymol 182: 626-646(1990); Rattanら、Ann NY Acad Sci 663: 48-62(1992)を参照のこと)。

### 【0164】

「配列番号1」は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリヌクレオチド配列をいい、一方、「配列番号2」は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチド配列をいう。

【0165】

「生物学的活性を有する」Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドとは、特定の生物学的アッセイで測定される場合、用量依存性を伴ってもまたは伴わなくても、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチド(成熟形態を含む)の活性と類似であるが、必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいう。用量依存性が存在する場合において、その用量依存性は、このGタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドの用量依存性と同一である必要はないが、むしろこのGタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドと比較した場合に、所定の活性における用量依存性に実質的に類似する(すなわち、候補ポリペプチドは、このGタンパク質ケモカインレセプター(CCR)ポリペプチドと比較して、より大きな活性を示すか、または約1/25以上、そして、好ましくは約1/10以上の活性、そして最も好ましくは約1/3以上の活性を示す)。

10

【0166】

(Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよびポリペプチド)

クローンHDGNR10は、ヒト単球ゲノムDNAライブラリーから単離された。このクローンは、配列番号2として同定されたポリペプチドをコードするコード領域全体を含む。この寄託プラスミドは、全体で1414ヌクレオチドを有する挿入DNAを含み、これは、352アミノ酸残基の推定オープンリーディングフレームをコードする(図1を参照のこと)。このオープンリーディングフレームは、ヌクレオチド259位に位置するN末端メチオニンから開始し、そしてヌクレオチド1314位の終止コドンで終わる。ストップコドンの位置は、1315~1317位である。

20

【0167】

引き続き発現分析もまた、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現が、マクロファージ(未熟な樹状細胞を含む(例えば、ランゲルハンス細胞およびT細胞(Th0およびTh1エフェクター細胞を含む)))に見られることを示し、免疫系特異的発現に一貫した発現パターンを示す。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)はまた、小グリア細胞、星状細胞、ニューロン、および中枢神経系(CNS)の血管内皮細胞において検出される。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)はまた、慢性関節リウマチ患者の滑液中の単球およびT細胞においても発現され、そして他の関節炎においても関連付けられる。

30

【0168】

(Gタンパク質共役ケモカインレセプター)

BLAST分析を使用して、配列番号2は、Gタンパク質共役ケモカインレセプターのファミリーのメンバーと相同的であることが見出された。特に、配列番号2は、ヒトMCP-1レセプター(MCP-1R)Aに対するMonoMac6mRNAの翻訳産物に相同性を示すドメインを含み(図2)(GenBank登録番号第U03882番;配列番号9)、Gタンパク質共役ケモカインレセプターファミリーの7回膜貫通セグメント特性を含む保存された膜貫通ドメインを含み、これは、配列番号2または寄託クローンによってコードされるポリペプチドのアミノ酸37から始まる。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)はまた、DRYモチーフを含み、これは、シグナル伝達において必要とされ、多くのGタンパク質共役レセプターにおいて、3番目の膜貫通ドメインのすぐ後に見出される。MCP-1Rが免疫系において重要であると考えられるので、MCP-1RとGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)との間の相同性は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)もまた免疫系に含まれ得ることを示す。

40

【0169】

第2のMCP-1R配列がまた単離され、これは、推定上の7番目膜貫通ドメインにあ

50

る5'非翻訳領域由来のMCP-1RAと同一であるが、異なる細胞内末端を含む。この第2の配列は、MCP-1RBと名づけられ、MCP-1RAの二者択一にスプライシングされたバージョンと見られる。これは、さらに米国特許第5,707,815号に記載される。

#### 【0170】

(ドメイン)

BLAST分析を使用して、配列番号2は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ファミリーのメンバーと相通的であることが見出された。特に、配列番号2は、ヒトMCP-1レセプター(MCP-1R)Aに対するMonoMac6mRNAの翻訳産物に相同性を示すドメインを含み(図2)(GenBank登録番号第U03882番;配列番号9)、以下の保存されたドメインを含む:(a)アミノ酸およそ1~36に位置する推定N末端細胞外ドメイン;(b)アミノ酸およそ37~305に位置する推定膜貫通ドメイン;(c)アミノ酸およそ306~352に位置する推定C末端細胞内ドメイン。推定膜貫通ドメインは、以下を含む:アミノ酸およそ37~58(セグメント1)、およそ68~88(セグメント2)、およそ103~124(セグメント3)、およそ142~166(セグメント4)、およそ196~223(セグメント5)、およそ236~260(セグメント6)、およびおよそ287~305(セグメント7)に位置する7回膜貫通セグメント;アミノ酸およそ59~67(細胞内ループ1)、およそ125~141(細胞内ループ2)、およびおよそ224~235(細胞内ループ3)に位置する細胞内ループ;そしてアミノ酸およそ89~102(細胞外ループ1)、およそ167~195(細胞外ループ2)、およびおよそ261~274(細胞外ループ3)に位置する細胞外ループ。上で規定されるかまたは寄託クローン(配列番号22)によってコードされるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のこれらのポリペプチドフラグメントは、本発明において特に意図され、これらと本明細書において開示される他の領域との組み合わせも同様である。意図されるポリペプチドはまた、1つ以上のこれらのドメイン、セグメントおよびループを除外する。「ループ」はまた、本明細書および当該分野において「領域」、「ドメイン」、および「部分」として反映される(例えば、細胞外「領域」、細胞内「領域」、細胞外「ドメイン」、および細胞内「ドメイン」、および細胞内「部分」)。

10

20

30

#### 【0171】

配列番号1および翻訳された配列番号2は、十分に正確であり、そしてさもなければ当該分野において周知の種々の使用およびさらに以下に記載される種々の使用に適切である。例えば、配列番号1は、配列番号1に含まれる核酸配列または寄託されたクローンに含まれるDNAを検出する核酸ハイブリダイゼーションプローブの設計を含む使用を有する。これらのプローブはまた、生物学的サンプル中の核酸分子にハイブリダイズし、その結果、本発明の種々の法医学的な方法および診断的な方法を可能にする。同様に、配列番号2より同定されたポリペプチドは、Gタンパク質ケモカインレセプターに特異的に結合する抗体を作製するのに用いられ得る。

#### 【0172】

それにもかかわらず、配列決定反応によって作製されるDNA配列は、配列決定誤差を含み得る。これらの誤差は、誤認ヌクレオチドとして、または作製されたDNA配列中のヌクレオチドの挿入もしくは欠失として存在する。誤って挿入されたかまたは欠失されたヌクレオチドは、推定アミノ酸配列の読み取り枠においてフレームシフトを引き起こす。これらの場合、たとえ作製されたDNA配列が実際のDNA配列と99.9%を超えて同一(例えば、1000を超える塩基のオープンリーディングフレームにおける1塩基の挿入または欠失)であり得るとしても、この推定アミノ酸配列は実際のアミノ酸配列とは異なる。

40

#### 【0173】

したがって、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列においての適用が要求する明確さについて、本発明は、配列番号1として同定される産生されたヌクレオチド配列および配列

50

番号2として同定される翻訳された推定翻訳アミノ酸配列を提供するだけでなく、ATCCに寄託されたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のヒトDNAを含むプラスミドDNAのサンプルをも提供する。寄託されたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)クローンのヌクレオチド配列は、既知の方法に従う寄託クローンの配列決定によって簡単に決定され得る。次いで、推定Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)アミノ酸配列は、このような寄託物から確認され得る。さらに、寄託クローンによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列はまた、ペプチドの配列決定または、タンパク質を寄託されたヒトGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を含む適当な宿主細胞において発現させ、タンパク質を収集してその配列を決定することによって、直接決定され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のオープンリーディングフレームを有する寄託クローンのサンプルは、ATCCから入手され、そして再び配列決定する。再び配列決定されたクローン由来の配列データは、配列番号21および22に示される。配列番号21は、5つの位置(配列番号1のヌクレオチド320、433、442、646、および1289)において配列番号1と異なり、5つの位置(配列番号2のアミノ酸残基21、59、62、130、および344)において配列番号2と異なる。

10

20

30

40

50

**【0174】**

本発明はまた、配列番号1、配列番号2、または寄託されたクローンに対応するGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)遺伝子に関する。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)遺伝子は、本明細書中に開示される配列情報を使用して、公知の方法に従って単離され得る。このような方法は、開示された配列からプローブまたはプライマーを調製する工程、およびゲノム物質の適切な供給源から対応する遺伝子を同定または増幅する工程を包含する。

**【0175】**

本発明においてまた提供されるものは、対立遺伝子改変体、オルソログ(ortholog)、および/または種相同体である。当該分野において公知である手順は、本明細書中で開示された配列またはATCCに寄託されたクローンからの情報を用いて、配列番号1、配列番号2、および/または寄託されたクローンに対応する遺伝子の全長遺伝子、対立遺伝子改変体、スプライス改変体、全長コード部分、オルソログ、および/または種相同体を得るために使用され得る。例えば、対立遺伝子改変体および/または種相同体は、本明細書中に提供される配列から適切なプローブまたはプライマーを作製し、そして対立遺伝子改変体および/または所望の相同体について適切な核酸供給源をスクリーニングすることにより単離および同定され得る。

**【0176】**

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリペプチドは、任意の適切な様式で調製され得る。そのようなポリペプチドとしては、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え的に生成されたポリペプチド、合成的に生成されたポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせによって生成されたポリペプチドが挙げられる。このようなポリペプチドを調製するための手段は、当該分野において十分に理解されている。

**【0177】**

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドは、分泌タンパク質の形態(成熟形態を含む)であり得るか、またはより大きなタンパク質(例えば、融合タンパク質)の一部であり得る(下記を参照のこと)。分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、精製において補助する配列(例えば、多重のヒスチジン残基)、または組換え生成の間の安定性のためのさらなる配列を含むさらなるアミノ酸配列を含むことは、しばしば有利である。

**【0178】**

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリペプチドは、好ましくは単離された形態で提供され、そして好ましくは実質的に精製される。ポリペプチドの組換え的に生成されたバージョン(分泌ポリペプチドを含む)は、本明細書中で記載される技術か、または当該分野で別の公知の技術を使用して(例えば、SmithおよびJohnson

(Gene 67:31-40(1988))により記載される1工程方法によって)、実質的に精製され得る。本発明のポリペプチドはまた、本明細書中で記載される技術、または当該分野における他の周知の方法を使用して(例えば、当該分野で周知の方法でGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質に対して惹起された本発明の抗体を使用することによって)、天然の供給源、合成的な供給源または組換え供給源から精製され得る。

**【0179】**

本発明は、配列番号1の核酸配列を含むか、あるいはこれから構成されるポリヌクレオチドを提供、および/またはATCC登録番号97183に含まれるクローンを提供する。本発明はまた、配列番号2のポリペプチド配列および/またはATCC登録番号97183に含まれるクローンによってコードされるポリペプチドを含むか、あるいはこれから構成されるポリペプチドを提供する。配列番号2のポリペプチド配列および/またはATCC寄託番号97183に含まれるクローンによってコードされるポリペプチド配列を含むか、これから構成されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明に含まれる。

10

**【0180】**

(シグナル配列)

本明細書に記載されるように、本発明はまた、配列番号2のポリペプチドおよびこれらのフラグメント、ならびに/または寄託クローンによってコードされるポリペプチドおよびこれらのフラグメントを有するシグナル配列の融合物を含み、これらはポリペプチドまたはフラグメントの分泌を指向する。このような融合物をコードするポリヌクレオチドはまた、本発明に含まれる。

20

**【0181】**

本発明はまた、配列番号2およびこのフラグメントの配列、ならびに/または寄託クローンによってコードされるポリペプチド配列、およびこのフラグメントの配列を有するポリペプチドの成熟形態を含む。この成熟形態をコードするポリヌクレオチド(例えば、配列番号1に記載のポリヌクレオチド、およびこのフラグメントの配列、ならびに/または寄託クローン中に含まれるポリペプチド配列、およびこのフラグメントの配列)もまた、本発明に含まれる。

**【0182】**

シグナル仮説にしたがって、哺乳動物細胞によって分泌されたタンパク質は、成熟タンパク質から、一旦、成長したGタンパク質鎖の粗面小胞体を通っての輸送が開始されると切断されるシグナル配列または分泌リーダー配列を有する。ほとんどの哺乳動物細胞および昆虫細胞でも、同じ特異性で分泌タンパク質を切断する。しかし、いくつかの場合、分泌タンパク質の切断は、完全には、均一ではなく、このことは、このタンパク質の2以上の成熟種を生じる。さらに、分泌タンパク質の切断特異性は、最終的には、完全なタンパク質の一次構造によって決定される(すなわち、これは、このポリペプチドのアミノ酸配列に固有である)ことが長い間公知である。

30

**【0183】**

タンパク質が、シグナル配列、ならびにその配列についての切断点を有するか否かを予測するための方法が、利用可能である。例えば、McGeoch, Virus Res. 3:271-286(1985)の方法は、短いN末端荷電領域およびそれに続く完全な(切断されていない)タンパク質の非荷電領域からの情報を使用する。von Heinje, Nucleic Acids Res. 14:4683-4690(1986)の方法は、切断部位の周辺の残基(代表的に-13~+2残基)からの情報を使用し、ここで、+1は、分泌タンパク質のアミノ末端を示す。これらの方法のそれぞれについての、公知の哺乳動物分泌タンパク質の切断点を予測することの正確さは、75~80%の範囲にある(von Heinje、前出)。しかし、2つの方法は、所定のタンパク質について、同じ推定切断点を必ずしも生成するとは限らない。

40

**【0184】**

50

本発明の場合において、分泌ポリペプチドの推定アミノ酸配列は、SignalPと呼ばれるコンピュータプログラム(Henrik Nielsenら、Protein Engineering 10:1-6(1997))によって分析され、このプログラムは、アミノ酸配列に基づいてタンパク質の細胞での位置を予測する。この局在化のコンピュータ予測の一部として、McGeochおよびvon Heinjeの方法が援用される。

【0185】

しかし、当業者に理解されるように、切断部位は、時折、生物に応じて変化し、そして絶対的な確実性を伴っては予測され得ない。融合タンパク質における異種のシグナル配列の切断は、ポリペプチド配列の接合部において生じるか、または接合部のいずれかの横の位置において生じ得る。従って、本発明は、配列番号2において示される配列を有する分泌ポリペプチドを提供し、これは推定切断点の5残基(すなわち、+5または-5残基)内で始まるN末端を有する。同様に、いくつかの場合において、分泌タンパク質からのシグナル配列の切断は、完全に均一という訳ではなく、1つより多くの分泌される種を生じることにもまた認識される。これらのポリペプチド、およびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明によって意図される。

10

【0186】

さらに、上述の分析によって同定されるシグナル配列は、天然に存在するシグナル配列を必ずしも予測しないかもしれない。例えば、天然に存在するシグナル配列は、推定シグナル配列からさらに上流にあり得る。しかし、推定シグナル配列は、分泌タンパク質をERに指向し得る可能性がある。それにもかかわらず、本発明は、哺乳動物細胞(例えば、下記のようなCOS細胞)において、配列番号Xのポリヌクレオチド配列および/または寄託されたクローンのcDNAに含まれるポリヌクレオチド配列の発現により産生される成熟タンパク質を提供する。これらのポリペプチド、およびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明によって意図される。

20

【0187】

(ポリヌクレオチドおよびポリペプチド改変体)

本発明は、配列番号1に開示されるポリヌクレオチド配列の改変体、それらに対する相補鎖の改変体、および/または寄託クローン中に含まれる配列の改変体に関する。

【0188】

本発明はまた、配列番号2に開示されるポリペプチド配列の改変体、および/または寄託クローン中のcDNAによってコードされるポリペプチド配列の改変体を含む。

30

【0189】

「改変体」とは、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるがそれらの特性は保持している、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。一般的に、改変体は全体的に非常に類似しており、そして、多くの領域において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドまたはポリペプチドと同一である。

【0190】

本発明はまた、例えば、配列番号1の配列をコードするヌクレオチドまたはその相補鎖、寄託クローン中に含まれる配列をコードするヌクレオチドまたはその相補鎖、配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、HDGNR10寄託クローンによりコードされるポリペプチド配列をコードするヌクレオチド、および/またはこれらの核酸分子のいずれかのポリヌクレオチドフラグメント(例えば、本明細書に記載のフラグメント)と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヌクレオチド配列を含むか、あるいはこれらからなるヌクレオチド配列に関する。これらの核酸分子に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下または低いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた、これらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドがそうであるように、本発明によって包含される。

40

50

## 【0191】

本発明はまた、例えば、配列番号2に示されるポリペプチド配列、寄託クローンによってコードされるポリペプチド配列、および/またはこれらのポリペプチド配列のいずれかのポリペプチドフラグメント（例えば、本明細書に記載のフラグメント）と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる、ポリペプチドに関する。

## 【0192】

本発明の参照ヌクレオチド配列に、例えば、少なくとも95%「同一」であるヌクレオチド配列を有する核酸とは、そのヌクレオチド配列がGタンパク質ケモカインレセプター（CCR）ポリペプチドをコードする参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドあたり5つまでの点変異を含み得ることを除いて、その核酸のヌクレオチド配列が参照配列に対して同一であることを意図する。換言すれば、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有する核酸を得るために、参照配列のヌクレオチドの5%までが、欠失され得るか、または別のヌクレオチドで置換され得るか、あるいは参照配列中の総ヌクレオチドの5%までの数のヌクレオチドが参照配列中に挿入され得る。問い合わせ（query）配列は、配列番号1に示される配列全体、寄託クローン中のHDGNR10 DNAのORF（オープンリーディングフレーム）、または本明細書中で記載されるように特定される任意のフラグメントであり得る。

## 【0193】

実際問題として、任意の特定の核酸分子またはポリペプチドが、本発明のヌクレオチド配列またはポリペプチドに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか否かは、公知のコンピュータープログラムを使用して従来的に決定され得る。問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との間の最も良好な全体的な適合性（全体的な配列整列とも呼ばれる）を決定するための好ましい方法は、Brutlagら（Comp. App. Biosci. 6:237-245（1990））のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータープログラムを使用して決定され得る。配列整列において、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともにDNA配列である。RNA配列は、UからTに変換することによって比較され得る。この全体的な配列整列の結果は、同一性パーセント（%）で示される。同一性パーセントを算定するためにDNA配列のFASTDB整列において使用される好ましいパラメータは：Matrix=Unitary、k-tuple=4、Mismatch Penalty=1、Joining Penalty=30、Randomization Group Length=0、Cutoff Score=1、Gap Penalty=5、Gap Size Penalty 0.05、Window Size=500または対象ヌクレオチド配列の長さ（どちらかより短い方）である。

## 【0194】

対象配列が、5'または3'欠失のために（内部欠失のためではなく）問い合わせ配列より短い場合、手動の補正が結果に対してなされなければならない。これは、同一性パーセントを計算する場合に、FASTDBプログラムが対象配列の5'および3'の短縮を考慮しないからである。5'末端または3'末端で短縮されている対象配列について、問い合わせ配列に対して、同一性パーセントは、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして一致/整列されない対象配列の5'および3'である問い合わせ配列の塩基の数を計算することによって補正される。ヌクレオチドが一致/整列されるか否かは、FASTDB配列整列の結果によって決定される。次いで、このパーセントは、特定のパラメータを用いて上記のFASTDBプログラムによって算定された同一性パーセントから差し引かれ、最終的な同一性パーセントのスコアに到達する。この補正されたスコアが、本発明の目的に使用されるものである。FASTDB整列によって示されるように、問い合わせ配列と一致/整列されない、対象配列の5'および3'の塩基の外側の塩基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的で算定される。

## 【0195】

例えば、90塩基の対象配列が、同一性パーセントを決定するために100塩基の問い合わせ配列に整列される。欠失が、対象配列の5'末端で生じ、従って、FASTDB整列は、5'末端の最初の10塩基で一致/整列を示さない。10個の不对合塩基は、配列の10%（一致していない5'および3'の末端の塩基の数/問い合わせ配列の塩基の総数）を表し、そのため10%が、FASTDBプログラムによって算定される同一性パーセントのスコアから差し引かれる。残りの90塩基が完全に一致する場合は、最終的な同一性パーセントが90%である。別の例では、90塩基の対象配列が、100塩基の問い合わせ配列と比較される。この場合、欠失は、内部欠失であり、その結果、対象配列の5'または3'に問い合わせと一致/整列しない塩基が存在しない。この場合、FASTDBによって算定される同一性パーセントは手動で補正されない。再び、問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列の5'または3'の塩基のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためにはなされない。

10

20

30

40

50

#### 【0196】

本発明の問い合わせアミノ酸配列に、例えば、少なくとも95%「同一」であるアミノ酸配列を有するポリペプチドとは、その対象ポリペプチド配列が問い合わせアミノ酸配列の各100個のアミノ酸あたり5つまでのアミノ酸の変更を含み得ることを除いて、対象ポリペプチドのアミノ酸配列が問い合わせ配列に同一であることが意図する。換言すれば、問い合わせアミノ酸配列に少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、対象配列におけるアミノ酸残基の5%までが、挿入、欠失、（インデル（*in del s*））または別のアミノ酸で置換され得る。参照配列のこれらの改変は、参照アミノ酸配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端位置で生じ得るか、またはそれらの末端位置の間のどこにでも生じ得、参照配列中の残基間で個々にかまたは参照配列内の1個以上連続する群中かのいずれかで、散在する。

#### 【0197】

実際問題として、任意の特定のポリペプチドが、例えば、配列番号2のアミノ酸配列または寄託クローンによりコードされるアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるか否かは、公知のコンピュータプログラムを使用して従来のように決定され得る。問い合わせ配列（本発明の配列）と対象配列との間での最良の全体的な一致（全体的配列整列とも呼ばれる）を決定するための好ましい方法は、Brutlagら（*Comp. App. Biosci.* 6:237-245（1990））のアルゴリズムに基づくFASTDBコンピュータプログラムを使用して決定され得る。配列整列において、問い合わせ配列および対象配列は、両方ともヌクレオチド配列であるかまたは両方ともアミノ酸配列であるかのいずれかである。上記の全体的配列整列の結果は、同一性パーセントで示される。FASTDBアミノ酸整列に用いられる好ましいパラメータは：Matrix = PAM 0、k-tuple = 2、Mismatch Penalty = 1、Joining Penalty = 20、Randomization Group Length = 0、Cutoff Score = 1、Window Size = 配列の長さ、Gap Penalty = 5、Gap Size Penalty = 0.05、Window Size = 500または対象アミノ酸配列の長さ（どちらかより短い方）である。

#### 【0198】

対象配列が、N末端またはC末端欠失により（内部の欠失のためではなく）問い合わせ配列よりも短い場合、手動の補正が結果に対してなされなければならない。これは、FASTDBプログラムが、全体的な同一性パーセントを算定する場合に、対象配列のN末端短縮およびC末端短縮を考慮しないからである。N末端およびC末端で短縮されている対象配列について、問い合わせ配列に対して、同一性パーセントは、問い合わせ配列の総塩基のパーセントとして、対応する対象残基と一致/整列しない、対象配列のN末端およびC末端である問い合わせ配列の残基の数を計算することによって補正される。残基が一致/整列されているか否かは、FASTDB配列整列の結果によって決定される。次いで、このパーセントは、上記のFASTDBプログラムによって特定のパラメータを使用し

て計算された同一性パーセントから差し引かれ、最終的な同一性パーセントのスコアに到達する。この最終的な同一性パーセントのスコアが、本発明の目的で使用されるものである。問い合わせ配列と一致/整列していない対象配列のN末端側およびC末端側の残基のみが、同一性パーセントのスコアを手動で調整する目的のために考慮される。すなわち、対象配列の最も遠いN末端およびC末端残基の外側の問い合わせ残基位置のみである。

**【0199】**

例えば、90アミノ酸残基の対象配列が、同一性パーセントを決定するために100残基の問い合わせ(query)配列と整列される。欠失が対象配列のN末端で生じ、そしてそれゆえFASTDB整列は、N末端での最初の10残基の一致/整列を示さない。この10個の不对合残基は、配列の10%(一致していないN末端およびC末端の残基の数/問い合わせ配列中の残基の総数)を表し、その結果FASTDBプログラムによって計算される同一性パーセントのスコアから10%が差し引かれる。残りの90残基が完全に一致した場合、最終的な同一性パーセントは90%である。別の例において、90残基の対象配列が、100残基の問い合わせ配列と比較される。この場合、欠失は、内部欠失であり、そのため問い合わせと一致/整列しない対象配列のN末端またはC末端の残基は存在しない。この場合、FASTDBによって算定される同一性パーセントは、手動で補正されない。再び、FASTDB整列において示される、問い合わせ配列と一致/整列しない対象配列のN末端およびC末端の外側の残基位置のみが手動で補正される。他の手動の補正は、本発明の目的のためにはなされない。

10

**【0200】**

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)改変体は、コード領域、非コード領域、またはその両方における変化を含み得る。特に好ましいものは、サイレントな置換、付加、または欠失を生成するがコードされるポリペプチドの特性または活性を変化させない変化を含む、ポリヌクレオチド改変体である。遺伝コードの縮重に起因するサイレントな置換によって生成されるヌクレオチド改変体が、好ましい。さらに、5~10アミノ酸、1~5アミノ酸、または1~2アミノ酸が、任意の組合せで置換、欠失、または付加されている改変体もまた、好ましい。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド改変体は、種々の理由(例えば、特定の宿主についてのコドン発現を最適化する(ヒトmRNAにおけるコドンを、E. coliのような細菌宿主によって好ましいコドンに変化させる))のために、生成され得る。

20

30

**【0201】**

天然に存在するGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)改変体は、「対立遺伝子改変体」と呼ばれ、そして生物の染色体上の所定の遺伝子座を占有する遺伝子のいくつかの代替の形態のうちの一つをいう。(Genes II, Lewin, B., 編 John Wiley & Sons, New York (1985))。これらの対立遺伝子改変体は、ポリヌクレオチドレベルおよび/またはポリペプチドのいずれかのレベルで変化し得、そして本発明に含まれる。あるいは、天然に存在しない改変体は、変異誘発技術によってまたは直接的な合成によって生成され得る。

**【0202】**

タンパク質工学および組換えDNA技術の公知の方法を使用して、改変体は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの特性を改善または変化させるために作製され得る。例えば、1つ以上のアミノ酸が、生物学的機能の実質的な欠損を伴わずに、本発明のポリペプチドのN末端またはC末端から欠失され得る。Ronら、J. Biol. Chem. 268:2984-2988(1993)の著者らは、3個、8個、または27個のアミノ末端アミノ酸残基を欠失させた後でさえもヘパリン結合活性を有する改変体KGFタンパク質を報告した。同様に、インターフェロンは、このタンパク質のカルボキシ末端から8~10個のアミノ酸残基を欠失させた後、10倍までのより高い活性を示した(Dobeliら、J. Biotechnology 7:199-216(1988))。

40

**【0203】**

50

さらに、豊富な証拠は、改変体が、天然に存在するタンパク質の生物学的活性に類似する活性をしばしば保持することを実証する。例えば、Gayleおよび共同研究者ら(J. Biol. Chem. 268:22105-22111(1993))は、ヒトサイトカインIL-1aの広範囲にわたる変異分析を行った。彼らは、ランダムな変異誘発を使用して、分子の全長にわたって改変体当たり平均2.5アミノ酸の変化になる、3,500個を超える個々のIL-1a改変体を作製した。複数の変異が、全ての可能なアミノ酸位置で試験された。この研究者らは、「分子の大部分は、[結合活性または生物学的活性]のいずれに対してもほとんど影響を伴わないで変化され得る」ことを見出した。(要約を参照のこと)。実際、試験された3,500個を超えるヌクレオチド配列のうち、わずか23個の独特なアミノ酸配列が、野生型と活性が有意に異なるタンパク質を生成した。

10

**【0204】**

さらに、ポリペプチドのN末端またはC末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、1つ以上の生物学的機能の改変または欠失を生じたとしても、他の生物学的活性はなお保持され得る。例えば、分泌形態を認識する抗体を誘導および/または結合する、欠失改変体の能力は、分泌形態の大多数より少ない残基が、N末端またはC末端から除去される場合に保持されるようである。タンパク質のN末端残基またはC末端残基を欠損する特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を保持するか否かは、本明細書中に記載される慣用的な方法、およびそうでなければ当該分野において公知の慣用的な方法によって容易に決定され得る。

**【0205】**

20

従って、本発明はさらに、実質的な生物学的活性を示すGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド改変体を含む。このような改変体としては、活性に対する影響をほとんど有さないように、当該分野において公知の一般的な法則に従って選択される、欠失、挿入、逆位、反復、および置換が挙げられる。

**【0206】**

本願は、本明細書中に開示される核酸配列(例えば、配列番号2のm~nとしてとして以下に開示されるN末端欠失および/もしくはC末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする)または寄託クローンによってコードされるポリペプチドに対応する核酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%同一である核酸分子に関し、これは、その核酸がGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)機能的活性を有するポリペプチドをコードするか否かに関わらない。これは、特定の核酸分子がGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)機能的活性を有するポリペプチドをコードしない場合でさえ、例えば、ハイブリダイゼーションプローブまたはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマーとしてその核酸を使用する方法を、当業者はなお知っているからである。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)機能的活性を有するポリペプチドをコードしない本発明の核酸分子の使用としては、とりわけ、(1)cDNAライブラリーにおいてGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)遺伝子またはその対立遺伝子改変体もしくはスプライス改変体を単離すること；(2)Vermaら、Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988)に記載されるような、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)遺伝子の正確な染色体位置を提供するための、中期染色体スプレッドに対するインサイチュハイブリダイゼーション(例えば、「FISH」)；ならびに(3)特定の組織におけるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)mRNA発現を検出するためのノーザンブロット分析、が挙げられる。

30

40

**【0207】**

しかし、好ましいのは、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)機能的活性を有するポリペプチドを実際にコードする、本明細書中に開示される核酸配列と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列を有する、核酸分子である。「Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)機能的活性を有するポリ

50

ペプチド」とは、例えば、特定の免疫アッセイまたは生物学的アッセイにおいて測定されるような、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)(例えば、完(全長)Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)、成熟Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)および可溶性Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)(例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の細胞外ドメインまたは領域中に含まれる配列を有する))の機能的活性に類似するが、必ずしも同一でない活性を示すポリペプチドを意図する。例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)機能的活性は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンドに結合するGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの能力を決定することによって慣用的に測定され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)機能的活性はまた、ポリペ

10

#### 【0208】

当然、遺伝子コードの縮重が原因で、例えば、寄託クローンの核酸配列、またはそれらのフラグメントと少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一な配列を有する核酸分子の大多数が、「Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)機能的活性を有する」ポリペプチドをコードすることを、当業者はただちに認識する。実際、これらのヌクレオチド配列のいずれかの縮重改変体はすべて同じポリペプチドをコードするので、多くの場合において、上記の比較アッセイを実施することなしでさえ、これは当業者には明らかである。縮重改変体でないこのような核酸分子について、妥当な数

20

#### 【0209】

例えば、表現型的にサイレントなアミノ酸置換を作製する方法に関する指針が、Bowleら「Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions」Science 247:1306~1310(1990)に提供され、この著者は、変化に対するアミノ酸配列の許容性を研究する2つの主なストラテジーが存在することを示している。

30

#### 【0210】

第1のストラテジーは、進化の過程の間の自然の選択によるアミノ酸置換の許容性を利用する。異なる種におけるアミノ酸配列を比較して、保存的アミノ酸が同定され得る。これらの保存的アミノ酸は、タンパク質の機能について重要であるようである。対照的に、置換が自然の選択によって許容されたアミノ酸の位置は、これらの位置がタンパク質の機能に重要ではないことを示す。従って、アミノ酸置換を許容する位置は、タンパク質の生物学的活性をなおも維持しつつ改変され得る。

#### 【0211】

第2のストラテジーは、タンパク質機能に重要な領域を同定するために、クローン化された遺伝子の特定の位置でアミノ酸変化を導入するための遺伝子工学を使用する。例えば、部位指向性変異誘発またはアラニンスキニング変異誘発(分子中のどの残基にも1つのアラニン変異の導入)が、使用され得る。(CunninghamおよびWells, Science 244:1081-1085(1989))。次いで、得られた変異分子は生物学的活性について試験され得る。

40

#### 【0212】

著者らが述べるように、これらの2つのストラテジーは、タンパク質がアミノ酸置換に驚くほど寛容であることを明らかにした。著者らはさらに、どのアミノ酸変化が、タンパク質中の特定のアミノ酸位置で許容されるようであることを示す。例えば、最も埋もれてい

50

る（タンパク質の三次構造内の）アミノ酸残基は、非極性側鎖を必要とするが、表面側鎖の特徴は、一般にほとんど保存されない。さらに、寛容される保存的なアミノ酸置換は、脂肪族または疎水性アミノ酸のAla、Val、Leu、およびIleの置換；ヒドロキシル残基のSerおよびThrの置換；酸性残基のAspおよびGluの置換；アミド残基のAsnおよびGlnの置換、塩基性残基のLys、Arg、およびHisの置換；芳香族残基のPhe、Tyr、およびTrpの置換、ならびに小さなサイズのアミノ酸のAla、Ser、Thr、Met、およびGlyの置換を含む。

【0213】

例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアミノ酸レベルでの変化に関する部位は、特定のアミノ酸を保存的なアミノ酸で置換することによってなされ得る。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）（配列番号2）の好ましい保存的な変異としては、以下が挙げられる：A、G、I、L、S、T、またはVで置換されたM1；Eで置換されたD2；F、またはWで置換されたY3；Nで置換されたQ4；A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV5；A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS6；A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS7；A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI9；F、またはWで置換されたY10；Eで置換されたD11；A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI12；Qで置換されたN13；F、またはWで置換されたY14；F、またはWで置換されたY15；A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT16；A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS17；Dで置換されたE18；H、またはRで置換されたK22；A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI23；Qで置換されたN24；A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV25；H、またはRで置換されたK26；Nで置換されたQ27；A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI28；G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA29；G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA30；H、またはKで置換されたR31；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL32；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL33；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL36；F、またはWで置換されたY37；A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS38；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL39；A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV40；W、またはYで置換されたF41；A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI42；W、またはYで置換されたF43；A、I、L、S、T、M、またはVで置換されたG44；W、またはYで置換されたF45；A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV46；A、I、L、S、T、M、またはVで置換されたG47；Qで置換されたN48；A、G、I、L、S、T、またはVで置換されたM49；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL50；A、G、I、L、S、T、またはMで置換されたV51；A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI52；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL53；A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI54；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL55；A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI56；Qで置換されたN57；Nで置換されたQ59；H、またはKで置換されたR60；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL61；Dで置換されたE62；A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS63；A、G、I、L、S、T、またはVで置換されたM64；A、G、I、L、S、M、またはVで置換されたT65；Eで置換されたD66；A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI67；F、またはWで置換されたY68；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL69；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL70；Qで置換されたN71；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL72；G、I、L、S、T、M、またはVで置換されたA73；A、G、L、S、T、M、またはVで置換されたI74；A、G、I、L、T、M、またはVで置換されたS75；Eで置換されたD76；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL77；W、またはYで置換されたF78；W、またはYで置換されたF79；A、G、I、S、T、M、またはVで置換されたL80；A、G、I、S、T、M、またはVで置

換された L 8 1 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 8 2 ; A , G , I ,  
 L , S , T , または M で置換された V 8 3 ; W , または Y で置換された F 8 5 ; F , また  
 は Y で置換された W 8 6 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 8 7 ; K ,  
 または R で置換された H 8 8 ; F , または W で置換された Y 8 9 ; G , I , L , S , T ,  
 M , または V で置換された ; A 9 1 G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 9  
 0 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 9 2 ; N で置換された Q 9 3 ; F  
 , または Y で置換された W 9 4 ; E で置換された D 9 5 ; W , または Y で置換された F 9  
 6 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 9 7 ; Q で置換された N 9 8 ; A  
 , G , I , L , S , M , または V で置換された T 9 9 ; A , G , I , L , S , T , または  
 V で置換された M 1 0 0 ; N で置換された Q 1 0 2 ; A , G , I , S , T , M , または V 10  
 で置換された L 1 0 3 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 0 4 ; A ,  
 G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 0 5 ; A , I , L , S , T , M , または  
 V で置換された G 1 0 6 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 0 7 ; F  
 , または W で置換された Y 1 0 8 ; W , または Y で置換された F 1 0 9 ; A , G , L , S  
 , T , M , または V で置換された I 1 1 0 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換さ  
 れた G 1 1 1 ; W , または Y で置換された F 1 1 2 ; W , または Y で置換された F 1 1 3  
 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 1 4 ; A , I , L , S , T , M ,  
 または V で置換された G 1 1 5 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 1  
 6 ; W , または Y で置換された F 1 1 7 ; W , または Y で置換された F 1 1 8 ; A , G ,  
 L , S , T , M , または V で置換された I 1 1 9 ; A , G , L , S , T , M , または V で 20  
 置換された I 1 2 0 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 2 1 ; A , G  
 , I , S , T , M , または V で置換された L 1 2 2 ; A , G , I , L , S , M , または V  
 で置換された T 1 2 3 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 2 4 ; E で  
 置換された D 1 2 5 ; H , または K で置換された R 1 2 6 ; F , または W で置換された Y  
 1 2 7 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 2 8 ; G , I , L , S , T  
 , M , または V で置換された A 1 2 9 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された  
 I 1 3 0 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 1 3 1 ; K , または R で置  
 換された H 1 3 2 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 1 3 3 ; A , G ,  
 I , L , S , T , または M で置換された V 1 3 4 ; W , または Y で置換された F 1 3 5 ;  
 G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 1 3 6 ; A , G , I , S , T , M , ま 30  
 たは V で置換された L 1 3 7 ; H , または R で置換された K 1 3 8 ; G , I , L , S , T  
 , M , または V で置換された A 1 3 9 ; H , または K で置換された R 1 4 0 ; A , G , I  
 , L , S , M , または V で置換された T 1 4 1 ; A , G , I , L , S , T , または M で置  
 換された V 1 4 2 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 4 3 ; W , また  
 は Y で置換された F 1 4 4 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 1 4 5 ;  
 A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 1 4 6 ; A , G , I , L , S , T , ま  
 たは M で置換された V 1 4 7 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 4 8  
 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 4 9 ; A , G , I , L , S , T ,  
 または M で置換された V 1 5 0 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 5  
 1 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 5 2 ; F , または Y で置換され 40  
 た W 1 5 3 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 1 5 4 ; A , G , I , L  
 , S , T , または M で置換された V 1 5 5 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換さ  
 れた A 1 5 6 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 1 5 7 ; W , または Y  
 で置換された F 1 5 8 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 1 5 9 ; A ,  
 G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 6 0 ; A , G , I , S , T , M , または  
 V で置換された L 1 6 1 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 1 6 3 ; A  
 , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 6 4 ; A , G , L , S , T , M , また  
 は V で置換された I 1 6 5 ; W , または Y で置換された F 1 6 6 ; A , G , I , L , S ,  
 M , または V で置換された T 1 6 7 ; H , または K で置換された R 1 6 8 ; A , G , I ,  
 L , T , M , または V で置換された S 1 6 9 ; N で置換された Q 1 7 0 ; H , または R で 50

置換された K 1 7 1 ; D で置換された E 1 7 2 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 1 7 3 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 7 4 ; K , または R で置換された H 1 7 5 ; F , または W で置換された Y 1 7 6 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 7 7 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 7 9 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 8 0 ; K , または R で置換された H 1 8 1 ; W , または Y で置換された F 1 8 2 ; F , または W で置換された Y 1 8 4 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 8 5 ; N で置換された Q 1 8 6 ; F , または W で置換された Y 1 8 7 ; N で置換された Q 1 8 8 ; W , または Y で置換された F 1 8 9 ; F , または Y で置換された W 1 9 0 ; H , または R で置換された K 1 9 1 ; Q で置換された N 1 9 2 ; W , または Y で置換された F 1 9 3 ; N で置換された Q 1 9 4 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 9 5 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 9 6 ; H , または R で置換された K 1 9 7 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 9 8 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 1 9 9 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 0 0 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 0 1 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 2 0 2 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 0 3 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 2 0 4 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 0 5 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 0 7 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 0 8 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 2 0 9 ; A , G , I , L , S , T , または V で置換された M 2 1 0 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 2 1 1 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 1 2 ; F , または W で置換された Y 2 1 4 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 2 1 5 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 2 1 6 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 1 7 ; L 2 1 8 A , G , I , S , T , M , または V で置換された ; H , または R で置換された K 2 1 9 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 2 2 0 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 2 1 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 2 2 ; H , または K で置換された R 2 2 3 ; H , または K で置換された R 2 2 5 ; Q で置換された N 2 2 6 ; D で置換された E 2 2 7 ; H , または R で置換された K 2 2 8 ; H , または R で置換された K 2 2 9 ; H , または K で置換された R 2 3 0 ; K , または R で置換された H 2 3 1 ; H , または K で置換された R 2 3 2 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 2 3 3 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 2 3 4 ; H , または K で置換された R 2 3 5 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 3 6 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 3 7 ; W , または Y で置換された F 2 3 8 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 2 3 9 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 4 0 ; A , G , I , L , S , T , または V で置換された M 2 4 1 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 4 2 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 2 4 3 ; F , または W で置換された Y 2 4 4 ; W , または Y で置換された F 2 4 5 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 4 6 ; W , または Y で置換された F 2 4 7 ; F , または Y で置換された W 2 4 8 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 2 4 9 ; F , または W で置換された Y 2 5 1 ; Q で置換された N 2 5 2 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 5 3 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 2 5 4 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 5 5 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 5 6 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 5 7 ; Q で置換された N 2 5 8 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 2 5 9 ; W , または Y で置換された F 2 6 0 ; N で置換された Q 2 6 1 ; D で置換された E 2 6 2 ; W , または Y で置換された F 2 6 3 ; W , または Y で置換された F 2 6 4 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 2 6 5 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 6 6 ; Q で置換された N 2 6 7 ; Q で置換された N 2 6 8 ; A

, G , I , L , T , M , または V で置換された S 2 7 0 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 2 7 1 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 2 7 2 ; Q で置換された N 2 7 3 ; H , または K で置換された R 2 7 4 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 7 5 ; E で置換された D 2 7 6 ; N で置換された Q 2 7 7 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 2 7 8 ; A , G , I , L , S , T , または V で置換された M 2 7 9 ; N で置換された Q 2 8 0 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 2 8 1 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 2 8 2 ; D で置換された E 2 8 3 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 2 8 4 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 8 5 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 2 8 6 ; A , G , I , L , S , T , または V で置換された M 2 8 7 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 2 8 8 ; K , または R で置換された H 2 8 9 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 9 2 ; Q で置換された N 2 9 3 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 9 5 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 9 6 ; F , または W で置換された Y 2 9 7 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 2 9 8 ; W , または Y で置換された F 2 9 9 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 3 0 0 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 3 0 1 ; D で置換された E 3 0 2 ; H , または R で置換された K 3 0 3 ; W , または Y で置換された F 3 0 4 ; H , または K で置換された R 3 0 5 ; Q で置換された N 3 0 6 ; F , または W で置換された Y 3 0 7 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 3 0 8 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 3 0 9 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 3 1 0 ; W , または Y で置換された F 3 1 1 ; W , または Y で置換された F 3 1 2 ; N で置換された Q 3 1 3 ; H , または R で置換された K 3 1 4 ; K , または R で置換された H 3 1 5 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 3 1 6 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 3 1 7 ; H , または R で置換された K 3 1 8 ; H , または K で置換された R 3 1 9 ; W , または Y で置換された F 3 2 0 ; H , または R で置換された K 3 2 2 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 3 2 5 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 3 2 6 ; W , または Y で置換された F 3 2 7 ; N で置換された Q 3 2 8 ; N で置換された Q 3 2 9 ; D で置換された E 3 3 0 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 3 3 1 ; D で置換された E 3 3 3 ; H , または K で置換された R 3 3 4 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 3 3 5 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 3 3 6 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 3 3 7 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 3 3 8 ; F , または W で置換された Y 3 3 9 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 3 4 0 ; H , または K で置換された R 3 4 1 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 3 4 2 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 3 4 3 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 3 4 4 ; D で置換された E 3 4 5 ; N で置換された Q 3 4 6 ; D で置換された E 3 4 7 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 3 4 8 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 3 4 9 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 3 5 0 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 3 5 1 ; および / あるいは A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 3 5 2 。

【 0 2 1 4 】

寄託された H D G N R 1 0 クローンによってコードされるような G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ( 配列番号 2 2 ) の好ましい保存的変異としては、以下が挙げられる : A , G , I , L , S , T , または V で置換された M 1 ; E で置換された D 2 ; F , または W で置換された Y 3 ; N で置換された Q 4 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 5 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 6 ; S 7 A , G , I , L , T , M , または V で置換された ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 9 ; F , または W で置換された Y 1 0 ; E で置換された D 1 1 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 2 ; Q で置換された N 1 3 ; F , または W で置換された

Y 1 4 ; F , または W で置換された Y 1 5 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 6 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 7 ; D で置換された E 1 8 ; N で置換された Q 2 1 ; H , または R で置換された K 2 2 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 3 ; Q で置換された N 2 4 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 2 5 ; H , または R で置換された ; Q 2 7 N で置換された K 2 6 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 2 8 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 2 9 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 3 0 ; H , または K で置換された R 3 1 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 3 2 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 3 3 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 3 6 ; F , または W で置換された Y 3 7 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 3 8 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 3 9 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 4 0 ; W , または Y で置換された F 4 1 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 4 2 ; W , または Y で置換された F 4 3 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 4 4 ; W , または Y で置換された F 4 5 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 4 6 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 4 7 ; Q で置換された N 4 8 ; A , G , I , L , S , T , または V で置換された M 4 9 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 5 0 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 5 1 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 5 2 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 5 3 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 5 4 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 5 5 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 5 6 ; Q で置換された N 5 7 ; H , または R で置換された K 5 9 ; H , または K で置換された R 6 0 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 6 1 ; H , または R で置換された K 6 2 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 6 3 ; A , G , I , L , S , T , または V で置換された M 6 4 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 6 5 ; E で置換された D 6 6 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 6 7 ; F , または W で置換された Y 6 8 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 6 9 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 7 0 ; Q で置換された N 7 1 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 7 2 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 7 3 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 7 4 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 7 5 ; E で置換された D 7 6 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 7 7 ; W , または Y で置換された F 7 8 ; W , または Y で置換された F 7 9 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 8 0 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 8 1 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 8 2 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 8 3 ; W , または Y で置換された F 8 5 ; F , または Y で置換された W 8 6 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 8 7 ; K , または R で置換された H 8 8 ; F , または W で置換された Y 8 9 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 9 0 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 9 1 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 9 2 ; N で置換された Q 9 3 ; F , または Y で置換された W 9 4 ; E で置換された D 9 5 ; W , または Y で置換された F 9 6 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 9 7 ; Q で置換された N 9 8 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 9 9 ; A , G , I , L , S , T , または V で置換された M 1 0 0 ; N で置換された Q 1 0 2 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 0 3 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 0 4 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 0 5 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 1 0 6 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 0 7 ; F , または W で置換された Y 1 0 8 ; W , または Y で置換された F 1 0 9 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 1 0 ; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 1 1 1 ; W , または Y で置換された F 1 1 2 ; W , または Y で置換された F 1 1 3 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 1 4

10

20

30

40

50

; A , I , L , S , T , M , または V で置換された G 1 1 5 ; A , G , L , S , T , M ,  
 または V で置換された I 1 1 6 ; W , または Y で置換された F 1 1 7 ; W , または Y で置  
 換された F 1 1 8 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 1 9 ; A , G ,  
 L , S , T , M , または V で置換された I 1 2 0 ; A , G , I , S , T , M , または V で  
 置換された L 1 2 1 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 2 2 ; A , G  
 , I , L , S , M , または V で置換された T 1 2 3 ; A , G , L , S , T , M , または V  
 で置換された I 1 2 4 ; E で置換された D 1 2 5 ; H , または K で置換された R 1 2 6 ;  
 F , または W で置換された Y 1 2 7 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L  
 1 2 8 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 1 2 9 ; A , G , I , L , S  
 , T , または M で置換された V 1 3 0 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された 10  
 V 1 3 1 ; K , または R で置換された H 1 3 2 ; G , I , L , S , T , M , または V で置  
 換された A 1 3 3 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 1 3 4 ; W , また  
 は Y で置換された F 1 3 5 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 1 3 6 ;  
 A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 3 7 ; H , または R で置換された K  
 1 3 8 ; G , I , L , S , T , M , または V で置換された A 1 3 9 ; H , または K で置換  
 された R 1 4 0 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 4 1 ; A , G , I  
 , L , S , T , または M で置換された V 1 4 2 ; A , G , I , L , S , M , または V で置  
 換された T 1 4 3 ; W , または Y で置換された F 1 4 4 ; A , I , L , S , T , M , また  
 は V で置換された G 1 4 5 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 1 4 6 ;  
 A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 1 4 7 ; A , G , I , L , S , M , ま 20  
 たは V で置換された T 1 4 8 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 4 9  
 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 1 5 0 ; A , G , L , S , T , M ,  
 または V で置換された I 1 5 1 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 5  
 2 ; F , または Y で置換された W 1 5 3 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換され  
 た V 1 5 4 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 1 5 5 ; G , I , L , S  
 , T , M , または V で置換された A 1 5 6 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換さ  
 れた V 1 5 7 ; W , または Y で置換された F 1 5 8 ; G , I , L , S , T , M , または V  
 で置換された A 1 5 9 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 6 0 ; A ,  
 G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 6 1 ; A , I , L , S , T , M , または  
 V で置換された G 1 6 3 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 6 4 ; A 30  
 , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 6 5 ; W , または Y で置換された F 1  
 6 6 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 6 7 ; H , または K で置換さ  
 れた R 1 6 8 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 6 9 ; N で置換され  
 た Q 1 7 0 ; H , または R で置換された K 1 7 1 ; D で置換された E 1 7 2 ; A , I , L  
 , S , T , M , または V で置換された G 1 7 3 ; A , G , I , S , T , M , または V で置  
 換された L 1 7 4 ; K , または R で置換された H 1 7 5 ; F , または W で置換された Y 1  
 7 6 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 7 7 ; A , G , I , L , T ,  
 M , または V で置換された S 1 7 9 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S  
 1 8 0 ; K , または R で置換された H 1 8 1 ; W , または Y で置換された F 1 8 2 ; F ,  
 または W で置換された Y 1 8 4 ; A , G , I , L , T , M , または V で置換された S 1 8 40  
 5 ; N で置換された Q 1 8 6 ; F , または W で置換された Y 1 8 7 ; N で置換された Q 1  
 8 8 ; W , または Y で置換された F 1 8 9 ; F , または Y で置換された W 1 9 0 ; H , ま  
 たは R で置換された K 1 9 1 ; Q で置換された N 1 9 2 ; W , または Y で置換された F 1  
 9 3 ; N で置換された Q 1 9 4 ; A , G , I , L , S , M , または V で置換された T 1 9  
 5 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 1 9 6 ; H , または R で置換され  
 た K 1 9 7 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換された I 1 9 8 ; A , G , I , L  
 , S , T , または M で置換された V 1 9 9 ; A , G , L , S , T , M , または V で置換さ  
 れた I 2 0 0 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換された L 2 0 1 ; A , I , L ,  
 S , T , M , または V で置換された G 2 0 2 ; A , G , I , S , T , M , または V で置換  
 された L 2 0 3 ; A , G , I , L , S , T , または M で置換された V 2 0 4 ; A , G , I 50

, S, T, M, または V で置換された L 2 0 5 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 0 7 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 0 8 ; A, G, I, L, S, T, または M で置換された V 2 0 9 ; A, G, I, L, S, T, または V で置換された M 2 1 0 ; A, G, I, L, S, T, または M で置換された V 2 1 1 ; A, G, L, S, T, M, または V で置換された I 2 1 2 ; F, または W で置換された Y 2 1 4 ; A, G, I, L, T, M, または V で置換された S 2 1 5 ; A, I, L, S, T, M, または V で置換された G 2 1 6 ; A, G, L, S, T, M, または V で置換された I 2 1 7 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 1 8 ; H, または R で置換された K 2 1 9 ; A, G, I, L, S, M, または V で置換された T 2 2 0 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 2 1 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 2 2 ; H, または K で置換された R 2 2 3 ; H, または K で置換された R 2 2 5 ; Q で置換された N 2 2 6 ; D で置換された E 2 2 7 ; H, または R で置換された K 2 2 8 ; H, または R で置換された K 2 2 9 ; H, または K で置換された R 2 3 0 ; K, または R で置換された H 2 3 1 ; H, または K で置換された R 2 3 2 ; G, I, L, S, T, M, または V で置換された A 2 3 3 ; A, G, I, L, S, T, または M で置換された V 2 3 4 ; H, または K で置換された R 2 3 5 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 3 6 ; A, G, L, S, T, M, または V で置換された I 2 3 7 ; W, または Y で置換された F 2 3 8 ; A, G, I, L, S, M, または V で置換された T 2 3 9 ; A, G, L, S, T, M, または V で置換された I 2 4 0 ; A, G, I, L, S, T, または V で置換された M 2 4 1 ; A, G, L, S, T, M, または V で置換された I 2 4 2 ; A, G, I, L, S, T, または M で置換された V 2 4 3 ; F, または W で置換された Y 2 4 4 ; W, または Y で置換された F 2 4 5 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 4 6 ; W, または Y で置換された F 2 4 7 ; F, または Y で置換された W 2 4 8 ; G, I, L, S, T, M, または V で置換された A 2 4 9 ; F, または W で置換された Y 2 5 1 ; Q で置換された N 2 5 2 ; A, G, L, S, T, M, または V で置換された I 2 5 3 ; A, G, I, L, S, T, または M で置換された V 2 5 4 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 5 5 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 5 6 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 5 7 ; Q で置換された N 2 5 8 ; A, G, I, L, S, M, または V で置換された T 2 5 9 ; W, または Y で置換された F 2 6 0 ; N で置換された Q 2 6 1 ; D で置換された E 2 6 2 ; W, または Y で置換された F 2 6 3 ; W, または Y で置換された F 2 6 4 ; A, I, L, S, T, M, または V で置換された G 2 6 5 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 6 6 ; Q で置換された N 2 6 7 ; Q で置換された N 2 6 8 ; A, G, I, L, T, M, または V で置換された S 2 7 0 ; A, G, I, L, T, M, または V で置換された S 2 7 1 ; A, G, I, L, T, M, または V で置換された S 2 7 2 ; Q で置換された N 2 7 3 ; H, または K で置換された R 2 7 4 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 7 5 ; E で置換された D 2 7 6 ; N で置換された Q 2 7 7 ; G, I, L, S, T, M, または V で置換された A 2 7 8 ; A, G, I, L, S, T, または V で置換された M 2 7 9 ; N で置換された Q 2 8 0 ; A, G, I, L, S, T, または M で置換された V 2 8 1 ; A, G, I, L, S, M, または V で置換された T 2 8 2 ; D で置換された E 2 8 3 ; A, G, I, L, S, M, または V で置換された T 2 8 4 ; A, G, I, S, T, M, または V で置換された L 2 8 5 ; A, I, L, S, T, M, または V で置換された G 2 8 6 ; A, G, I, L, S, T, または V で置換された M 2 8 7 ; A, G, I, L, S, M, または V で置換された T 2 8 8 ; K, または R で置換された H 2 8 9 ; A, G, L, S, T, M, または V で置換された I 2 9 2 ; Q で置換された N 2 9 3 ; A, G, L, S, T, M, または V で置換された I 2 9 5 ; A, G, L, S, T, M, または V で置換された I 2 9 6 ; F, または W で置換された Y 2 9 7 ; G, I, L, S, T, M, または V で置換された A 2 9 8 ; W, または Y で置換された F 2 9 9 ; A, G, I, L, S, T, または M で置換された V 3 0 0 ; A, I, L, S, T, M, または V で置換された G 3 0 1 ; D で置換された E 3 0 2 ; H, または R で置換された K 3 0 3

10

20

30

40

50

；W，またはYで置換されたF 3 0 4；H，またはKで置換されたR 3 0 5；Qで置換されたN 3 0 6；F，またはWで置換されたY 3 0 7；A，G，I，S，T，M，またはVで置換されたL 3 0 8；A，G，I，S，T，M，またはVで置換されたL 3 0 9；A，G，I，L，S，T，またはMで置換されたV 3 1 0；W，またはYで置換されたF 3 1 1；W，またはYで置換されたF 3 1 2；Nで置換されたQ 3 1 3；H，またはRで置換されたK 3 1 4；K，またはRで置換されたH 3 1 5；A，G，L，S，T，M，またはVで置換されたI 3 1 6；G，I，L，S，T，M，またはVで置換されたA 3 1 7；H，またはRで置換されたK 3 1 8；H，またはKで置換されたR 3 1 9；W，またはYで置換されたF 3 2 0；H，またはRで置換されたK 3 2 2；A，G，I，L，T，M，またはVで置換されたS 3 2 5；A，G，L，S，T，M，またはVで置換されたI 3 2 6；W，またはYで置換されたF 3 2 7；Nで置換されたQ 3 2 8；Nで置換されたQ 3 2 9；Dで置換されたE 3 3 0；G，I，L，S，T，M，またはVで置換されたA 3 3 1；Dで置換されたE 3 3 3；H，またはKで置換されたR 3 3 4；G，I，L，S，T，M，またはVで置換されたA 3 3 5；A，G，I，L，T，M，またはVで置換されたS 3 3 6；A，G，I，L，T，M，またはVで置換されたS 3 3 7；A，G，I，L，S，T，またはMで置換されたV 3 3 8；F，またはWで置換されたY 3 3 9；A，G，I，L，S，M，またはVで置換されたT 3 4 0；H，またはKで置換されたR 3 4 1；A，G，I，L，T，M，またはVで置換されたS 3 4 2；A，G，I，L，S，M，またはVで置換されたT 3 4 3；Dで置換されたE 3 4 4；E 3 4 5 Dで置換された；Nで置換されたQ 3 4 6；Dで置換されたE 3 4 7；A，G，L，S，T，M，またはVで置換されたI 3 4 8；A，G，I，L，T，M，またはVで置換されたS 3 4 9；A，G，I，L，S，T，またはMで置換されたV 3 5 0；A，I，L，S，T，M，またはVで置換されたG 3 5 1；および/あるいはA，G，I，S，T，M，またはVで置換されたL 3 5 2。

10

20

30

40

50

#### 【0215】

得られた構築物は、本明細書にわたって記載されるかまたは当該分野で公知の活性または機能について慣用的にスクリーニングされ得る。好ましくは、得られた構築物は、増加および/または減少したGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性または機能を有し、一方、残りのGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性または機能は、維持される。さらに好ましくは、得られた構築物は、1つより多い増加および/または減少したGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性または機能を有し、一方、残りのGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性または機能は、維持される。

#### 【0216】

保存的なアミノ酸置換以外に、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）改変体は、(i) 1つ以上の非保存的なアミノ酸残基での置換、ここでは置換されるアミノ酸残基は、遺伝コードによってコードされるアミノ酸残基であってもよいし、そうでなくてもよい、あるいは(ii) 置換基を有する1つ以上のアミノ酸残基での置換、あるいは(iii) 別の化合物（例えば、ポリペプチドの安定性および/もしくは可溶性を増加するための化合物（例えば、ポリエチレングリコール））との成熟ポリペプチドの融合、あるいは(iv) さらなるアミノ酸（例えば、IgG Fc融合領域ペプチド、またはリーダーもしくは分泌配列、または精製を容易にする配列）とのポリペプチドの融合を含む。このような改変体ポリペプチドは、本明細書中の教示から、当業者の範囲内であることが考えられる。

#### 【0217】

例えば、荷電アミノ酸の他の荷電アミノ酸または中性のアミノ酸とのアミノ酸置換を含むGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチド改変体は、改善した特性（例えば、より低い凝集）を有するタンパク質を生成し得る。薬学的処方物の凝集は、この凝集の免疫原性活性に起因して、活性を減少させもするし、かつクリアランスを増加させもする。（Pinc kardら，Clin. Exp. Immunol. 2: 331 - 3

40 (1967); Robbinsら, Diabetes 36: 838 - 845 (1987); Clelandら, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10: 307 - 377 (1993)。

【0218】

例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)(配列番号2)の好ましい非保存的置換には以下が挙げられる：M1(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；D2(以下と置換された：H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、PまたはC)；Y3(以下と置換された：D、E、H、H、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、PまたはC)；Q4(以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、Y、M、V、F、W、Y、P、またはC)；V5(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、PまたはC)；S6(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、PまたはC)；S7(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、PまたはC)；P8(以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC)；I9(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、PまたはC)；Y10(以下と置換されたD、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；D11(以下と置換された：H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、PまたはC)；I12(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；N13(以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、PまたはC)；Y14(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；Y15(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；T16(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；S17(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；E18(以下と置換された：H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；P19(以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC)；C20(以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP)；P21(以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC)；K22(以下と置換された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；I23(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；N24(以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC)；V25(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；K26(以下と置換された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；Q27(以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC)；I28(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；A29(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；A30(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；R31(以下と置換された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；L32(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；L33(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；P34(以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC)；P35(以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC)；L36(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；Y37(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；S38(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、ま

10

20

30

40

50

たはC) ; L 3 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、  
 またはC) ; V 4 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P  
 、またはC) ; F 4 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、  
 L、S、T、M、V、P、またはC) ; I 4 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R  
 、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 4 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R  
 、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; G 4 4 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 4 5 (以下と置換さ  
 れた : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)  
 ; V 4 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ) ; G 4 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、または  
 C) ; N 4 8 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、  
 V、F、W、Y、P、またはC) ; M 4 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N  
 、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 5 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 5 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R  
 、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 5 2 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 5 3 (以下と置換された : D、E、H、K  
 、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 5 4 (以下と置換された : D、E、H、  
 K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 5 5 (以下と置換された : D、E、H  
 、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 5 6 (以下と置換された : D、E、  
 H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; N 5 7 (以下と置換された : D、E  
 、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; C 5 8  
 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、  
 F、W、Y、またはP) ; Q 5 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I  
 、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; R 6 0 (以下と置換された : D、  
 E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 6 1 (以下  
 と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; E 6 2  
 (以下と置換された : H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、  
 Y、P、またはC) ; S 6 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W  
 、Y、P、またはC) ; M 6 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、  
 W、Y、P、またはC) ; T 6 5 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F  
 、W、Y、P、またはC) ; D 6 6 (以下と置換された : H、K、R、A、G、I、L、  
 S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 6 7 (以下と置換された : D  
 、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Y 6 8 (以下と置換された :  
 D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; L 6 9  
 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L  
 7 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 N 7 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F  
 、W、Y、P、またはC) ; L 7 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC) ; A 7 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q  
 、F、W、Y、P、またはC) ; I 7 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; S 7 5 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N  
 、Q、F、W、Y、P、またはC) ; D 7 6 (以下と置換された : H、K、R、A、G、  
 I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 7 7 (以下と置換さ  
 れた : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 7 8 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC  
 ) ; F 7 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T  
 、M、V、P、またはC) ; L 8 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC) ; L 8 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q  
 、F、W、Y、P、またはC) ; T 8 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 8 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N

10

20

30

40

50



はC) ; R 1 2 6 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; Y 1 2 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; L 1 2 8 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; A 1 2 9 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 1 3 0 (以下と  
 置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 1 3 1 (以  
 下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; H 1 3 2  
 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、  
 P、またはC) ; A 1 3 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、  
 Y、P、またはC) ; V 1 3 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、  
 W、Y、P、またはC) ; F 1 3 5 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、  
 A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; A 1 3 6 (以下と置換された : D、  
 E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 1 3 7 (以下と置換された :  
 D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; K 1 3 8 (以下と置換され  
 た : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 A 1 3 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、または  
 C) ; R 1 4 0 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q  
 、F、W、Y、P、またはC) ; T 1 4 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N  
 、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 1 4 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R  
 、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; T 1 4 3 (以下と置換された : D、E、H、K  
 、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 1 4 4 (以下と置換された : D、E、H  
 、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; G 1 4 5 (以下  
 と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 1 4 6 (以  
 下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 1 4  
 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; T  
 1 4 8 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)  
 ; S 1 4 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、または  
 C) ; V 1 5 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、ま  
 たはC) ; I 1 5 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P  
 、またはC) ; T 1 5 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y  
 、P、またはC) ; W 1 5 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G  
 、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; V 1 5 4 (以下と置換された : D、E、H  
 、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 1 5 5 (以下と置換された : D、E  
 、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; A 1 5 6 (以下と置換された : D  
 、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 1 5 7 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 1 5 8 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC  
 ) ; A 1 5 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC) ; S 1 6 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、  
 またはC) ; L 1 6 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、  
 P、またはC) ; P 1 6 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、  
 S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC) ; G 1 6 3 (以下と置換された : D、  
 E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 1 6 4 (以下と置換された :  
 D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 1 6 5 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 1 6 6 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC  
 ) ; T 1 6 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC) ; R 1 6 8 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; S 1 6 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Q 1 7 0 (以下と置換された : D、E、H、K、



K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; C 2 1 3 (以下と置換された : D、E、  
 H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP) ; Y 2  
 1 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、  
 V、P、またはC) ; S 2 1 5 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、  
 W、Y、P、またはC) ; G 2 1 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC) ; 1 2 1 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2 1 8 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; K 2 1 9 (以下と置換された : D、E、A、G、  
 I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 T 2 2 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC 10  
 ) ; L 2 2 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC) ; L 2 2 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、  
 またはC) ; R 2 2 3 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; C 2 2 4 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP) ; R 2 2 5 (以  
 下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、  
 またはC) ; N 2 2 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、  
 T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; E 2 2 7 (以下と置換された : H、K、R、  
 A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; K 2 2 8 (以  
 下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、 20  
 またはC) ; K 2 2 9 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; R 2 3 0 (以下と置換された : D、E、A、G、  
 I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; H 2 3 1 (以下と置換  
 された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ) ; R 2 3 2 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC) ; A 2 3 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 2 3 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R  
 、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; R 2 3 5 (以下と置換された : D、E、A、G  
 、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2 3 6 (以下と置  
 換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 2 3 7 (以下 30  
 と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 2 3 8 (  
 以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P  
 、またはC) ; T 2 3 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y  
 、P、またはC) ; I 2 4 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W  
 、Y、P、またはC) ; M 2 4 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F  
 、W、Y、P、またはC) ; I 2 4 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q  
 、F、W、Y、P、またはC) ; V 2 4 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N  
 、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Y 2 4 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R  
 、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; F 2 4 5 (以下と置換さ  
 れた : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) 40  
 ; L 2 4 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、または  
 C) ; F 2 4 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S  
 、T、M、V、P、またはC) ; W 2 4 8 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N  
 、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; A 2 4 9 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; P 2 5 0 (以下と置換さ  
 れた : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、ま  
 たはC) ; Y 2 5 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、  
 L、S、T、M、V、P、またはC) ; N 2 5 2 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; 1 2 5 3 (以下と  
 置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 2 5 4 (以 50

下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；L 2 5 5  
 （以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；L 2  
 5 6（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；  
 L 2 5 7（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ）；N 2 5 8（以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、  
 V、F、W、Y、P、またはC）；T 2 5 9（以下と置換された：D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC）；F 2 6 0（以下と置換された：D、E、H、K、  
 R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC）；Q 2 6 1（以下と置換  
 された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、また  
 はC）；E 2 6 2（以下と置換された：H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC）；F 2 6 3（以下と置換された：D、E、H、K、  
 R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC）；F 2 6 4（以下と置換  
 された：D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC  
 ）；G 2 6 5（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC）；L 2 6 6（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、  
 またはC）；N 2 6 7（以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、  
 T、M、V、F、W、Y、P、またはC）；N 2 6 8（以下と置換された：D、E、H、  
 K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC）；C 2 6 9（以  
 下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、  
 W、Y、またはP）；S 2 7 0（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、  
 W、Y、P、またはC）；S 2 7 1（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC）；S 2 7 2（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC）；N 2 7 3（以下と置換された：D、E、H、K、R、  
 A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC）；R 2 7 4（以下と置換  
 された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ）；L 2 7 5（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC）；D 2 7 6（以下と置換された：H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Q 2 7 7（以下と置換された：D、E、H、K、  
 R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC）；A 2 7 8（以下と  
 置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；M 2 7 9（以  
 下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Q 2 8 0  
 （以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W  
 、Y、P、またはC）；V 2 8 1（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F  
 、W、Y、P、またはC）；T 2 8 2（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q  
 、F、W、Y、P、またはC）；E 2 8 3（以下と置換された：H、K、R、A、G、I  
 、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；T 2 8 4（以下と置換さ  
 れた：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；L 2 8 5（以下と置  
 換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；G 2 8 6（以下  
 と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；M 2 8 7（  
 以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；T 2 8  
 8（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；H  
 2 8 9（以下と置換された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W  
 、Y、P、またはC）；C 2 9 0（以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I  
 、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP）；C 2 9 1（以下と置換された  
 ：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、または  
 P）；I 2 9 2（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、ま  
 たはC）；N 2 9 3（以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T  
 、M、V、F、W、Y、P、またはC）；P 2 9 4（以下と置換された：D、E、H、K  
 、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC）；I 2 9 5（  
 以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；I 2 9

10

20

30

40

50

6 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC); Y  
 297 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M  
 、V、P、またはC); A298 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC); F299 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、  
 Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC); V300 (以下と置換された:  
 D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC); G301 (以下と置換され  
 た: D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC); E302 (以下と置換  
 された: H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC); K303 (以下と置換された: D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC); F304 (以下と置換された: D、E、H、K、R、  
 N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC); R305 (以下と置換され  
 た: D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC);  
 N306 (以下と置換された: D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 F、W、Y、P、またはC); Y307 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、  
 Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC); L308 (以下と置換された:  
 D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC); L309 (以下と置換され  
 た: D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC); V310 (以下と置換  
 された: D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC); F311 (以下と  
 置換された: D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、また  
 はC); F312 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、  
 S、T、M、V、P、またはC); Q313 (以下と置換された: D、E、H、K、R、  
 A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC); K314 (以下と置換  
 された: D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ); H315 (以下と置換された: D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC); I316 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC); A317 (以下と置換された: D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC); K318 (以下と置換された: D、E、A、G、  
 I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC); R319 (以下と置換  
 された: D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ); F320 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、  
 T、M、V、P、またはC); C321 (以下と置換された: D、E、H、K、R、A、  
 G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP); K322 (以下と置換  
 された: D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ); C323 (以下と置換された: D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、  
 V、N、Q、F、W、Y、またはP); C324 (以下と置換された: D、E、H、K、  
 R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP);  
 S325 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ); I326 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC); F327 (以下と置換された: D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、  
 S、T、M、V、P、またはC); Q328 (以下と置換された: D、E、H、K、R、  
 A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC); Q329 (以下と置換  
 された: D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、また  
 はC); E330 (以下と置換された: H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC); A331 (以下と置換された: D、E、H、K、  
 R、N、Q、F、W、Y、P、またはC); P332 (以下と置換された: D、E、H、  
 K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC); E333  
 (以下と置換された: H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、  
 Y、P、またはC); R334 (以下と置換された: D、E、A、G、I、L、S、T、  
 M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC); A335 (以下と置換された: D、E、  
 H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC); S336 (以下と置換された: D、

10

20

30

40

50

E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; S 3 3 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 3 3 8 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Y 3 3 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; T 3 4 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; R 3 4 1 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; S 3 4 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; T 3 4 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; G 3 4 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; E 3 4 5 (以下と置換された : H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Q 3 4 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; E 3 4 7 (以下と置換された : H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 3 4 8 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; S 3 4 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 3 5 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; G 3 5 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; および / または L 3 5 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC。  
【 0 2 1 9】

H D G N R 1 0 が寄託された ( d e p o s i t e d ) クローン ( 配列番号 2 2 ) によってコードされる、さらに好ましい G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) の保存的置換には以下が挙げられる : M I (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; D 2 (以下と置換された : H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Y 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; Q 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; V 5 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; S 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; S 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; P 8 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC) ; I 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Y 1 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; D 1 1 (以下と置換された : H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 1 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; N 1 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; Y 1 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; Y 1 5 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; T 1 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; S 1 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; E 1 8 (以下と置換された : H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; P 1 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC) ; C 2 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP) ; Q 2 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; K 2 2 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 2 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; N 2 4 (以下と置

10

20

30

40

50



: D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; L  
 69 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 L70 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)  
 ; N71 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 F、W、Y、P、またはC) ; L72 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q  
 、F、W、Y、P、またはC) ; A73 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; I74 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N  
 、Q、F、W、Y、P、またはC) ; S75 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; D76 (以下と置換された : H、K、R、A、G  
 、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L77 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F78 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、または  
 C) ; F79 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、  
 T、M、V、P、またはC) ; L80 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q  
 、F、W、Y、P、またはC) ; L81 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; T82 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N  
 、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V83 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; P84 (以下と置換された : D、E、H、K、R  
 、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC) ; F85 (以下と  
 置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、また  
 はC) ; W86 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S  
 、T、M、V、P、またはC) ; A87 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; H88 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L  
 、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Y89 (以下と置換された :  
 D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; A9  
 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; A  
 91 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 A92 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)  
 ; Q93 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 F、W、Y、P、またはC) ; W94 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q  
 、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; D95 (以下と置換された : H、  
 K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F9  
 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V  
 、P、またはC) ; G97 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、  
 Y、P、またはC) ; N98 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、  
 L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; T99 (以下と置換された : D、E  
 、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; M100 (以下と置換された : D  
 、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; C101 (以下と置換された  
 : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、または  
 P) ; Q 102 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、  
 M、V、F、W、Y、P、またはC) ; L103 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L104 (以下と置換された : D、E、H、  
 K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; T105 (以下と置換された : D、E、  
 H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; G106 (以下と置換された : D、  
 E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L107 (以下と置換された :  
 D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Y108 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ;  
 F109 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、  
 M、V、P、またはC) ; I110 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC) ; G111 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、



(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；V 1  
5 7 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；  
F 1 5 8 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、  
M、V、P、またはC)；A 1 5 9 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、  
F、W、Y、P、またはC)；S 1 6 0 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、  
Q、F、W、Y、P、またはC)；L 1 6 1 (以下と置換された：D、E、H、K、R、  
N、Q、F、W、Y、P、またはC)；P 1 6 2 (以下と置換された：D、E、H、K、  
R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC)；G 1 6 3 (以  
下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；I 1 6 4  
(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；I 1  
6 5 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；  
F 1 6 6 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、  
M、V、P、またはC)；T 1 6 7 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、  
F、W、Y、P、またはC)；R 1 6 8 (以下と置換された：D、E、A、G、I、L、  
S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；S 1 6 9 (以下と置換された：  
D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；Q 1 7 0 (以下と置換され  
た：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC  
)；K 1 7 1 (以下と置換された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、  
F、W、Y、P、またはC)；E 1 7 2 (以下と置換された：H、K、R、A、G、I、  
L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；G 1 7 3 (以下と置換され  
た：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；L 1 7 4 (以下と置換  
された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；H 1 7 5 (以下と  
置換された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、また  
はC)；Y 1 7 6 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、  
S、T、M、V、P、またはC)；T 1 7 7 (以下と置換された：D、E、H、K、R、  
N、Q、F、W、Y、P、またはC)；C 1 7 8 (以下と置換された：D、E、H、K、  
R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP)；S 1 7 9 (以  
下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；S 1 8 0  
(以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；H 1  
8 1 (以下と置換された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、  
Y、P、またはC)；F 1 8 2 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、A、  
G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；P 1 8 3 (以下と置換された：D、E、  
H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC)；Y 1  
8 4 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、  
V、P、またはC)；S 1 8 5 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、  
W、Y、P、またはC)；Q 1 8 6 (以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、  
I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC)；Y 1 8 7 (以下と置換された：  
D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；Q 1  
8 8 (以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、  
W、Y、P、またはC)；F 1 8 9 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、  
A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；W 1 9 0 (以下と置換された：D、  
E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；K 1 9 1  
(以下と置換された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、  
P、またはC)；N 1 9 2 (以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、  
S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC)；F 1 9 3 (以下と置換された：D、E、  
H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；Q 1 9 4 (以  
下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、  
P、またはC)；T 1 9 5 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、  
Y、P、またはC)；L 1 9 6 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、  
W、Y、P、またはC)；K 1 9 7 (以下と置換された：D、E、A、G、I、L、S、

10

20

30

40

50

T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 1 9 8 (以下と置換された : D、  
 E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 1 9 9 (以下と置換された :  
 D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; 1 2 0 0 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2 0 1 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; G 2 0 2 (以下と  
 置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2 0 3 (以  
 下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 2 0 4  
 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2  
 0 5 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 P 2 0 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 N、Q、F、W、Y、またはC) ; L 2 0 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2 0 8 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 2 0 9 (以下と置換された : D、E、H、  
 K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; M 2 1 0 (以下と置換された : D、E、  
 H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 2 1 1 (以下と置換された : D、  
 E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 2 1 2 (以下と置換された :  
 D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; C 2 1 3 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、また  
 はP) ; Y 2 1 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、  
 S、T、M、V、P、またはC) ; S 2 1 5 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; G 2 1 6 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 2 1 7 (以下と置換された : D、E、H、  
 K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2 1 8 (以下と置換された : D、E、  
 H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; K 2 1 9 (以下と置換された : D、  
 E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 T 2 2 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ) ; L 2 2 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC) ; L 2 2 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、  
 またはC) ; R 2 2 3 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; C 2 2 4 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP) ; R 2 2 5 (以  
 下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、  
 またはC) ; N 2 2 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S  
 、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; E 2 2 7 (以下と置換された : H、K、R  
 、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; K 2 2 8 (以  
 下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P  
 、またはC) ; K 2 2 9 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V  
 、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; R 2 3 0 (以下と置換された : D、E、A、G  
 、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; H 2 3 1 (以下と置  
 換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、または  
 C) ; R 2 3 2 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q  
 、F、W、Y、P、またはC) ; A 2 3 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 2 3 4 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; R 2 3 5 (以下と置換された : D、E、A、  
 G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2 3 6 (以下と  
 置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 2 3 7 (以  
 下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 2 3 8  
 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 P、またはC) ; T 2 3 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、  
 Y、P、またはC) ; I 2 4 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、

10

20

30

40

50

W、Y、P、またはC) ; M 2 4 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC) ; 1 2 4 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 2 4 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Y 2 4 4 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; F 2 4 5 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC  
 ) ; L 2 4 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC) ; F 2 4 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、  
 S、T、M、V、P、またはC) ; W 2 4 8 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; A 2 4 9 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; P 2 5 0 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、  
 またはC) ; Y 2 5 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、  
 L、S、T、M、V、P、またはC) ; N 2 5 2 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; I 2 5 3 (以下と  
 置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 2 5 4 (以  
 下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2 5 5  
 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2  
 5 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 L 2 5 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ) ; N 2 5 8 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、  
 V、F、W、Y、P、またはC) ; T 2 5 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 2 6 0 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; Q 2 6 1 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、また  
 はC) ; E 2 6 2 (以下と置換された : H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 2 6 3 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; F 2 6 4 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC  
 ) ; G 2 6 5 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC) ; L 2 6 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、  
 またはC) ; N 2 6 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、  
 T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; N 2 6 8 (以下と置換された : D、E、H、  
 K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; C 2 6 9 (以  
 下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、  
 W、Y、またはP) ; S 2 7 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、  
 W、Y、P、またはC) ; S 2 7 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC) ; S 2 7 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; N 2 7 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、  
 A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; R 2 7 4 (以下と置換  
 された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ) ; L 2 7 5 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC) ; D 2 7 6 (以下と置換された : H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、  
 N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Q 2 7 7 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; A 2 7 8 (以下と  
 置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; M 2 7 9 (以  
 下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Q 2 8 0  
 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、  
 Y、P、またはC) ; V 2 8 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、  
 W、Y、P、またはC) ; T 2 8 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、

F、W、Y、P、またはC) ; E 2 8 3 (以下と置換された : H、K、R、A、G、I、  
 L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; T 2 8 4 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 2 8 5 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; G 2 8 6 (以下と  
 置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; M 2 8 7 (以  
 下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; T 2 8 8  
 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; H 2  
 8 9 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、  
 Y、P、またはC) ; C 2 9 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、  
 L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP) ; C 2 9 1 (以下と置換された : 10  
 D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP  
 ) ; I 2 9 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また  
 はC) ; N 2 9 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、  
 M、V、F、W、Y、P、またはC) ; P 2 9 4 (以下と置換された : D、E、H、K、  
 R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC) ; I 2 9 5 (以  
 下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; I 2 9 6  
 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; Y 2  
 9 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、  
 V、P、またはC) ; A 2 9 8 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、F、  
 W、Y、P、またはC) ; F 2 9 9 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、 20  
 A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; V 3 0 0 (以下と置換された : D、  
 E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; G 3 0 1 (以下と置換された :  
 D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; E 3 0 2 (以下と置換され  
 た : H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC  
 ) ; K 3 0 3 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC) ; F 3 0 4 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; R 3 0 5 (以下と置換された :  
 D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; N 3  
 0 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、  
 W、Y、P、またはC) ; Y 3 0 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、 30  
 A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC) ; L 3 0 8 (以下と置換された : D、  
 E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; L 3 0 9 (以下と置換された :  
 D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; V 3 1 0 (以下と置換され  
 た : D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; F 3 1 1 (以下と置換  
 された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC  
 ) ; F 3 1 2 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、  
 T、M、V、P、またはC) ; Q 3 1 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、  
 G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC) ; K 3 1 4 (以下と置換され  
 た : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 H 3 1 5 (以下と置換された : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、 40  
 W、Y、P、またはC) ; I 3 1 6 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、  
 F、W、Y、P、またはC) ; A 3 1 7 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、  
 Q、F、W、Y、P、またはC) ; K 3 1 8 (以下と置換された : D、E、A、G、I、  
 L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ; R 3 1 9 (以下と置換され  
 た : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 F 3 2 0 (以下と置換された : D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、  
 M、V、P、またはC) ; C 3 2 1 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、  
 I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP) ; K 3 2 2 (以下と置換され  
 た : D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC) ;  
 C 3 2 3 (以下と置換された : D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、 50

N、Q、F、W、Y、またはP)；

C 3 2 4 (以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはP)；S 3 2 5 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；I 3 2 6 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；F 3 2 7 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；Q 3 2 8 (以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC)；Q 3 2 9 (以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC)；E 3 3 0 (以下と置換された：H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；A 3 3 1 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；P 3 3 2 (以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、またはC)；E 3 3 3 (以下と置換された：H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；R 3 3 4 (以下と置換された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；A 3 3 5 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；S 3 3 6 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；S 3 3 7 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；V 3 3 8 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；Y 3 3 9 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、A、G、I、L、S、T、M、V、P、またはC)；T 3 4 0 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；R 3 4 1 (以下と置換された：D、E、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；S 3 4 2 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；T 3 4 3 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；E 3 4 4 (以下と置換された：H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；E 3 4 5 (以下と置換された：H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；Q 3 4 6 (以下と置換された：D、E、H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、F、W、Y、P、またはC)；E 3 4 7 (以下と置換された：H、K、R、A、G、I、L、S、T、M、V、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；I 3 4 8 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；S 3 4 9 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；V 3 5 0 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；G 3 5 1 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)；および/またはL 3 5 2 (以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC)。

#### 【0220】

生じる構築物は、明細書中に全体に渡って記載されそして当該分野で公知である活性および機能について慣習的にスクリーニングされ得る。好ましくは、この生じる構築物は、増加および/または減少したGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)活性もしくは機能を有し、一方残りのGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)活性もしくは機能は、維持される。より好ましくは、生じる構築物は、1つより多い増加および/または減少したGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)活性もしくは機能を有し、一方残りのGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)活性もしくは機能は、維持される。

#### 【0221】

さらに、1つよりも多いアミノ酸(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9および10)は、上記に記載されるように(保存的または非保存的に)置換されたアミノ酸と置きかえられ得る。この置換されたアミノ酸は、以下に列挙される一般式m-nを有する、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質の全長型、成熟型もしくはプロ

10

20

30

40

50

タンパク質型、ならびにN末端およびC末端欠失変異体において起こり得る。

【0222】

本発明のさらなる実施形態は、少なくとも1つのアミノ酸置換、しかし50以下のアミノ酸置換を含み、さらにより好ましくは40以下のアミノ酸置換を含み、なおより好ましくは30以下のアミノ酸置換を含み、そしてそれでもさらにより好ましくは20以下のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を有するGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。もちろん、かつてないほど多い選択に起因して、ポリペプチドについて、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列を有することは非常に好ましく、このポリペプチドは、少なくとも1つ、しかし10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1以下のアミノ酸置換を含む。特定の実施形態において、図1のアミノ酸配列、または寄託されたクローンもしくはそれらのフラグメント(例えば、成熟型および/または本明細書中に記載される他のフラグメント)によってコードされるアミノ酸配列における付加、置換、および/または欠失の数は、1~5、5~10、5~25、5~50、10~50または50~150であり、保存的アミノ酸置換は好ましい。

10

【0223】

(ポリヌクレオチドフラグメントおよびポリペプチドフラグメント)

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドの、ポリヌクレオチドフラグメントに関する。本発明において、「ポリヌクレオチドフラグメント」とは、以下である核酸配列を有する短いポリヌクレオチドをいう：寄託されたクローン中に含まれるポリヌクレオチド配列の一部か、もしくは寄託されたクローンによりコードされるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の一部；配列番号1のポリヌクレオチド配列の一部もしくはその相補鎖、または配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の一部。本発明のヌクレオチドフラグメントは、好ましくは、少なくとも約15nt、そしてより好ましくは少なくとも約20nt、さらにより好ましくは少なくとも約30nt、そしてなおより好ましくは少なくとも約40nt、少なくとも約50nt、少なくとも約75nt、または少なくとも約150ntの長さである。例えば、「少なくとも20ntの長さ」のフラグメントは、寄託されたクローンまたは配列番号1において示されるヌクレオチド配列中に含まれるHDGNR10 DNA配列由来の20以上の連続する塩基を含むことが意図される。この文脈において「約(おおよそ)」は、特に記載された値、あるいはそれより数個(5、4、3、2、または1)のヌクレオチドだけ、末端のいずれかで、または両方の末端において大きいかまたは小さな値を含む。これらのヌクレオチドフラグメントは、本明細書中で議論されるように、診断プローブおよびプライマーとしての使用を含むが、それらに限定されない使用を有する。もちろん、より大きなフラグメント(例えば、50、150、500、600、1000ヌクレオチド)もまた、好ましい。

20

30

【0224】

さらに、本発明のポリヌクレオチドフラグメントの代表例としては、例えば、以下のおおよそのヌクレオチド数の配列を含むか、あるいはそれらからなるフラグメント：配列番号1の末端の1~50、51~100、101~150、151~200、201~250、251~300、301~350、351~400、401~450、451~500、501~550、551~600、651~700、701~750、751~800、800~850、851~900、901~950、951~1000、1001~1050、1051~1100、1101~1150、1151~1200、1201~1250、1251~1300、1301~1350、1351~1400、もしくは1401、またはそれらの相補鎖、または寄託されたクローン中に含まれるHDGNR10 DNAが挙げられる。この文脈において、「おおよそ(約)」は、特に記載された範囲、またはいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個(5、4、3、2、または1)のヌクレオチドだけ大きいか、または小さな範囲を含む。好ましくは、これらのフラグメントは、生物学的活性を有するポリペプチドをコードする。より好ましくは、これらのポリヌクレオチドは、本明細書中で議論されるようにプローブまたはプライマー

40

50

として使用され得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下またはより低いストリンジェンシー条件下でこれらの核酸分子にハイブリダイズするポリヌクレオチドもまた本発明に含まれ、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドも同様に含まれる。本発明において、「ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2に含まれるアミノ酸配列の一部、または寄託されたクローン中に含まれるHDGNR10 DNAにコードされるアミノ酸配列をいう。タンパク質(ポリペプチド)フラグメントは、「自立構造(free-standing)」であり得るか、あるいはより大きなポリペプチド(このフラグメントが、部分または領域(最も好ましくは単一の連続した領域として)を形成する)内に含まれ得る。本発明のポリペプチドフラグメントの代表例としては、例えば、コード領域の末端の、以下のおおよそのアミノ酸数のアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなるフラグメントが挙げられる: 1~20、21~40、41~60、61~80、81~100、102~120、121~140、141~160または161。さらに、本発明のポリペプチドフラグメントは、少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、または150のアミノ酸の長さであり得る。この文脈において、「約(おおよそ)」とは、特に記載された範囲または値、ならびにいずれかの末端もしくは両方の末端において、これより数個(5、4、3、2、または1)のアミノ酸だけ大きいかまたは小さな、範囲または値を含む。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明に含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0225】

タンパク質のN末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、タンパク質の1つ以上の生物学的機能の損失の改変を生じるとしても、他の機能的活性(例えば、生物学的活性、多量体化する能力、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンドに結合する能力)は、なお保持され得る。例えば、ポリペプチドの完全な形態または成熟形態を認識する抗体を誘導するおよび/または抗体に結合する、短縮型Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ムテインの能力は、完全なポリペプチド、または成熟ポリペプチドの大部分より少ない残基が、N末端から除去される場合には、一般的に保持される。完全なポリペプチドのN末端残基を欠く特定のポリペプチドが、このような免疫原性活性を保持するかどうかは、本明細書中に記載される慣用的な方法、おおよそでなければ当該分野における公知の別の方法によって容易に決定され得る。多数の欠失したN末端アミノ酸残基を有するGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ムテインは、いくつかの生物学的活性または免疫原性活性を保持し得るようである。実際に、6つほどの少ないGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)アミノ酸残基からなるペプチドは、しばしば免疫応答を惹起し得る。

#### 【0226】

好ましいポリペプチドフラグメントとしては、分泌タンパク質および成熟形態が挙げられる。さらに好ましいポリペプチドフラグメントとしては、アミノ末端もしくはカルボキシ末端またはその両方から、連続した一連の欠失した残基を有する分泌タンパク質、もしくは成熟形態が挙げられる。例えば、任意の数のアミノ酸は、。

#### 【0227】

従って、本発明のポリペプチドフラグメントとしては、分泌Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質および成熟形態が挙げられる。さらに好ましいポリペプチドフラグメントとしては、アミノ末端もしくはカルボキシ末端またはその両方から、連続した一連の欠失した残基を有する分泌Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質、もしくは成熟形態が挙げられる。例えば、任意の数のアミノ酸(1~60の範囲)は、分泌Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドもしくは成熟形態のいずれかのアミノ末端から欠失され得る。同様に、任意の数のアミノ酸(1~30の範囲)が、分泌Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質もしくは成熟形態のカルボキシ末端から欠失され得る。さらに、上記のアミノ末端およびカルボキシ末端の欠失の任意の組み合わせは好ましい。同様に、これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドもまた好ましい。

## 【 0 2 2 8 】

特に、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドのN末端欠失は、一般式m-352で表され、ここで、mは2~346整数であって、mは、配列番号2または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドにて同定されるアミノ酸残基の位置に対応する。さらに詳細には、本発明は、配列番号2の以下の残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、配列番号2で示される本発明のポリペプチドのN末端欠失の残基のアミノ酸配列を含むか、あるいは、これらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する：D-2~L-352；Y-3~L-352；Q-4~L-352；V-5~L-352；S-6~L-352；S-7~L-352；P-8~L-352；I-9~L-352；Y-10~L-352；D-11~L-352；I-12~L-352；N-13~L-352；Y-14~L-352；Y-15~L-352；T-16~L-352；S-17~L-352；E-18~L-352；P-19~L-352；C-20~L-352；P-21~L-352；K-22~L-352；I-23~L-352；N-24~L-352；V-25~L-352；K-26~L-352；Q-27~L-352；I-28~L-352；A-29~L-352；A-30~L-352；R-31~L-352；L-32~L-352；L-33~L-352；P-34~L-352；P-35~L-352；L-36~L-352；Y-37~L-352；S-38~L-352；L-39~L-352；V-40~L-352；F-41~L-352；I-42~L-352；F-43~L-352；G-44~L-352；F-45~L-352；V-46~L-352；G-47~L-352；N-48~L-352；M-49~L-352；L-50~L-352；V-51~L-352；I-52~L-352；L-53~L-352；I-54~L-352；L-55~L-352；I-56~L-352；N-57~L-352；C-58~L-352；Q-59~L-352；R-60~L-352；L-61~L-352；E-62~L-352；S-63~L-352；M-64~L-352；T-65~L-352；D-66~L-352；I-67~L-352；Y-68~L-352；L-69~L-352；L-70~L-352；N-71~L-352；L-72~L-352；A-73~L-352；I-74~L-352；S-75~L-352；D-76~L-352；L-77~L-352；F-78~L-352；F-79~L-352；L-80~L-352；L-81~L-352；T-82~L-352；V-83~L-352；P-84~L-352；F-85~L-352；W-86~L-352；A-87~L-352；H-88~L-352；Y-89~L-352；A-90~L-352；A-91~L-352；A-92~L-352；Q-93~L-352；W-94~L-352；D-95~L-352；F-96~L-352；G-97~L-352；N-98~L-352；T-99~L-352；M-100~L-352；C-101~L-352；Q-102~L-352；L-103~L-352；L-104~L-352；T-105~L-352；G-106~L-352；L-107~L-352；Y-108~L-352；F-109~L-352；I-110~L-352；G-111~L-352；F-112~L-352；F-113~L-352；S-114~L-352；G-115~L-352；I-116~L-352；F-117~L-352；F-118~L-352；I-119~L-352；I-120~L-352；L-121~L-352；L-122~L-352；T-123~L-352；I-124~L-352；D-125~L-352；R-126~L-352；Y-127~L-352；L-128~L-352；A-129~L-352；I-130~L-352；V-131~L-352；H-132~L-352；A-133~L-352；V-134~L-352；F-135~L-352；A-136~L-352；L-137~L-352；K-138~L-352；A-139~L-352；R-140~L-352；T-141~L-352；V-142~L-352；T-143~L-352；F-144~L-352；G-145~L-352；V-146~L-352；V-147~L-352；T-148~L-352；S-149~L-352；V-150~L-352；I-151~L-352；T-152~L-352；W-153~L-

10

20

30

40

50

3 5 2 ; V - 1 5 4 ~ L - 3 5 2 ; V - 1 5 5 ~ L - 3 5 2 ; A - 1 5 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 V - 1 5 7 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 5 8 ~ L - 3 5 2 ; A - 1 5 9 ~ L - 3 5 2 ; S - 1 6  
 0 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 6 1 ~ L - 3 5 2 ; P - 1 6 2 ~ L - 3 5 2 ; G - 1 6 3 ~ L -  
 3 5 2 ; I - 1 6 4 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 6 5 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 6 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 T - 1 6 7 ~ L - 3 5 2 ; R - 1 6 8 ~ L - 3 5 2 ; S - 1 6 9 ~ L - 3 5 2 ; Q - 1 7  
 0 ~ L - 3 5 2 ; K - 1 7 1 ~ L - 3 5 2 ; E - 1 7 2 ~ L - 3 5 2 ; G - 1 7 3 ~ L -  
 3 5 2 ; L - 1 7 4 ~ L - 3 5 2 ; H - 1 7 5 ~ L - 3 5 2 ; Y - 1 7 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 T - 1 7 7 ~ L - 3 5 2 ; C - 1 7 8 ~ L - 3 5 2 ; S - 1 7 9 ~ L - 3 5 2 ; S - 1 8  
 0 ~ L - 3 5 2 ; H - 1 8 1 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 8 2 ~ L - 3 5 2 ; P - 1 8 3 ~ L -  
 3 5 2 ; Y - 1 8 4 ~ L - 3 5 2 ; S - 1 8 5 ~ L - 3 5 2 ; Q - 1 8 6 ~ L - 3 5 2 ; 10  
 Y - 1 8 7 ~ L - 3 5 2 ; Q - 1 8 8 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 8 9 ~ L - 3 5 2 ; W - 1 9  
 0 ~ L - 3 5 2 ; K - 1 9 1 ~ L - 3 5 2 ; N - 1 9 2 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 9 3 ~ L -  
 3 5 2 ; Q - 1 9 4 ~ L - 3 5 2 ; T - 1 9 5 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 9 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 K - 1 9 7 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 9 8 ~ L - 3 5 2 ; V - 1 9 9 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 0  
 0 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 0 1 ~ L - 3 5 2 ; G - 2 0 2 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 0 3 ~ L -  
 3 5 2 ; V - 2 0 4 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 0 5 ~ L - 3 5 2 ; P - 2 0 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 L - 2 0 7 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 0 8 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 0 9 ~ L - 3 5 2 ; M - 2 1  
 0 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 1 1 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 1 2 ~ L - 3 5 2 ; C - 2 1 3 ~ L -  
 3 5 2 ; Y - 2 1 4 ~ L - 3 5 2 ; S - 2 1 5 ~ L - 3 5 2 ; G - 2 1 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 I - 2 1 7 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 1 8 ~ L - 3 5 2 ; K - 2 1 9 ~ L - 3 5 2 ; T - 2 2 20  
 0 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 2 1 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 2 2 ~ L - 3 5 2 ; R - 2 2 3 ~ L -  
 3 5 2 ; C - 2 2 4 ~ L - 3 5 2 ; R - 2 2 5 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 2 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 E - 2 2 7 ~ L - 3 5 2 ; K - 2 2 8 ~ L - 3 5 2 ; K - 2 2 9 ~ L - 3 5 2 ; R - 2 3  
 0 ~ L - 3 5 2 ; H - 2 3 1 ~ L - 3 5 2 ; R - 2 3 2 ~ L - 3 5 2 ; A - 2 3 3 ~ L -  
 3 5 2 ; V - 2 3 4 ~ L - 3 5 2 ; R - 2 3 5 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 3 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 I - 2 3 7 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 3 8 ~ L - 3 5 2 ; T - 2 3 9 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 4  
 0 ~ L - 3 5 2 ; M - 2 4 1 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 4 2 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 4 3 ~ L -  
 3 5 2 ; Y - 2 4 4 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 4 5 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 4 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 F - 2 4 7 ~ L - 3 5 2 ; W - 2 4 8 ~ L - 3 5 2 ; A - 2 4 9 ~ L - 3 5 2 ; P - 2 5  
 0 ~ L - 3 5 2 ; Y - 2 5 1 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 5 2 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 5 3 ~ L - 30  
 3 5 2 ; V - 2 5 4 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 5 5 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 5 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 L - 2 5 7 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 5 8 ~ L - 3 5 2 ; T - 2 5 9 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 6  
 0 ~ L - 3 5 2 ; Q - 2 6 1 ~ L - 3 5 2 ; E - 2 6 2 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 6 3 ~ L -  
 3 5 2 ; F - 2 6 4 ~ L - 3 5 2 ; G - 2 6 5 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 6 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 N - 2 6 7 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 6 8 ~ L - 3 5 2 ; C - 2 6 9 ~ L - 3 5 2 ; S - 2 7  
 0 ~ L - 3 5 2 ; S - 2 7 1 ~ L - 3 5 2 ; S - 2 7 2 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 7 3 ~ L -  
 3 5 2 ; R - 2 7 4 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 7 5 ~ L - 3 5 2 ; D - 2 7 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 Q - 2 7 7 ~ L - 3 5 2 ; A - 2 7 8 ~ L - 3 5 2 ; M - 2 7 9 ~ L - 3 5 2 ; Q - 2 8  
 0 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 8 1 ~ L - 3 5 2 ; T - 2 8 2 ~ L - 3 5 2 ; E - 2 8 3 ~ L -  
 3 5 2 ; T - 2 8 4 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 8 5 ~ L - 3 5 2 ; G - 2 8 6 ~ L - 3 5 2 ; 40  
 M - 2 8 7 ~ L - 3 5 2 ; T - 2 8 8 ~ L - 3 5 2 ; H - 2 8 9 ~ L - 3 5 2 ; C - 2 9  
 0 ~ L - 3 5 2 ; C - 2 9 1 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 9 2 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 9 3 ~ L -  
 3 5 2 ; P - 2 9 4 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 9 5 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 9 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 Y - 2 9 7 ~ L - 3 5 2 ; A - 2 9 8 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 9 9 ~ L - 3 5 2 ; V - 3 0  
 0 ~ L - 3 5 2 ; G - 3 0 1 ~ L - 3 5 2 ; E - 3 0 2 ~ L - 3 5 2 ; K - 3 0 3 ~ L -  
 3 5 2 ; F - 3 0 4 ~ L - 3 5 2 ; R - 3 0 5 ~ L - 3 5 2 ; N - 3 0 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 Y - 3 0 7 ~ L - 3 5 2 ; L - 3 0 8 ~ L - 3 5 2 ; L - 3 0 9 ~ L - 3 5 2 ; V - 3 1  
 0 ~ L - 3 5 2 ; F - 3 1 1 ~ L - 3 5 2 ; F - 3 1 2 ~ L - 3 5 2 ; Q - 3 1 3 ~ L -  
 3 5 2 ; K - 3 1 4 ~ L - 3 5 2 ; H - 3 1 5 ~ L - 3 5 2 ; I - 3 1 6 ~ L - 3 5 2 ;  
 A - 3 1 7 ~ L - 3 5 2 ; K - 3 1 8 ~ L - 3 5 2 ; R - 3 1 9 ~ L - 3 5 2 ; F - 3 2 50

0 ~ L - 3 5 2 ; C - 3 2 1 ~ L - 3 5 2 ; K - 3 2 2 ~ L - 3 5 2 ; C - 3 2 3 ~ L - 3 5 2 ; C - 3 2 4 ~ L - 3 5 2 ; S - 3 2 5 ~ L - 3 5 2 ; I - 3 2 6 ~ L - 3 5 2 ; F - 3 2 7 ~ L - 3 5 2 ; Q - 3 2 8 ~ L - 3 5 2 ; Q - 3 2 9 ~ L - 3 5 2 ; E - 3 3 0 ~ L - 3 5 2 ; A - 3 3 1 ~ L - 3 5 2 ; P - 3 3 2 ~ L - 3 5 2 ; E - 3 3 3 ~ L - 3 5 2 ; R - 3 3 4 ~ L - 3 5 2 ; A - 3 3 5 ~ L - 3 5 2 ; S - 3 3 6 ~ L - 3 5 2 ; S - 3 3 7 ~ L - 3 5 2 ; V - 3 3 8 ~ L - 3 5 2 ; Y - 3 3 9 ~ L - 3 5 2 ; T - 3 4 0 ~ L - 3 5 2 ; R - 3 4 1 ~ L - 3 5 2 ; S - 3 4 2 ~ L - 3 5 2 ; T - 3 4 3 ~ L - 3 5 2 ; G - 3 4 4 ~ L - 3 5 2 ; E - 3 4 5 ~ L - 3 5 2 ; Q - 3 4 6 ~ L - 3 5 2 ; および / または E - 3 4 7 ~ L - 3 5 2 。 これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明に含まれる。

10

## 【 0 2 2 9 】

さらに、本発明は、配列番号 2 2 の以下の残基のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、寄託された HDGNR 10 クローン (配列番号 2 2) によってコードされる、本発明のポリペプチドの N 末端欠失の残基のアミノ酸配列を含むか、あるいはまたこれらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する： D - 2 ~ L - 3 5 2 ; Y - 3 ~ L - 3 5 2 ; Q - 4 ~ L - 3 5 2 ; V - 5 ~ L - 3 5 2 ; S - 6 ~ L - 3 5 2 ; S - 7 ~ L - 3 5 2 ; P - 8 ~ L - 3 5 2 ; I - 9 ~ L - 3 5 2 ; Y - 1 0 ~ L - 3 5 2 ; D - 1 1 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 2 ~ L - 3 5 2 ; N - 1 3 ~ L - 3 5 2 ; Y - 1 4 ~ L - 3 5 2 ; Y - 1 5 ~ L - 3 5 2 ; T - 1 6 ~ L - 3 5 2 ; S - 1 7 ~ L - 3 5 2 ; E - 1 8 ~ L - 3 5 2 ; P - 1 9 ~ L - 3 5 2 ; C - 2 0 ~ L - 3 5 2 ; Q - 2 1 ~ L - 3 5 2 ; K - 2 2 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 3 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 4 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 5 ~ L - 3 5 2 ; K - 2 6 ~ L - 3 5 2 ; Q - 2 7 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 8 ~ L - 3 5 2 ; A - 2 9 ~ L - 3 5 2 ; A - 3 0 ~ L - 3 5 2 ; R - 3 1 ~ L - 3 5 2 ; L - 3 2 ~ L - 3 5 2 ; L - 3 3 ~ L - 3 5 2 ; P - 3 4 ~ L - 3 5 2 ; P - 3 5 ~ L - 3 5 2 ; L - 3 6 ~ L - 3 5 2 ; Y - 3 7 ~ L - 3 5 2 ; S - 3 8 ~ L - 3 5 2 ; L - 3 9 ~ L - 3 5 2 ; V - 4 0 ~ L - 3 5 2 ; F - 4 1 ~ L - 3 5 2 ; I - 4 2 ~ L - 3 5 2 ; F - 4 3 ~ L - 3 5 2 ; G - 4 4 ~ L - 3 5 2 ; F - 4 5 ~ L - 3 5 2 ; V - 4 6 ~ L - 3 5 2 ; G - 4 7 ~ L - 3 5 2 ; N - 4 8 ~ L - 3 5 2 ; M - 4 9 ~ L - 3 5 2 ; L - 5 0 ~ L - 3 5 2 ; V - 5 1 ~ L - 3 5 2 ; I - 5 2 ~ L - 3 5 2 ; L - 5 3 ~ L - 3 5 2 ; I - 5 4 ~ L - 3 5 2 ; L - 5 5 ~ L - 3 5 2 ; I - 5 6 ~ L - 3 5 2 ; N - 5 7 ~ L - 3 5 2 ; C - 5 8 ~ L - 3 5 2 ; K - 5 9 ~ L - 3 5 2 ; R - 6 0 ~ L - 3 5 2 ; L - 6 1 ~ L - 3 5 2 ; K - 6 2 ~ L - 3 5 2 ; S - 6 3 ~ L - 3 5 2 ; M - 6 4 ~ L - 3 5 2 ; T - 6 5 ~ L - 3 5 2 ; D - 6 6 ~ L - 3 5 2 ; I - 6 7 ~ L - 3 5 2 ; Y - 6 8 ~ L - 3 5 2 ; L - 6 9 ~ L - 3 5 2 ; L - 7 0 ~ L - 3 5 2 ; N - 7 1 ~ L - 3 5 2 ; L - 7 2 ~ L - 3 5 2 ; A - 7 3 ~ L - 3 5 2 ; I - 7 4 ~ L - 3 5 2 ; S - 7 5 ~ L - 3 5 2 ; D - 7 6 ~ L - 3 5 2 ; L - 7 7 ~ L - 3 5 2 ; F - 7 8 ~ L - 3 5 2 ; F - 7 9 ~ L - 3 5 2 ; L - 8 0 ~ L - 3 5 2 ; L - 8 1 ~ L - 3 5 2 ; T - 8 2 ~ L - 3 5 2 ; V - 8 3 ~ L - 3 5 2 ; P - 8 4 ~ L - 3 5 2 ; F - 8 5 ~ L - 3 5 2 ; W - 8 6 ~ L - 3 5 2 ; A - 8 7 ~ L - 3 5 2 ; H - 8 8 ~ L - 3 5 2 ; Y - 8 9 ~ L - 3 5 2 ; A - 9 0 ~ L - 3 5 2 ; A - 9 1 ~ L - 3 5 2 ; A - 9 2 ~ L - 3 5 2 ; Q - 9 3 ~ L - 3 5 2 ; W - 9 4 ~ L - 3 5 2 ; D - 9 5 ~ L - 3 5 2 ; F - 9 6 ~ L - 3 5 2 ; G - 9 7 ~ L - 3 5 2 ; N - 9 8 ~ L - 3 5 2 ; T - 9 9 ~ L - 3 5 2 ; M - 1 0 0 ~ L - 3 5 2 ; C - 1 0 1 ~ L - 3 5 2 ; Q - 1 0 2 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 0 3 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 0 4 ~ L - 3 5 2 ; T - 1 0 5 ~ L - 3 5 2 ; G - 1 0 6 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 0 7 ~ L - 3 5 2 ; Y - 1 0 8 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 0 9 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 1 0 ~ L - 3 5 2 ; G - 1 1 1 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 1 2 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 1 3 ~ L - 3 5 2 ; S - 1 1 4 ~ L - 3 5 2 ; G - 1 1 5 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 1 6 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 1 7 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 1 8 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 1 9 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 2 0 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 2 1 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 2 2 ~ L - 3 5 2 ; T - 1 2 3 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 2 4 ~ L - 3 5 2 ; D - 1 2 5 ~ L - 3 5 2 ; R - 1 2 6 ~ L - 3 5 2 ; Y - 1 2 7 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 2 8 ~ L - 3 5

20

30

40

50

2 ; A - 1 2 9 ~ L - 3 5 2 ; V - 1 3 0 ~ L - 3 5 2 ; V - 1 3 1 ~ L - 3 5 2 ; H -  
1 3 2 ~ L - 3 5 2 ; A - 1 3 3 ~ L - 3 5 2 ; V - 1 3 4 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 3 5 ~  
L - 3 5 2 ; A - 1 3 6 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 3 7 ~ L - 3 5 2 ; K - 1 3 8 ~ L - 3 5  
2 ; A - 1 3 9 ~ L - 3 5 2 ; R - 1 4 0 ~ L - 3 5 2 ; T - 1 4 1 ~ L - 3 5 2 ; V -  
1 4 2 ~ L - 3 5 2 ; T - 1 4 3 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 4 4 ~ L - 3 5 2 ; G - 1 4 5 ~  
L - 3 5 2 ; V - 1 4 6 ~ L - 3 5 2 ; V - 1 4 7 ~ L - 3 5 2 ; T - 1 4 8 ~ L - 3 5  
2 ; S - 1 4 9 ~ L - 3 5 2 ; V - 1 5 0 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 5 1 ~ L - 3 5 2 ; T -  
1 5 2 ~ L - 3 5 2 ; W - 1 5 3 ~ L - 3 5 2 ; V - 1 5 4 ~ L - 3 5 2 ; V - 1 5 5 ~  
L - 3 5 2 ; A - 1 5 6 ~ L - 3 5 2 ; V - 1 5 7 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 5 8 ~ L - 3 5  
2 ; A - 1 5 9 ~ L - 3 5 2 ; S - 1 6 0 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 6 1 ~ L - 3 5 2 ; P - 10  
1 6 2 ~ L - 3 5 2 ; G - 1 6 3 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 6 4 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 6 5 ~  
L - 3 5 2 ; F - 1 6 6 ~ L - 3 5 2 ; T - 1 6 7 ~ L - 3 5 2 ; R - 1 6 8 ~ L - 3 5  
2 ; S - 1 6 9 ~ L - 3 5 2 ; Q - 1 7 0 ~ L - 3 5 2 ; K - 1 7 1 ~ L - 3 5 2 ; E -  
1 7 2 ~ L - 3 5 2 ; G - 1 7 3 ~ L - 3 5 2 ; L - 1 7 4 ~ L - 3 5 2 ; H - 1 7 5 ~  
L - 3 5 2 ; Y - 1 7 6 ~ L - 3 5 2 ; T - 1 7 7 ~ L - 3 5 2 ; C - 1 7 8 ~ L - 3 5  
2 ; S - 1 7 9 ~ L - 3 5 2 ; S - 1 8 0 ~ L - 3 5 2 ; H - 1 8 1 ~ L - 3 5 2 ; F -  
1 8 2 ~ L - 3 5 2 ; P - 1 8 3 ~ L - 3 5 2 ; Y - 1 8 4 ~ L - 3 5 2 ; S - 1 8 5 ~  
L - 3 5 2 ; Q - 1 8 6 ~ L - 3 5 2 ; Y - 1 8 7 ~ L - 3 5 2 ; Q - 1 8 8 ~ L - 3 5  
2 ; F - 1 8 9 ~ L - 3 5 2 ; W - 1 9 0 ~ L - 3 5 2 ; K - 1 9 1 ~ L - 3 5 2 ; N -  
1 9 2 ~ L - 3 5 2 ; F - 1 9 3 ~ L - 3 5 2 ; Q - 1 9 4 ~ L - 3 5 2 ; T - 1 9 5 ~ 20  
L - 3 5 2 ; L - 1 9 6 ~ L - 3 5 2 ; K - 1 9 7 ~ L - 3 5 2 ; I - 1 9 8 ~ L - 3 5  
2 ; V - 1 9 9 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 0 0 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 0 1 ~ L - 3 5 2 ; G -  
2 0 2 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 0 3 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 0 4 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 0 5 ~  
L - 3 5 2 ; P - 2 0 6 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 0 7 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 0 8 ~ L - 3 5  
2 ; V - 2 0 9 ~ L - 3 5 2 ; M - 2 1 0 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 1 1 ~ L - 3 5 2 ; I -  
2 1 2 ~ L - 3 5 2 ; C - 2 1 3 ~ L - 3 5 2 ; Y - 2 1 4 ~ L - 3 5 2 ; S - 2 1 5 ~  
L - 3 5 2 ; G - 2 1 6 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 1 7 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 1 8 ~ L - 3 5  
2 ; K - 2 1 9 ~ L - 3 5 2 ; T - 2 2 0 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 2 1 ~ L - 3 5 2 ; L -  
2 2 2 ~ L - 3 5 2 ; R - 2 2 3 ~ L - 3 5 2 ; C - 2 2 4 ~ L - 3 5 2 ; R - 2 2 5 ~  
L - 3 5 2 ; N - 2 2 6 ~ L - 3 5 2 ; E - 2 2 7 ~ L - 3 5 2 ; K - 2 2 8 ~ L - 3 5 30  
2 ; K - 2 2 9 ~ L - 3 5 2 ; R - 2 3 0 ~ L - 3 5 2 ; H - 2 3 1 ~ L - 3 5 2 ; R -  
2 3 2 ~ L - 3 5 2 ; A - 2 3 3 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 3 4 ~ L - 3 5 2 ; R - 2 3 5 ~  
L - 3 5 2 ; L - 2 3 6 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 3 7 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 3 8 ~ L - 3 5  
2 ; T - 2 3 9 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 4 0 ~ L - 3 5 2 ; M - 2 4 1 ~ L - 3 5 2 ; I -  
2 4 2 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 4 3 ~ L - 3 5 2 ; Y - 2 4 4 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 4 5 ~  
L - 3 5 2 ; L - 2 4 6 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 4 7 ~ L - 3 5 2 ; W - 2 4 8 ~ L - 3 5  
2 ; A - 2 4 9 ~ L - 3 5 2 ; P - 2 5 0 ~ L - 3 5 2 ; Y - 2 5 1 ~ L - 3 5 2 ; N -  
2 5 2 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 5 3 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 5 4 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 5 5 ~  
L - 3 5 2 ; L - 2 5 6 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 5 7 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 5 8 ~ L - 3 5  
2 ; T - 2 5 9 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 6 0 ~ L - 3 5 2 ; Q - 2 6 1 ~ L - 3 5 2 ; E - 40  
2 6 2 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 6 3 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 6 4 ~ L - 3 5 2 ; G - 2 6 5 ~  
L - 3 5 2 ; L - 2 6 6 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 6 7 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 6 8 ~ L - 3 5  
2 ; C - 2 6 9 ~ L - 3 5 2 ; S - 2 7 0 ~ L - 3 5 2 ; S - 2 7 1 ~ L - 3 5 2 ; S -  
2 7 2 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 7 3 ~ L - 3 5 2 ; R - 2 7 4 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 7 5 ~  
L - 3 5 2 ; D - 2 7 6 ~ L - 3 5 2 ; Q - 2 7 7 ~ L - 3 5 2 ; A - 2 7 8 ~ L - 3 5  
2 ; M - 2 7 9 ~ L - 3 5 2 ; Q - 2 8 0 ~ L - 3 5 2 ; V - 2 8 1 ~ L - 3 5 2 ; T -  
2 8 2 ~ L - 3 5 2 ; E - 2 8 3 ~ L - 3 5 2 ; T - 2 8 4 ~ L - 3 5 2 ; L - 2 8 5 ~  
L - 3 5 2 ; G - 2 8 6 ~ L - 3 5 2 ; M - 2 8 7 ~ L - 3 5 2 ; T - 2 8 8 ~ L - 3 5  
2 ; H - 2 8 9 ~ L - 3 5 2 ; C - 2 9 0 ~ L - 3 5 2 ; C - 2 9 1 ~ L - 3 5 2 ; I -  
2 9 2 ~ L - 3 5 2 ; N - 2 9 3 ~ L - 3 5 2 ; P - 2 9 4 ~ L - 3 5 2 ; I - 2 9 5 ~ 50

L - 3 5 2 ; I - 2 9 6 ~ L - 3 5 2 ; Y - 2 9 7 ~ L - 3 5 2 ; A - 2 9 8 ~ L - 3 5 2 ; F - 2 9 9 ~ L - 3 5 2 ; V - 3 0 0 ~ L - 3 5 2 ; G - 3 0 1 ~ L - 3 5 2 ; E - 3 0 2 ~ L - 3 5 2 ; K - 3 0 3 ~ L - 3 5 2 ; F - 3 0 4 ~ L - 3 5 2 ; R - 3 0 5 ~ L - 3 5 2 ; N - 3 0 6 ~ L - 3 5 2 ; Y - 3 0 7 ~ L - 3 5 2 ; L - 3 0 8 ~ L - 3 5 2 ; L - 3 0 9 ~ L - 3 5 2 ; V - 3 1 0 ~ L - 3 5 2 ; F - 3 1 1 ~ L - 3 5 2 ; F - 3 1 2 ~ L - 3 5 2 ; Q - 3 1 3 ~ L - 3 5 2 ; K - 3 1 4 ~ L - 3 5 2 ; H - 3 1 5 ~ L - 3 5 2 ; I - 3 1 6 ~ L - 3 5 2 ; A - 3 1 7 ~ L - 3 5 2 ; K - 3 1 8 ~ L - 3 5 2 ; R - 3 1 9 ~ L - 3 5 2 ; F - 3 2 0 ~ L - 3 5 2 ; C - 3 2 1 ~ L - 3 5 2 ; K - 3 2 2 ~ L - 3 5 2 ; C - 3 2 3 ~ L - 3 5 2 ; C - 3 2 4 ~ L - 3 5 2 ; S - 3 2 5 ~ L - 3 5 2 ; I - 3 2 6 ~ L - 3 5 2 ; F - 3 2 7 ~ L - 3 5 2 ; Q - 3 2 8 ~ L - 3 5 2 ; Q - 3 2 9 ~ L - 3 5 2 ; E - 3 3 0 ~ L - 3 5 2 ; A - 3 3 1 ~ L - 3 5 2 ; P - 3 3 2 ~ L - 3 5 2 ; E - 3 3 3 ~ L - 3 5 2 ; R - 3 3 4 ~ L - 3 5 2 ; A - 3 3 5 ~ L - 3 5 2 ; S - 3 3 6 ~ L - 3 5 2 ; S - 3 3 7 ~ L - 3 5 2 ; V - 3 3 8 ~ L - 3 5 2 ; Y - 3 3 9 ~ L - 3 5 2 ; T - 3 4 0 ~ L - 3 5 2 ; R - 3 4 1 ~ L - 3 5 2 ; S - 3 4 2 ~ L - 3 5 2 ; T - 3 4 3 ~ L - 3 5 2 ; E - 3 4 4 ~ L - 3 5 2 ; E - 3 4 5 ~ L - 3 5 2 ; Q - 3 4 6 ~ L 3 5 2 ; および / または E - 3 4 7 ~ L - 3 5 2 。 これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明に含まれる。

10

## 【0230】

本発明はまた、上述のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に少なくとも90%、92%、95%、96%、97%、98%、または99%同一なポリヌクレオチド配列を含むか、またあるいは、これらからなる核酸分子に関する。本発明はまた、異種のポリヌクレオチドに融合した上述のポリヌクレオチド配列を含む。

20

## 【0231】

上述したように、タンパク質のC末端からの1つ以上のアミノ酸の欠失が、このタンパク質の1つ以上の生物学的機能の欠失の改変を生じたとしても、他の機能的活性(例えば、生物学的活性、多量体化する能力、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンドに結合する能力)はなお保持され得る。例えば、ポリペプチドの完全または成熟形態を認識する抗体を誘導し、そして / または認識する抗体に結合する短縮化されたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ムテインの能力は、完全なまたは成熟したポリペプチドの大部分未満の残基をC末端から除去した場合において、一般に保持される。完全なポリペプチドのC末端の残基を欠失する特定のポリペプチドがこのような免疫活性を保持しているか否かは、本明細書中に記載されたか、またはさもなければ当業者に公知の慣用的な方法によって容易に決定される。C末端のアミノ酸残基の多くが除去されたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ムテインは、いくつかの生物学的または免疫学的活性を保持し得る可能性はあり得る。実際、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)アミノ酸残基のうち6残基ほどからなるが、しばしば免疫応答を誘起し得る。

30

## 【0232】

従って、本発明はさらに、図1に示されたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド(配列番号2)、または寄託されたクローンによってコードされたポリペプチドのアミノ酸配列のカルボキシ末端から1つ以上の残基が欠失されたポリペプチドを提供する。このポリペプチドは、一般式1-nで表され、ここで、nは、6~346の整数であって、ここでnは、配列番号2または寄託されたクローンによってコードされたポリペプチドにおいて同定される、アミノ酸残基の位置に対応する。さらに詳細には、本発明は、配列番号2の以下の残基からなるアミノ酸配列を含むか、またはあるいはこれらからなる、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する：D-2~G-351；D-2~V-350；D-2~S-349；D-2~I-348；D-2~E-347；D-2~Q-346；D-2~E-345；D-2~G-344；D-2~T-343；D-2~S-342；D-2~R-341；D-2~T-340；D-2~Y-339；D-2~V-338；D-2~S-337；D-2~S-336；D-2~A-335；D-

40

50

2 ~ R - 3 3 4 ; D - 2 ~ E - 3 3 3 ; D - 2 ~ P - 3 3 2 ; D - 2 ~ A 3 3 1 ; D - 2  
 ~ E - 3 3 0 ; D - 2 ~ Q - 3 2 9 ; D - 2 ~ Q - 3 2 8 ; D - 2 ~ F - 3 2 7 ; D - 2  
 ~ I - 3 2 6 ; D - 2 ~ S - 3 2 5 ; D - 2 ~ C - 3 2 4 ; D - 2 ~ C - 3 2 3 ; D - 2  
 ~ K - 3 2 2 ; D - 2 ~ C - 3 2 1 ; D - 2 ~ F - 3 2 0 ; D - 2 ~ R - 3 1 9 ; D - 2  
 ~ K - 3 1 8 ; D - 2 ~ A - 3 1 7 ; D - 2 ~ I - 3 1 6 ; D - 2 ~ H - 3 1 5 ; D - 2  
 ~ K - 3 1 4 ; D - 2 ~ Q - 3 1 3 ; D - 2 ~ F - 3 1 2 ; D - 2 ~ F - 3 1 1 ; D - 2  
 ~ V - 3 1 0 ; D - 2 ~ L - 3 0 9 ; D - 2 ~ L 3 0 8 ; D - 2 ~ Y - 3 0 7 ; D - 2 ~  
 N - 3 0 6 ; D - 2 ~ R - 3 0 5 ; D - 2 ~ F - 3 0 4 ; D - 2 ~ K - 3 0 3 ; D - 2 ~  
 E - 3 0 2 ; D - 2 ~ G - 3 0 1 ; D - 2 ~ V - 3 0 0 ; D - 2 ~ F - 2 9 9 ; D - 2 ~  
 A - 2 9 8 ; D - 2 ~ Y - 2 9 7 ; D - 2 ~ I - 2 9 6 ; D - 2 ~ I - 2 9 5 ; D - 2 ~ 10  
 P - 2 9 4 ; D - 2 ~ N - 2 9 3 ; D - 2 ~ I - 2 9 2 ; D - 2 ~ C - 2 9 1 ; D - 2 ~  
 C - 2 9 0 ; D - 2 ~ H - 2 8 9 ; D - 2 ~ T - 2 8 8 ; D - 2 ~ M - 2 8 7 ; D - 2 ~  
 G - 2 8 6 ; D - 2 ~ L - 2 8 5 ; D - 2 ~ T - 2 8 4 ; D - 2 ~ E - 2 8 3 ; D - 2 ~  
 T - 2 8 2 ; D - 2 ~ V - 2 8 1 ; D - 2 ~ Q - 2 8 0 ; D - 2 ~ M - 2 7 9 ; D - 2 ~  
 A - 2 7 8 ; D - 2 ~ Q - 2 7 7 ; D - 2 ~ D - 2 7 6 ; D - 2 ~ L - 2 7 5 ; D - 2 ~  
 R - 2 7 4 ; D - 2 ~ N - 2 7 3 ; D - 2 ~ S - 2 7 2 ; D - 2 ~ S - 2 7 1 ; D - 2 ~  
 S - 2 7 0 ; D - 2 ~ C - 2 6 9 ; D - 2 ~ N - 2 6 8 ; D - 2 ~ N - 2 6 7 ; D - 2 ~  
 L - 2 6 6 ; D - 2 ~ G - 2 6 5 ; D - 2 ~ F - 2 6 4 ; D - 2 ~ F - 2 6 3 ; D - 2 ~  
 E - 2 6 2 ; D 2 ~ Q - 2 6 1 ; D - 2 ~ F - 2 6 0 ; D - 2 ~ T - 2 5 9 ; D - 2 ~ N  
 - 2 5 8 ; D - 2 ~ L - 2 5 7 ; D - 2 ~ L - 2 5 6 ; D - 2 ~ L - 2 5 5 ; D - 2 ~ V 20  
 - 2 5 4 ; D - 2 ~ I - 2 5 3 ; D - 2 ~ N - 2 5 2 ; D - 2 ~ Y - 2 5 1 ; D - 2 ~ P  
 - 2 5 0 ; D - 2 ~ A - 2 4 9 ; D - 2 ~ W - 2 4 8 ; D - 2 ~ F - 2 4 7 ; D - 2 ~ L  
 - 2 4 6 ; D - 2 ~ F - 2 4 5 ; D - 2 ~ Y - 2 4 4 ; D - 2 ~ V - 2 4 3 ; D - 2 ~ I  
 - 2 4 2 ; D - 2 ~ M - 2 4 1 ; D - 2 ~ I - 2 4 0 ; D - 2 ~ T - 2 3 9 ; D - 2 ~ F  
 - 2 3 8 ; D - 2 ~ I - 2 3 7 ; D - 2 ~ L - 2 3 6 ; D - 2 ~ R - 2 3 5 ; D - 2 ~ V  
 - 2 3 4 ; D - 2 ~ A - 2 3 3 ; D - 2 ~ R - 2 3 2 ; D - 2 ~ H - 2 3 1 ; D - 2 ~ R  
 - 2 3 0 ; D - 2 ~ K - 2 2 9 ; D - 2 ~ K - 2 2 8 ; D - 2 ~ E - 2 2 7 ; D - 2 ~ N  
 - 2 2 6 ; D - 2 ~ R - 2 2 5 ; D - 2 ~ C - 2 2 4 ; D - 2 ~ R - 2 2 3 ; D - 2 ~ L  
 - 2 2 2 ; D - 2 ~ L 2 2 1 ; D - 2 ~ T - 2 2 0 ; D - 2 ~ K - 2 1 9 ; D - 2 ~ L -  
 2 1 8 ; D - 2 ~ I - 2 1 7 ; D - 2 ~ G - 2 1 6 ; D - 2 ~ S - 2 1 5 ; D - 2 ~ Y - 30  
 2 1 4 ; D - 2 ~ C - 2 1 3 ; D - 2 ~ I - 2 1 2 ; D - 2 ~ V - 2 1 1 ; D - 2 ~ M -  
 2 1 0 ; D - 2 ~ V - 2 0 9 ; D - 2 ~ L - 2 0 8 ; D - 2 ~ L - 2 0 7 ; D - 2 ~ P -  
 2 0 6 ; D - 2 ~ L - 2 0 5 ; D - 2 ~ V - 2 0 4 ; D - 2 ~ L - 2 0 3 ; D - 2 ~ G -  
 2 0 2 ; D - 2 ~ L - 2 0 1 ; D - 2 ~ I - 2 0 0 ; D - 2 ~ V - 1 9 9 ; D - 2 ~ I -  
 1 9 8 ; D - 2 ~ K - 1 9 7 ; D - 2 ~ L - 1 9 6 ; D - 2 ~ T - 1 9 5 ; D - 2 ~ Q -  
 1 9 4 ; D - 2 ~ F - 1 9 3 ; D - 2 ~ N - 1 9 2 ; D - 2 ~ K - 1 9 1 ; D - 2 ~ W -  
 1 9 0 ; D - 2 ~ F - 1 8 9 ; D - 2 ~ Q - 1 8 8 ; D - 2 ~ Y - 1 8 7 ; D 2 ~ Q - 1  
 8 6 ; D - 2 ~ S - 1 8 5 ; D - 2 ~ Y - 1 8 4 ; D - 2 ~ P - 1 8 3 ; D - 2 ~ F - 1  
 8 2 ; D - 2 ~ H - 1 8 1 ; D - 2 ~ S - 1 8 0 ; D - 2 ~ S - 1 7 9 ; D - 2 ~ C - 1  
 7 8 ; D - 2 ~ T - 1 7 7 ; D - 2 ~ Y - 1 7 6 ; D - 2 ~ H 1 7 5 ; D - 2 ~ L - 1 7 40  
 4 ; D - 2 ~ G - 1 7 3 ; D - 2 ~ E - 1 7 2 ; D - 2 ~ K - 1 7 1 ; D - 2 ~ Q - 1 7  
 0 ; D - 2 ~ S - 1 6 9 ; D - 2 ~ R - 1 6 8 ; D - 2 ~ T - 1 6 7 ; D - 2 ~ F - 1 6  
 6 ; D - 2 ~ I - 1 6 5 ; D - 2 ~ I - 1 6 4 ; D - 2 ~ G - 1 6 3 ; D - 2 ~ P - 1 6  
 2 ; D - 2 ~ L - 1 6 1 ; D - 2 ~ S - 1 6 0 ; D - 2 ~ A - 1 5 9 ; D - 2 ~ F - 1 5  
 8 ; D - 2 ~ V - 1 5 7 ; D - 2 ~ A - 1 5 6 ; D - 2 ~ V - 1 5 5 ; D - 2 ~ V - 1 5  
 4 ; D - 2 ~ W - 1 5 3 ; D - 2 ~ T - 1 5 2 ; D - 2 ~ I - 1 5 1 ; D - 2 ~ V - 1 5  
 0 ; D - 2 ~ S - 1 4 9 ; D - 2 ~ T - 1 4 8 ; D - 2 ~ V - 1 4 7 ; D - 2 ~ V 1 4 6  
 ; D - 2 ~ G - 1 4 5 ; D - 2 ~ F - 1 4 4 ; D - 2 ~ T - 1 4 3 ; D - 2 ~ V - 1 4 2  
 ; D - 2 ~ T - 1 4 1 ; D - 2 ~ R - 1 4 0 ; D - 2 ~ A - 1 3 9 ; D - 2 ~ K - 1 3 8  
 ; D - 2 ~ L - 1 3 7 ; D - 2 ~ A - 1 3 6 ; D - 2 ~ F - 1 3 5 ; D - 2 ~ V - 1 3 4 50

; D - 2 ~ A - 1 3 3 ; D - 2 ~ H - 1 3 2 ; D - 2 ~ V - 1 3 1 ; D - 2 ~ 1 - 1 3 0  
 ; D - 2 ~ A - 1 2 9 ; D - 2 ~ L - 1 2 8 ; D - 2 ~ Y - 1 2 7 ; D - 2 ~ R - 1 2 6  
 ; D - 2 ~ D - 1 2 5 ; D - 2 ~ 1 - 1 2 4 ; D - 2 ~ T - 1 2 3 ; D - 2 ~ L - 1 2 2  
 ; D - 2 ~ L - 1 2 1 ; D - 2 ~ I - 1 2 0 ; D - 2 ~ 1 - 1 1 9 ; D - 2 ~ F - 1 1 8  
 ; D - 2 ~ F - 1 1 7 ; D - 2 ~ I - 1 1 6 ; D - 2 ~ G - 1 1 5 ; D - 2 ~ S - 1 1 4  
 ; D - 2 ~ F - 1 1 3 ; D - 2 ~ F - 1 1 2 ; D - 2 ~ G - 1 1 1 ; D - 2 ~ I - 1 1 0  
 ; D - 2 ~ F - 1 0 9 ; D - 2 ~ Y - 1 0 8 ; D - 2 ~ L - 1 0 7 ; D - 2 ~ G - 1 0 6  
 ; D 2 ~ T - 1 0 5 ; D - 2 ~ L - 1 0 4 ; D - 2 ~ L - 1 0 3 ; D - 2 ~ Q - 1 0 2 ;  
 D - 2 ~ C - 1 0 1 ; D - 2 ~ M - 1 0 0 ; D - 2 ~ T - 9 9 ; D - 2 ~ N - 9 8 ; D -  
 2 ~ G - 9 7 ; D - 2 ~ F - 9 6 ; D - 2 ~ D - 9 5 ; D - 2 ~ W - 9 4 ; D - 2 ~ Q - 10  
 9 3 ; D - 2 ~ A - 9 2 ; D - 2 ~ A - 9 1 ; D - 2 ~ A - 9 0 ; D - 2 ~ Y - 8 9 ; D  
 - 2 ~ H - 8 8 ; D - 2 ~ A - 8 7 ; D - 2 ~ W - 8 6 ; D - 2 ~ F - 8 5 ; D - 2 ~ P  
 - 8 4 ; D - 2 ~ V - 8 3 ; D - 2 ~ T - 8 2 ; D - 2 ~ L - 8 1 ; D - 2 ~ L - 8 0 ;  
 D - 2 ~ F - 7 9 ; D - 2 ~ F - 7 8 ; D - 2 ~ L - 7 7 ; D - 2 ~ D - 7 6 ; D - 2 ~  
 S - 7 5 ; D - 2 ~ I - 7 4 ; D - 2 ~ A - 7 3 ; D - 2 ~ L - 7 2 ; D - 2 ~ N - 7 1  
 ; D - 2 ~ L - 7 0 ; D - 2 ~ L - 6 9 ; D - 2 ~ Y - 6 8 ; D - 2 ~ I - 6 7 ; D - 2  
 ~ D - 6 6 ; D - 2 ~ T - 6 5 ; D - 2 ~ M - 6 4 ; D - 2 ~ S - 6 3 ; D - 2 ~ E - 6  
 2 ; D - 2 ~ L - 6 1 ; D - 2 ~ R - 6 0 ; D - 2 ~ Q - 5 9 ; D - 2 ~ C - 5 8 ; D -  
 2 ~ N - 5 7 ; D - 2 ~ I - 5 6 ; D - 2 ~ L - 5 5 ; D - 2 ~ I - 5 4 ; D - 2 ~ L -  
 5 3 ; D - 2 ~ 1 - 5 2 ; D - 2 ~ V - 5 1 ; D - 2 ~ L - 5 0 ; D - 2 ~ M - 4 9 ; D 20  
 - 2 ~ N - 4 8 ; D - 2 ~ G - 4 7 ; D - 2 ~ V - 4 6 ; D - 2 ~ F - 4 5 ; D - 2 ~ G  
 - 4 4 ; D - 2 ~ F - 4 3 ; D - 2 ~ I - 4 2 ; D - 2 ~ F - 4 1 ; D - 2 ~ V - 4 0 ;  
 D - 2 ~ L - 3 9 ; D - 2 ~ S - 3 8 ; D - 2 ~ Y - 3 7 ; D - 2 ~ L - 3 6 ; D - 2 ~  
 P - 3 5 ; D - 2 ~ P - 3 4 ; D - 2 ~ L - 3 3 ; D - 2 ~ L - 3 2 ; D - 2 ~ R - 3 1  
 ; D - 2 ~ A - 3 0 ; D - 2 ~ A - 2 9 ; D - 2 ~ I - 2 8 ; D - 2 ~ Q - 2 7 ; D - 2  
 ~ K - 2 6 ; D - 2 ~ V - 2 5 ; D - 2 ~ N - 2 4 ; D - 2 ~ I - 2 3 ; D - 2 ~ K - 2  
 2 ; D - 2 ~ P - 2 1 ; D - 2 ~ C - 2 0 ; D - 2 ~ P - 1 9 ; D - 2 ~ E - 1 8 ; D -  
 2 ~ S - 1 7 ; D - 2 ~ T - 1 6 ; D - 2 ~ Y - 1 5 ; D - 2 ~ Y - 1 4 ; D - 2 ~ N -  
 1 3 ; D - 2 ~ I - 1 2 ; D - 2 ~ D - 1 1 ; D - 2 ~ Y - 1 0 ; D - 2 ~ I - 9 ; およ  
 び/または D - 2 ~ P - 8。さらに、メチオニンが、これらの C 末端構築物の各々の N 末  
 端に付加され得る。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明  
 に含まれる。

【 0 2 3 3 】

さらに、本発明は、配列番号 2 2 の以下の残基のアミノ酸配列を含むか、またはあるい  
 は、これらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する： D 2 ~ G -  
 3 5 1 ; D - 2 ~ V - 3 5 0 ; D - 2 ~ S - 3 4 9 ; D - 2 ~ I - 3 4 8 ; D - 2 ~ E -  
 3 4 7 ; D - 2 ~ Q - 3 4 6 ; D - 2 ~ E - 3 4 5 ; D - 2 ~ E - 3 4 4 ; D - 2 ~ T -  
 3 4 3 ; D - 2 ~ S - 3 4 2 ; D - 2 ~ R - 3 4 1 ; D - 2 ~ T - 3 4 0 ; D - 2 ~ Y -  
 3 3 9 ; D - 2 ~ V - 3 3 8 ; D - 2 ~ S - 3 3 7 ; D - 2 ~ S - 3 3 6 ; D - 2 ~ A -  
 3 3 5 ; D - 2 ~ R - 3 3 4 ; D - 2 ~ E - 3 3 3 ; D - 2 ~ P - 3 3 2 ; D - 2 ~ A - 40  
 3 3 1 ; D - 2 ~ E - 3 3 0 ; D - 2 ~ Q - 3 2 9 ; D - 2 ~ Q - 3 2 8 ; D - 2 ~ F -  
 3 2 7 ; D - 2 ~ 1 - 3 2 6 ; D - 2 ~ S - 3 2 5 ; D - 2 ~ C - 3 2 4 ; D - 2 ~ C -  
 3 2 3 ; D 2 ~ K - 3 2 2 ; D - 2 ~ C - 3 2 1 ; D - 2 ~ F - 3 2 0 ; D - 2 ~ R - 3  
 1 9 ; D - 2 ~ K - 3 1 8 ; D - 2 ~ A - 3 1 7 ; D - 2 ~ I - 3 1 6 ; D - 2 ~ H - 3  
 1 5 ; D - 2 ~ K - 3 1 4 ; D - 2 ~ Q - 3 1 3 ; D - 2 ~ F - 3 1 2 ; D - 2 ~ F 3 1  
 1 ; D - 2 ~ V - 3 1 0 ; D - 2 ~ L - 3 0 9 ; D - 2 ~ L - 3 0 8 ; D - 2 ~ Y - 3 0  
 7 ; D - 2 ~ N - 3 0 6 ; D - 2 ~ R - 3 0 5 ; D - 2 ~ F - 3 0 4 ; D - 2 ~ K - 3 0  
 3 ; D - 2 ~ E - 3 0 2 ; D - 2 ~ G - 3 0 1 ; D - 2 ~ V - 3 0 0 ; D - 2 ~ F - 2 9  
 9 ; D - 2 ~ A - 2 9 8 ; D - 2 ~ Y - 2 9 7 ; D - 2 ~ I - 2 9 6 ; D - 2 ~ I - 2 9  
 5 ; D - 2 ~ P - 2 9 4 ; D - 2 ~ N - 2 9 3 ; D - 2 ~ I - 2 9 2 ; D - 2 ~ C - 2 9 50

1 ; D - 2 ~ C - 2 9 0 ; D - 2 ~ H - 2 8 9 ; D - 2 ~ T - 2 8 8 ; D 2 ~ M - 2 8 7  
 ; D - 2 ~ G - 2 8 6 ; D - 2 ~ L - 2 8 5 ; D - 2 ~ T - 2 8 4 ; D - 2 ~ E - 2 8 3  
 ; D - 2 ~ T - 2 8 2 ; D - 2 ~ V - 2 8 1 ; D - 2 ~ Q - 2 8 0 ; D - 2 ~ M - 2 7 9  
 ; D - 2 ~ A - 2 7 8 ; D - 2 ~ Q - 2 7 7 ; D - 2 ~ D 2 7 6 ; D - 2 ~ L - 2 7 5 ;  
 D - 2 ~ R - 2 7 4 ; D - 2 ~ N - 2 7 3 ; D - 2 ~ S - 2 7 2 ; D - 2 ~ S - 2 7 1 ;  
 D - 2 ~ S - 2 7 0 ; D - 2 ~ C - 2 6 9 ; D - 2 ~ N - 2 6 8 ; D - 2 ~ N - 2 6 7 ;  
 D - 2 ~ L - 2 6 6 ; D - 2 ~ G - 2 6 5 ; D - 2 ~ F - 2 6 4 ; D - 2 ~ F - 2 6 3 ;  
 D - 2 ~ E - 2 6 2 ; D - 2 ~ Q - 2 6 1 ; D - 2 ~ F - 2 6 0 ; D - 2 ~ T - 2 5 9 ;  
 D 2 ~ N - 2 5 8 ; D - 2 ~ L - 2 5 7 ; D - 2 ~ L - 2 5 6 ; D - 2 ~ L - 2 5 5 ; D  
 - 2 ~ V - 2 5 4 ; D - 2 ~ I - 2 5 3 ; D - 2 ~ N - 2 5 2 ; D - 2 ~ Y - 2 5 1 ; D 10  
 - 2 ~ P - 2 5 0 ; D - 2 ~ A - 2 4 9 ; D - 2 ~ W - 2 4 8 ; D - 2 ~ F 2 4 7 ; D -  
 2 ~ L - 2 4 6 ; D - 2 ~ F - 2 4 5 ; D - 2 ~ Y - 2 4 4 ; D - 2 ~ V - 2 4 3 ; D -  
 2 ~ I - 2 4 2 ; D - 2 ~ M - 2 4 1 ; D - 2 ~ I - 2 4 0 ; D - 2 ~ T - 2 3 9 ; D -  
 2 ~ F - 2 3 8 ; D - 2 ~ I - 2 3 7 ; D - 2 ~ L - 2 3 6 ; D - 2 ~ R - 2 3 5 ; D -  
 2 ~ V - 2 3 4 ; D - 2 ~ A - 2 3 3 ; D - 2 ~ R - 2 3 2 ; D - 2 ~ H - 2 3 1 ; D -  
 2 ~ R - 2 3 0 ; D - 2 ~ K - 2 2 9 ; D - 2 ~ K - 2 2 8 ; D - 2 ~ E - 2 2 7 ; D -  
 2 ~ N - 2 2 6 ; D - 2 ~ R - 2 2 5 ; D - 2 ~ C 2 2 4 ; D - 2 ~ R - 2 2 3 ; D - 2  
 ~ L - 2 2 2 ; D - 2 ~ L - 2 2 1 ; D - 2 ~ T - 2 2 0 ; D - 2 ~ K - 2 1 9 ; D - 2  
 ~ L - 2 1 8 ; D - 2 ~ I - 2 1 7 ; D - 2 ~ G - 2 1 6 ; D - 2 ~ S - 2 1 5 ; D - 2  
 ~ Y - 2 1 4 ; D - 2 ~ C - 2 1 3 ; D - 2 ~ I - 2 1 2 ; D - 2 ~ V - 2 1 1 ; D - 2 20  
 ~ M - 2 1 0 ; D - 2 ~ V - 2 0 9 ; D - 2 ~ L - 2 0 8 ; D - 2 ~ L - 2 0 7 ; D - 2  
 ~ P - 2 0 6 ; D - 2 ~ L - 2 0 5 ; D - 2 ~ V - 2 0 4 ; D - 2 ~ L - 2 0 3 ; D - 2  
 ~ G - 2 0 2 ; D - 2 ~ L - 2 0 1 ; D - 2 ~ I - 2 0 0 ; D - 2 ~ V - 1 9 9 ; D - 2  
 ~ I - 1 9 8 ; D - 2 ~ K - 1 9 7 ; D - 2 ~ L - 1 9 6 ; D - 2 ~ T - 1 9 5 ; D - 2  
 ~ Q - 1 9 4 ; D - 2 ~ F - 1 9 3 ; D - 2 ~ N - 1 9 2 ; D - 2 ~ K - 1 9 1 ; D - 2  
 ~ W - 1 9 0 ; D - 2 ~ F - 1 8 9 ; D - 2 ~ Q - 1 8 8 ; D - 2 ~ Y - 1 8 7 ; D - 2  
 ~ Q - 1 8 6 ; D - 2 ~ S - 1 8 5 ; D - 2 ~ Y - 1 8 4 ; D - 2 ~ P - 1 8 3 ; D - 2  
 ~ F - 1 8 2 ; D - 2 ~ H - 1 8 1 ; D - 2 ~ S - 1 8 0 ; D - 2 ~ S - 1 7 9 ; D - 2  
 ~ C 1 7 8 ; D - 2 ~ T - 1 7 7 ; D - 2 ~ Y - 1 7 6 ; D - 2 ~ H - 1 7 5 ; D - 2 ~  
 L - 1 7 4 ; D - 2 ~ G - 1 7 3 ; D - 2 ~ E - 1 7 2 ; D - 2 ~ K - 1 7 1 ; D - 2 ~ 30  
 Q - 1 7 0 ; D - 2 ~ S - 1 6 9 ; D - 2 ~ R - 1 6 8 ; D - 2 ~ T - 1 6 7 ; D - 2 ~  
 F - 1 6 6 ; D - 2 ~ I - 1 6 5 ; D - 2 ~ I - 1 6 4 ; D - 2 ~ G - 1 6 3 ; D - 2 ~  
 P - 1 6 2 ; D - 2 ~ L - 1 6 1 ; D - 2 ~ S - 1 6 0 ; D - 2 ~ A - 1 5 9 ; D - 2 ~  
 F - 1 5 8 ; D - 2 ~ V - 1 5 7 ; D - 2 ~ A - 1 5 6 ; D - 2 ~ V - 1 5 5 ; D - 2 ~  
 V - 1 5 4 ; D - 2 ~ W - 1 5 3 ; D - 2 ~ T - 1 5 2 ; D - 2 ~ 1 - 1 5 1 ; D - 2 ~  
 V - 1 5 0 ; D - 2 ~ S 1 4 9 ; D - 2 ~ T - 1 4 8 ; D - 2 ~ V - 1 4 7 ; D - 2 ~ V  
 - 1 4 6 ; D - 2 ~ G - 1 4 5 ; D - 2 ~ F - 1 4 4 ; D - 2 ~ T - 1 4 3 ; D - 2 ~ V  
 - 1 4 2 ; D - 2 ~ T - 1 4 1 ; D - 2 ~ R - 1 4 0 ; D - 2 ~ A - 1 3 9 ; D - 2 ~ K  
 - 1 3 8 ; D - 2 ~ L - 1 3 7 ; D - 2 ~ A - 1 3 6 ; D - 2 ~ F - 1 3 5 ; D - 2 ~ V  
 - 1 3 4 ; D - 2 ~ A - 1 3 3 ; D - 2 ~ H - 1 3 2 ; D - 2 ~ V - 1 3 1 ; D - 2 ~ V 40  
 - 1 3 0 ; D - 2 ~ A - 1 2 9 ; D - 2 ~ L - 1 2 8 ; D - 2 ~ Y - 1 2 7 ; D - 2 ~ R  
 - 1 2 6 ; D - 2 ~ D - 1 2 5 ; D - 2 ~ I - 1 2 4 ; D - 2 ~ T - 1 2 3 ; D - 2 ~ L  
 - 1 2 2 ; D - 2 ~ L - 1 2 1 ; D - 2 ~ I - 1 2 0 ; D - 2 ~ 1 - 1 1 9 ; D - 2 ~ F  
 - 1 1 8 ; D - 2 ~ F - 1 1 7 ; D - 2 ~ 1 - 1 1 6 ; D - 2 ~ G - 1 1 5 ; D - 2 ~ S  
 - 1 1 4 ; D - 2 ~ F - 1 1 3 ; D - 2 ~ F - 1 1 2 ; D - 2 ~ G - 1 1 1 ; D - 2 ~ I  
 - 1 1 0 ; D - 2 ~ F - 1 0 9 ; D - 2 ~ Y - 1 0 8 ; D - 2 ~ L - 1 0 7 ; D - 2 ~ G  
 - 1 0 6 ; D - 2 ~ T - 1 0 5 ; D - 2 ~ L - 1 0 4 ; D - 2 ~ L - 1 0 3 ; D - 2 ~ Q  
 - 1 0 2 ; D - 2 ~ C - 1 0 1 ; D - 2 ~ M - 1 0 0 ; D - 2 ~ T - 9 9 ; D - 2 ~ N -  
 9 8 ; D - 2 ~ G - 9 7 ; D - 2 ~ F - 9 6 ; D - 2 ~ D - 9 5 ; D - 2 ~ W - 9 4 ; D  
 - 2 ~ Q - 9 3 ; D - 2 ~ A - 9 2 ; D - 2 ~ A - 9 1 ; D - 2 ~ A - 9 0 ; D - 2 ~ Y 50

- 89 ; D - 2 ~ H - 88 ; D - 2 ~ A - 87 ; D - 2 ~ W - 86 ; D - 2 ~ F - 85 ;  
 D - 2 ~ P - 84 ; D - 2 ~ V - 83 ; D - 2 ~ T - 82 ; D - 2 ~ L - 81 ; D - 2 ~  
 L - 80 ; D - 2 ~ F - 79 ; D - 2 ~ F - 78 ; D - 2 ~ L - 77 ; D - 2 ~ D - 76  
 ; D - 2 ~ S - 75 ; D - 2 ~ I - 74 ; D - 2 ~ A - 73 ; D - 2 ~ L - 72 ; D - 2  
 ~ N - 71 ; D - 2 ~ L - 70 ; D - 2 ~ L - 69 ; D - 2 ~ Y - 68 ; D - 2 ~ 1 - 6  
 7 ; D - 2 ~ D - 66 ; D - 2 ~ T - 65 ; D - 2 ~ M - 64 ; D - 2 ~ S - 63 ; D -  
 2 ~ K - 62 ; D - 2 ~ L - 61 ; D - 2 ~ R - 60 ; D - 2 ~ K - 59 ; D - 2 ~ C -  
 58 ; D - 2 ~ N - 57 ; D - 2 ~ I - 56 ; D - 2 ~ L - 55 ; D - 2 ~ I - 54 ; D  
 - 2 ~ L - 53 ; D - 2 ~ I - 52 ; D - 2 ~ V - 51 ; D - 2 ~ L - 50 ; D - 2 ~ M  
 - 49 ; D - 2 ~ N - 48 ; D - 2 ~ G - 47 ; D - 2 ~ V - 46 ; D - 2 ~ F - 45 ;  
 D - 2 ~ G - 44 ; D - 2 ~ F - 43 ; D - 2 ~ 1 - 42 ; D - 2 ~ F - 41 ; D - 2 ~  
 V - 40 ; D - 2 ~ L - 39 ; D - 2 ~ S - 38 ; D - 2 ~ Y - 37 ; D - 2 ~ L - 36  
 ; D - 2 ~ P - 35 ; D - 2 ~ P - 34 ; D - 2 ~ L - 33 ; D - 2 ~ L - 32 ; D - 2  
 ~ R - 31 ; D - 2 ~ A - 30 ; D - 2 ~ A - 29 ; D - 2 ~ I - 28 ; D - 2 ~ Q - 2  
 7 ; D - 2 ~ K - 26 ; D - 2 ~ V - 25 ; D - 2 ~ N - 24 ; D - 2 ~ I - 23 ; D -  
 2 ~ K - 22 ; D - 2 ~ Q - 21 ; D - 2 ~ C - 20 ; D - 2 ~ P - 19 ; D - 2 ~ E -  
 18 ; D - 2 ~ S - 17 ; D - 2 ~ T - 16 ; D - 2 ~ Y - 15 ; D - 2 ~ Y - 14 ; D  
 - 2 ~ N - 13 ; D - 2 ~ 1 - 12 ; D - 2 ~ D - 11 ; D - 2 ~ Y - 10 ; D - 2 ~ 1  
 - 9 ; および / または D - 2 ~ P - 8。さらに、メチオニンが、これらのC末端構築物の  
 各々のN末端に、付加され得る。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは  
 また、本発明に含まれる。

10

20

## 【0234】

本出願はまた、上記のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドを  
 コードするポリヌクレオチド配列に、少なくとも90%、92%、95%、96%、97  
 %、98%、または99%同一なポリヌクレオチド配列を含むか、またあるいは、これら  
 からなる核酸分子に関する。本発明はまた、異種のポリヌクレオチド配列を融合した上記  
 のポリヌクレオチド配列を含む。

## 【0235】

さらに、上に列挙したN末端またはC末端の欠失の任意のものを合わせて、N末端およ  
 びC末端欠失Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドを生成し得る  
 。本発明はまた、アミノ末端およびカルボキシル末端の両方から1つ以上のアミノ酸が欠  
 失したポリペプチドを提供し、これは一般に、配列番号2、または寄託されたクローンに  
 コードされたポリペプチドの、残基m-nを有するものとして一般に記述し得、ここでn  
 およびmは、上記の整数である。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは  
 また、本発明に含まれる。

30

## 【0236】

ATCC寄託番号97183に含まれるクローンによってコードされた完全なGタンバ  
 ク質ケモカインレセプター(CCR5)アミノ酸配列の部分からなるポリペプチドをコー  
 ドするヌクレオチド配列は、また含まれる。ここで、この部分は、1~約342のアミノ  
 酸のアミノ酸残基の任意の整数を、ATCC寄託番号97183に含まれるクローンに  
 コードされる完全なアミノ酸配列のアミノ末端から、排除し、または1~約342のアミノ  
 酸のアミノ酸残基の任意の整数を、ATCC寄託番号97183に含まれるクローンに  
 コードされた完全なアミノ酸配列のカルボキシル末端から、または上記のアミノ末端およびカ  
 ルボキシル末端の欠失の任意の組合せから排除する。上記の欠失変異体のポリペプチド形態  
 の全てをコードするポリヌクレオチドがまた、提供される。

40

## 【0237】

本出願はまた、本明細書中でm-nとして示されるGタンパク質ケモカインレセプター  
 (CCR5)ポリペプチド配列に、少なくとも90%、92%、93%、94%、95%  
 、96%、97%、98%または99%同一であるポリペプチドを含む、タンパク質に関  
 する。好ましい実施形態において、本出願は、本明細書中で列挙された特定のGタンバク

50

質ケモカインレセプター（CCR5）のN末端およびC末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプチドに、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%または99%同一なポリペプチドを含むタンパク質に関する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドはまた、本発明に含まれる。

【0238】

さらなる好ましいポリペプチドフラグメントは、以下の残基のアミノ酸配列を含むかまたは以下の残基のアミノ酸配列からなる：配列番号2のM-1~Y-15；D-2~T-16；Y-3~S-17；Q-4~E-18；V-5~P-19；S-6~C-20；S-7~P-21；P-8~K-22；I-9~I-23；Y-10~N-24；D-11~V-25；I-12~K-26；N-13~Q-27；Y-14~I-28；Y-15~A-29；T-16~A-30；S-17~R-31；E-18~L-32；P-19~L-33；C-20~P-34；P-21~P-35；K-22~L-36；I-23~Y-37；N-24~S-38；V-25~L-39；K-26~V-40；Q-27~F-41；I-28~I-42；A-29~F-43；A-30~G-44；R-31~F-45；L-32~V-46；L-33~G-47；P-34~N-48；P-35~M-49；L-36~L-50；Y-37~V-51；S-38~I-52；L-39~L-53；V-40~I-54；F-41~L-55；I-42~I-56；F-43~N-57；G-44~C-58；F-45~Q-59；V-46~R-60；G-47~L-61；N-48~E-62；M-49~S-63；L-50~M-64；V-51~T-65；I-52~D-66；L-53~I-67；I-54~Y-68；L-55~L-69；I-56~L-70；N-57~N-71；C-58~L-72；Q-59~A-73；R-60~I-74；L-61~S-75；E-62~D-76；S-63~L-77；M-64~F-78；T-65~F-79；D-66~L-80；I-67~L-81；Y-68~T-82；L-69~V-83；L-70~P-84；N-71~F-85；L-72~W-86；A-73~A-87；I-74~H-88；S-75~Y-89；D-76~A-90；L-77~A-91；F-78~A-92；F-79~Q-93；L-80~W-94；L-81~D-95；T-82~F-96；V-83~G-97；P-84~N-98；F-85~T-99；W-86~M-100；A-87~C-101；H-88~Q-102；Y-89~L-103；A-90~L-104；A-91~T-105；A-92~G-106；Q-93~L-107；W-94~Y-108；D-95~F-109；F-96~I-110；G-97~G-111；N-98~F-112；T-99~F-113；M-100~S-114；C-101~G-115；Q-102~I-116；L-103~F-117；L-104~F-118；T-105~I-119；G-106~I-120；L-107~L-121；Y-108~L-122；F-109~T-123；I-110~I-124；G-111~D-125；F-112~R-126；F-113~Y-127；S-114~L-128；G-115~A-129；I-116~I-130；F-117~V-131；F-118~H-132；I-119~A-133；I-120~V-134；L-121~F-135；L-122~A-136；T-123~L-137；I-124~K-138；D-125~A-139；R-126~R-140；Y-127~T-141；L-128~V-142；A-129~T-143；I-130~F-144；V-131~G-145；H-132~V-146；A-133~V-147；V-134~T-148；F-135~S-149；A-136~V-150；L-137~I-151；K-138~T-152；A-139~W-153；R-140~V-154；T-141~V-155；V-142~A-156；T-143~V-157；F-144~F-158；G-145~A-159；V-146~S-160；V-147~L-161；T-148~P-162；S-149~G-163；V-150~I-164；I-151~I-165；T-152~F-166；W-153~T-167；V-154~R-168；V-155~S-169；A-156~Q-170；V-157~K-171；F-158~E-172；A-159~G-173；S-160~L-174；L-161~H-1

10

20

30

40

50

7 5 ; P - 1 6 2 ~ Y - 1 7 6 ; G - 1 6 3 ~ T - 1 7 7 ; I - 1 6 4 ~ C - 1 7 8 ; I  
 - 1 6 5 ~ S - 1 7 9 ; F - 1 6 6 ~ S - 1 8 0 ; T - 1 6 7 ~ H - 1 8 1 ; R - 1 6 8  
 ~ F - 1 8 2 ; S - 1 6 9 ~ P - 1 8 3 ; Q - 1 7 0 ~ Y - 1 8 4 ; K - 1 7 1 ~ S - 1  
 8 5 ; E - 1 7 2 ~ Q - 1 8 6 ; G - 1 7 3 ~ Y - 1 8 7 ; L - 1 7 4 ~ Q - 1 8 8 ; H  
 - 1 7 5 ~ F - 1 8 9 ; Y - 1 7 6 ~ W - 1 9 0 ; T - 1 7 7 ~ K - 1 9 1 ; C - 1 7 8  
 ~ N - 1 9 2 ; S - 1 7 9 ~ F - 1 9 3 ; S - 1 8 0 ~ Q - 1 9 4 ; H - 1 8 1 ~ T - 1  
 9 5 ; F - 1 8 2 ~ L - 1 9 6 ; P - 1 8 3 ~ K - 1 9 7 ; Y - 1 8 4 ~ I - 1 9 8 ; S  
 - 1 8 5 ~ V - 1 9 9 ; Q - 1 8 6 ~ I - 2 0 0 ; Y - 1 8 7 ~ L - 2 0 1 ; Q - 1 8 8  
 ~ G - 2 0 2 ; F - 1 8 9 ~ L - 2 0 3 ; W - 1 9 0 ~ V - 2 0 4 ; K - 1 9 1 ~ L - 2  
 0 5 ; N - 1 9 2 ~ P - 2 0 6 ; F - 1 9 3 ~ L - 2 0 7 ; Q - 1 9 4 ~ L - 2 0 8 ; T 10  
 - 1 9 5 ~ V - 2 0 9 ; L - 1 9 6 ~ M - 2 1 0 ; K - 1 9 7 ~ V - 2 1 1 ; I - 1 9 8  
 ~ I - 2 1 2 ; V - 1 9 9 ~ C - 2 1 3 ; I - 2 0 0 ~ Y - 2 1 4 ; L - 2 0 1 ~ S - 2  
 1 5 ; G - 2 0 2 ~ G - 2 1 6 ; L - 2 0 3 ~ I - 2 1 7 ; V - 2 0 4 ~ L - 2 1 8 ; L  
 - 2 0 5 ~ K - 2 1 9 ; P - 2 0 6 ~ T - 2 2 0 ; L - 2 0 7 ~ L - 2 2 1 ; L - 2 0 8  
 ~ L - 2 2 2 ; V - 2 0 9 ~ R - 2 2 3 ; M - 2 1 0 ~ C - 2 2 4 ; V - 2 1 1 ~ R - 2  
 2 5 ; I - 2 1 2 ~ N - 2 2 6 ; C - 2 1 3 ~ E - 2 2 7 ; Y - 2 1 4 ~ K - 2 2 8 ; S  
 - 2 1 5 ~ K - 2 2 9 ; G - 2 1 6 ~ R - 2 3 0 ; I - 2 1 7 ~ H - 2 3 1 ; L - 2 1 8  
 ~ R - 2 3 2 ; K - 2 1 9 ~ A - 2 3 3 ; T - 2 2 0 ~ V - 2 3 4 ; L - 2 2 1 ~ R - 2  
 3 5 ; L - 2 2 2 ~ L - 2 3 6 ; R - 2 2 3 ~ I - 2 3 7 ; C - 2 2 4 ~ F - 2 3 8 ; R  
 - 2 2 5 ~ T - 2 3 9 ; N - 2 2 6 ~ I - 2 4 0 ; E - 2 2 7 ~ M - 2 4 1 ; K - 2 2 8 20  
 ~ I - 2 4 2 ; K - 2 2 9 ~ V - 2 4 3 ; R - 2 3 0 ~ Y - 2 4 4 ; H - 2 3 1 ~ F - 2  
 4 5 ; R - 2 3 2 ~ L - 2 4 6 ; A - 2 3 3 ~ F - 2 4 7 ; V - 2 3 4 ~ W - 2 4 8 ; R  
 - 2 3 5 ~ A - 2 4 9 ; L - 2 3 6 ~ P - 2 5 0 ; I - 2 3 7 ~ Y - 2 5 1 ; F - 2 3 8  
 ~ N - 2 5 2 ; T - 2 3 9 ~ I - 2 5 3 ; I - 2 4 0 ~ V - 2 5 4 ; M - 2 4 1 ~ L - 2  
 5 5 ; I - 2 4 2 ~ L - 2 5 6 ; V - 2 4 3 ~ L - 2 5 7 ; Y - 2 4 4 ~ N - 2 5 8 ; F  
 - 2 4 5 ~ T - 2 5 9 ; L - 2 4 6 ~ F - 2 6 0 ; F - 2 4 7 ~ Q - 2 6 1 ; W - 2 4 8  
 ~ E - 2 6 2 ; A - 2 4 9 ~ F - 2 6 3 ; P - 2 5 0 ~ F - 2 6 4 ; Y - 2 5 1 ~ G - 2  
 6 5 ; N - 2 5 2 ~ L - 2 6 6 ; I - 2 5 3 ~ N - 2 6 7 ; V - 2 5 4 ~ N - 2 6 8 ; L  
 - 2 5 5 ~ C - 2 6 9 ; L - 2 5 6 ~ S - 2 7 0 ; L - 2 5 7 ~ S - 2 7 1 ; N - 2 5 8  
 ~ S - 2 7 2 ; T - 2 5 9 ~ N - 2 7 3 ; F - 2 6 0 ~ R - 2 7 4 ; Q - 2 6 1 ~ L - 2 30  
 7 5 ; E - 2 6 2 ~ D - 2 7 6 ; F - 2 6 3 ~ Q - 2 7 7 ; F - 2 6 4 ~ A - 2 7 8 ; G  
 - 2 6 5 ~ M - 2 7 9 ; L - 2 6 6 ~ Q - 2 8 0 ; N - 2 6 7 ~ V - 2 8 1 ; N - 2 6 8  
 ~ T - 2 8 2 ; C - 2 6 9 ~ E - 2 8 3 ; S - 2 7 0 ~ T - 2 8 4 ; S - 2 7 1 ~ L - 2  
 8 5 ; S - 2 7 2 ~ G - 2 8 6 ; N - 2 7 3 ~ M - 2 8 7 ; R - 2 7 4 ~ T - 2 8 8 ; L  
 - 2 7 5 ~ H - 2 8 9 ; D - 2 7 6 ~ C - 2 9 0 ; Q - 2 7 7 ~ C - 2 9 1 ; A - 2 7 8  
 ~ I - 2 9 2 ; M - 2 7 9 ~ N - 2 9 3 ; Q - 2 8 0 ~ P - 2 9 4 ; V - 2 8 1 ~ I - 2  
 9 5 ; T - 2 8 2 ~ I - 2 9 6 ; E - 2 8 3 ~ Y - 2 9 7 ; T - 2 8 4 ~ A - 2 9 8 ; L  
 - 2 8 5 ~ F - 2 9 9 ; G - 2 8 6 ~ V - 3 0 0 ; M - 2 8 7 ~ G - 3 0 1 ; T - 2 8 8  
 ~ E - 3 0 2 ; H - 2 8 9 ~ K - 3 0 3 ; C - 2 9 0 ~ F - 3 0 4 ; C - 2 9 1 ~ R - 3  
 0 5 ; I - 2 9 2 ~ N - 3 0 6 ; N - 2 9 3 ~ Y - 3 0 7 ; P - 2 9 4 ~ L - 3 0 8 ; I 40  
 - 2 9 5 ~ L - 3 0 9 ; I - 2 9 6 ~ V - 3 1 0 ; Y - 2 9 7 ~ F - 3 1 1 ; A - 2 9 8  
 ~ F - 3 1 2 ; F - 2 9 9 ~ Q - 3 1 3 ; V - 3 0 0 ~ K - 3 1 4 ; G - 3 0 1 ~ H - 3  
 1 5 ; E - 3 0 2 ~ I - 3 1 6 ; K - 3 0 3 ~ A - 3 1 7 ; F - 3 0 4 ~ K - 3 1 8 ; R  
 - 3 0 5 ~ R - 3 1 9 ; N - 3 0 6 ~ F - 3 2 0 ; Y - 3 0 7 ~ C - 3 2 1 ; L - 3 0 8  
 ~ K - 3 2 2 ; L - 3 0 9 ~ C - 3 2 3 ; V - 3 1 0 ~ C - 3 2 4 ; F - 3 1 1 ~ S - 3  
 2 5 ; F - 3 1 2 ~ I - 3 2 6 ; Q - 3 1 3 ~ F - 3 2 7 ; K - 3 1 4 ~ Q - 3 2 8 ; H  
 - 3 1 5 ~ Q - 3 2 9 ; I - 3 1 6 ~ E - 3 3 0 ; A - 3 1 7 ~ A - 3 3 1 ; K - 3 1 8  
 ~ P - 3 3 2 ; R - 3 1 9 ~ E - 3 3 3 ; F - 3 2 0 ~ R - 3 3 4 ; C - 3 2 1 ~ A - 3  
 3 5 ; K - 3 2 2 ~ S - 3 3 6 ; C - 3 2 3 ~ S - 3 3 7 ; C - 3 2 4 ~ V - 3 3 8 ; S  
 - 3 2 5 ~ Y - 3 3 9 ; I - 3 2 6 ~ T - 3 4 0 ; F - 3 2 7 ~ R - 3 4 1 ; Q - 3 2 8 50

~ S - 3 4 2 ; Q - 3 2 9 ~ T - 3 4 3 ; E - 3 3 0 ~ G - 3 4 4 ; A - 3 3 1 ~ E - 3  
4 5 ; P - 3 3 2 ~ Q - 3 4 6 ; E - 3 3 3 ~ E - 3 4 7 ; R - 3 3 4 ~ I - 3 4 8 ; A  
- 3 3 5 ~ S - 3 4 9 ; S - 3 3 6 ~ V - 3 5 0 ; S - 3 3 7 ~ G - 3 5 1 ; および / ま  
たは ; V - 3 3 8 ~ L - 3 5 2 。

【 0 2 3 9 】

さらなる好ましいポリペプチドフラグメントは、以下の残基のアミノ酸配列を含むかま  
たは以下の残基のアミノ酸配列からなる：配列番号 2 2 の M - 1 ~ Y - 1 5 ; D - 2 ~ T  
- 1 6 ; Y - 3 ~ S - 1 7 ; Q - 4 ~ E - 1 8 ; V - 5 ~ P - 1 9 ; S - 6 ~ C - 2 0 ;  
S - 7 ~ Q - 2 1 ; P - 8 ~ K - 2 2 ; I - 9 ~ I - 2 3 ; Y - 1 0 ~ N - 2 4 ; D - 1  
1 ~ V - 2 5 ; I - 1 2 ~ K - 2 6 ; N - 1 3 ~ Q - 2 7 ; Y - 1 4 ~ I - 2 8 ; Y - 1  
5 ~ A - 2 9 ; T - 1 6 ~ A - 3 0 ; S - 1 7 ~ R - 3 1 ; E - 1 8 ~ L - 3 2 ; P - 1  
9 ~ L - 3 3 ; C - 2 0 ~ P - 3 4 ; Q - 2 1 ~ P - 3 5 ; K - 2 2 ~ L - 3 6 ; I - 2  
3 ~ Y - 3 7 ; N - 2 4 ~ S - 3 8 ; V - 2 5 ~ L - 3 9 ; K - 2 6 ~ V - 4 0 ; Q - 2  
7 ~ F - 4 1 ; I - 2 8 ~ I - 4 2 ; A - 2 9 ~ F - 4 3 ; A - 3 0 ~ G - 4 4 ; R - 3  
1 ~ F - 4 5 ; L - 3 2 ~ V - 4 6 ; L - 3 3 ~ G - 4 7 ; P - 3 4 ~ N - 4 8 ; P - 3  
5 ~ M - 4 9 ; L - 3 6 ~ L - 5 0 ; Y - 3 7 ~ V - 5 1 ; S - 3 8 ~ I - 5 2 ; L - 3  
9 ~ L - 5 3 ; V - 4 0 ~ I - 5 4 ; F - 4 1 ~ L - 5 5 ; I - 4 2 ~ I - 5 6 ; F - 4  
3 ~ N - 5 7 ; G - 4 4 ~ C - 5 8 ; F - 4 5 ~ K - 5 9 ; V - 4 6 ~ R - 6 0 ; G - 4  
7 ~ L - 6 1 ; N - 4 8 ~ K - 6 2 ; M - 4 9 ~ S - 6 3 ; L - 5 0 ~ M - 6 4 ; V - 5  
1 ~ T - 6 5 ; I - 5 2 ~ D - 6 6 ; L - 5 3 ~ I - 6 7 ; I - 5 4 ~ Y - 6 8 ; L - 5  
5 ~ L - 6 9 ; I - 5 6 ~ L - 7 0 ; N - 5 7 ~ N - 7 1 ; C - 5 8 ~ L - 7 2 ; K - 5  
9 ~ A - 7 3 ; R - 6 0 ~ I - 7 4 ; L - 6 1 ~ S - 7 5 ; K - 6 2 ~ D - 7 6 ; S - 6  
3 ~ L - 7 7 ; M - 6 4 ~ F - 7 8 ; T - 6 5 ~ F - 7 9 ; D - 6 6 ~ L - 8 0 ; I - 6  
7 ~ L - 8 1 ; Y - 6 8 ~ T - 8 2 ; L - 6 9 ~ V - 8 3 ; L - 7 0 ~ P - 8 4 ; N - 7  
1 ~ F - 8 5 ; L - 7 2 ~ W - 8 6 ; A - 7 3 ~ A - 8 7 ; I - 7 4 ~ H - 8 8 ; S - 7  
5 ~ Y - 8 9 ; D - 7 6 ~ A - 9 0 ; L - 7 7 ~ A - 9 1 ; F - 7 8 ~ A - 9 2 ; F - 7  
9 ~ Q - 9 3 ; L - 8 0 ~ W - 9 4 ; L - 8 1 ~ D - 9 5 ; T - 8 2 ~ F - 9 6 ; V - 8  
3 ~ G - 9 7 ; P - 8 4 ~ N - 9 8 ; F - 8 5 ~ T - 9 9 ; W - 8 6 ~ M - 1 0 0 ; A -  
8 7 ~ C - 1 0 1 ; H - 8 8 ~ Q - 1 0 2 ; Y - 8 9 ~ L - 1 0 3 ; A - 9 0 ~ L - 1 0  
4 ; A - 9 1 ~ T - 1 0 5 ; A - 9 2 ~ G - 1 0 6 ; Q - 9 3 ~ L - 1 0 7 ; W - 9 4 ~  
Y - 1 0 8 ; D - 9 5 ~ F - 1 0 9 ; F - 9 6 ~ I - 1 1 0 ; G - 9 7 ~ G - 1 1 1 ; N  
- 9 8 ~ F - 1 1 2 ; T - 9 9 ~ F - 1 1 3 ; M - 1 0 0 ~ S - 1 1 4 ; C - 1 0 1 ~ G  
- 1 1 5 ; Q - 1 0 2 ~ I - 1 1 6 ; L - 1 0 3 ~ F - 1 1 7 ; L - 1 0 4 ~ F - 1 1 8  
; T - 1 0 5 ~ I - 1 1 9 ; G - 1 0 6 ~ I - 1 2 0 ; L - 1 0 7 ~ L - 1 2 1 ; Y - 1  
0 8 ~ L - 1 2 2 ; F - 1 0 9 ~ T - 1 2 3 ; I - 1 1 0 ~ I - 1 2 4 ; G - 1 1 1 ~ D  
- 1 2 5 ; F - 1 1 2 ~ R - 1 2 6 ; F - 1 1 3 ~ Y - 1 2 7 ; S - 1 1 4 ~ L - 1 2 8  
; G - 1 1 5 ~ A - 1 2 9 ; I - 1 1 6 ~ V - 1 3 0 ; F - 1 1 7 ~ V - 1 3 1 ; F - 1  
1 8 ~ H - 1 3 2 ; I - 1 1 9 ~ A - 1 3 3 ; I - 1 2 0 ~ V - 1 3 4 ; L - 1 2 1 ~ F  
- 1 3 5 ; L - 1 2 2 ~ A - 1 3 6 ; T - 1 2 3 ~ L - 1 3 7 ; I - 1 2 4 ~ K - 1 3 8  
; D - 1 2 5 ~ A - 1 3 9 ; R - 1 2 6 ~ R - 1 4 0 ; Y - 1 2 7 ~ T - 1 4 1 ; L - 1  
2 8 ~ V - 1 4 2 ; A - 1 2 9 ~ T - 1 4 3 ; V - 1 3 0 ~ F - 1 4 4 ; V - 1 3 1 ~ G  
- 1 4 5 ; H - 1 3 2 ~ V - 1 4 6 ; A - 1 3 3 ~ V - 1 4 7 ; V - 1 3 4 ~ T - 1 4 8  
; F - 1 3 5 ~ S - 1 4 9 ; A - 1 3 6 ~ V - 1 5 0 ; L - 1 3 7 ~ I - 1 5 1 ; K - 1  
3 8 ~ T - 1 5 2 ; A - 1 3 9 ~ W - 1 5 3 ; R - 1 4 0 ~ V - 1 5 4 ; T - 1 4 1 ~ V  
- 1 5 5 ; V - 1 4 2 ~ A - 1 5 6 ; T - 1 4 3 ~ V - 1 5 7 ; F - 1 4 4 ~ F - 1 5 8  
; G - 1 4 5 ~ A - 1 5 9 ; V - 1 4 6 ~ S - 1 6 0 ; V - 1 4 7 ~ L - 1 6 1 ; T - 1  
4 8 ~ P - 1 6 2 ; S - 1 4 9 ~ G - 1 6 3 ; V - 1 5 0 ~ I - 1 6 4 ; I - 1 5 1 ~ I  
- 1 6 5 ; T - 1 5 2 ~ F - 1 6 6 ; W - 1 5 3 ~ T - 1 6 7 ; V - 1 5 4 ~ R - 1 6 8  
; V - 1 5 5 ~ S - 1 6 9 ; A - 1 5 6 ~ Q - 1 7 0 ; V - 1 5 7 ~ K - 1 7 1 ; F - 1  
5 8 ~ E - 1 7 2 ; A - 1 5 9 ~ G - 1 7 3 ; S - 1 6 0 ~ L - 1 7 4 ; L - 1 6 1 ~ H

10

20

30

40

50

- 1 7 5 ; P - 1 6 2 ~ Y - 1 7 6 ; G - 1 6 3 ~ T - 1 7 7 ; I - 1 6 4 ~ C - 1 7 8  
 ; I - 1 6 5 ~ S - 1 7 9 ; F - 1 6 6 ~ S - 1 8 0 ; T - 1 6 7 ~ H - 1 8 1 ; R - 1  
 6 8 ~ F - 1 8 2 ; S - 1 6 9 ~ P - 1 8 3 ; Q - 1 7 0 ~ Y - 1 8 4 ; K - 1 7 1 ~ S  
 - 1 8 5 ; E - 1 7 2 ~ Q - 1 8 6 ; G - 1 7 3 ~ Y - 1 8 7 ; L - 1 7 4 ~ Q - 1 8 8  
 ; H - 1 7 5 ~ F - 1 8 9 ; Y - 1 7 6 ~ W - 1 9 0 ; T - 1 7 7 ~ K - 1 9 1 ; C - 1  
 7 8 ~ N - 1 9 2 ; S - 1 7 9 ~ F - 1 9 3 ; S - 1 8 0 ~ Q - 1 9 4 ; H - 1 8 1 ~ T  
 - 1 9 5 ; F - 1 8 2 ~ L - 1 9 6 ; P - 1 8 3 ~ K - 1 9 7 ; Y - 1 8 4 ~ I - 1 9 8  
 ; S - 1 8 5 ~ V - 1 9 9 ; Q - 1 8 6 ~ I - 2 0 0 ; Y - 1 8 7 ~ L - 2 0 1 ; Q - 1  
 8 8 ~ G - 2 0 2 ; F - 1 8 9 ~ L - 2 0 3 ; W - 1 9 0 ~ V - 2 0 4 ; K - 1 9 1 ~ L  
 - 2 0 5 ; N - 1 9 2 ~ P - 2 0 6 ; F - 1 9 3 ~ L - 2 0 7 ; Q - 1 9 4 ~ L - 2 0 8 10  
 ; T - 1 9 5 ~ V - 2 0 9 ; L - 1 9 6 ~ M - 2 1 0 ; K - 1 9 7 ~ V - 2 1 1 ; I - 1  
 9 8 ~ I - 2 1 2 ; V - 1 9 9 ~ C - 2 1 3 ; I - 2 0 0 ~ Y - 2 1 4 ; L - 2 0 1 ~ S  
 - 2 1 5 ; G - 2 0 2 ~ G - 2 1 6 ; L - 2 0 3 ~ I - 2 1 7 ; V - 2 0 4 ~ L - 2 1 8  
 ; L - 2 0 5 ~ K - 2 1 9 ; P - 2 0 6 ~ T - 2 2 0 ; L - 2 0 7 ~ L - 2 2 1 ; L - 2  
 0 8 ~ L - 2 2 2 ; V - 2 0 9 ~ R - 2 2 3 ; M - 2 1 0 ~ C - 2 2 4 ; V - 2 1 1 ~ R  
 - 2 2 5 ; I - 2 1 2 ~ N - 2 2 6 ; C - 2 1 3 ~ E - 2 2 7 ; Y - 2 1 4 ~ K - 2 2 8  
 ; S - 2 1 5 ~ K - 2 2 9 ; G - 2 1 6 ~ R - 2 3 0 ; I - 2 1 7 ~ H - 2 3 1 ; L - 2  
 1 8 ~ R - 2 3 2 ; K - 2 1 9 ~ A - 2 3 3 ; T - 2 2 0 ~ V - 2 3 4 ; L - 2 2 1 ~ R  
 - 2 3 5 ; L - 2 2 2 ~ L - 2 3 6 ; R - 2 2 3 ~ I - 2 3 7 ; C - 2 2 4 ~ F - 2 3 8  
 ; R - 2 2 5 ~ T - 2 3 9 ; N - 2 2 6 ~ I - 2 4 0 ; E - 2 2 7 ~ M - 2 4 1 ; K - 2 20  
 2 8 ~ I - 2 4 2 ; K - 2 2 9 ~ V - 2 4 3 ; R - 2 3 0 ~ Y - 2 4 4 ; H - 2 3 1 ~ F  
 - 2 4 5 ; R - 2 3 2 ~ L - 2 4 6 ; A - 2 3 3 ~ F - 2 4 7 ; V - 2 3 4 ~ W - 2 4 8  
 ; R - 2 3 5 ~ A - 2 4 9 ; L - 2 3 6 ~ P - 2 5 0 ; I - 2 3 7 ~ Y - 2 5 1 ; F - 2  
 3 8 ~ N - 2 5 2 ; T - 2 3 9 ~ I - 2 5 3 ; I - 2 4 0 ~ V - 2 5 4 ; M - 2 4 1 ~ L  
 - 2 5 5 ; I - 2 4 2 ~ L - 2 5 6 ; V - 2 4 3 ~ L - 2 5 7 ; Y - 2 4 4 ~ N - 2 5 8  
 ; F - 2 4 5 ~ T - 2 5 9 ; L - 2 4 6 ~ F - 2 6 0 ; F - 2 4 7 ~ Q - 2 6 1 ; W - 2  
 4 8 ~ E - 2 6 2 ; A - 2 4 9 ~ F - 2 6 3 ; P - 2 5 0 ~ F - 2 6 4 ; Y - 2 5 1 ~ G  
 - 2 6 5 ; N - 2 5 2 ~ L - 2 6 6 ; I - 2 5 3 ~ N - 2 6 7 ; V - 2 5 4 ~ N - 2 6 8  
 ; L - 2 5 5 ~ C - 2 6 9 ; L - 2 5 6 ~ S - 2 7 0 ; L - 2 5 7 ~ S - 2 7 1 ; N - 2  
 5 8 ~ S - 2 7 2 ; T - 2 5 9 ~ N - 2 7 3 ; F - 2 6 0 ~ R - 2 7 4 ; Q - 2 6 1 ~ L 30  
 - 2 7 5 ; E - 2 6 2 ~ D - 2 7 6 ; F - 2 6 3 ~ Q - 2 7 7 ; F - 2 6 4 ~ A - 2 7 8  
 ; G - 2 6 5 ~ M - 2 7 9 ; L - 2 6 6 ~ Q - 2 8 0 ; N - 2 6 7 ~ V - 2 8 1 ; N - 2  
 6 8 ~ T - 2 8 2 ; C - 2 6 9 ~ E - 2 8 3 ; S - 2 7 0 ~ T - 2 8 4 ; S - 2 7 1 ~ L  
 - 2 8 5 ; S - 2 7 2 ~ G - 2 8 6 ; N - 2 7 3 ~ M - 2 8 7 ; R - 2 7 4 ~ T - 2 8 8  
 ; L - 2 7 5 ~ H - 2 8 9 ; D - 2 7 6 ~ C - 2 9 0 ; Q - 2 7 7 ~ C - 2 9 1 ; A - 2  
 7 8 ~ I - 2 9 2 ; M - 2 7 9 ~ N - 2 9 3 ; Q - 2 8 0 ~ P - 2 9 4 ; V - 2 8 1 ~ I  
 - 2 9 5 ; T - 2 8 2 ~ I - 2 9 6 ; E - 2 8 3 ~ Y - 2 9 7 ; T - 2 8 4 ~ A - 2 9 8  
 ; L - 2 8 5 ~ F - 2 9 9 ; G - 2 8 6 ~ V - 3 0 0 ; M - 2 8 7 ~ G - 3 0 1 ; T - 2  
 8 8 ~ E - 3 0 2 ; H - 2 8 9 ~ K - 3 0 3 ; C - 2 9 0 ~ F - 3 0 4 ; C - 2 9 1 ~ R  
 - 3 0 5 ; I - 2 9 2 ~ N - 3 0 6 ; N - 2 9 3 ~ Y - 3 0 7 ; P - 2 9 4 ~ L - 3 0 8 40  
 ; I - 2 9 5 ~ L - 3 0 9 ; I - 2 9 6 ~ V - 3 1 0 ; Y - 2 9 7 ~ F - 3 1 1 ; A - 2  
 9 8 ~ F - 3 1 2 ; F - 2 9 9 ~ Q - 3 1 3 ; V - 3 0 0 ~ K - 3 1 4 ; G - 3 0 1 ~ H  
 - 3 1 5 ; E - 3 0 2 ~ I - 3 1 6 ; K - 3 0 3 ~ A - 3 1 7 ; F - 3 0 4 ~ K - 3 1 8  
 ; R - 3 0 5 ~ R - 3 1 9 ; N - 3 0 6 ~ F - 3 2 0 ; Y - 3 0 7 ~ C - 3 2 1 ; L - 3  
 0 8 ~ K - 3 2 2 ; L - 3 0 9 ~ C - 3 2 3 ; V - 3 1 0 ~ C - 3 2 4 ; F - 3 1 1 ~ S  
 - 3 2 5 ; F - 3 1 2 ~ I - 3 2 6 ; Q - 3 1 3 ~ F - 3 2 7 ; K - 3 1 4 ~ Q - 3 2 8  
 ; H - 3 1 5 ~ Q - 3 2 9 ; I - 3 1 6 ~ E - 3 3 0 ; A - 3 1 7 ~ A - 3 3 1 ; K - 3  
 1 8 ~ P - 3 3 2 ; R - 3 1 9 ~ E - 3 3 3 ; F - 3 2 0 ~ R - 3 3 4 ; C - 3 2 1 ~ A  
 - 3 3 5 ; K - 3 2 2 ~ S - 3 3 6 ; C - 3 2 3 ~ S - 3 3 7 ; C - 3 2 4 ~ V - 3 3 8  
 ; S - 3 2 5 ~ Y - 3 3 9 ; I - 3 2 6 ~ T - 3 4 0 ; F - 3 2 7 ~ R - 3 4 1 ; Q - 3 50

28 ~ S - 342 ; Q - 329 ~ T - 343 ; E - 330 ~ E - 344 ; A - 331 ~ E - 345 ; P - 332 ~ Q - 346 ; E - 333 ~ E - 347 ; R - 334 ~ I - 348 ; A - 335 ~ S - 349 ; S - 336 ~ V - 350 ; S - 337 ~ G - 351 ; および / または V - 338 ~ L - 352 。

【0240】

これらのポリペプチドフラグメントは、本発明の G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドの生物学的活性を保持し得、そして / またはさらに以下に記載されるように、抗体を産生あるいはスクリーニングするのに有用であり得る。本発明はまた、これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0241】

本発明はまた、上記の G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に、少なくとも 90%、92%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一であるヌクレオチド配列を含むか、あるいはこのようなヌクレオチド配列からなる核酸分子に関する。本発明はまた、異種ヌクレオチド配列に融合されたこれらのポリヌクレオチド配列を含む。

【0242】

さらに、本発明はまた、上記の G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列に、少なくとも 90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一であるヌクレオチドを含むタンパク質に関する。本発明はまた、これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0243】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドフラグメントは、G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 機能的活性を実証するポリペプチドをコードする。「機能的活性」を示す G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) とは、全長 (完全) G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) タンパク質と関連した 1 つ以上の公知の機能的活性を示し得るポリペプチドを意味する。このような機能的活性としては、生物学的活性、抗原性 [ 抗 G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体に結合する (または結合することについて、G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドと競合する) 能力 ]、免疫原性 (G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドに結合する抗体を生成する能力)、本発明の G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドと多量体を形成する能力、および G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドについてのレセプターまたはリガンドに結合する能力が挙げられるが、これらに限定されない。

【0244】

G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチド、およびフラグメント、変異誘導体ならびにそれらのアナログの機能的活性は、種々の方法によってアッセイされ得る。

【0245】

例えば、抗 G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体への結合について全長 G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドと結合するか、またはこれと競合する能力についてアッセイされる 1 つの実施態様においては、以下を含むがこれらに限定されない、当該分野において公知の種々のイムノアッセイが使用され得る：ラジオイムノアッセイ、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドウィッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、インサイチュイムノアッセイ (例えば、金コロイド、酵素、またはラジオアイソトープ標識を使用する)、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ (例えば、ゲル凝集アッセイ、血球凝集アッセイ)、補体結合アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテイン A アッセイ、および免疫電気泳動アッセイなどのような技術を使用する競合的および非競合的アッセイ系。1 つの実施態様において、抗体結合は、一次抗体上の標識を検出することによ

10

20

30

40

50

て検出される。別の実施態様において、一次抗体は、この一次抗体に対する二次抗体または試薬の結合を検出することによって検出される。さらなる実施態様において、二次抗体が標識される。イムノアッセイにおける結合を検出するための多くの手段が当該分野において公知であり、そしてこれらは本発明の範囲内である。

#### 【0246】

別の実施形態において、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンドが、同定される場合、またはポリペプチドフラグメント、本発明の変異体もしくは誘導体の多量体化する能力が、評価される場合、結合は、例えば、還元ゲルクロマトグラフィーおよび非還元ゲルクロマトグラフィー、タンパク質アフィニティークロマトグラフィーならびにアフィニティープロットングのような、この当該分野で周知の手段によってアッセイされ得る。一般に、Phizicky, E. R., 1995, Microbiol. Rev. 59: 94-123を参照のこと。別の実施態様において、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)結合のその基質への結合の生理学的相関(シグナル伝達)が、アッセイされ得る。

#### 【0247】

さらに、本明細書中に記載されるアッセイ(実施例を参照のこと)およびさもなければ当該分野において公知のアッセイは、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド、ならびにそのフラグメント、改変体、誘導体、およびそれらのアナログが、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に関連した生物学的活性を誘発する(例えば、インビトロかまたはインビボにおける)能力を測定するために、慣用的に適用され得る。他の方法は当業者に公知であり、そして本発明の範囲内である。

#### 【0248】

本発明の特に好ましいフラグメントの中には、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の構造的または機能的属性により特徴づけられるフラグメントがある。このようなフラグメントは、完全(すなわち、全長)G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)(配列番号2)のヘリックスおよびヘリックス形成領域(「領域」、シートおよびシート形成領域(「領域」、ターンおよびターン形成領域(「ターン領域」、コイルまたはコイル形成領域(「コイル領域」、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、表面形成領域、および高抗原性指数領域(すなわち、Jameson-Wolfプログラムのデフォルトパラメーターを使用して同定された場合、1.5以上の抗原性指数を有する4つ以上の連続するアミノ酸を含む)を含む、または寄託クローンによってコードされるアミノ酸残基を含む。特定の好ましい領域は、図3に示される領域であり、そしてこれらの領域としては、図1に示されるアミノ酸配列(配列番号2)に示されるかまたは寄託クローンによってコードされるアミノ酸配列の分析により同定された、前述の型の領域が挙げられるが、これらに限定されず、これらのコンピュータープログラムのデフォルトパラメーターを使用して予想される場合、このような好ましい領域としては、以下が挙げられる: Garnier-Robsonの領域、領域、ターン領域、およびコイル領域; Chou-Fasmanの領域、領域、およびコイル領域; Kyte-Doolittle領域および疎水性領域; Eisenbergおよび両親媒性領域; Emini表面形成領域; ならびに高い抗原性指数のJameson-Wolf領域。本発明はまた、これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む。

#### 【0249】

さらなる実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の機能的属性をコードする。この点における本発明の好ましい実施形態は、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のヘリックスおよびヘリックス形成領域(「領域」、シートおよびシート形成領域(「領域」、ターンおよびターン形成領域(「ターン領域」、コイルおよびコイル形成領域(「コイル領域」、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、可撓性領域、表面形成領域および高度抗原性指標領域を含むか、あるいはこれらから構成さ

10

20

30

40

50

れるフラグメントを含む。

【0250】

上記されるように、図 I に示されるかまたは寄託クローンおよび / または表 I によってコードされる G - タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) の構造的または機能的特質を表すデータは、デフォルトパラメーターにセットされた DNA \* S T A R の種々のモジュールおよびアルゴリズムを用いて作製された。好ましい実施形態において、表 I の欄 V I I I、I X、X I I I、および X I V に提示されるデータは、抗原性について高い程度の可能性を示す G - タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) の領域を決定するために使用され得る。高い抗原性の領域は、抗原認識が免疫応答の開始のプロセスにおいて生じ得る環境中のポリペプチドの表面に曝露されるようなポリペプチドの領域を提示する値を選択することによって、欄 V I I I、I X、X I I I、および X I V において提示されるデータから決定される。

10

【0251】

これらの点において特定の好ましい領域は、図 3 に示されるが、この領域は、表 I に示されるように、図 3 に提示されるデータの表の表示を用いることによって提示および同定され得る。図 3 を作製するために使用された DNA \* S T A R コンピューターアルゴリズム ( もともとのデフォルトパラメーターでセットされる ) は、表の形式において図 3 でデータを提示するために使用された ( 表 I を参照のこと ) 。図 3 におけるデータの表の形式は、好ましい領域の特異的な境界を容易に決定するために使用され得る。

20

【0252】

図 3 および / または表 I に示される上記の好ましい領域は、図 1 に示されるか、または寄託クローンによってコードされるアミノ酸配列の分析によって同定される上記のタイプの領域を含むが、これに限定されない。図 3 および表 I に示される、このような好ましい領域としては、G a r n i e r - R o b s o n の - 領域、 - 領域、ターン領域、およびコイル領域、C h o u - F a s m a n の - 領域、 - 領域、およびターン領域、K y t e - D o o l i t t l e の親水性領域および H o p p - W o o d s の疎水性領域、E i s e n b e r g の - 両親媒性領域および - 両親媒性領域、K a r p l u s - S c h u l z の可撓性領域、高い抗原性指標の J a m e s o n - W o l f の領域、ならびに E m i n i の表面形成領域が挙げられる。

30

【0253】

【表 1】

表 1

残基の位置

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Met	1		B					0.24	0.06		*		0.05	1.68
Asp	2		B	B				0.33	0.27		*		-0.30	0.98
Tyr	3		B	B				0.42	0.23		*		-0.15	1.02
Gln	4		B	B				0.60	0.19		*		-0.15	1.38
Val	5		B	B				0.10	0.00		*	F	0.00	1.28
Ser	6		B	B				0.46	0.69		*	F	-0.45	0.57
Ser	7		B	B				0.46	0.69		*	F	-0.45	0.52
Pro	8		B	B				-0.19	0.29		*	F	0.00	1.17
Ile	9		B	B				-0.19	0.33		*		-0.30	0.61
Tyr	10		B	B				0.42	0.34		*		-0.30	0.73
Asp	11		B			T		0.48	0.71				-0.20	0.74
Ile	12		B			T		0.47	1.04				-0.05	1.66
Asn	13		B			T		0.38	0.84		*		-0.05	1.53
Tyr	14		B			T		1.27	0.47		*		-0.05	1.23
Tyr	15			B	T			1.30	0.47		*		-0.05	3.03
Thr	16			B	T			0.63	0.21		*	F	0.65	2.91
Ser	17			B	T			1.31	0.39		*	F	0.75	1.00
Glu	18		B					1.36	0.06		*	F	0.80	0.98
Pro	19				T			0.71	-0.70		*	F	2.50	1.36
Cys	20				T	T		0.96	-0.50		*	F	2.50	0.71
Pro	21				T	T		0.41	-0.49		*	F	2.25	0.66
Lys	22				T	T		0.76	0.16		*	F	1.40	0.32
Ile	23	A				T		0.76	-0.27	*	*	F	1.50	1.19
Asn	24	A	A					0.08	-0.44		*	F	0.85	1.33
Val	25	A	A					0.16	-0.19		*		0.30	0.47
Lys	26		A	B				-0.22	0.31		*		-0.30	0.67
Gln	27		A	B				-0.16	0.13	*	*		-0.30	0.42
Ile	28		A	B				-0.08	-0.27	*	*		0.45	1.11
Ala	29		A	B				-0.89	-0.23	*	*		0.30	0.46
Ala	30		A	B				-0.24	0.46	*	*		-0.60	0.22
Arg	31		A	B				-0.50	0.49	*	*		-0.60	0.48
Leu	32		A	B				-1.31	0.23	*	*		-0.30	0.74
Leu	33		A	B				-0.67	0.41	*	*		-0.60	0.60
Pro	34					T	C	-0.38	0.67	*	*	F	0.15	0.48
Pro	35				T	T		-0.60	1.06	*	*	F	0.35	0.78
Leu	36			B		T		-1.57	1.06	*	*		-0.20	0.78
Tyr	37			B		T		-1.46	1.01				-0.20	0.38
Ser	38			B	B			-1.53	1.37				-0.60	0.21
Leu	39			B	B			-2.02	1.63				-0.60	-0.18
Val	40			B	B			-2.16	1.73				-0.60	0.10
Phe	41			B	B			-2.04	1.40				-0.60	0.07
Ile	42			B	B			-2.66	1.80				-0.60	0.08
Phe	43			B	B			-2.70	1.76				-0.60	0.08
Gly	44			B	B			-1.89	1.54				-0.60	0.09
Phe	45			B	T			-1.63	1.16				-0.20	0.20
Val	46			B			C	-1.74	1.09				-0.40	0.23
Gly	47			B			C	-1.71	0.99				-0.40	0.19
Asn	48	A		B				-1.90	1.20				-0.60	0.16
Met	49	A		B				-2.37	1.10				-0.60	0.15
Leu	50	A		B				-2.56	1.14				-0.60	0.13
Val	51			B	B			-2.51	1.40				-0.60	0.06
Ile	52			B	B			-3.06	1.69				-0.60	0.05
Leu	53			B	B			-3.06	1.76				-0.60	0.04
Ile	54			B	B			-3.12	1.47		*		-0.60	0.09
Leu	55			B	B			-2.31	1.40	*			-0.60	0.07
Ile	56			B	B			-1.34	1.11	*			-0.60	0.14

10

20

30

表 1(7次)  
残基の位置

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Asn 57	.	.	B	B	.	.	.	-1.27	0.43	.	*	.	-0.60	0.39
Cys 58	.	A	B	B	.	.	.	-0.46	0.43	.	.	.	-0.60	0.39
Gln 59	A	A	.	B	.	.	.	0.13	-0.26	*	.	.	0.30	0.96
Arg 60	A	A	.	B	.	.	.	0.34	-0.56	.	.	F	0.75	0.80
Leu 61	A	A	.	B	.	.	.	0.92	-0.34	.	.	F	0.60	1.47
Glu 62	.	A	B	B	.	.	.	0.92	-0.43	.	*	F	0.60	1.23
Ser 63	.	A	B	.	.	.	.	0.70	-0.83	*	*	F	0.90	1.05
Met 64	.	A	B	B	.	.	.	0.46	-0.14	*	*	F	0.45	0.89
Thr 65	.	A	B	B	.	.	.	-0.47	-0.07	.	*	F	0.45	0.80
Asp 66	A	A	.	B	.	.	.	-0.47	0.61	.	*	.	-0.60	0.50
Ile 67	A	A	.	B	.	.	.	-0.47	0.91	.	.	.	-0.60	0.41
Tyr 68	A	A	.	B	.	.	.	-0.98	0.70	.	.	.	-0.60	0.46
Leu 69	A	A	.	B	.	.	.	-0.97	0.90	.	.	.	-0.60	0.23
Leu 70	A	A	.	B	.	.	.	-1.34	1.40	.	*	.	-0.60	0.33
Asn 71	A	A	.	B	.	.	.	-1.84	1.40	.	.	.	-0.60	0.15
Leu 72	A	A	B	B	.	.	.	-0.96	1.03	*	.	.	-0.60	0.24
Ala 73	A	A	.	B	.	.	.	-1.52	0.34	*	.	.	-0.30	0.48
Ile 74	A	A	.	B	.	.	.	-1.41	0.34	.	.	.	-0.30	0.25
Ser 75	A	A	.	B	.	.	.	-1.30	0.73	.	*	.	-0.60	0.26
Asp 76	A	A	.	B	.	.	.	-2.11	0.83	.	.	.	-0.60	0.22
Leu 77	.	A	B	B	.	.	.	-2.11	1.01	.	.	.	-0.60	0.26
Phe 78	.	A	B	B	.	.	.	-1.83	1.01	.	.	.	-0.60	0.16
Phe 79	.	A	B	B	.	.	.	-1.80	1.11	.	.	.	-0.60	0.14
Leu 80	.	A	B	B	.	.	.	-1.71	1.76	.	*	.	-0.60	0.13
Leu 81	.	A	B	B	.	.	.	-2.41	1.50	.	*	.	-0.60	0.22
Thr 82	.	A	B	B	.	.	.	-1.89	1.50	.	*	.	-0.60	0.22
Val 83	.	A	.	B	.	.	C	-1.78	1.63	.	.	.	-0.40	0.29
Pro 84	A	A	.	B	.	.	.	-1.11	1.44	.	*	.	-0.60	0.35
Phe 85	A	A	.	B	.	.	.	-0.54	1.26	.	.	.	-0.60	0.33
Trp 86	A	A	.	B	.	.	.	-0.32	1.33	.	*	.	-0.60	0.70
Ala 87	A	A	.	B	.	.	.	-0.60	1.39	.	.	.	-0.60	0.45
His 88	A	A	.	B	.	.	.	-0.33	1.46	.	.	.	-0.60	0.53
Tyr 89	A	A	.	B	.	.	.	-0.12	1.17	.	.	.	-0.60	0.51
Ala 90	A	A	.	B	.	.	.	0.29	0.66	.	*	.	-0.60	0.87
Ala 91	A	A	.	.	.	.	.	0.58	1.07	.	*	.	-0.60	0.67
Ala 92	A	A	.	.	.	.	.	0.47	0.57	.	*	.	-0.60	0.72
Gln 93	A	A	.	.	.	.	.	0.16	0.60	.	*	.	-0.60	0.62
Trp 94	A	A	.	.	.	.	.	0.40	0.53	.	*	.	-0.60	0.60
Asp 95	.	.	.	.	T	T	.	0.68	0.43	.	*	.	0.20	0.96
Phe 96	.	.	.	.	T	T	.	0.67	0.41	.	*	.	0.20	0.80
Gly 97	.	.	.	.	T	T	.	0.59	0.63	*	*	F	0.35	0.75
Asn 98	.	.	.	.	T	T	.	0.59	0.29	*	*	F	0.65	0.24
Thr 99	.	.	.	B	T	.	.	0.07	0.69	*	.	.	-0.20	0.48
Met 100	.	.	.	B	T	.	.	-0.74	0.59	*	.	.	-0.20	0.40
Cys 101	.	.	B	B	.	.	.	-0.36	0.84	*	.	.	-0.60	0.21
Gln 102	.	.	B	B	.	.	.	-0.36	0.93	*	.	.	-0.60	0.21
Leu 103	.	.	B	B	.	.	.	-1.17	0.87	*	.	.	-0.60	0.21
Leu 104	.	.	B	B	.	.	.	-1.10	0.94	.	.	.	-0.60	0.32
Thr 105	.	.	B	B	.	.	.	-1.20	1.13	*	.	.	-0.60	0.29
Gly 106	.	.	B	B	.	.	.	-1.42	1.51	*	.	.	-0.60	0.30
Leu 107	.	.	B	B	.	.	.	-1.77	1.51	.	.	.	-0.60	0.26
Tyr 108	.	.	B	B	.	.	.	-1.66	1.26	.	.	.	-0.60	0.18
Phe 109	.	.	B	B	.	.	.	-1.54	1.56	.	.	.	-0.60	0.15
Ile 110	.	.	B	B	.	.	.	-1.53	1.91	.	.	.	-0.60	0.16
Gly 111	.	.	B	B	.	.	.	-1.53	1.61	.	.	.	-0.60	0.14
Phe 112	.	.	B	B	.	.	.	-1.61	1.29	.	.	.	-0.60	0.16

10

20

30

表 1(77残)

残基の位置		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Phe 113	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.07	1.19	.	.	.	-0.60	0.16
Ser 114	.	.	.	B	.	.	.	C	-2.07	1.29	.	.	.	-0.40	0.14
Gly 115	.	.	.	B	.	.	.	C	-2.07	1.64	.	.	.	-0.40	0.14
Ile 116	.	.	.	B	.	.	.	C	-2.61	1.54	.	.	.	-0.40	0.11
Phe 117	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.72	1.44	.	.	.	-0.60	0.06
Phe 118	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.83	1.74	.	.	.	-0.60	0.05
Ile 119	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.84	2.00	.	.	.	-0.60	0.06
Ile 120	.	.	B	B	.	.	.	.	-3.39	1.80	.	*	.	-0.60	0.10
Leu 121	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.50	1.70	*	.	.	-0.60	0.08
Leu 122	.	.	B	B	.	.	.	.	-1.69	0.91	*	.	.	-0.60	0.18
Thr 123	A	.	.	B	.	.	.	.	-1.23	0.23	*	.	.	-0.30	0.52
Ile 124	A	.	.	B	.	.	.	.	-1.16	0.30	*	.	.	-0.30	0.98
Asp 125	A	.	.	.	.	.	T	.	-0.86	0.30	*	.	F	0.25	0.98
Arg 126	A	.	.	.	.	.	T	.	-0.93	0.11	*	.	.	0.10	0.69
Tyr 127	A	.	.	.	.	.	T	.	-0.98	0.31	*	.	.	0.10	0.69
Leu 128	A	.	.	.	.	.	T	.	-0.70	0.27	*	.	.	0.10	0.30
Ala 129	A	.	.	B	.	.	.	.	-0.40	0.77	*	.	.	-0.60	0.21
Ile 130	A	.	.	B	.	.	.	.	-1.26	1.27	*	.	.	-0.60	0.14
Val 131	A	.	.	B	.	.	.	.	-2.07	1.16	*	.	.	-0.60	0.12
His 132	A	.	.	B	.	.	.	.	-2.41	1.26	.	.	.	-0.60	0.11
Ala 133	A	.	.	B	.	.	.	.	-2.41	1.26	.	*	.	-0.60	0.15
Val 134	A	.	.	B	.	.	.	.	-1.78	1.26	.	*	.	-0.60	0.17
Phe 135	A	.	.	B	.	.	.	.	-1.48	0.61	.	*	.	-0.60	0.25
Ala 136	A	.	.	B	.	.	.	.	-0.51	0.61	.	*	.	-0.60	0.25
Leu 137	A	.	.	B	.	.	.	.	-0.79	0.11	.	*	.	-0.30	0.65
Lys 138	A	.	.	B	.	.	.	.	-1.06	-0.04	.	*	F	0.60	1.09
Ala 139	A	.	.	B	.	.	.	.	-0.51	-0.19	.	*	F	0.45	0.80
Arg 140	A	.	.	B	.	.	.	.	-0.51	-0.20	.	*	F	0.60	1.40
Thr 141	.	.	B	B	.	.	.	.	-0.27	-0.10	.	*	F	0.45	0.61
Val 142	.	.	B	B	.	.	.	.	-0.31	0.33	.	*	.	-0.30	0.59
Thr 143	.	.	B	B	.	.	.	.	-1.21	0.47	.	*	.	-0.60	0.23
Phe 144	.	.	B	B	.	.	.	.	-0.93	1.11	.	.	.	-0.60	0.12
Gly 145	.	.	B	B	.	.	.	.	-1.34	1.11	.	.	.	-0.60	0.23
Val 146	.	.	B	B	.	.	.	.	-1.89	0.86	.	.	.	-0.60	0.21
Val 147	.	.	B	B	.	.	.	.	-1.92	1.01	.	.	.	-0.60	0.18
Thr 148	.	.	B	B	.	.	.	.	-1.92	0.91	.	.	.	-0.60	0.13
Ser 149	.	.	B	B	.	.	.	.	-1.51	0.97	*	.	.	-0.60	0.25
Val 150	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.02	1.24	*	.	.	-0.60	0.35
Ile 151	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.02	1.24	*	.	.	-0.60	0.18
Thr 152	.	.	B	B	.	.	.	.	-1.76	1.40	*	.	.	-0.60	0.10
Trp 153	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.30	1.51	*	.	.	-0.60	0.14
Val 154	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.70	1.51	*	.	.	-0.60	0.14
Val 155	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.43	1.61	*	.	.	-0.60	0.09
Ala 156	.	.	B	B	.	.	.	.	-1.84	1.63	*	.	.	-0.60	0.08
Val 157	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.34	1.10	.	.	.	-0.60	0.15
Phe 158	.	.	B	B	.	.	.	.	-2.27	1.14	.	.	.	-0.60	0.17
Ala 159	.	.	B	B	.	.	.	.	-1.76	0.93	.	.	.	-0.60	0.25
Ser 160	.	.	.	B	.	.	.	C	-1.79	0.86	.	.	.	-0.40	0.34
Leu 161	.	.	.	B	.	.	.	C	-2.09	0.90	.	.	.	-0.40	0.27
Pro 162	.	.	.	B	.	.	.	C	-1.93	0.80	.	.	.	-0.40	0.19
Gly 163	.	.	.	B	T	.	.	.	-1.54	1.09	*	.	.	-0.20	0.12
Ile 164	.	.	B	B	.	.	.	.	-0.84	1.19	.	.	.	-0.60	0.22
Ile 165	.	.	B	B	.	.	.	.	-0.84	0.50	.	*	.	-0.60	0.27
Phe 166	.	.	B	B	.	.	.	.	-0.03	0.46	.	.	.	-0.26	0.37
Thr 167	.	.	B	.	.	.	T	.	0.22	0.43	*	.	F	0.63	0.91
Arg 168	.	.	B	.	.	.	T	.	0.57	-0.26	*	.	F	2.02	2.60

10

20

30

表 1(77変)

残基の位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Ser 169						T	C	1.11	-0.94	*		F	2.86	5.21
Gln 170					T	T		1.19	-1.30	*		F	3.40	3.57
Lys 171					T			1.86	-1.10	*		F	2.86	1.50
Glu 172					T			1.92	-0.60	*		F	2.52	1.53
Gly 173				B	T			1.50	-0.23	*	*	F	1.68	1.38
Leu 174			B	B				1.13	-0.14				0.64	1.00
His 175			B	B				0.83	0.43				-0.60	0.31
Tyr 176			B	B				0.49	0.81				-0.60	0.42
Thr 177			B	B				0.46	0.77		*		-0.60	0.68
Cys 178			B			T		0.10	0.59		*		-0.20	0.68
Ser 179					T	T		0.70	0.87		*		0.20	0.38
Ser 180					T	T		0.49	0.54				0.20	0.40
His 181					T	T		0.43	0.81				0.35	1.18
Phe 182						T	C	0.74	0.63				0.15	1.18
Pro 183					T	T		1.17	0.64				0.35	1.52
Tyr 184					T	T		1.47	1.01		*		0.35	1.75
Ser 185					T	T		1.07	0.91				0.35	3.50
Gln 186			B	B				0.81	0.91	*			-0.45	1.96
Tyr 187				B	T			1.56	1.40	*			-0.05	1.31
Gln 188				B	T			1.77	0.64	*			-0.05	1.96
Phe 189				B	T			1.31	0.66	*	*		-0.05	1.82
Trp 190				B	T			1.61	1.04	*	*		-0.05	1.01
Lys 191			B	B				1.30	0.69	*	*		-0.45	1.01
Asn 192				B	T			0.73	0.77	*			-0.05	1.68
Phe 193				B	T			0.78	0.67	*	*		-0.05	1.32
Gln 194	A			B				0.59	-0.24	*		F	0.60	1.32
Thr 195				B			C	0.02	0.44	*	*	F	-0.25	0.57
Leu 196			B	B				-0.91	0.69	*			-0.60	0.49
Lys 197			B	B				-1.72	0.59	*			-0.60	0.20
Ile 198			B	B				-1.37	0.87	*			-0.60	0.11
Val 199			B	B				-2.18	0.81	*	*		-0.60	0.14
Ile 200			B	B				-2.72	0.81	*	*		-0.60	0.06
Leu 201			B	B				-2.72	1.46	*	*		-0.60	0.06
Gly 202			B	B				-2.98	1.46	*	*		-0.60	0.07
Leu 203			B	B				-2.90	1.24	*			-0.60	0.15
Val 204			B	B				-2.86	1.24	*			-0.60	0.15
Leu 205			B	B				-2.82	1.24	*			-0.60	0.12
Pro 206			B	B				-2.61	1.46	*			-0.60	0.11
Leu 207			B	B				-3.12	1.39	*			-0.60	0.15
Leu 208			B	B				-3.20	1.39	*			-0.60	0.13
Val 209			B	B				-3.01	1.39	*			-0.60	0.06
Met 210			B	B				-2.44	1.53	*			-0.60	0.04
Val 211			B	B				-2.53	1.60	*			-0.60	0.07
Ile 212			B	B				-2.07	1.30	*			-0.60	0.13
Cys 213			B			T		-2.14	1.09	*			-0.20	0.13
Tyr 214			B			T		-2.10	1.16	*			-0.20	0.13
Ser 215			B			T		-1.46	1.20	*			-0.20	0.15
Gly 216			B			T		-0.91	0.51	*			-0.20	0.55
Ile 217			B	B				-0.83	0.43	*			-0.60	0.51
Leu 218			B	B				-0.98	0.36	*	*		-0.30	0.31
Lys 219			B	B				-0.62	0.66	*	*	F	-0.45	0.26
Thr 220			B	B				-0.99	0.23	*	*		-0.30	0.73
Leu 221			B	B				-0.53	0.11	*	*		-0.30	0.47
Leu 222	A			B				0.36	-0.57	*	*		0.60	0.46
Arg 223	A			B				1.17	-0.17	*	*		0.30	0.52
Cys 224	A					T		1.17	-0.66	*	*		1.15	1.08

10

20

30

表 1( 77頁 )

残基の位置	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Arg	225	A	.	.	.	T	.	1.52	-1.34	*	*	F	1.30	2.63
Asn	226	A	.	.	.	T	.	2.44	-2.03	*	*	F	1.30	2.68
Glu	227	A	.	.	.	T	.	3.22	-2.03	.	*	F	1.30	9.80
Lys	228	A	.	.	.	.	.	3.22	-2.10	.	*	F	1.10	6.81
Lys	229	A	.	.	.	.	.	3.30	-2.10	*	*	F	1.10	8.29
Arg	230	A	.	.	.	.	.	2.33	-2.00	*	.	F	1.10	4.83
His	231	A	.	.	B	.	.	2.44	-1.36	*	*	.	0.75	1.79
Arg	232	A	.	.	B	.	.	1.63	-1.36	*	.	.	0.75	1.76
Ala	233	A	.	.	B	.	.	0.70	-0.67	*	*	.	0.60	0.74
Val	234	A	.	.	B	.	.	-0.04	0.01	*	.	.	-0.30	0.38
Arg	235	A	.	.	B	.	.	-0.47	0.30	*	*	.	-0.30	0.17
Leu	236	.	.	B	B	.	.	-1.32	0.79	*	*	.	-0.60	0.24
Ile	237	.	.	B	B	.	.	-2.03	0.97	*	*	.	-0.60	0.23
Phe	238	.	.	B	B	.	.	-2.33	0.94	*	*	.	-0.60	0.11
Thr	239	.	.	B	B	.	.	-2.33	1.63	*	*	.	-0.60	0.10
Ile	240	.	.	B	B	.	.	-2.69	1.39	*	*	.	-0.60	0.10
Met	241	.	.	B	B	.	.	-2.58	1.66	.	.	.	-0.60	0.19
Ile	242	.	.	B	B	.	.	-2.50	1.66	.	.	.	-0.60	0.11
Val	243	.	.	B	B	.	.	-2.50	1.86	.	.	.	-0.60	0.13
Tyr	244	.	.	B	B	.	.	-2.48	1.96	.	.	.	-0.60	0.12
Phe	245	.	.	B	B	.	.	-2.18	2.26	.	.	.	-0.60	0.17
Leu	246	.	.	B	B	.	.	-1.79	2.07	.	.	.	-0.60	0.24
Phe	247	.	.	B	B	T	.	-1.14	1.86	.	.	.	-0.20	0.23
Trp	248	.	.	B	.	.	.	-0.29	1.86	.	*	.	-0.40	0.42
Ala	249	.	.	.	.	T	C	-0.93	1.47	.	.	.	0.00	0.82
Pro	250	.	.	.	.	T	C	-1.09	1.47	.	*	.	0.00	0.67
Tyr	251	.	.	.	T	T	.	-1.09	1.33	.	.	.	0.20	0.47
Asn	252	.	.	B	.	T	.	-1.20	1.10	.	*	.	-0.20	0.38
Ile	253	.	.	B	B	.	.	-1.72	1.29	.	*	.	-0.60	0.20
Val	254	.	.	B	B	.	.	-1.13	1.54	.	*	.	-0.60	0.11
Leu	255	.	.	B	B	.	.	-1.23	1.19	*	.	.	-0.60	0.11
Leu	256	.	.	B	B	.	.	-1.69	1.27	*	.	.	-0.60	0.22
Leu	257	.	.	B	B	.	.	-1.69	1.37	*	.	.	-0.60	0.26
Asn	258	.	.	B	B	.	.	-0.80	1.13	*	.	.	-0.60	0.54
Thr	259	A	.	B	.	.	.	-0.64	0.44	*	.	.	-0.45	1.14
Phe	260	A	.	B	.	.	.	-0.53	0.54	*	.	.	-0.45	1.20
Gln	261	.	.	B	B	.	.	-0.07	0.64	*	.	.	-0.60	0.64
Glu	262	.	.	B	B	.	.	-0.07	0.67	*	.	.	-0.60	0.44
Phe	263	.	.	B	.	.	.	-0.07	0.87	*	.	.	-0.40	0.42
Phe	264	.	.	.	.	T	.	0.24	0.49	.	.	.	0.00	0.39
Gly	265	.	.	.	.	T	.	0.28	0.49	.	.	.	0.00	0.36
Leu	266	.	.	.	.	T	.	-0.02	1.06	.	.	.	0.00	0.22
Asn	267	.	.	.	.	T	.	-0.32	0.66	.	.	.	0.00	0.35
Asn	268	.	.	.	.	T	.	0.08	0.26	.	.	F	0.45	0.47
Cys	269	.	.	.	.	T	T	0.78	0.21	*	*	F	0.65	0.76
Ser	270	.	.	.	.	T	T	1.23	-0.07	*	*	F	1.25	0.76
Ser	271	.	.	.	.	T	T	1.23	-0.47	.	*	F	1.25	0.93
Ser	272	.	.	.	.	T	C	1.23	-0.19	*	*	F	1.20	1.43
Asn	273	.	A	.	.	T	.	1.23	-0.76	.	*	F	1.30	1.79
Arg	274	.	A	.	.	T	.	1.31	-0.74	*	*	F	1.30	2.31
Leu	275	A	A	.	.	.	.	1.01	-0.63	*	*	F	0.90	1.74
Asp	276	A	A	.	.	.	.	1.31	-0.40	*	*	F	0.60	1.07
Gln	277	A	A	.	.	.	.	0.76	-0.40	*	*	.	0.30	0.95
Ala	278	A	.	.	B	.	.	0.44	0.24	*	*	.	-0.30	0.85
Met	279	.	.	B	B	.	.	0.33	0.04	*	*	.	-0.30	0.74
Gln	280	.	.	B	B	.	.	0.83	0.04	*	*	.	-0.30	0.74

10

20

30

表 1(77続)

残基の位置		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Val	281	.	.	B	B	.	.	.	0.02	0.13	*	.	.	-0.15	1.05
Thr	282	A	.	.	B	.	.	.	-0.32	0.31	*	.	F	-0.15	0.88
Glu	283	A	.	.	B	.	.	.	-0.33	0.13	*	.	F	-0.15	0.50
Thr	284	A	.	.	B	.	.	.	-0.04	0.34	.	*	F	-0.15	0.67
Leu	285	A	.	.	B	.	.	.	-0.08	0.19	.	.	.	-0.30	0.67
Gly	286	.	.	.	B	T	.	.	0.11	0.20	.	.	.	0.10	0.52
Met	287	.	.	.	B	T	.	.	-0.24	0.77	.	.	.	-0.20	0.19
Thr	288	.	.	B	B	.	.	.	-1.13	0.86	.	.	.	-0.60	0.13
His	289	.	.	B	B	.	.	.	-0.82	0.86	.	.	.	-0.60	0.09
Cys	290	.	.	B	B	.	.	.	-0.22	0.83	.	.	.	-0.60	0.15
Cys	291	.	.	B	B	.	.	.	-0.77	0.64	.	.	.	-0.60	0.16
Ile	292	.	.	B	B	.	.	.	-1.06	0.84	.	.	.	-0.60	0.08
Asn	293	.	.	B	B	.	.	.	-0.99	1.03	*	*	.	-0.60	0.11
Pro	294	.	.	B	B	.	.	.	-1.54	1.21	*	.	.	-0.60	0.31
Ile	295	.	A	B	B	.	.	.	-1.58	1.14	*	.	.	-0.60	0.44
Ile	296	.	A	B	B	.	.	.	-1.77	1.24	*	.	.	-0.60	0.24
Tyr	297	.	A	B	B	.	.	.	-1.22	1.49	*	.	.	-0.60	0.11
Ala	298	.	A	B	B	.	.	.	-1.22	1.49	*	.	.	-0.60	0.16
Phe	299	.	A	B	B	.	.	.	-0.97	0.80	.	.	.	-0.60	0.40
Val	300	.	A	B	B	.	.	.	-0.78	0.11	*	*	.	-0.30	0.51
Gly	301	A	A	.	B	.	.	.	0.22	0.14	*	*	F	-0.15	0.44
Glu	302	A	A	.	.	.	.	.	0.47	-0.36	*	*	F	0.45	0.99
Lys	303	A	A	.	.	.	.	.	0.81	-0.74	*	*	F	0.90	2.14
Phe	304	A	.	.	.	.	T	.	0.70	-0.63	*	*	F	1.30	3.39
Arg	305	A	.	.	.	.	T	.	0.74	-0.37	*	*	.	0.85	1.62
Asn	306	A	.	.	.	.	T	.	0.23	0.31	*	*	.	0.10	0.67
Tyr	307	A	.	.	.	.	T	.	-0.47	0.96	*	*	.	-0.20	0.57
Leu	308	A	.	.	B	.	.	.	-1.21	0.96	*	*	.	-0.60	0.25
Leu	309	A	.	.	B	.	.	.	-0.51	1.74	*	*	.	-0.60	0.14
Val	310	A	.	.	B	.	.	.	-0.58	1.74	.	.	.	-0.60	0.15
Phe	311	A	.	.	B	.	.	.	-0.61	0.99	*	.	.	-0.60	0.36
Phe	312	A	.	.	B	.	.	.	-1.26	0.80	*	.	.	-0.60	0.60
Gln	313	A	.	.	B	.	.	.	-1.03	0.80	*	.	.	-0.60	0.57
Lys	314	A	.	.	B	.	.	.	-0.18	0.66	*	.	.	-0.60	0.66
His	315	A	A	.	.	.	.	.	0.79	-0.13	*	*	.	0.45	1.53
Ile	316	A	A	.	.	.	.	.	0.79	-0.91	*	.	.	0.75	1.73
Ala	317	A	A	.	.	.	.	.	0.82	-0.53	*	.	.	0.88	0.75
Lys	318	A	A	.	.	.	.	.	0.87	0.04	*	.	.	0.26	0.30
Arg	319	.	A	.	.	.	T	.	0.16	-0.46	*	.	.	1.54	0.84
Phe	320	.	A	.	.	.	T	.	-0.48	-0.57	*	.	.	2.12	0.45
Cys	321	.	.	.	.	T	T	.	0.11	-0.50	*	.	.	2.80	0.12
Lys	322	.	.	.	.	T	T	.	-0.19	-0.11	*	.	.	2.22	0.08
Cys	323	.	.	.	.	T	T	.	-0.93	0.57	*	.	.	1.04	0.07
Cys	324	.	.	.	.	T	T	.	-1.04	0.57	*	.	.	0.76	0.11
Ser	325	.	A	.	.	T	.	.	-0.34	0.40	*	.	.	0.38	0.09
Ile	326	.	A	B	.	.	.	.	0.32	0.80	*	.	.	-0.60	0.30
Phe	327	.	A	B	.	.	.	.	-0.31	0.23	*	.	.	-0.30	0.97
Gln	328	A	A	.	.	.	.	.	0.14	0.16	.	.	F	-0.15	0.73
Gln	329	A	A	.	.	.	.	.	0.81	0.20	.	*	F	0.00	1.61
Glu	330	A	A	.	.	.	.	.	1.22	-0.49	.	*	F	0.60	3.22
Ala	331	A	A	.	.	.	.	C	1.52	-1.27	.	*	F	1.10	3.64
Pro	332	A	A	.	.	.	.	.	1.92	-1.17	*	*	F	0.90	2.13
Glu	333	A	A	.	.	.	.	.	1.62	-1.19	*	*	F	0.90	1.64
Arg	334	A	A	.	.	.	.	.	0.77	-0.80	*	.	F	0.90	2.18
Ala	335	A	A	.	B	.	.	.	0.52	-0.66	*	*	F	0.90	1.05
Ser	336	.	A	B	B	.	.	.	0.80	-0.33	*	*	F	0.45	0.95

10

20

30

表 1(77続)

残基の位置		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Ser	337	.	.	B	B	.	.	.	1.12	0.16	*	.	F	-0.15	0.70
Val	338	.	.	B	B	.	.	.	0.82	0.16	*	*	.	-0.15	1.35
Tyr	339	.	.	B	B	.	.	.	0.40	0.04	*	*	F	0.30	1.35
Thr	340	.	.	B	B	.	.	.	0.64	0.14	*	*	F	0.60	1.46
Arg	341	.	.	.	B	.	.	.	0.94	0.19	.	*	F	1.10	1.94
Ser	342	.	.	.	.	.	T	C	1.24	-0.46	.	*	F	2.40	2.15
Thr	343	.	.	.	.	.	T	C	2.10	-0.81	.	*	F	3.00	2.58
Gly	344	.	.	.	.	.	T	C	1.46	-1.30	.	*	F	2.70	2.28
Glu	345	.	.	.	.	.	T	C	1.47	-0.61	.	*	F	2.40	1.19
Gln	346	.	.	B	B	.	.	.	0.50	-0.61	.	*	F	1.50	1.11
Glu	347	.	.	B	B	.	.	.	0.46	-0.46	.	*	F	0.75	0.83
Ile	348	.	.	B	B	.	.	.	-0.04	-0.46	.	*	F	0.45	0.47
Ser	349	.	.	B	B	.	.	.	-0.09	0.23	.	*	.	-0.30	0.23
Val	350	.	.	B	B	.	.	.	-0.48	0.26	.	*	.	-0.30	0.17
Gly	351	.	.	B	B	.	.	.	-0.87	0.69	.	*	.	-0.60	0.30
Leu	352	A	.	.	B	.	.	.	-1.26	0.43	.	*	.	-0.60	0.29

40

50

この点に関して非常に好ましいフラグメントの中には、いくつかの構造的特徴（例えば、上記に示すいくつかの特徴）を合わせる G - タンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の領域を含むフラグメントがある。

【0254】

他の好ましいフラグメントは、生物学的に活性な G - タンパク質ケモカインレセプター（CCR5）フラグメントである。生物学的に活性なフラグメントとは、G - タンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドの活性に類似の（しかし、同一である必要はない）活性を示すフラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改善された所望の活性、または低下した望まれない活性を含み得る。これらのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明によって含まれる。

10

【0255】

しかし、多くのポリヌクレオチド配列（例えば、EST配列）は、公に利用可能であり、そして配列データベースを通してアクセス可能である。これらの配列のいくつかは、配列番号1、または寄託クローンに関連し、そして本発明の着想の前に公に利用可能であり得る。好ましくは、このような関連するポリヌクレオチドは、本発明の範囲から特に除外される。全ての関連配列を列挙することは、本出願の開示では非常に煩わしい。従って、好ましくは、一般式 a - b により記載されるヌクレオチド配列（ここで、a は配列番号1の1 ~ 1400の間の任意の整数であり、b は15 ~ 1414の整数であり、ここで a および b の両方は配列番号1に示されるヌクレオチド残基かまたは寄託クローンの位置に対応し、そしてここで b は a + 14 以上である）を含む1つ以上のポリヌクレオチドが除外される。

20

【0256】

（エピトープおよび抗体）

本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドのエピトープ、あるいは ATCC 受託番号 97183 に含まれるポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド配列のエピトープ、または配列番号1の配列の相補体もしくは ATCC 受託番号 97183 に含まれる配列の相補体に、上記に定義されるようなストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下もしくは低いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド配列のエピトープを含むか、またはこれらからなる、ポリペプチドを含む。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列（例えば、配列番号1に開示される配列または寄託クローンの配列）のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列、本発明のエピトープをコードするポリヌクレオチド配列の相補鎖のポリヌクレオチド配列、および上記に定義されるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下もしくは低いストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で、その相補鎖にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列を含む。

30

【0257】

本明細書中で使用される用語「エピトープ」とは、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトにおいて、抗原性活性または免疫原性活性を有するポリペプチドの部分を用いる。好ましい実施形態において、本発明は、このポリペプチドをコードするエピトープならびにポリヌクレオチドを含むポリペプチドを含む。本明細書で使用される場合、「免疫原性エピトープ」は、動物において抗体応答を誘発するタンパク質の一部として定義され、このような応答は、当該分野で公知の任意の方法（例えば、以下に記載された抗体作製の方法）によって測定される。（例えば、Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3998 - 4002 (1983) を参照のこと）。本明細書中で使用される場合、用語「抗原性エピトープ」とは、当該分野で周知の任意の方法（例えば、本明細書中に記載されたイムノアッセイ）によって測定されるように、タンパク質の一部として定義され、このタンパク質に抗体はその抗原結合領域（すなわち、相補性決定領域または抗原結合部位を含むドメイン）を介して結合する。免疫特異的な結合は、非特異的な結合を除外するが、必ずしも他の抗原との交差反応性を除外する必要はない。抗原性エピトープは、必ずしも免疫原性を必要とはしない。全長タンパク質または

40

50

抗原性ペプチドフラグメントのどちらでも使用され得る。高い抗原性指標を有する領域を、表1および図3に示す。

【0258】

好ましくは、抗体は、これらの領域からまたはこれらの領域における別々の領域から調製される。しかし、抗体は、本明細書中に記載されるようなペプチドの任意の領域から調整され得る。好ましいフラグメントは、リガンド結合を減少または完全に防止する抗体を産生する。抗体は、レセプターの全体またはレセプターの一部（例えば、細胞内カルボキシ末端ドメイン、アミノ末端細胞内ドメイン、膜貫通ドメインの全体もしくは特定の膜貫通セグメント、細胞内ループもしくは細胞外ループのいずれか、またはこれら領域の任意の部分）に対して開発され得る。抗体はまた、特定の機能性部位（例えば、リガンド結合の部位、G-タンパク質結合の部位、またはグリコシル化、リン酸化、ミリスチル化もしくはアミド化される部位）に対して開発され得る。

10

【0259】

エピトープとして機能するフラグメントは、任意の従来手段により作製され得る。（例えば、Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135 (1985) (米国特許第4,631,211号にさらに記載される)を参照のこと）。

【0260】

本発明において、抗原性エピトープは、好ましくは、少なくとも4アミノ酸、少なくとも5アミノ酸、少なくとも6アミノ酸、少なくとも7アミノ酸の配列を含み、より好ましくは、少なくとも8アミノ酸、少なくとも9アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも11アミノ酸、少なくとも12アミノ酸、少なくとも13アミノ酸、少なくとも14アミノ酸、少なくとも15アミノ酸、少なくとも20アミノ酸、少なくとも25アミノ酸、少なくとも30アミノ酸、少なくとも40アミノ酸、少なくとも50アミノ酸の配列を含み、そして最も好ましくは約15アミノ酸と約30アミノ酸との間の配列を含む。免疫原性または抗原性エピトープを含有する好ましいポリペプチドは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100アミノ酸残基の長さである。さらなる非限定的な好ましい抗原性エピトープは、本明細書中に開示される抗原性エピトープおよびそれらの部分を含む。抗原性エピトープは、例えば、このエピトープに特異的に結合する抗体（モノクローナル抗体を含む）を惹起するために有用である。好ましい抗原性エピトープは、本明細書中に開示される抗原性エピトープ、およびこれらの2、3、4、5以上の抗原性エピトープの任意の組み合わせを含む。抗原性エピトープは、イムノアッセイにおいて、標的分子として使用され得る。（例えば、Wilsonら, Cell 37: 767-778 (1984); Sutcliffeら, Science 219: 660-666 (1983)を参照のこと）。しかし、これらのフラグメントは、本発明の前に開示され得る任意のフラグメントを含むように作製されない。

20

30

【0261】

同様に、当該分野で周知の方法に従って、免疫原性エピトープを使用して、例えば、抗体を誘導し得る。（例えば、Sutcliffeら、前出；Wilsonら、前出；Chowら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 910-914；およびBittleら、J. Gen. Virol. 66: 2347-2354 (1985)を参照のこと）。好ましい抗原性エピトープは、本明細書中に開示される抗原性エピトープ、およびこれらの2、3、4、5以上の抗原性エピトープの任意の組み合わせを含む。1つ以上の免疫原性エピトープを含むポリペプチドは、キャリアタンパク質（例えば、アルブミン）とともに動物系（例えば、ウサギまたはマウス）に抗体応答を誘発するために提示され得るか、このポリペプチドが十分に長い場合（少なくとも約25アミノ酸）、このポリペプチドは、キャリアなしで動物系に提示され得る。しかし、8~10程度の少ないアミノ酸を含む免疫原性エピトープは、少なくとも変性ポリペプチド中の直鎖状エピトープ（例えば、ウェスタンブロットティングにおいて）に結合し得る抗体を惹起するには十分

40

50

であることが示されている。

【0262】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、当該分野で周知の方法に従って抗体を誘導するために使用され得る。これらの周知の方法としては、インビボ免疫、インビトロ免疫、およびファージディスプレイ法が挙げられるが、それらに限定されない。例えば、Sutcliffeら、前出；Wilsonら、前出；およびBittleら、J. Gen. Virol. 66: 2347-2354 (1985)を参照のこと。インビボ免疫を使用する場合、動物を遊離ペプチドを用いて免疫し得る；しかし、抗ペプチド抗体力価は、高分子キャリア（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）または破傷風トキソイド）にペプチドを結合させることによりブーストされ得る。例えば、システイン残基を含むペプチドは、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）のようなリンカーを用いてキャリアに結合され得るが、他のペプチドは、グルタルアルデヒドのようなより一般的な結合薬剤を使用してキャリアに結合され得る。

10

【0263】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5409にJ. P. Tamによって最初に記載された（この全体が本明細書中に参照として援用される）、複数抗原ペプチド（multiple antigen peptide）（MAP）として合成され得る。MAPは、非免疫抗原性リジン核に結合する特定のペプチドの複数のコピーからなる。Mapペプチドは、通常、MAP-4ペプチドまたはMAP-8ペプチドとしてしばしば称される4または8コピーのペプチドを含む。非限定的な例として、MAPは、ポリエチレングリコール-ポリスチレン（PEG-PS）支持体に結合するリジン核マトリックスにおいて合成され得る。目的のペプチドは、9-フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）化学反応を使用してリジン残基において合成される。例えば、Applied Biosystems（Forster City, CA）は、MAPリジン（例えば、MAPを合成するために使用され得るFmocリジン4分枝（Fmoc Resin 4 Branch）およびFmocリジン8分枝（Fmoc Resin 8 Branch）のような）を提供する。リジンからのMAPの切断は、当該分野で公知の標準トリフルオロ酢酸（TFA）基礎化カクテルを使用して実施される。MAPの精製（脱塩を除く）は、必要ではない。MAPペプチドは、MAPとこのペプチドを由来とする天然のタンパク質の両方を認識する抗体を惹起するワクチンを免疫化するために使用され得る。

20

30

【0264】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドはまた、ウイルスのコートタンパク質に組み込まれ得、次いで、これは抗エピトープ抗体の産生を促進するために、免疫抗原または動物（ヒトを含む）に免疫するワクチンとして使用され得る。例えば、ヒト免疫不全ウイルスタイプ1（HIV-1）のgp120糖タンパク質のV3ループは、ライノウイルスの表面上に発現されるように操作されている。V3ループペプチドを表示するこのライノウイルスの免疫化は、HIV-1免疫抗原の明らかに効果的な擬態を産生する（抗HIV-1抗体によって中和される能力および細胞培養物においてHIV-1を中和し得る抗体の産生を惹起する能力によって測定されるように）。免疫原として操作されたウイルス粒子を使用するこの技術は、Smithら、Behring Inst Mitt; (98): 229-39 (1997), Smithら、J. Virol. 72: 651-9 (1998), およびZhangら、Biol. Chem. 380: 365-74 (1999)により詳細に記載される（これらは、その全体が本明細書中に参照として援用される）。

40

【0265】

本発明のエピトープ保有ポリペプチドは、例えば、ペプチドのアミノ末端および/またはカルボキシ末端にアミノ酸の添加によって改変され得る。このような改変は、例えば、エピトープ保有ポリペプチドの高次構造を改変するために実施され得、その結果、エピトープは、天然のタンパク質におけるエピトープの構造により密接に関連する高次構造を有する。本発明のポリペプチドを産生する改変されたエピトープの例は、1つ以上のシステ

50

イン残基が、2つのシステイン間にジスルフィド結合の形成を可能にするためにポリペプチドに加えられたポリペプチドであり、非還元条件下でエピトープ保有ポリペプチドを安定してループ構造を生じる。ジスルフィド結合は、ポリペプチドに加えられたシステイン残基と天然に存在するエピトープのシステイン残基との間に形成され得るか、または両方の天然に存在するエピトープ保有ポリペプチドに加えられた2つのシステイン間に形成され得る。さらに、ジスルフィド結合されたループ構造の形成を促進するためにシステインで置換することによって、天然に存在するエピトープ保有ポリペプチドの1つ以上のアミノ酸残基を改変することが可能である。合成ペプチドの環状チオエステル分子は、この分野で公知でかつPCT出願WO97/46251(その全体が本明細書中に参照として援用される)に記載される技術を使用して通常産生され得る。本発明によって企図されるエピトープ保有ポリペプチドの他の改変としては、ビオチン化が挙げられる。

10

## 【0266】

ウサギ、ラット、およびマウスのような動物は、遊離のペプチドもしくはキャリア結合ペプチドのいずれかまたはMAPペプチドを用いて、例えば、エマルジョン(約100μgのペプチドまたはキャリアタンパク質およびフロイントアジュバント、あるいは免疫応答を刺激するための当該分野で公知の他のアジュバントを含む)の腹腔内注射および/または皮内注射により免疫される。いくつかのブースター注射が、抗ペプチド抗体の有用な力価を提供するために(例えば、約2週間の間隔で)必要とされ得る。この力価は、例えば、固体表面に吸着した遊離のペプチドを用いるELISAアッセイにより検出され得る。免疫した動物由来の血清中の抗ペプチド抗体の力価は、例えば、当該分野で周知の方法に従う固体支持体上のペプチドの吸着および選択された抗体の溶出による、抗ペプチド抗体の選択により上昇し得る。

20

## 【0267】

当業者に理解されるように、そして上記で考察されるように、免疫原性エピトープまたは抗原性エピトープを含む本発明のポリペプチドは、他のポリペプチド配列に融合され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン(IgA、IgE、IgG、IgM)の定常ドメインまたはそれらの部分(CH1、CH2、CH3、またはそれらの任意の組み合わせおよびそれらの部分)、あるいはアルブミン(組換えアルブミン(例えば、1999年3月2日発行の米国特許第5,876,969号、欧州特許第0413622号、および1998年6月16日発行の米国特許第5,766,883号(これらは、本明細書によってその全体において参考として援用される)を参照のこと)を含むが、限定はされない)と融合され得、キメラポリペプチドを生じる。このような融合タンパク質は、精製を容易にし得、そしてインビボでの半減期を増大させ得る。これは、ヒトCD4-ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されている。例えば、EP394,827; Traunekerら、Nature, 331: 84~86(1988)を参照のこと。上皮の障壁を横切る抗原の免疫系への増強された送達は、IgGまたはFcフラグメントのようなFcRn結合パートナーへ結合された抗原(例えば、インシュリン)について実証された(例えば、PCT公開WO96/22024および同WO99/04813を参照のこと)。IgG部分のジスルフィド結合に起因するジスルフィド結合二量体構造を有するIgG融合タンパク質はまた、単量体ポリペプチドまたはそれらのフラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和においてより効果的であることが見出された。例えば、Fountoulakisら、J. Biochem., 270: 3958-3964(1995)を参照のこと。上記のエピトープをコードする核酸はまた、エピトープタグ(例えば、赤血球凝集素(「HA」)タグまたはフラッグ(flag)タグ)として目的の遺伝子と組換えられ、発現されたポリペプチドの検出および精製を補助し得る。例えば、Janknechtらによって記載される系は、ヒト細胞株中で発現される非変性融合タンパク質の容易な精製を可能にする(Janknechtら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-8977)。この系において、目的の遺伝子はワクシニア組換えプラスミドへサブクローン化

30

40

50

され、その結果、この遺伝子のオープンリーディングフレームが、6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグへ翻訳時に融合される。このタグは、融合タンパク質についての基質結合ドメインとしての機能を果たす。組換えワクシニアウイルスを用いて感染された細胞からの抽出物は、Ni<sup>2+</sup>ニトリロ酢酸-アガロースカラム上へロードされ、そしてヒスチジンタグ化タンパク質は、イミダゾール含有緩衝液を用いて選択的に溶出され得る。

#### 【0268】

本発明のさらなる融合タンパク質は、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および/またはコドンシャッフリング（総称して「DNAシャッフリング」といわれる）の技術を通じて生成され得る。DNAシャッフリングを利用して、本発明のポリペプチドの活性を調節し得、この方法を使用することにより、改変された活性を有するポリペプチド、ならびにこれらのポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストを生成し得る。一般には、米国特許第5,605,793号；同第5,811,238号；同第5,830,721号；同第5,834,252号；および同第5,837,458号、ならびにPattemら、Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 (1997)；Harayama, Trends Biotechnol. 16(2):76-82 (1998)；Hanssonら、J. Mol. Biol. 287:265-76 (1999)；ならびにLorenzoおよびBlasco, Biotechniques 24(2):308-13 (1998)（これらの特許および刊行物の各々が本明細書によってその全体において参考として援用される）を参照のこと。1つの実施形態において、配列番号1に対応するポリヌクレオチドおよびこれらのポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの改変は、DNAシャッフリングにより達成され得る。DNAシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的組換えにより、ポリヌクレオチド配列において変化を生じるように2つ以上のDNAセグメントをアSEMBLすることを含む。別の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドまたはそのコードするポリペプチドは、組換え前に、誤りがちの(error-prone)PCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法による、ランダム変異誘発に供されることにより改変され得る。別の実施形態において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの1つ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、フラグメントなどは、1つ以上の異種分子の、1つ以上の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、フラグメントなどと組換えられ得る。

#### 【0269】

（抗体）

本発明のさらなるポリペプチドは、（特異的抗体-抗原結合をアッセイするための当該分野で周知のイムノアッセイにより決定されるような）本発明のポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、あるいは配列番号2の改変体または開示されたクローンによってコードされるポリペプチドの改変体、および/もしくはエピトープを免疫特異的に結合する抗体およびT-細胞抗原レセプター(TCR)に関する。

#### 【0270】

基本的な抗体の構造単位は、四量体を構成することが公知である。各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対からなり、各対は、1つの「軽」鎖（約25kDa）および1つの「重」鎖（約50~70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部は、主に抗原の認識を担う約100~110以上のアミノ酸の可変領域を含む。この鎖のカルボキシ末端部は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、軽鎖および軽鎖として分類される。重鎖は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$  または  $\alpha$  として分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとして抗体のイソタイプを規定する。一般的に、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W.ら、第二版 Raven Press, N.Y. (1989))（その全体が全ての目的のために参考として援用される）を参照のこと。各軽鎖/重鎖の対の可変領域は、抗体の結合部位を形成する。

10

20

30

40

50

## 【0271】

従って、完全なIgG抗体は、2つの結合部位を有する。二重機能性または二重特異性の抗体を除いて、これら2つの結合部位は、同じである。

## 【0272】

これらの鎖は全て、相補性決定領域またはCDRとまた称される3つの高可変領域によって連結された、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)の、同じ一般的構造を示す。各対の重鎖および軽鎖由来のCDRは、特定のエピトープに結合し得るフレームワーク領域によって並べられる。N末端からC末端へ、軽鎖および重鎖の両方が、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4を含む。各ドメインに対するアミノ酸の指定は、Kabat Sequences of Protein  
s of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987および1991))、またはChothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothiaら、Nature 342:878-883 (1989)の定義に従った。

10

## 【0273】

二重特異性または二重機能性の抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'フラグメントの連結を含む種々の方法によって産生され得る。例えば、Song sivilai & Lachmann Clin. Exp. Immunol.  
79:315-321 (1990)、Kostelnyら、J Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照のこと。さらに、二重特異性抗体は、「ダイアボディ(diabody)」として形成され得る(Holligerら、「Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments」PNAS USA 90:6444-6448 (1993))または「ヤヌシン(Janusin)」(Traunekerら、「Bispecific single chain molecules (Janusins) target cytotoxic lymphocytes on HIV infected cells」EMBO J 10:3655-3659 (1991)およびTraunekerら、「Janusin: new molecular design for  
rbispecific reagents」Int J Cancer Suppl 7:51-52 (1992))。

20

30

## 【0274】

用語「抗体」とは、本明細書中で使用される場合、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分またはそのフラグメント(すなわち、免疫特異的に抗原を結合する抗原結合部位を含む分子)をいう。このように、用語「抗体」は抗体分子全体だけでなく、抗体マルチマー(antibody multimer)ならびに抗体のフラグメントおよび/または抗体、抗体マルチマーおよび抗体フラグメントの改変体(誘導体を含む)をも包含する。本明細書中で用語「抗体」によって記載される分子の例として、単鎖Fv(scFv)、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')  
2、ジスルフィド架橋化Fv(sdFv)、Fv、およびVLドメインまたはVHドメインのいずれかを含むフラグメント、あるいは代替的にVLドメインまたはVHドメインのいずれかからなるフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。用語「単鎖Fv」または「scFv」とは、本明細書中で使用される場合、抗体VHドメインと連結された抗体VLドメインを含むポリペプチドをいう。

40

## 【0275】

本発明の抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')  
フラグメント、Fab発現ライブラリーによって産生されたフラグメント、抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体が挙げられる)、細胞

50

内で生成される抗体（すなわち、イントラボディ（*intrabody*））、および任意の上記の抗体のエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子の任意の型（例えば、*IgG*、*IgE*、*IgM*、*IgD*、*IgA*、および *IgY*）、クラス（例えば、*IgG1*、*IgG2*、*IgG3*、*IgG4*、*IgA1* および *IgA2*）またはサブクラスの分子であり得る。好ましい実施形態において、免疫グロブリンは *IgM* イソタイプである。好ましい実施形態において、この免疫グロブリンは *IgG1* イソタイプである。別の好ましい実施形態において、この免疫グロブリンは *IgG2* イソタイプである。別の好ましい実施形態において、この免疫グロブリンは *IgG4* イソタイプである。免疫グロブリンは、重鎖および軽鎖の両方を有し得る。*IgG*、*IgE*、*IgM*、*IgD*、*IgA*、および *IgY* 重鎖は、または形態の軽鎖と対になり得る。

10

**【0276】**

本発明の抗体はまた、抗体のマルチマー形態を包含し得る。例えば、本発明の抗体は、抗体二量体、抗体三量体、または単量体免疫グロブリン分子のより高オーダーのマルチマーの形態を、取り得る。免疫グロブリン分子全体の二量体または *F(ab')*<sub>2</sub> フラグメントの二量体は4価であり、一方、*Fab* フラグメントまたは *scFv* 分子の二量体は2価である。抗体マルチマー中の個々の抗体は、同一であっても異なってもよい。すなわち、これらはヘテロマー性抗体マルチマーまたはモノマー性抗体マルチマーであり得る。例えば、マルチマー中の個々の抗体は、同じ結合特異性を有しても異なる結合特異性を有してもよい。

20

**【0277】**

抗体のマルチマー化は、抗体の自然な凝集を介してか、または当該分野で公知の化学的連結技術またはしくは組換え連結技術を介して、達成され得る。例えば、精製した抗体調製物（例えば、精製した *IgG1* 分子）のある割合は、抗体ホモ二量体、および他のより高オーダーの抗体マルチマーを含むタンパク質凝集物を、自発的に形成する。あるいは、抗体ホモ二量体は、当該分野で公知の化学的連結技術を介して形成され得る。例えば、ヘテロ二官能性架橋剤（*SMCC*（スクシンイミジル4-（マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート）および *SATA*（*N*-スクシンイミジル5-アセチルチオアセテート）（例えば、*Pierce Biotechnology, Inc.*（*Rockford, IL*）より市販される）が挙げられるが、これに限定されない）を使用して、抗体マルチマーを形成し得る。抗体マルチマーの形成に関する例示的プロトコルは、*Ghetie*ら、*Proceedings of the National Academy of Science USA*（1997）94：7509-7514（これは、その全体が参考として本明細書により援用される）に示される。抗体ホモ二量体は、ペプシンを用いた消化を介して *Fab'*<sub>2</sub> ホモ二量体へと変換され得る。抗体ホモ二量体を形成するための別の方法は、自己消化性（*autophilic*）*T15* ペプチドの使用を介する方法であり、これは *Zhao* および *Kohler*、*The Journal of Immunology*（2002）25：396-404（これは、その全体が参考として本明細書により援用される）に記載される。

30

**【0278】**

あるいは、抗体は組換えDNA技術を介してマルチマー化され得る。*IgM* および *IgA* は、J鎖ポリペプチドとの相互作用を介して、抗体マルチマーを自然に形成する。非 *IgA* 分子または非 *IgM* 分子（例えば、*IgG*）は、*IgA* または *IgM* のJ鎖相互作用ドメインを含むように操作されて、これによって非 *IgA* 分子または非 *IgM* 分子に対してより高オーダーのマルチマーを形成する能力を付与し得る（例えば、*Chintalacha*ら、（2001）*Clinical Immunology* 101：21-31 および *Frigerio*ら、（2000）*Plant Physiology* 123：1483-94を参照のこと（これらの両方は、その全体が参考として本明細書により援用される））。*scFv* 二量体はまた、当該分野で公知の組換え技術を介して形成され得る；*scFv* 二量体の構築例は、*Goel*ら、（2000）*Cancer Re*

40

50

search 60:6964-6971 (これは、その全体が参考として本明細書により援用される)に示される。抗体マルチマーは、当該分野で公知の任意の適切な方法(サイズ排除クロマトグラフィーが挙げられるが、これに限定されない)を使用して精製され得る。

【0279】

「単離された抗体」によって、天然の環境から取り出された抗体が意図される。従って、ハイブリドーマおよび/または組換え宿主細胞により産生され、それらから単離され、そして/またはそれらの中に含まれる抗体は、本発明の目的のために単離されると見なされる。

【0280】

本明細書中で他に定義されない限り、抗CCR5抗体による特異的結合または免疫特異的結合は、抗CCR5抗体がCCR5を結合するが、CCR5以外の他のタンパク質(例えば、同じタンパク質ファミリー中の他のタンパク質)に有意には結合しない(すなわち、有意に交差反応しない)ことを意味する。CCR5タンパク質を結合するが他のタンパク質と交差反応しない抗体とは、必ずしも、あらゆる条件下でも他のタンパク質を結合しない抗体ではなく、むしろ本発明のCCR5特異的抗体とは、他のタンパク質を結合する能力と比較してCCR5を優先的に結合し、その結果、この抗体は、少なくとも1つの型のアッセイまたは処理における使用に適切である。すなわち、処理において低レベルのバックグラウンドを生じるか、または理にそぐわない不利な効果を生じない。タンパク質の、抗体により結合される部分がエピトープとして知られることは、周知である。エピトープは、直鎖状(すなわち、タンパク質配列における連続したアミノ酸残基から構成される)または立体配置的(すなわち、タンパク質の一次構造において連続していないが、タンパク質の二次構造、三次構造または四次構造によって一緒に導かれる1つ以上のアミノ酸残基)のいずれかであり得る。CCR5特異的抗体がCCR5のエピトープに結合する場合、CCR5を特異的に結合する抗体は、CCR5のフラグメントおよび/またはCCR5の改変体(すなわち、CCR5に少なくとも90%同一であるタンパク質)を結合しても結合しなくてもよい。このことは、このCCR5のフラグメントまたは改変体における所定のCCR5特異的抗体によって結合されるエピトープの存在または不在に依存する。同様に、本発明のCCR5特異的抗体は、この抗体により認識されるオーソログ中のエピトープの存在または不在に依存して、CCR5の種オーソログ(そのフラグメントを含む)を結合し得る。さらに、本発明のCCR5特異的抗体はCCR5の改変形態(例えば、CCR5融合タンパク質)を結合し得る。本発明の抗体がCCR5融合タンパク質を結合するような場合、この抗体は、結合が特異的であるように、結合を融合タンパク質のCCR5部分と接触させなければならない。CCR5に特異的に結合する抗体は、例えば、イムノアッセイまたは当業者に公知の他の技術(例えば、以下の実施例において記載されるイムノアッセイ)によって同定され得る。

【0281】

最も好ましくは、抗体は、本発明のヒト抗原結合抗体フラグメントであり、そしてFab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>、Fd、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド連結Fv(sdFv)およびVLドメインまたはVHドメインのいずれかを含むフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。単鎖抗体を含む抗原結合抗体フラグメントは、可変領域を、単独であるいは以下:ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインの全体または部分との組み合わせで含み得る。ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインと可変領域の任意の組み合わせをもまた含む抗原結合フラグメントもまた、本発明に含まれる。本発明の抗体は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起源由来であり得る。好ましくは、この抗体は、ヒト、ネズミ(例えば、マウスおよびラット)、ロバ、ウサギ(ship rabbit)、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリである。本明細書中で使用される場合、「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、そしてヒト免疫グロブリンライブラリーから、または1つ以上のヒト免疫グロブリンについてトランスジェニッ

10

20

30

40

50

クでかつ内因性免疫グロブリンを発現しない動物（以下および、例えば、K u c h e r l a p a t i らによる米国特許第 5 , 9 3 9 , 5 9 8 号に記載されるような）から単離された抗体を含む。

【 0 2 8 2 】

本発明の抗体は、一重特異的、二重特異的、三重特異的またはより多価の多重特異的であり得る。多重特異的な抗体は、本発明のポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であり得るか、または本発明のポリペプチドおよび異種エピトープ（例えば、異種ポリペプチドまたは固体支持体物質）の両方に特異的であり得る。例えば、P C T 公開 W O 9 3 / 1 7 7 1 5 ; W O 9 2 / 0 8 8 0 2 ; W O 9 1 / 0 0 3 6 0 ; W O 9 2 / 0 5 7 9 3 ; T u t t ら、J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 - 6 9 ( 1 9 9 1 ) ; 米国特許第 4 , 4 7 4 , 8 9 3 号 ; 同第 4 , 7 1 4 , 6 8 1 号 ; 同第 4 , 9 2 5 , 6 4 8 号 ; 同第 5 , 5 7 3 , 9 2 0 号 ; 同第 5 , 6 0 1 , 8 1 9 号 ; K o s t e l n y ら、J . I m m u n o l . 1 4 8 : 1 5 4 7 - 1 5 5 3 ( 1 9 9 2 ) を参照のこと。

10

【 0 2 8 3 】

本発明の抗体は、抗体により認識されるかまたは特異的に結合される本発明のポリペプチドのエピトープまたは部分によって記載され得るかまたは特定化され得る。このエピトープまたはポリペプチド部分は、本明細書中に記載されるように、例えば、N 末端および C 末端位置により、または連続するアミノ酸残基のサイズにより、特定化され、もしくは表および図に示される得る。本発明の好ましいエピトープとしては、以下が挙げられる：配列番号 2 の、または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドの T h r 1 6 ~ V a l 2 5 、 G l n 5 9 ~ T h r 6 5 、 T h r 1 6 7 ~ L e u 1 7 4 、 S e r 1 7 9 ~ S e r 1 8 5 、 L e u 2 2 2 ~ A l a 2 3 3 、 A s n 2 6 8 ~ G l n 2 7 7 、 H i s 3 1 5 ~ S e r 3 2 5 、 G l u 3 3 0 ~ S e r 3 3 6 、 T y r 3 3 9 ~ I l e 3 4 8 、 およびこれらのエピトープをコードするポリペプチド。本発明のさらにより好ましいエピトープとしては、本発明の G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）の細胞外ループに対応するペプチドまたはそのフラグメントおよび改変体（例えば、配列番号 2 あるいは寄託されたクローンにコードされるポリペプチドのアミノ酸 8 9 ~ 1 0 2 、 1 6 7 ~ 1 9 5 および / または 2 6 1 ~ 2 7 4 ）が挙げられる。本発明の任意のエピトープまたはポリペプチドを特異的に結合する抗体はまた排除され得る。従って、本発明は、本発明のポリペプチドを特異的に結合し、そしてこのポリペプチドの排除を可能にする抗体を含む。

20

30

【 0 2 8 4 】

本発明の抗体はまた、その交差反応性によって記載され得るか、または特定化され得る。本発明のポリペプチドの任意の他のアナログ、オルソログ（o r t h o l o g）またはホモログを結合しない抗体が、含まれる。本発明のポリペプチドに対して少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 6 0 %、少なくとも 5 5 % および少なくとも 5 0 % の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書において記載された方法を用いて計算される場合）を有するポリペプチドを結合する抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、本発明の抗体は、ヒトタンパク質のマウス、サル、ラットおよび / またはウサギホモログ、ならびにその対応するエピトープと交差反応し得る。本発明のポリペプチドに対して 9 5 % 未満の、9 0 % 未満の、8 5 % 未満の、8 0 % 未満の、7 5 % 未満の、7 0 % 未満の、6 5 % 未満の、6 0 % 未満の、5 5 % 未満のおよび 5 0 % 未満の同一性（当該分野で公知の方法および本明細書において記載された方法を用いて計算される場合）を有するポリペプチドを結合しない抗体もまた、本発明に含まれる。特定の実施形態において、上記の交差反応性は、任意の単一の特異的抗原および免疫原性ポリペプチド、あるいは 2、3、4、5 以上の特異的抗原および / または本明細書に記載される免疫原性ポリペプチドの組み合わせに関する。さらに本発明には、（本明細書中に記載されるような）ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で本発明のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを結合する抗

40

50

体が含まれる。

【0285】

本発明の抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含むかあるいはこれらからなる分子を含む）は、ヒトGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）（配列番号2または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドの）ならびに/またはサルGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントあるいはその改変体に免疫特異的に結合するものに、免疫特異的に結合し得る。好ましくは、本発明の抗体は、ヒトのGタンパク質ケモカインレセプターに免疫特異的に結合する。好ましくは、本発明の抗体は、ヒトおよびサルのGタンパク質ケモカインレセプターに免疫特異的に結合する。また好ましくは、本発明の抗体は、ヒトGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）およびマウスGタンパク質ケモカインレセプターに、免疫特異的に結合する。より好ましくは、本発明の抗体は、マウスGタンパク質ケモカインレセプターよりもヒトGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に、より高い親和性で免疫特異的に結合する。

10

【0286】

好ましい実施形態において、本発明の抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含むかあるいはこれらからなる分子を含む）は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に免疫特異的に結合するし、他のいかなる抗原とも交差反応しない。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に免疫特異的に結合するし、他のケモカインレセプター（例えば、US28、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4および/またはCXCR5のような）とは、交差反応しない。

20

【0287】

他の好ましい実施形態において、本発明の抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に免疫特異的に結合し、そして他のケモカインレセプター（例えば、US28、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4および/またはCXCR5のような）と交差反応する。より好ましい実施形態において、本発明の抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に免疫特異的に結合し、そしてCCR3および/またはCXCR4と交差反応する。

30

【0288】

好ましい実施形態において、本発明の抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）（配列番号2のまたは寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドの）、あるいはそのフラグメントおよび改変体に、他の抗原（例えば、他のケモカインレセプターのような）に対する結合能と比較して優先的に結合する。

【0289】

非限定的な実施例について、抗体が、第二の抗原についての抗体の $K_D$ 未満の解離定数（ $K_D$ ）で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は第一の抗体に優先的に結合したとみなされ得る。他の非限定的な実施形態において、抗体が第二の抗原についての抗体の $K_D$ よりも少なくとも一桁弱い強度の親和性で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は、第一の抗体に優先的に結合したとみなされ得る。他の非限定的な実施例において、抗体が第二の抗原についての抗体の $K_D$ よりも少なくとも二桁弱い強度の親和性で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は、第一の抗体に優先的に結合したとみなされ得る。

40

【0290】

他の非限定的な実施例において、抗体が第二の抗原についての抗体の $K_{off}$ 未満の解離速度（ $off\ rate$ ）（ $K_{off}$ ）で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は第一の抗体に優先的に結合したとみなされ得る。他の非限定的な実施形態において、抗体が第二の抗原についての抗体の $K_{off}$ よりも少なくとも一桁弱い強度の親和性で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は、第一の抗体に優先的に結合したとみなされ得る。他の

50

非限定的な実施例において、抗体が第二の抗原についての抗体の  $K_{off}$  よりも少なくとも二桁弱い強度の親和性で第一の抗原に結合する場合に、この抗体は、第一の抗体に優先的に結合したとみなされ得る。

【0291】

本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドに対する結合親和性に関して記載され特定化され得る。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-2} M$ 、 $10^{-2} M$ 、 $5 \times 10^{-3} M$ 、 $10^{-3} M$ 、 $5 \times 10^{-4} M$ 、または  $10^{-4} M$  未満の解離定数または  $K_d$  を有する結合親和性が挙げられる。より好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-5} M$ 、 $10^{-5} M$ 、 $5 \times 10^{-6} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 $5 \times 10^{-7} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $5 \times 10^{-8} M$ 、または  $10^{-8} M$  未満の解離定数または  $K_d$  を有する結合親和性が挙げられる。さらにより好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-9} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $5 \times 10^{-10} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $5 \times 10^{-11} M$ 、 $10^{-11} M$ 、 $5 \times 10^{-12} M$ 、 $10^{-12} M$ 、 $5 \times 10^{-13} M$ 、 $10^{-13} M$ 、 $5 \times 10^{-14} M$ 、 $10^{-14} M$ 、 $5 \times 10^{-15} M$ 、または  $10^{-15} M$  未満の解離定数または  $K_d$  を有する結合親和性が挙げられる。

10

【0292】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、 $5 \times 10^{-2} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^{-2} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-3} \text{秒}^{-1}$  または  $10^{-3} \text{秒}^{-1}$  以下の解離速度 ( $K_{off}$ ) で G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドあるいはそのフラグメントまたは改変体を結合する。より好ましくは、本発明の抗体は、 $5 \times 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^{-6} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-7} \text{秒}^{-1}$ 、または  $10^{-7} \text{秒}^{-1}$  以下の解離速度 ( $K_{off}$ ) で G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドあるいはそのフラグメントまたは改変体を結合する。

20

【0293】

他の実施形態において、本発明の抗体は、 $10^3 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^4 M^{-1} \text{秒}^{-1}$  または  $5 \times 10^4 M^{-1} \text{秒}^{-1}$  以上の解離速度 ( $K_{off}$ ) で G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドあるいはそのフラグメントまたは改変体を結合する。より好ましくは、本発明の抗体は、 $10^5 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $10^6 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、 $5 \times 10^6 M^{-1} \text{秒}^{-1}$ 、または  $10^7 M^{-1} \text{秒}^{-1}$  以上の解離速度 ( $K_{off}$ ) で G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドあるいはそのフラグメントまたは改変体を結合する。

30

【0294】

本発明はまた、競合的な結合を決定するための当該分野で公知の任意の方法 (例えば、本明細書中に記載されるイムノアッセイ) によって決定されるような、本発明のエピトープに対する抗体の結合を競合的に阻害する抗体を提供する。好ましい実施形態において、抗体は、少なくとも 95%、少なくとも 90%、少なくとも 85%、少なくとも 80%、少なくとも 75%、少なくとも 70%、少なくとも 60%、または少なくとも 50%、エピトープに対する結合を競合的に阻害する。

【0295】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストとして作用し得る。例えば、本発明は、レセプター/リガンドと本発明のポリペプチドとの相互作用を部分的または完全にのいずれかで破壊する抗体を含む。好ましくは、本発明の抗体は、本明細書中に開示される抗原性エピトープまたはその一部を結合する。本発明は、レセプター特異的抗体およびリガンド特異的抗体の両方を特徴とする。本発明はまた、リガンド結合を妨げないがレセプターの活性化を妨げるレセプター特異的抗体を特徴とする。レセプターの活性化 (すなわち、シグナル伝達) は、本明細書中に記載される技術、またはさもなくば当該分野で公知の技術によって決定され得る。例えば、レセプターの活性化は、(例えば、上記されたような) 免疫沈降、続いてウエスタンブロット分析によって、レセプターのリン酸化 (例えば、チロシンまたはセリン/スレオニン) あるいはその基質を検出することによって決定され得る。特定の実施形態において、抗体の非存在下の活性の少なくとも 95%、少なくとも 90%、少なくとも 85%、少なくとも 80%、少なくとも

40

50

75%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%、リガンド活性またはレセプター活性を阻害する抗体を提供する。

【0296】

本発明はまた、リガンド結合およびレセプター活性化の両方を妨げるレセプター特異的抗体、ならびにレセプター-リガンド複合体を認識し、そして、好ましくは、結合していないレセプターまたは結合していないリガンドを特異的に認識しない抗体を特徴とする。同様に、本発明には、リガンドに結合し、そしてリガンドのレセプターへの結合を妨げる中和抗体、ならびにリガンドに結合し、それによってレセプター活性化を妨げるが、リガンドがレセプターに結合することは妨げない抗体が含まれる。さらに本発明に含まれるのは、レセプターを活性化する抗体である。これらの抗体は、レセプターアゴニストとして作用し得、すなわち、リガンド媒介のレセプター活性化の生物学的活性のすべてまたはサブセット (subset) のいずれかを増強または活性化し得る (例えば、レセプターの二量体化を誘導することによって)。この抗体は、本明細書中に開示される本発明のペプチドの特定の生物学的活性を含む生物学的活性に対するアゴニスト、アンタゴニストまたはインバーズ (inverse) アゴニストとして特定化され得る。上記の抗体アゴニストは、当該分野で公知の方法を用いて作製され得る。例えば、PCT公開WO96/40281; 米国特許第5,811,097号; Dengら、Blood 92(6):1981-1988(1998); Chenら、Cancer Res. 58(16):3668-3678(1998); Harropら、J. Immunol. 161(4):1786-1794(1998); Zhuら、Cancer Res: 58(15):3209-3214(1998); Yoonら、J. Immunol. 160(7):3170-3179(1998); Pratら、J. Cell. Sci. 111(Pt2):237-247(1998); Pitardら、J. Immunol. Methods 205(2):177-190(1997); Liautardら、Cytokine 9(4):233-241(1997); Carlsonら、J. Biol. Chem. 272(17):11295-11301(1997); Tarymanら、Neuron 14(4):755-762(1995); Mullerら、Structure 6(9):1153-1167(1998); Bartunekら、Cytokine 8(1):14-20(1996) (上記の文献はすべて、その全体が本明細書において参考として援用される) を参照のこと。

10

20

30

【0297】

本発明の1つの実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) あるいはそのフラグメントまたは改変体に免疫特異的に結合する抗体は、抗Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される任意の1つの重鎖、および/または抗Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される任意の1つの軽鎖のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。本発明の別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) あるいはそのフラグメントまたは改変体に免疫特異的に結合する抗体は、抗Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される重鎖の任意の1つのVHドメイン、および/または抗Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される軽鎖の任意の1つのVLドメインのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、単一の抗Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体を発現する本発明の細胞株によって発現されるVHドメインおよびVLドメインのアミノ酸配列を含む。代替の実施形態において、本発明の抗体は、2つの異なる抗Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体を発現する本発明の細胞株によって発現されるVHドメインおよびVLドメインのアミノ酸配列を含む。抗体フラグメントあるいは抗Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体を発現する本発明の細胞株によって発現されるVHおよび/またはVLドメインの改変体を含むかあるいはこれらからなる、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) に免疫特異的に結合する分子はまた、本発明に

40

50

より含まれ、これらのVHおよびVLドメインをコードする核酸分子、分子、フラグメントならびに/または改変体もまた含まれる。

【0298】

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリペプチド、あるいはポリペプチドフラグメントまたは改変体に免疫特異的に結合する抗体を、提供する。ここで、この抗体は、抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の1以上の細胞株によって発現される重鎖に含まれる任意の1、2、3以上のVH CDRのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。特に、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に免疫特異的に結合する抗体を提供し、この抗体は、1以上の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される重鎖に含まれるVH CDR1のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に免疫特異的に結合する抗体は、1以上の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される重鎖に含まれるVH CDR2のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。好ましい実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に免疫特異的に結合する抗体は、1以上の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される重鎖に含まれるVH CDR3のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)フラグメントあるいはその改変体に免疫特異的に結合する抗体、あるいは抗体フラグメントまたはその改変体を含むかまたはこれらからなる分子はまた、本発明によって含まれ、これらの抗体をコードする核酸分子、分子、フラグメントおよび/または改変体もまた含まれる。

10

20

【0299】

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリペプチド、あるいはポリペプチドフラグメントまたは改変体に免疫特異的に結合する抗体を、提供する。ここで、この抗体は、1以上の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される軽鎖に含まれる任意の1、2、3以上のVL CDRのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。特に、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に免疫特異的に結合する抗体を提供し、この抗体は、1以上の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される軽鎖に含まれるVL CDR1のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に免疫特異的に結合する抗体は、1以上の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される軽鎖に含まれるVL CDR2のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。好ましい実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に免疫特異的に結合する抗体は、1以上の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される軽鎖に含まれるVL CDR3のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)フラグメントあるいはその改変体に免疫特異的に結合する抗体、あるいは抗体フラグメントまたはその改変体を含むかまたはこれらからなる分子はまた、本発明によって含まれ、これらの抗体をコードする核酸分子、分子、フラグメントおよび/または改変体もまた含まれる。

30

40

【0300】

本発明はまた、抗体(抗体フラグメントまたは改変体を含むかまたはこれらからなる分子を含む)を提供し、この抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントあるいはGタンパク質ケモカインレセプター(

50

CCR5)の改変体に免疫特異的に結合し、ここで、これらの抗体は、1以上の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される重鎖または軽鎖に含まれるような、1、2、3以上のVH CDRおよび1、2、3以上のVL CDRを含むかまたはこれらからなる。特に、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントあるいは改変体に免疫特異的に結合する抗体を提供する。ここで、これらの抗体は、1以上の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される重鎖または軽鎖に含まれる、VH CDRおよびVL CDRの、VH CDR 1およびVL CDR 1、VH CDR 1およびVL CDR 2、VH CDR 1およびVL CDR 3、VH CDR 2およびVL CDR 1、VH CDR 2およびVL CDR 2、VH CDR 2およびVL CDR 3、VH CDR 3およびVL CDR 1、VH CDR 3およびVL CDR 2、VH CDR 3およびVL CDR 3、またはその任意の組み合わせを含むかまたはこれらからなる。好ましい実施形態において、これらの組み合わせの1以上は、単一の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株由来である。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に免疫特異的に結合する、これらの抗体のフラグメントまたは改変体を含むかこれらからなる分子はまた、本発明によって含まれ、これらの抗体をコードする核酸分子、分子、フラグメントおよび/または改変体もまた含まれる。

#### 【0301】

本発明はまた、一般的に単離され、本発明の抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むかまたはこれらからなる分子を含む)をコードする核酸分子を提供する。特定の実施形態において、本発明の核酸分子は、抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むかまたはこれらからなる分子を含む)をコードし、この抗体は、抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される重鎖のVHドメインの任意の1つのアミノ酸配列を有するVHドメイン、ならびに抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される軽鎖のアミノ酸配列を有するVLドメインを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、本発明の核酸分子は、抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むかまたはこれらからなる分子を含む)をコードし、この抗体は、抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される重鎖のVHドメインの任意の1つのアミノ酸配列を有するVHドメイン、あるいは抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される軽鎖のアミノ酸配列を有するVLドメインを含むかまたはこれらからなる。

#### 【0302】

本発明はまた、本明細書中に記載される抗体分子(例えば、VHドメインおよび/またはVLドメイン)の改変体(誘導体を含む)を含むかまたはこれらからなる抗体を提供し、これらの抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはフラグメントあるいはその改変体に結合する。当業者に公知の標準的技術が、本発明の分子をコードするヌクレオチド配列に変異を導入するために使用され得る(例えば、アミノ酸置換を生じる部位指向性の変異誘発およびPCR媒介変異誘発を含む)。好ましくは、これらの改変体(誘導体を含む)は、参考のVHドメイン、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、HLドメイン、VLCDR1、VLCDR2、またはVLCDR3と比較して、50未満のアミノ酸置換、40未満のアミノ酸置換、30未満のアミノ酸置換、25未満のアミノ酸置換、20未満のアミノ酸置換、15未満のアミノ酸置換、10未満のアミノ酸置換、5未満のアミノ酸置換、4未満のアミノ酸置換、3未満のアミノ酸置換、2未満のアミノ酸置換をコードする。「保存されたアミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基で置換されたものである。同様の電荷を有するアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野において定義されてきた。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、

アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性残基(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、位-分岐側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸が、挙げられる。あるいは、変異は、コード配列の全てまたは一部に沿って、例えば、飽和変異誘発によってランダムに導入され得、そして、生じた変異は、活性を保持する変異を同定するために、生物学的活性(例えば、Gタンパク質ケモカインレセプターを結合する能力)について、スクリーニングされ得る。

#### 【0303】

例えば、変異の導入は、抗体分子のフレームワーク領域のみまたはCDR領域のみに可能である。変異の導入は、サイレントまたは中立のミスセンス変異であり得る(すなわち、抗原を結合する抗体の能力に影響を有さないかまたはほとんど影響を有さない)。これらの型の変異は、コドンの使用を最適化し、またはハイブリドーマの抗体産生を改善するために有用であり得る。あるいは、非中立のミスセンス変異は、抗原を結合する抗体の能力を変更し得る。これは完全な必要条件ではないが、サイレントおよび中立のミスセンス変異のほとんどの位置は、フレームワーク領域中にありがちであるが、一方、非中立のミスセンス変異のほとんどの位置は、CDR中にありがちである。当業者は、所望の特性(例えば、抗原結合活性、または結合活性(例えば、抗原結合活性の改善、または抗体の特異性の変化)における変更のない)を有する変異分子を設計しそして試験し得る。変異誘発に続き、コードされるタンパク質は、慣用的に発現され、そしてコードされるタンパク質の機能のおよび/または生物学的活性(例えば、Gタンパク質ケモカインレセプターを免疫特異的に結合する能力)は、本明細書中に記載された技術を使用することによって、または当該分野で公知の慣用的な調節技術によって決定され得る。

#### 【0304】

特定の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドまたはフラグメントあるいはその改変体に免疫特異的に結合する本発明の抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むかあるいはこれらからなる分子を含む)は、1以上の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体を発現する本発明の細胞株によって発現されるVHまたはVLドメインの1つをコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で(例えば、フィルター結合DNAに対して6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中での約45でのハイブリダイゼーション、次いで0.2×SSC/0.1%SDS中での約50~65での1回以上の洗浄)、より高いストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で(例えば、フィルター結合核酸に対して6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中で約45でハイブリダイゼーション、次いで0.1×SSC/0.2%SDS中で約68で1回以上の洗浄)、あるいは当業者に公知の他のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むかまたはこれらからなる。(例えば、Ausubel、F. M.ら編、1989、Current Protocols in Molecular Biology、Vol I、Green Publishing Associates、Inc.およびJohn Wiley & Sons、Inc.、New Yorkの6.3.1~6.3.6頁および2.10.3頁を参照のこと)。これらの抗体をコードする核酸分子はまた、本発明に包含される。

#### 【0305】

類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドあるいはそのフラグメントまたは改変体が、しばしば類似の構造および同等の生物学的活性の多くを有することが、当該分野内で周知である。従って、1つの実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドまたはフラグメントあるいはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの改変体に免疫特異的に結合する抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むかあるいはこれらからなる分子を含む)は、抗Gタンパク質ケモカインレセ

10

20

30

40

50

プター（CCR5）抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される重鎖のVHドメインのアミノ酸配列に対して、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するVHドメインを含むかまたはこれらからなる。

【0306】

別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドまたはフラグメントあるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドの改変体に免疫特異的に結合する抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含むかあるいはこれらからなる分子を含む）は、抗Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）抗体を発現する本発明の細胞株によって発現される軽鎖のVLドメインのアミノ酸配列に対して、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するVLドメインを含むかまたはこれらからなる。

【0307】

本発明はまた、本明細書中に記載した1以上の抗体と同等の1以上の生物学的特徴を有する抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含むかあるいはこれらからなる分子を含む）を含む。「生物学的特徴」によって意味されるものは、インビボまたはインビトロの抗体の活性または特性（例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）（例えば、実施例67のような、細胞表面に発現したGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）、膜結合Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）、および/あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のフラグメントまたは改変体）を結合する能力）；Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）リガンド（例えば、MIP1-、例えば、実施例61を参照のこと）への結合を実質的に阻害または破壊する能力；細胞表面のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の発現をダウンレギュレートする能力；Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）媒介の生物学的活性（例えば、HIVの、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現細胞への結合、感染（侵入/融合）を阻害または破壊する能力、および/またはその中での複製（例えば、実施例53、60、68および69を参照のこと）、MIP1- が誘導した末梢血単核球細胞PBMC（または他のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現細胞）の走化性を阻害または破壊する能力、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現細胞における細胞内カルシウム流動（flux）を誘導する能力（例えば、実施例63を参照のこと）である。必要に応じて、本発明の抗体は、本明細書中で具体的に参照される少なくとも1つの抗体と、同じエピトープに結合する。このようなエピトープの結合は、当該分野で公知のアッセイを使用して慣用的に決定され得る。

【0308】

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）、本発明の抗体のVHまたはVLドメインの一部（例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、および/もしくはVL CDR3）を含むかまたはこれらからなる上記の抗体を中和する抗体（抗体フラグメントまたはその改変体を含むかあるいはこれらからなる分子を含む）を提供する。例えば、「Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはそのフラグメントもしくは改変体を中和する」抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはそのフラグメントもしくは改変体の、リガンド（例えば、HIVおよびMIP1-）へ結合する能力を減少させるかまたは破壊する抗体；PBMCまたは他のCCR5発現細胞の走化性を誘導したMIP1- を減少させるかまたは破壊する抗体；および/あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（

10

20

30

40

50

CCR5)シグナル伝達カスケード(例えば、活性化したGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)によって阻害されるカルシウム流動、実施例63を参照のこと)を破壊するかまたは阻害する抗体のことである。1つの実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を中和する抗体は、本発明の抗体のVHドメインあるいはそのフラグメントまたは改変体、および本発明の抗体のVLドメインあるいはそのフラグメントまたは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を中和する抗体は、本発明の単一の抗体(あるいはscFvまたはFabフラグメント)由来のVHドメインおよびVLドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。1つの実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を中和する抗体は、本発明の抗体またはそのフラグメントもしくは改変体のVHドメインのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を中和する抗体は、本発明の抗体またはそのフラグメントもしくは改変体のVLドメインのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはそのフラグメントもしくは改変体を中和する抗体は、本発明の抗体のVH CDRドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。好ましい実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはそのフラグメントもしくは改変体を中和する抗体は、本発明の抗体のVH CDR3ドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはそのフラグメントもしくは改変体を中和する抗体は、本発明の抗体のVL CDRドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の好ましい実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはそのフラグメントもしくは改変体を中和する抗体は、本発明の抗体のVL CDR3ドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。これらの抗体をコードする核酸分子はまた、本発明によって含まれる。

10

20

30

40

50

**【0309】**

本発明はまた、当業者に公知の任意の方法(例えば、実施例60に記載されたアッセイ)によって決定されるように、HIVウイルス、特にコレセプターとしてGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を使用するHIVウイルスの、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞への結合、感染(侵入/融合)、および/またはその中で複製する能力を減少させるかまたは破壊する抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むかあるいはこれらからなる分子を含む)を提供する。上記の抗体は、本発明の抗体またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するVHドメインまたはVLドメインの一部(例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2もしくはVL CDR3)を含むかまたはこれらからなり得る。1つの実施形態において、HIVウイルス、特にコレセプターとしてGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を使用するHIVウイルスの、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞への結合、感染(侵入/融合)、および/またはその中で複製する能力を減少させるかまたは破壊する抗体は、本発明の抗体のVHドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列、および本発明の抗体のVLドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、HIVウイルス、特にコレセプターとしてGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を使用するHIVウイルスの、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞への結合、感染(侵入/融合)、および/またはその中で複製する能力を減少させるかまたは破壊する抗体は、本発明の単一の抗体(あるいはscFvまたはFabフラグメント)由来のVHドメインおよびVLドメイン、

またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。1つの実施形態において、HIVウイルス、特にコレセプターとしてGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を使用するHIVウイルスの、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞への結合、感染(侵入/融合)、および/またはその中で複製する能力を減少させるかまたは破壊する抗体は、本発明の抗体のVHドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、HIVウイルス、特にコレセプターとしてGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を使用するHIVウイルスの、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞への結合、感染(侵入/融合)、および/またはその中で複製する能力を減少させるかまたは破壊する抗体は、本発明の抗体のVH CDR3またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の好ましい実施形態において、HIVウイルス、特にコレセプターとしてGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を使用するHIVウイルスの、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞への結合、感染(侵入/融合)、および/またはその中で複製する能力を減少させるかまたは破壊する抗体は、本発明の抗体のVL CDR3またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。これらの抗体をコードする核酸分子はまた、本発明によって含まれる。

10

20

**【0310】**

本発明はまた、当業者に公知の任意の方法(例えば、実施例62に記載されたアッセイ)によって決定されるように、MIP1- が誘導する末梢血単核球細胞PBMCまたは他のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞の走化性を阻害するかまたは破壊する抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むかあるいはこれらからなる分子を含む)を提供する。上記の抗体は、本発明の抗体またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するVHドメインまたはVLドメインの一部(例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2もしくはVL CDR3)を含むかまたはこれらからなり得る。1つの実施形態において、MIP1- が誘導する末梢血単核球細胞PBMCまたは他のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞の走化性を減少させるかまたは破壊する抗体は、本発明の抗体のVHドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列、および本発明の抗体のVLドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、MIP1- が誘導する末梢血単核球細胞PBMCまたは他のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞の走化性を減少させるかまたは破壊する抗体は、本発明の単一の抗体(あるいはscFvまたはFabフラグメント)由来のVHドメインおよびVLドメイン、またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。1つの実施形態において、MIP1- が誘導する末梢血単核球細胞PBMCまたは他のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞の走化性を減少させるかまたは破壊する抗体は、本発明の抗体のVHドメインまたはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の実施形態において、MIP1- が誘導する末梢血単核球細胞PBMCまたは他のGタンパク質ケモカインレセプ

30

40

50

ター（CCR5）発現細胞の走化性を減少させるかまたは破壊する抗体は、本発明の抗体のVH CDR3またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。別の好ましい実施形態において、MIP1- が誘導する末梢血単核球細胞PBMCまたは他のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現細胞の走化性を減少させるかまたは破壊する抗体は、本発明の抗体のVL CDR3またはそのフラグメントもしくは改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むかまたはこれらからなる。これらの抗体をコードする核酸分子はまた、本発明によって含まれる。

#### 【0311】

本発明はまた、例えば、実施例61または63に記載されるFACS分析/アッセイのような当該分野で公知の任意の方法によって決定されるようなGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の細胞表面での発現をダウンレギュレートする抗体（抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む）を提供する。非限定的な仮定を目的として、このようなダウンレギュレーションは、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の内部移行に誘導される抗体の結果であり得る。この抗体は、本発明の抗体またはこれらのこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するHVまたはVLドメインの一部（例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、またはVL CDR3）を含むか、あるいはこれらから構成され得る。1つの実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の細胞表面での発現をダウンレギュレートする抗体は、本発明の抗体のVHドメインまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体および本発明の抗体のVLドメインまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の細胞表面での発現をダウンレギュレートする抗体は、本発明の単一抗体（またはscFvもしくはFabフラグメント）由来のVHドメインおよびVLドメインまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。1つの実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の細胞表面での発現をダウンレギュレートする抗体は、本発明の抗体のVHドメインまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の細胞表面での発現をダウンレギュレートする抗体は、本発明の抗体のVLドメインまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。好ましい実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の細胞表面での発現をダウンレギュレートする抗体は、本発明の抗体のVH CDR3またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。別の好ましい実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の細胞表面での発現をダウンレギュレートする抗体は、本発明の抗体のVL CDR3またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。これらの抗体をコードする核酸分子もまた、本発明によって包括される。

#### 【0312】

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性を高める抗体（抗体フラグメントまたはこれらの改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む）を提供し、この抗体は、本発明の抗体のVHもしくはVLドメインあるいはこれらのフラグメントまたはこれらの改変体の一部（例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2またはVL CDR3）を含むか、あるいはこれらから構成される。非限定的な例を目的として、「Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体の活性を高

10

20

30

40

50

める」は、抗体が、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のPBMC（または他のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現細胞）の走化性を刺激するため、および/またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）シグナル伝達カスケード（例えば、細胞内カルシウム流入を開始するための（実施例63を参照のこと））を刺激するための結合能力を増加することである。1つの実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性を高める抗体は、本発明の抗体のVHドメイン、またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体あるいは本発明の抗体のVLドメイン、またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性を高める抗体は、本発明の単一抗体（またはs c F vもしくはF a bフラグメント）由来のVHドメインおよびVLドメインあるいはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。1つの実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体の活性を高める抗体は、本発明の抗体のVHドメインまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体の活性を高める抗体は、本発明の抗体のVLドメインまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体の活性を高める抗体は、表2に示されるVH CDRドメインまたはこれらのフラグメントまたはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。好ましい実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体の活性を高める抗体は、本発明の抗体のVH 3CDR、またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体の活性を高める抗体は、本発明の抗体のVL CDRドメインまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。別の好ましい実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体の活性を高める抗体は、本発明の抗体のVL CDR3またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、あるいはこれらから構成される。これらの抗体をコードする核酸分子もまた本発明によって包括される。

10

20

30

### 【0313】

本発明はまた、免疫特異的にGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）および異種ポリペプチドと結合する抗体（抗体フラグメントまたはこれらの改変体を含むか、あるいはこれらから構成される分子を含む）を含むか、あるいはこれらから構成される融合タンパク質を提供する。好ましくは、この抗体が融合される異種ポリペプチドは、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現細胞（MIP-1- ; 抗CD4抗体のようなCD4結合ポリペプチド；間質由来の因子1（SDF-）のようなCXCR4結合ポリペプチド；および/またはMIP1- のようなCCR3結合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない）の機能のために有用であるか、または標的化に有用である。代替的な好ましい実施形態において、抗体が融合される異種ポリペプチドは、T細胞、マクロファージ、および/もしくは単球細胞の機能に有用であるか、または抗体のT細胞、マクロファージ、もしくは単球（MIP-1- ; 抗CD4抗体のようなCD4結合ポリペプチド；間質由来の因子1（SDF-）のようなCXCR4結合ポリペプチド；および/またはMIP1- のようなCCR3結合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない）への標的化に有用である。1つの実施形態において、本発明の融合タ

40

50

ンパク質は、本発明の抗体の1以上の任意のVHドメインのアミノ酸配列、または本発明の抗体の1以上の任意のVLドメインのアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体、および異種ポリペプチド配列を含むか、あるいはこれらから構成される。別の実施形態において、本発明の融合タンパク質は、本発明の抗体の1、2、3以上の任意のVH CDRのアミノ酸配列あるいは本発明の抗体の1、2、3以上の任意のVL CDRのアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体および異種ポリペプチド配列を含むか、あるいはこれらから構成される。好ましい実施形態において、融合タンパク質は、本発明の抗体のVH CDR3またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体のアミノ酸配列を有するポリペプチド、および融合タンパク質が免疫特異的にGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に結合する異種ポリペプチド配列を含むか、あるいはこれらから構成される。別の実施形態において、融合タンパク質は、本発明の抗体の少なくとも1つのVHドメインのアミノ酸配列および本発明の抗体の少なくとも1つのVLドメインのアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体、ならびに異種ポリペプチド配列を含むか、あるいはこれらから構成される。好ましくは、融合タンパク質のVHおよびVLドメインは、本発明の単一抗体（またはscFvもしくはFabフラグメント）に対応する。なお別の実施形態において、本発明の融合タンパク質は、本発明の抗体の1、2、3以上の任意のVH CDRのアミノ酸配列および本発明の抗体の1、2、3以上の任意のVL CDRのアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体、ならびに異種ポリペプチド配列を含むか、あるいはこれらから構成される。好ましくは、2、3、4、5、6以上のVHCDRまたはVLCDRが本発明の単一抗体（またはscFvもしくはFabフラグメント）に対応する。これらの融合タンパク質をコードする核酸分子もまた本発明により包括される。

#### 【0314】

本発明の抗体は、例えば、本発明のポリペプチドを精製、検出および標的化するために使用（インビトロとインビボの両方における診断的方法および治療的方法を含む）され得るが、これらに限定されない。例えば、これらの抗体は、生物学的サンプル中の本発明のポリペプチドのレベルを定性的および定量的に測定するための免疫アッセイにおける使用を有する。例えば、この抗体は、生物学的サンプル中の本発明のポリペプチドのレベルを定性的および定量的に測定するための免疫アッセイでの使用を有する。例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版、1988)（その全体が本明細書中で参考として援用される）。

#### 【0315】

別の非限定的な例を目的として、本発明の抗体は、受動的免疫化の形態で個体に投与され得る。あるいは、本発明の抗体をエピトープマッピングに使用し、抗体により結合されたエピトープを同定し得る。このようにして同定されたエピトープは、次に、ワクチン候補物（すなわち、個体を免疫化し、天然に存在する形態のGタンパク質ケモカインレセプターに対する抗体を惹起する）として使用され得る。

#### 【0316】

以下により詳細が議論されるように、本発明の抗体は、単独で、または他の組成物との組み合わせのいずれかで用いられ得る。この抗体は、さらに、N末端もしくはC末端で異種ポリペプチドに組換え的に融合され得るか、またはポリペプチドもしくは他の組成物に化学的に結合（共有結合および非共有結合を含む）され得る。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子およびエフェクター分子（例えば、異種ポリペプチド、薬物、放射性核種または毒素）に、組換え的に融合または結合され得る。例えば、PCT公開WO92/08495；WO91/14438；WO89/12624；米国特許第5,314,995号；およびEP396,387号を参照のこと。

#### 【0317】

本発明の抗体は、改変された（すなわち、抗体に対する任意の分子型の共有結合（co

valent attachment) によって) 誘導体を含む。例えば、抗体誘導体としては、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化 (pegylation)、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロック基 (blocking group) による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって改変された抗体が挙げられるが、限定を目的としない。多数の任意の化学的改変が、特異的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成などを含むが、これらに制限されない公知の技術によって実行され得る。さらに、誘導体は、1つ以上の非古典的アミノ酸を含み得る。

#### 【0318】

本発明の抗体は、当該分野で公知の任意の適切な方法によって産生され得る。目的の抗原に対するポリクローナル抗体は、当該分野で周知の種々の手順によって産生され得る。例えば、本発明のポリペプチドが種々の宿主動物 (ウサギ、マウス、ラットなどを含むがこれらに限定されない) に投与されて、抗原に対して特異的なポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導し得る。種々のアジュバントが、宿主種に依存して、免疫学的応答を増加させるために使用され得、そしてフロイント (完全および不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル (mineral gel)、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニック (pluronic) ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびに BCG (カルメット-ゲラン桿菌) および *Corynebacterium parvum* のような潜在的に有用なヒトアジュバントを含むが、これらに限定されない。このようなアジュバントはまた、当該分野で周知である。

#### 【0319】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え、およびファージディスプレイ技術、またはそれらの組み合わせの使用を含む、当該分野で公知の広範な種々の技術を用いて調製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、当該分野で公知の技術を含むハイブリドーマ技術を使用して産生され得、例えば、Harlowら、*Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版、1988); Hammerlingら、*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y. 1981) (上記の参考文献は、その全体が参考として援用される) に教示される。本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマ技術を介して生成された抗体に限定されない。用語「モノクローナル抗体」とは、任意の真核生物、原核生物、またはファージクローンを含む単一のクローンに由来する抗体をいい、そしてそれが生成される方法ではない。

#### 【0320】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を産生およびスクリーニングする方法は、当該分野で慣用的かつ周知であり、そして実施例に詳細に議論される。非限定的な実施例において、マウスは、本発明のポリペプチドまたはそのようなペプチドを発現する細胞を用いて免疫され得る。一旦免疫応用が検出される (例えば、抗原に特異的な抗体がマウスの血清中に検出されると)、マウスの脾臓を収集しそして脾細胞を単離する。次に、その脾細胞を周知の技術によって任意の適切な骨髄腫細胞 (例えば、ATCCから入手可能な細胞株 SP20 および P3X63-8.653 由来の細胞) に融合させる。ハイブリドーマを限界希釈によって選択およびクローン化する。次に、ハイブリドーマクローンを、本発明のポリペプチドに結合し得る抗体を分泌する細胞について、当該分野で公知の方法によってアッセイする。一般的に高いレベルの抗体を含む腹水 (ascites fluid) が、陽性ハイブリドーマクローンをを用いてマウスを免疫化することによって、産生され得る。

#### 【0321】

従って、本発明は、モノクローナル抗体を産生する方法および本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養する工程を包含する方法によって産生される抗体を提供し、こ

ここで、好ましくは、このハイブリドーマは、本発明の抗原で免疫したマウスから単離された脾細胞と骨髄腫細胞とを融合させることによって、次いで本発明のポリペプチドと結合し得る抗体を分泌するハイブリドーマクローンについて、融合から生じるハイブリドーマをスクリーニングすることによって産生される。

#### 【0322】

ポリクローナルおよびモノクローナルヒトB細胞株の両方を生産する別の周知の方法は、エプスタインバーウイルス(EBV)を使用する形質導入である。EBV形質導入B細胞株を産生するためのプロトコル(例えば、*Current Protocols in Immunology*、Coligenら編、1994、John Wiley & Sons、NY(その全体が本明細書中で参考として援用される)の第7.22章に概略されるプロトコル)が、当該分野で一般的に公知である。形質導入のためのB細胞の供給源は、一般的にヒト末梢血であるが、形質導入のためのB細胞はまた、以下に挙げられる他の供給源に由来し得るが、これらに限定されない:リンパ節、扁桃腺、脾臓、腫瘍組織、および感染組織。一般的に組織は、EBV形質導入の前に単一細胞懸濁液に作製される。さらに、B細胞を含むサンプル中のT細胞を物理的に取り除くか、またはT細胞を不活化(例えば、シクロスポリンAを用いる処置によって)する工程が取られ得る。なぜなら、抗EBV抗体について血清陽性の個体由来のT細胞は、EBVによるB細胞の不活化を抑制し得るからである。一般的に、ヒトB細胞を含むサンプルにEBVを接種し、そして3~4週間培養する。EBVの代表的な供給源は、B95-8細胞株(ATCC#VR-1492)の培養上清である。EBV形質導入の理学的徴候は、一般的に3~4週間の培養期間の最後に見られ得る。位相差顕微鏡によって、形質導入された細胞は、大きく、明瞭で、毛様に見え、そして細胞の密集したクラスター状に凝集する傾向にある。一般的に、最初EBV株はポリクローナルである。しかし、過剰に長期の細胞培養物のEBV株は特定のB細胞の選択的な増殖の結果としてモノクローナルまたはポリクローナルになり得る。あるいは、ポリクローナルEBV形質導入株は、適切な融合パートナーでサブクローニング(例えば、限界希釈培養によって)されるか、または融合され、そして限界希釈でプレートされ、モノクローナルB抗体を入手し得る。EBV形質導入細胞株のための適切な融合パートナーとして、マウス骨髄腫細胞株(例えば、SP2/0、X63-Ag8.653)、ヘテロ骨髄腫細胞株(ヒト×マウス;例えば、SPAM-8、SBC-H20、およびCB-F7)、およびヒト細胞株(例えば、GM1500、SKO-007、RPMI8226、およびKR-4)が挙げられる。従って、本発明はまた、本発明のポリペプチドまたはこれらのフラグメントに対するポリクローナルまたはモノクローナルヒト抗体を作製する方法を提供し、その方法は、ヒトB細胞のEBV形質導入を包含する。

#### 【0323】

特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術によって作製される。例えば、本発明のFabおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、例えば、パバイン(Fabフラグメントを産生する)またはペプシン(F(ab')<sub>2</sub>フラグメントを産生する)のような酵素を用いてイムノグロブリン分子のタンパク質分解性切断によって産生され得る。F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは、可変領域、軽鎖含有領域、および重鎖のCH1ドメインを含む。

#### 【0324】

例えば、本発明の抗体はまた、当該分野で公知の種々のファージディスプレイ方法を用いて産生され得る。ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。特定の実施形態において、そのようなファージは、レパトリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒトまたはマウス)から発現される抗原結合ドメインを提示するために利用され得る。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて選択または同定され得る(例えば、標識した抗体あるいは固体表面またはビーズに結合または捕捉された抗原を使用する)。これらの方法において用いられるファージは、代表的には、ファージ遺伝子IIIタンパク質またはファージ遺伝子VIIタンパク質

10

20

30

40

50

のいずれかに組換え的に融合された Fab、Fv またはジスルフィド安定化された Fv の抗体ドメインを有するファージから発現された fd および M13 結合ドメインを含む糸状ファージ (filamentous phage) である。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例としては、以下に開示される方法が挙げられる: Brinkman ら、J. Immunol. Methods 182: 41-50 (1995); Ames ら、J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995); Kettleborough ら、Eur. J. Immunol. 24: 952-958 (1994); Persic ら、Gene 187: 9-18 (1997); Burton ら、Advances in Immunology 57: 191-280 (1994); PCT 出願番号 PCT/GB91/01134; PCT 公開 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; ならびに米国特許第 5,698,426 号; 同第 5,223,409 号; 同第 5,403,484 号; 同第 5,580,717 号; 同第 5,427,908 号; 同第 5,750,753 号; 同第 5,821,047 号; 同第 5,571,698 号; 同第 5,427,908 号; 同第 5,516,637 号; 同第 5,780,225 号; 同第 5,658,727 号; 同第 5,733,743 号および同第 5,969,108 号 (これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される)。

#### 【0325】

上記参考文献に記載されるように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体をコードする領域は、ヒト抗体を含む抗体の全体または任意の他の所望の抗原結合フラグメントを生成するために単離および使用され得、そして例えば、以下に詳細が記載されるように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌を含む任意の所望の宿主において発現され得る。例えば、Fab、Fab' および F(ab')<sub>2</sub> フラグメントを組換え的に産生するための技術はまた、当該分野で公知の方法を用いて使用され得、このような方法は、以下に開示される: PCT 公開 WO 92/22324; Mullinax ら、Bio Techniques 12(6): 864-869 (1992); および Sawai ら、AJRI 34: 26-34 (1995); および Better ら、Science 240: 1041-1043 (1998) (これらの参考文献は、その全体が参考として援用される)。

#### 【0326】

単鎖の Fvs および抗体を産生するために用いられ得る技術の例としては、米国特許第 4,946,778 号および同第 5,258,498 号; Huston ら、Methods in Enzymology 203: 46-88 (1991); Shu ら、PNAS 90: 7995-7999 (1993); および Skerra ら、Science 240: 1038-1040 (1988) に記載される技術が挙げられる。ヒトにおける抗体のインビボでの使用およびインビトロ検出アッセイを含むいくつかの用途のために、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体の使用が好ましくあり得る。キメラ抗体は、抗体の異なる部分が、異なる動物種に由来する分子 (例えば、マウスモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体) である。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野において公知である。例えば、Morrisson, Science 229: 1202 (1985); Oi ら、Bio Techniques 4: 214 (1986); Gillies ら、(1989) J. Immunol. Methods 125: 191-202; 米国特許第 5,807,715 号; 同第 4,816,567 号; および同第 4,816,397 号を参照のこと (これらはそれらの全体が、参考として本明細書中に援用される)。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の 1 つ以上の相補性決定領域 (CDR) およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する所望された抗原に結合する非ヒト種抗体由来の抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域内のフレームワーク残基 (framework residue) は、抗原結合を変化させるため (好ましくは改善させるために) CDR ドナー抗体由来の対応残基と置換され

る。これらフレームワークの置換は、当該分野で周知の方法によって同定され、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリング、ならびに特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較による。(例えば、Queenら、米国特許第5,585,089号; Riechmannら、Nature 332:323(1988)を参照のこと(これらはそれらの全体が参考として本明細書中に援用される)。)抗体は、以下を含む当該分野で公知の種々の技術を用いてヒト化され得る:例えば、CDR-グラフティング(欧州特許第239,400号; PCT公開WO 91/09967; 米国特許第5,225,539号; 同第5,530,101号および同第5,585,089号)、ベニヤリング(veneering)またはリサーフェイシング(resurfacing)(欧州特許第592,106号; 同第519,596号; Padlan、Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991); Studnickaら、Protein Engineering 7(6):805-814(1994); Roguskaら、PNAS 91:969-973(1994)、およびチェーンシャッフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)。

#### 【0327】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置に対して特に所望される。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いた上記のファージディスプレイ法を含む当該分野で公知の種々の方法により作製され得る。米国特許第4,444,887号、同第4,716,111号; およびPCT公開WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、およびWO 91/10741; (これら各々はその全体が参考として本明細書中に援用される)もまた参照のこと。

#### 【0328】

ヒト抗体はまた、機能的内因性免疫グロブリンを発現し得ないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現し得るトランスジェニックマウスを用いて産生され得る。例えば、ヒト重鎖免疫グロブリン遺伝子およびヒト軽鎖免疫グロブリン遺伝子の複合体は、無作為にまたは相同組換えによってマウス胚性幹細胞に導入され得る。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域(diversity region)は、ヒト重鎖遺伝子およびヒト軽鎖遺伝子に加えて、マウスの胚性幹細胞に導入され得る。マウス重鎖免疫グロブリン遺伝子およびマウス軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン座の導入と別々にまたは同時に非機能的にされ得る。特に、JH領域のホモ接合性の欠失は、内因性抗体の産生を妨げる。改変された胚性幹細胞を拡大させ、そしてキメラマウスを産生するために胚盤胞中に微量注入する。次に、キメラマウスを、ヒト抗体を発現するホモ接合性の子孫を産生するために繁殖させる。トランスジェニックマウスを、選択された抗原(例えば、本発明のポリペプチドの全体または部分)を用いて通常の様式で免疫化する。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来ハイブリドーマ技術を用いた免疫したトランスジェニックマウスから得られ得る。トランスジェニックマウスに保持されたヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再編成し、そしてその後、クラススイッチングおよび体細胞変異を受ける。従って、そのような技術の使用によって、治療的に有用なIgG抗体、IgA抗体、IgM抗体およびIgE抗体の産生が可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、LonbergおよびHuszar、Int. Rev. Immunol. 13:65-93(1995)を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術のならびにそのような抗体を産生するためのプロトコルの詳細な議論については、例えば、PCT公開WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; 欧州特許第0598877; 米国特許第5,413,923号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,569,825号; 同第5,661,016号; 同第5,545,806号; 同第5,814,318号; 同第5,885,793号; 同

10

20

30

40

50

第5,916,771号;同第5,939,598号;同第6,075,181号;および同第6,114,598号(これらはその全体が本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。さらに、Abgenix, Inc. (Fremont, CA)およびGenpharm (San Jose, CA)のような企業は、上記の技術に類似した技術を用いて選択された抗原に対して指向するヒト抗体を提供することに従事し得る。

【0329】

選択されたエピトープを完全に認識するヒト抗体を、「ガイドされた(guided)選択」といわれる技術を用いて産生し得る。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体(例えば、マウス抗体)は、同じエピトープを完全に認識するヒト抗体の選択を導くために使用される。(Jespersenら、Bio/technology 12:899-903(1988))。

10

【0330】

さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、当業者に周知の技術を用いて本発明のポリペプチドを「模倣する」抗イディオタイプ抗体を産生するために順々に利用され得る。(例えば、GreenspanおよびBona、FASEB J. 7(5):437-444;(1989)およびNissinoff, J. Immunol. 147(8):2429-2438(1991)を参照のこと。)例えば、結合し、そしてポリペプチドの多量体化(multimerization)および/またはリガンドに対する本発明のポリペプチドの結合を競合的に阻害する抗体が、ポリペプチドの多量体化ドメインおよび/または結合ドメインを「模倣する」抗イディオタイプを産生するために使用され得、そして結果としてポリペプチドおよび/またはそのリガンドに結合し、そして中和する。このような抗イディオタイプまたはそのような抗イディオタイプのFabフラグメントの中和は、ポリペプチドリガンドを中和するための治療的レジメンに使用され得る。例えば、そのような抗イディオタイプ抗体は、本発明のポリペプチドに結合するためおよび/またはそのリガンド/レセプターに結合するために使用され得、そしてそれによってその生物学的活性が活性化されるか、またはブロックされる。

20

【0331】

イントラボディー(intrabody)は組換え核酸分子から発現された抗体(しばしばscFv)であり、そして細胞間に保持されるように操作される(例えば、細胞質、小胞体、または周辺質に保持される)。イントラボディーを使用して、例えば、イントラボディーが結合するタンパク質の機能を除去し得る。イントラボディーの発現はまた、イントラボディーを含む核酸発現ベクター中の誘導可能なプロモーターの使用を介して調節され得る。本発明のイントラボディーは、以下に開示およびレビューされるような当該分野で公知の方法を使用して産生され得る:Chenら、Hum. Gene Ther. 5:595~601(1994);Marasco, W. A., Gene Ther. 4:11~15(1997);RondonおよびMarasco, Annu. Rev. Microbiol. 51:257~283(1997);Probaら、J. Mol. Biol. 275:245~253(1998);Cohenら、Oncogene 17:2445~2456(1998);OhageおよびSteipe, J. Mol. Biol. 291:1119~1128(1999);Ohaceら、J. Mol. Biol. 291:1129~1134(1999);WirtzおよびSteipe, Protein Sci. 8:2245~2250(1999);Zhuら、J. Immunol. Methods 231:207~222(1999);およびこれらに引用される参考文献。特に、CCR5イントラボディーは、Steinbergerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:805~810(2000)によって産生されてきた。

30

40

【0332】

(Xenomouse技術)

本発明による抗体は、好ましくは、挿入されたヒト抗体産生ゲノムの実質的な部分を有するが、外因性マウス抗体の産生を欠損させるトランスジェニックマウスの使用により調

50

製される（例えば、XenoMouse種はAbgenix Inc., Fremont, CAから入手可能）。次に、このようなマウスは、ヒト免疫グロブリン分子および抗体を産生し得、そしてマウス免疫グロブリン分子および抗体の産生を欠損する。同じことを達成するために使用される技術が、特許，出願および本明細書中に開示される参考文献に開示される。

#### 【0333】

YACのメガベースの大きさのヒト遺伝座をクローン化し、そして再構築する能力、およびそれらをマウスの生殖系列に導入する能力は、非常に大きなまたは大雑把にマッピングされた遺伝子座の機能的な成分の解明ならびにヒト疾患の有用なモデル作成に対する強力なアプローチを提供する。さらに、マウス遺伝子座のそれらのヒト等価物との置換のためのこのような技術の使用は、発生期のヒト遺伝子産物の発現および調節、それらの他の系との係わり合い、ならびに疾患の誘導および進行とそれらの関連に独特な知見を提供する。

10

#### 【0334】

このようなストラテジーの重要な実用的適用は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」である。ヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子座のマウスへの導入において、外因性Ig遺伝子は不活化され、プログラムされた発現の基礎となるメカニズムを研究する機会を与え、そして抗体およびB細胞発生におけるこれらの役割を構築する。さらに、このようなストラテジーは、完全ヒトモノクローナル抗体(MAb)の産生のための理想的な供給源を提供し得、ヒト疾患における抗体治療の期待を実現することへの重要な布石である。

20

#### 【0335】

完全ヒト抗体は、マウスまたはマウス誘導モノクローナル抗体に対する内因性の免疫原性およびアレルギー性の応答を最小にし、従って、投与される抗体の効率および安全性を高めることが期待される。完全ヒト抗体の使用は、繰り返し抗体の投与が必要な慢性的および再発性のヒト疾患（例えば、癌）の処置において実質的な利益を提供することが期待され得る。

#### 【0336】

この目的に対する1つのアプローチは、マウス抗体産生を欠損するマウスを、このようなマウスが、マウス抗体の非存在下でヒト抗体の巨大レパートリーを産生することを予測して、ヒトIg遺伝子座の巨大フラグメントを用いて操作することである。巨大ヒトIgフラグメントは、巨大可変遺伝子多様性ならびに抗体産生および発現の適切な調節を保持する。抗体多様化および選択についてのマウスの機構ならびにヒトタンパク質に対する免疫学的耐性の欠如を開発することによって、これらのマウス種における再生されたヒト抗体レパートリーは、ヒト抗原を含む目的の任意の抗原に対する高い親和性の抗体を生じるはずである。ハイブリドーマ技術を使用して、所望の特異性を有する抗原特異的ヒトモノクローナル抗体は、容易に産生および選択され得る。

30

#### 【0337】

この一般的なストラテジーは、1994年に発表された最初のXenoMouse<sup>TM</sup>種の作製に関連して示された。Greenら、Nature Genetics 7: 13~21 (1994)を参照のこと。XenoMouse<sup>TM</sup>種を245 kbおよび10190 kbの大きさの生殖系配置のフラグメント（それぞれ、ヒト重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座（これらは核可変領域識別配列および定常領域識別配列に含まれる））を含む酵母人工染色体(YACS)で操作した。YACを含むヒトIgは、再配列および抗体の発現の両方のためにマウス系と適合するようにプローブされ、そして不活化されたマウスIg遺伝子を置換し得た。このことは、B細胞発生を誘発し、完全ヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、そして抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を生成するこれらの能力によって示された。これらの結果はまた、より多数のV遺伝子、さらなる調節エレメント、およびヒトIg定常領域を含むヒトIg遺伝子座のより大きな部分の導入が、感染および免疫化に対するヒト体液性応答の特徴である完全レパートリーを実質的に再利用することを示唆した。最近、Greenらの研究を、XenoMouse<sup>TM</sup>マウスを作製

40

50

するために、ヒト重鎖遺伝子座および 軽鎖遺伝子座それぞれのメガベースの大きさの生殖系列配置のYACフラグメントの導入を介して約80%より大きいヒト抗体レパートリーの導入にまで発展させた。Mendezら、Nature Genetics 15:146~156(1997)、GreenおよびJakobovits J Exp. Med. 188:483~495(1998)、Green、Journal of Immunological Methods 231:11~23(1999)および米国特許出願番号08/759,620(1996年12月3日出願)(これらの開示は、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

#### 【0338】

このようなアプローチは、さらに以下において議論され、そして描写される。米国特許出願番号07/466,008号(1990年1月12日出願)、同07/710,515(1990年11月8日出願)、同07/919,297(1992年7月24日出願)、同07/922,649(1992年7月30日出願)、同08/031,801(1993年3月15日出願)、同08/112,848(1993年8月27日出願)、同08/234,145(1994年4月28日出願)、同08/376,279(1995年1月20日出願)、同08/430,938(1995年4月27日出願)、同08/464,584(1995年6月5日出願)、同08/464,582(1995年6月5日出願)、同08/471,191(1995年6月5日出願)、同08/462,837(1995年6月5日出願)、同08/486,853(1995年6月5日出願)、同08/486,857(1995年6月5日出願)、同08/486,859(1995年6月5日出願)、同08/462,513(1995年6月5日出願)、同08/724,752(1996年10月2日出願)、および08/759,620(1996年12月3日出願)。Mendezら、Nature Genetics 15:146~156(1997)ならびにGreenおよびJakobovits J Exp. Med. 188:483~495(1998)もまた参照のこと。欧州特許第EP 0471151 B1(1996年6月12日許可公開)、国際特許出願番号WO 94/02602(1994年2月3日公開)、国際特許出願番号WO 96/34096(1996年10月31日公開)および同WO 98/24893(1998年6月11日公開)をまた参照のこと。上記列挙した特許、出願、および参考文献のそれぞれの開示は、その全体が参考として本明細書中に援用される。

#### 【0339】

ヒト抗マウス抗体(HAMA)応答は、キメラまたは他のヒト化抗体を調製する産業をもたらした。キメラ抗体は、ヒト定常領域およびマウス可変領域を含むが、特定のヒト抗キメラ抗体(HACA)応答が、特に長期に渡る抗体の利用または抗体の多回用量利用において観察される。従って、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに対する完全ヒト抗体が提供されることが、HAMAまたはHACA応答の関連および/または影響を無くすために望まれる。

#### 【0340】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体が、ハイブリドーマ技術を使用して調製される。(Kohlerら、Nature 256:495(1975); Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6:511(1976); Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6:292(1976); Hammerlingら、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 571~681頁(1981))。簡単には、Xenomouse<sup>TM</sup>マウスをGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現ベクターでトランスフェクトさせた細胞で免疫化し(詳細については実施例54を参照のこと)した。免疫化の後、このようなマウスの脾細胞を抽出し、適切な骨髓腫細胞株と融合した。任意の適切な骨髓腫細胞株が、本発明に従って使用され得る;しかし、ATCCから入手可能な親骨髓腫細胞株(P3X63-AG8.653)が使用されることが好ましい。融合の後、生じたハイブリドーマ細胞をHAT培地で選

択的に維持し、次いで、Wandsら (Gastroenterology 80:225~232(1981)) により記載されるような限界希釈によってクローン化する。ハイブリドーマ細胞をこのような選択によって入手し、次いでGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドに結合し得る抗体を分泌するクローンを同定するためのアッセイを行う。

#### 【0341】

本発明は、完全ヒト抗体、一般的には、免疫特異的にGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドと結合する単離された完全ヒト抗体に関連する。基本的には、ヒト抗体を発現する Abgenix, Inc. (Fremont, CA) からのマウスの Xenomouse 株をGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現細胞 (免疫化プロトコルの詳細について、実施例54を参照のこと) で免疫化した; 脾臓および/またはリンパ節の細胞 (B細胞を含む) を抗Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体の高力価を有するマウスから回収した; そしてこのように回収された細胞を骨髓型細胞株と融合し、不死化ハイブリドーマ細胞株を調製した。ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングし、免疫原に特異的な抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を選択および同定した。Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドに特異的な抗体の調製について本発明によるこれらの技術を利用した。本明細書中で、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドに特異的な抗体を産生する複数のハイブリドーマ細胞株の産生を記載する。さらに、このような細胞株によって産生される抗体の特徴付けを提供する。

10

20

#### 【0342】

本明細書中で議論されるハイブリドーマ細胞株由来の抗体を、表2に列挙する。本発明の好ましい抗体として、以下の細胞株によって発現される抗体が挙げられる: XF11.1D8、XF11.4D10、XF11.4C4、XF11.5H1、XF11.1G8、XF22.3C9.6、XF22.9E6、XF27/28.7D5、XF27/28.18B5、XF27/28.25G10、XF27/28.36A12、XF27/28.36F11、XF27/28.43E2、およびXF27/28.55G4。Abgenix, Inc. からのマウスの Xenomouse 種は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4のいずれかを有するヒト軽鎖を発現する。各々の Xenomouse 株はまた、ヒトIgMタイプの抗体を産生し得る。IgG2を発現する系統を使用して本発明のハイブリドーマ細胞株および抗体を作製した。従って、ハイブリドーマ細胞株によって産生された各抗体は、ヒト軽鎖を有する完全ヒトIgG2重鎖またはヒト軽鎖を有するIgM重鎖のいずれかである。これらのハイブリドーマ細胞株を、American Type Culture Collection (「ATCC」) に表2に列挙した日付で寄託し、そして与えられたATCC受託番号を表2に列挙した。ATCCは、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USAに位置する。ATCCへの受託は、特許手続上の目的のための微生物の受託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に準拠させた。

30

#### 【0343】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ペプチドに特異的なモノクローナル抗体を分泌する安定な細胞株は、組換えDNA技術を使用して、上記の特定のハイブリドーマから調製された。より具体的には、XF27/28.36F11ハイブリドーマによって発現される抗体のVHドメインおよびVLドメインをコードする核酸配列 (配列番号71 (VH) および配列番号73 (VL)) は、ヒトIgG4定常領域をコードする配列 (配列番号82) および定常領域をコードする配列 (配列番号83) を含むベクター中にクローニングされた。このベクターは、トランスフェクトされた細胞株による、IgG4定常ドメイン (配列番号82) と融合された配列番号72のVHドメインを有する重鎖と、ヒト定常ドメイン (配列番号83) と融合された配列番号74のVLドメインを含む軽鎖とを含む、抗体の分泌を可能にする。XF27/28.43E2ハイブリドーマにより発現される抗体のVHドメインおよびVLドメインをコードするヌクレオチド配列 (配

40

50

列番号75(VH)および配列番号77(VL))は、ヒトIgG4定常領域をコードする配列(配列番号82)および定常領域(配列番号83)をコードする配列を含むベクター中にクローニングされた。このベクターは、トランスフェクトされた細胞株による、IgG4定常ドメイン(配列番号82)と融合された配列番号76のVHドメインを有する重鎖と、ヒト定常ドメイン(配列番号83)と融合された配列番号78のVLドメインを含む軽鎖とを含む、抗体の分泌を可能にする。これらのベクターを使用してNS0細胞に安定にトランスフェクトし、それぞれ細胞株NS0mAb36F11および細胞株NS0mAb43E2を作製した。

#### 【0344】

X27/28.36F11ハイブリドーマのVHドメインおよびVLドメインをコードするポリヌクレオチドがクローニングされ、そしてこれを使用して、X27/28.36F11ハイブリドーマによって産生される抗体のVHドメインおよびVLドメインをコードするポリヌクレオチド配列を含む、scFv(36F11 scFv)をコードするベクターを作出した。36F11 scFvの改変体の発現ベクターを調製し、そしてこれを使用して、ファージディスプレイ技術を使用した36F11 scFvのアフィニティー成熟した改変体について選択した。同定された1つのアフィニティー成熟した36F11 scFv改変体は、AK38181である。AK38181のVLドメインをコードするポリヌクレオチド配列(配列場号79)が、鎖定常ドメインと、XF27/28.36F11細胞株またはXF27/28.43E2細胞株のどちらかによって産生される抗体のVHドメイン(ヒトIgG4重鎖定常ドメインをコードするヌクレオチド配列と共同している)をコードするポリヌクレオチド配列とを含む発現ベクター中に、クローニングした。これらのベクターは、トランスフェクトされた細胞株による、IgG4定常ドメイン(配列番号82)と融合された配列番号72または76のVHドメインを有する重鎖と、ヒト定常ドメイン(配列番号83)と融合された配列番号80のVLドメインを含む軽鎖とを含む、抗体の分泌を可能にする。これらのベクターを使用してNS0細胞に安定にトランスフェクトし、それぞれ細胞株NS0mAb36F11/AK38181および細胞株NS0mAb43E2/AK38181を作製した。これらの細胞株はまた、表2に列挙される。

#### 【0345】

XF11.1D8を2001年2月7日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-3030を得た。ハイブリドーマXF11.4D10を2001年2月7日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-3026を得た。ハイブリドーマXF11.4C4を2001年2月7日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-3028を得た。ハイブリドーマXF11.5H1を2001年2月7日に寄託し、ATCC受託番号PTA-3029を得た。ハイブリドーマXF11.1G8を2001年2月7日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-3027を得た。ハイブリドーマXF3.5F1を2001年3月2日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-3147を得た。ハイブリドーマXF11.8F8を2001年3月2日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-3150を得た。ハイブリドーマXF3.6A2を2001年3月2日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-3148を得た。ハイブリドーマXF3.10B8を2001年3月2日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-3151を得た。ハイブリドーマXF22.3C9.6を2001年9月12日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-3702を得た。ハイブリドーマXF22.9E6を2001年11月14日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-3859を得た。ハイブリドーマXF27/28.7D5を2002年2月1日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-4049を得た。ハイブリドーマXF27/28.18B5を2002年2月1日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-4050を得た。ハイブリドーマXF27/28.25G10を2002年2月1日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-4051を得た。ハイブリドーマXF27/28.36A12を2002年2月1日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-4052を得た。ハイブリド-

10

20

30

40

50

マXF27/28.36F11を2002年2月1日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-4053を得た。ハイブリドーマXF27/28.43E2を2002年2月1日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-4054を得た。ハイブリドーマXF27/28.55G4を\_\_\_\_\_にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-\_\_\_\_\_を得た。組換え細胞株NS0mAb36F11を\_\_\_\_\_にATCCに寄託し、ATCC受託番号\_\_\_\_\_を得た。組換え細胞株NS0mAb43E2を2004年3月15日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-5860を得た。組換え細胞株NS0mAb36F11/AK38181を2004年3月15日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-5859を得た。組換え細胞株NS0mAb43E2/AK38181を2004年3月15日にATCCに寄託し、ATCC受託番号PTA-5861を得た。ATCC受託番号およびハイブリドーマの名称はまた、表2に示される。

10

【0346】

(表2：抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)レセプター抗体を発現する細胞株)

【0347】

【表2】

細胞株	ATCC 受託番号	ATCC 寄託日
XF11.1D8	PTA-3030	2001年2月7日
XF11.4D10	PTA-3026	2001年2月7日
XF11.4C4	PTA-3028	2001年2月7日
XF11.5H1	PTA-3029	2001年2月7日
XF11.1G8	PTA-3027	2001年2月7日
XF3.5F1	PTA-3147	2001年3月2日
XF11.1F8	PTA-3150	2001年3月2日
XF3.6A2	PTA-3148	2001年3月2日
XF3.10B8	PTA-3151	2001年3月2日
XF22.3C9.6	PTA-3702	2001年9月12日
XF22.9E6	PTA-3859	2001年11月14日
XF27/28.7D5	PTA-4049	2002年2月1日
XF27/28.18B5	PTA-4050	2002年2月1日
XF27/28.25G10	PTA-4051	2002年2月1日
XF27/28.36A12	PTA-4052	2002年2月1日
XF27/28.36F11	PTA-4053	2002年2月1日
XF27/28.43E2	PTA-4054	2002年2月1日
XF27/28.55G4		
NS0mAb36F11		
NS0mAb43E2	PTA-5860	2004年3月15日
NS0mAb36F11/AK38181	PTA-5859	2004年3月15日
NS0mAb43E2/AK38181	PTA-5861	2004年3月15日

20

30

40

1つの実施形態において、本発明は、本発明の抗体を発現するハイブリドーマ細胞株を提供する。特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞は、株XF11.1D8である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、XF11.4D10である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、XF11.4C4である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、XF11.5H1である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、XF11.1G8である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、XF3.5F1である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ

50

細胞株は、X F 1 1 . 1 F 8 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 3 . 6 A 2 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 3 . 1 0 B 8 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 2 2 . 3 C 9 . 6 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 2 2 . 9 E 6 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 2 7 / 2 8 . 7 D 5 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 2 7 / 2 8 . 1 8 B 5 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 2 7 / 2 8 . 2 5 G 1 0 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 2 7 / 2 8 . 3 6 A 1 2 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 2 7 / 2 8 . 3 6 F 1 1 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 2 7 / 2 8 . 4 3 E 2 である。別の特定の実施形態において、本発明のハイブリドーマ細胞株は、X F 2 7 / 2 8 . 5 5 G 4 である。別の特定の局面において、本発明の細胞株は、N S 0 m A b 3 6 F 1 1 である。別の特定の局面において、本発明の細胞株は、N S 0 m A b 4 3 E 2 である。別の特定の局面において、本発明の細胞株は、N S 0 m A b 3 6 F 1 1 / A K 3 8 1 8 1 である。別の特定の局面において、本発明の細胞株は、N S 0 m A b 4 3 E 2 / A K 3 8 1 8 1 である。

#### 【 0 3 4 8 】

本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド、またはこれらのフラグメント、改変体、もしくは融合タンパク質と免疫特異的に結合する抗体(抗体フラグメントまたはそれらの改変体を含むか、またあるいはこれらから構成される分子を含む)を包括する。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドとして、配列番号2のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドまたは1995年6月1日に寄託されたATCC受託97183に含まれるクローンHDGNR10のDNAによってコードされるポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない; Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)は、配列番号2のポリペプチドまたはATCC受託番号97183のHDGNR10DNAをコードする核酸の組換え発現を介して産生され得る。

#### 【 0 3 4 9 】

本発明の1つの実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体に免疫特異的に結合する抗体は、表2で言及される少なくとも1つの細胞株によって発現される重鎖のいずれか1つおよび/または表2で言及される少なくとも1つの細胞株によって包括される軽鎖の任意の1つのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。本発明の別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはこれらのフラグメントもしくはこれらの改変体と免疫特異的に結合する抗体は、表2で言及される少なくとも1つの細胞株によって発現される重鎖VHドメインのいずれか1つおよび/または表2で言及される少なくとも1つの細胞株によって発現される軽鎖VHドメインのいずれか1つのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。好ましい実施形態において、本発明の抗体は、表2で言及される細胞株からなる群より選択される同一の細胞株によって発現されるVHドメインおよびVLドメインのアミノ酸配列を含む。代替の実施形態において、本発明の抗体は、表2に言及されるものとは異なる細胞株由来のVHドメインおよびVLドメインのアミノ酸配列を含む。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に免疫特異的に結合する表2に言及される少なくとも1つの細胞株によって発現されるVHドメインおよび/またはVLドメインの抗体フラグメントまたは改変体を含むか、またあるいはこれらからなる分子は、VHドメインおよびVLドメイン、分子、フラグメントならびに/または改変体をコードする核酸分子のように、本発明によって包括される。

#### 【 0 3 5 0 】

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリペプチド、もしくはポリペプチドフラグメントまたは改変体に免疫特異的に結合する抗体を提供し、こ

でこの抗体は、表 2 に言及される 1 以上の細胞株によって発現される重鎖に含まれる V H C D R の 1、2、3 以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またあるいはこれらから構成される。特に、本発明は、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) に免疫特異的に結合する抗体を提供し、この抗体は、表 2 で言及される 1 以上の細胞株によって発現される重鎖に含まれる V H C D R 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またあるいはこれらから構成される。別の実施形態において、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) と免疫特異的に結合する抗体は、表 2 で言及される 1 以上の細胞株によって発現される重鎖に含まれる H V C D R 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またあるいは、これらから構成される。好ましい実施形態において、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) に免疫特異的に結合する抗体は、表 2 に言及される 1 以上の細胞株によって発現される重鎖に含まれる V H C D R 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またあるいはこれらから構成される。G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) もしくは G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) フラグメントまたはこれらの改変体に免疫特異的に結合するこれらの抗体 ( 複数 ) もしくは抗体フラグメントまたはこれらの改変体はまた、これらの抗体、分子、フラグメントおよび / または改変体をコードする核酸分子のように、本発明によって包括される。

#### 【 0 3 5 1 】

本発明はまた、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) のポリペプチドもしくはポリペプチドフラグメントまたは改変体に免疫特異的に結合する抗体を提供し、ここでこの抗体は、表 2 で言及される 1 以上の細胞株によって発現される軽鎖に含まれる 1、2、3 以上の V L C D R のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またあるいはこれらから構成される。特に、本発明は、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) に免疫特異的に結合する抗体を提供し、この抗体は、表 2 で言及される 1 以上の細胞株によって発現される軽鎖に含まれる V L C D R 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またあるいはこれらから構成される。別の実施形態において、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) に免疫特異的に結合する抗体は、表 2 で言及される 1 以上の細胞株によって発現される軽鎖に含まれる V L C D R 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またあるいはこれらから構成される。好ましい実施形態において、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) に免疫特異的に結合する抗体は、表 2 で言及される 1 以上の細胞株によって発現される軽鎖に含まれる V L C D R 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか、またあるいは、これらから構成される。G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) もしくは G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) フラグメントまたはこれらの改変体に免疫特異的に結合する抗体もしくは抗体フラグメントまたはこれらの改変体を含むか、またあるいはこれらから構成される分子はまた、これらの抗体、分子、フラグメントおよび / または改変体をコードする核酸分子のように本発明によって包括される。

#### 【 0 3 5 2 】

本発明はまた、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリペプチドまたは G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) のポリペプチドフラグメントもしくはこれらの改変体に免疫特異的に結合する抗体 ( 抗体フラグメントまたは改変体を含むか、またあるいは、これらから構成される分子を含む ) を提供し、ここでこの抗体は、表 2 で言及される 1 以上の細胞株によって発現される重鎖または軽鎖に含まれるような 1、2、3 以上の V H C D R および 1、2、3 以上の V L C D R を含むか、またあるいはこれらから構成される。特に、本発明は、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) のポリペプチドもしくはポリペプチドフラグメントまたは改変体に免疫特異的に結合する抗体を提供し、ここでこの抗体は、表 2 で言及される 1 以上の細胞株によって発現される重鎖または軽鎖に含まれる V H C D R および V L C D R の V H C D R 1 および V L C D R 1、V H C D R 1 および V L C D R 2、V H C D R 1 および V L C D R 3、V H C D R 2 および V L C D R 1、V H C D R 2 および V L C D R 2、V H C D R 2 および V L C D R 3、V H C D R 3 および V L C D R 1、V H C D R 3 およ

10

20

30

40

50

び V L C D R 2、V H C D R 3 および V L C D R 3、またはこれらの任意の組み合わせを含むか、またあるいはこれらから構成される。好ましい実施形態において、1以上のこれらの組み合わせは、表 2 に開示されるように同一の s c F v 由来である。G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) に免疫特異的に結合するこれらの抗体のフラグメントまたは改変体を含むか、またあるいはこれらから構成される分子はまた、これらの抗体、分子、フラグメントまたは改変体をコードする核酸分子のように本発明に包括される。

#### 【 0 3 5 3 】

( X e n o m o u s 種に由来する抗体に対応する抗 G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) 抗体をコードする核酸分子)

本発明はまた、一般に、単離された、本発明の抗体 ( 抗体フラグメントまたはその改変体を含むか、あるいはそれからなる分子を含む ) をコードする核酸分子を提供する。特定の実施形態において、本発明の核酸分子は、表 2 において参照される少なくとも 1 つの細胞株によって発現される重鎖の V H ドメイン、および表 2 において参照される少なくとも 1 つの細胞株によって発現される軽鎖のアミノ酸配列を有する V L ドメイン、のいずれか 1 つを含むか、あるいはそれらからなる抗体 ( 抗体フラグメントまたはその改変体を含むか、あるいはそれからなる分子を含む ) をコードする。別の実施形態において、本発明の核酸分子は、表 2 において参照される少なくとも 1 つの細胞株によって発現される重鎖の V H ドメイン、または表 2 において参照される少なくとも 1 つの細胞株によって発現される軽鎖のアミノ酸配列を有する V L ドメイン、のいずれか 1 つを含むか、あるいはそれらからなる抗体 ( 抗体フラグメントまたはその改変体を含むか、あるいはそれからなる分子を含む ) をコードする。

#### 【 0 3 5 4 】

本発明はまた、本明細書中に記載される抗体分子 ( 例えば、V H ドメインおよび / または V L ドメイン ) の改変体 ( 誘導体を含む ) を含むか、あるいはそれからなる抗体を提供し、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) またはそのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する。当業者に公知の標準的技術を使用して、本発明の分子をコードするヌクレオチド配列に変異を導入し、この変異としては、例えば、アミノ酸置換を生じる部位指向変異誘発および P C R 媒介性変異誘発が挙げられる。好ましくは、改変体 ( 誘導体を含む ) は、参照の V H ドメイン、V H C D R 1、V H C D R 2、V H C D R 3、V L ドメイン、V L C D R 1、V L C D R 2、または V L C D R 3 と比較して、50 個未満のアミノ酸置換、40 個未満のアミノ酸置換、30 個未満のアミノ酸置換、25 個未満のアミノ酸置換、20 個未満のアミノ酸置換、15 個未満のアミノ酸置換、10 個未満のアミノ酸置換、5 個未満のアミノ酸置換、4 個未満のアミノ酸置換、3 個未満のアミノ酸置換、2 個未満のアミノ酸置換をコードする。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基で置換される置換である。同様の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖 ( 例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン )、酸性側鎖 ( 例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸 )、無電荷極性側鎖 ( 例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン )、非極性側鎖 ( 例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン )、分岐側鎖 ( トレオニン、バリン、イソロイシン ) および芳香属側鎖 ( 例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン ) を有するアミノ酸が挙げられる。あるいは、変異は、コード配列の全てまたは一部と共に、例えば、飽和変異誘発によって、ランダムに導入され得、そして、得られた変異体は、生物学的活性についてスクリーニングされ、活性 ( 例えば、G タンパク質ケモカインレセプターに結合する能力 ) を保持する変異体を同定し得る。

#### 【 0 3 5 5 】

例えば、フレームワーク領域のみかまたは抗体分子の C D R 領域のみに変異を導入することが可能である。導入された変異は、沈黙突然変異または中性ミスセンス変異 ( すなわ

10

20

30

40

50

ち、抗原に結合する抗体の能力に対する影響が全くまたはほとんどない)であり得る。これらの型の変異は、コドン使用を最適化するか、またはハイブリドーマの抗体産生を改善するために有用であり得る。あるいは、非中性ミスセンス変異は、抗原に結合する抗体の能力を変更し得る。大部分の沈黙突然変異および中性ミスセンス変異の位置は、フレームワーク領域に存在するようであるが、これは絶対的な必要条件ではないけれども、多くの非中性のミスセンス変異は、CDR中に存在するようである。当業者は、抗原結合活性における無変更または結合活性における変更(例えば、抗原結合活性における改善または抗体特異性における変化)のような所望の性質を有する変異分子を設計および試験し得る。変異誘発後、コードされたタンパク質は、慣例的に発現され得、そして、コードされたタンパク質の機能的および/または生物学的活性(例えば、Gタンパク質ケモカインレセプターに免疫特異的に結合する能力)は、本明細書中に記載される技術を使用してかまたは当該分野で公知の技術を慣例的に改変することによって測定され得る。

#### 【0356】

特定の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドまたはそのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する、本発明の抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むか、あるいはそれからなる分子を含む)は、ストリンジентな条件下で(例えば、約50~65での0.2xSSC/0.1%SDS中での1回以上の洗浄が後に続く、約45で6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でフィルターに結合したDNAへのハイブリダイゼーション)、高度にストリンジентな条件下で(例えば、約68での0.1xSSC/0.2%SDS中での1回以上の洗浄が後に続く、約45で6xSSC中でフィルターに結合した核酸へのハイブリダイゼーション)、または当業者に公知の他のストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、表2において参照される少なくとも1つの細胞株によって発現されるVHドメインまたはVLドメインの1つをコードするヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含むか、あるいはそれらからなる(例えば、Ausubel, F.M.ら編、1989年、Current Protocols in Molecular Biology, 第I巻、Green Publishing Associates, IncおよびJohn Wiley & Sons, Inc., New York、6.3.1~6.3.6頁および2.10.3頁を参照のこと)。これらの抗体をコードする核酸分子はまた、本発明によって包含される。

#### 【0357】

同様のアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは改変体は、しばしば同様の構造および多数の同じ生物学的活性を有することが当該分野で周知である。従って、1つの実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドまたはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むか、あるいはそれからなる分子を含む)は、表2に参照される細胞株の1つ以上によって発現される重鎖のVHドメインのアミノ酸配列に、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するVHドメインを含むか、あるいはそれらからなる。

#### 【0358】

別の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドまたはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドのフラグメントもしくは改変体に免疫特異的に結合する抗体(抗体フラグメントまたはその改変体を含むか、あるいはそれからなる分子を含む)は、表2に参照される細胞株の少なくとも1つ以上によって発現される軽鎖のVLドメインのアミノ酸配列に、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、

10

20

30

40

50

少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するVLDメインを含むか、あるいはそれらからなる。

【0359】

(抗体をコードするポリヌクレオチド)

本発明の抗体(抗体フラグメントまたは改変体を含む)は、当該分野で公知の任意の方法によって産生され得る。例えば、本発明に従って、抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株(ミエローマ細胞株が挙げられるが、これに限定されない)において発現され得ることが理解される。特定の抗体についてのcDNAまたはゲノムクローンをコードする配列は、例えば、適切な哺乳動物もしくは非哺乳動物宿主細胞の形質転換のため、または

10

【0360】

本発明の抗体を産生するための1つの方法は、表2に参照される任意の1つ以上のハイブリドーマ細胞株によって発現されるVHドメインおよび/またはVLドメインをクローン化することである。ハイブリドーマ細胞株からVHドメインおよびVLドメインを単離するために、VHまたはVLヌクレオチド配列を含むPCRプライマー(実施例55を参照のこと)を使用して、ハイブリドーマ細胞株から単離された総RNAに含まれる発現されたVHおよびVL配列を増幅する。次いで、PCR産物は、例えば、5'および3'の

20

【0361】

クローン化されたVHおよびVL遺伝子は、1つ以上の適切な発現ベクター中に配置され得る。非制限的な例として、VHまたはVLヌクレオチド配列、制限部位、および制限部位を保護するための隣接配列を含むPCRプライマーを使用して、VHまたはVL配列を増幅する。当業者に公知のクローニング技術を利用して、PCR増幅されたVHドメインは、適切な免疫グロブリン定常領域(例えば、それぞれ、VHドメインについてのヒトIgG1定常領域またはIgG4定常領域、ならびにVLドメインおよびVLドメインについてのヒト定常領域または定常領域)を発現するベクターにクローン化され得る。好ましくは、VHまたはVLドメインを発現するベクターは、選択された発現系における重鎖および軽鎖の発現を指向するのに適したプロモーター、分泌シグナル、免疫グロブリン可変領域についてのクローニング部位、免疫グロブリン定常領域、およびネオマイシンのような選択マーカーを含む。VHドメインおよびVLドメインはまた、必要な定常領域を発現する単一のベクターにクローン化され得る。次いで、重鎖転換ベクターおよび軽鎖転換ベクターを、当業者に公知の技術を使用して、細胞株に同時トランスフェクトし、安定してかまたは一過的に全長抗体(例えば、IgG)を発現する細胞株を作製する(

30

40

【0362】

本発明のVHドメインまたはVLドメインの任意のものをコードするポリヌクレオチドは、当該分野で公知の配列と結合されて、抗体分子またはその一部をコードする発現ベクターを調整し得る。例えば、VHドメインをコードするポリヌクレオチド配列は、免疫グロブリン定常ドメイン(例えば、ヒトIgG1重鎖定常ドメインまたはヒトIgG4重鎖定常ドメイン)をコードするポリヌクレオチド配列と結合され得る。VLドメインをコー

50

ドするポリヌクレオチド配列は、免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、ヒト 軽鎖定常ドメインまたはヒト 軽鎖定常ドメイン）をコードするポリヌクレオチド配列と結合され得る。ヒトIgG1重鎖定常ドメインのアミノ酸配列（配列番号81）、ヒトIgG4重鎖定常ドメインのアミノ酸配列（配列番号82）、およびヒト 軽鎖定常ドメイン（配列番号83）が以下に示される。抗体分子の発現ベクターはまた、培地中への分泌を促進するため、VHドメインおよび/またはVLドメインをコードする配列のN末端にシグナル配列をコードし得る。このようなシグナル配列の例は、以下に提供される（配列番号84～85）。

## 【化1】

10

## ヒトIgG1重鎖定常ドメイン(配列番号81)

ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHNKPS	NTKVDKKVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPELLGG	120
PSVFLFPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	180
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYITLPPSRDE	240
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV	LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	300
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK				330

## ヒトIgG4重鎖定常ドメイン(配列番号82)

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVAT	VPSSSLGTKT	YTCNVNHNKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPSCP	APEFLGGPSV	120
FLFPPKPKDT	LMISRTP EVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	180
RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	240
NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	300
NVFCSCVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSLGK				327

20

## ヒトκ定常ドメイン(配列番号83)

TVAAPSVEFIF	PPSDEQLKSG	TASVVCLLNN	FYPREAKVQW	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	60
KDSTYSLSST	LTLISKADYEK	HKVYACEVTH	QGLSSPVTKS	FNRGEC		106

## 免疫グロブリン重鎖または免疫グロブリン軽鎖に対するシグナルペプチド

30

MGWSCIILFL	VATATGAHS	19
(配列番号84)		

MGWSCIILFL	VATATGVHS	19
(配列番号85)		

## 【0363】

本発明はさらに、本発明の抗体およびそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、ストリンジェントな、またはより低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下で（例えば、上記に定義されるような）、抗体（好ましくは、本発明のポリペプチドと特異的に結合する、好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは寄託されたクローンによってコードされたポリペプチドに結合する抗体）をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

40

## 【0364】

ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の任意の方法によって得られ得、そしてそのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定される。例えば、抗体のヌクレオチド配列が知られている場合、この抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドからアセンブリされ得（例えば、Kutmeierら、BioTechniques 17:242(1994)に記載されるような）、これは、簡単にいうと、以下の工程を包含する：この抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラップするオリゴヌ

50

クレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、次いでPCRによる連結されたオリゴヌクレオチドの増幅。

【0365】

あるいは、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適切な供給源からの核酸から生成され得る。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは入手不可能だが、その抗体分子の配列が既知である場合、その免疫グロブリンをコードする核酸は、化学的に合成され得るか、あるいは適切な供給源（例えば、抗体cDNAライブラリー、または抗体を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明の抗体の発現のために選択されたハイブリドーマ細胞）から生成されたcDNAライブラリー、またはそれから単離された核酸（好ましくはポリA+RNA））から、例えば、その抗体をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定するために、配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によって、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって得られ得る。PCRによって生成された増幅された核酸は、次いで、当該分野で周知の任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

10

【0366】

一旦、抗体のヌクレオチド配列および対応するアミノ酸配列が決定されると、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の操作について当該分野で周知の方法（例えば、組換えDNA技術、部位指向性変異誘発、PCRなど（例えば、Sambrookら、1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubelら編、1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載の技術を参照のこと。これらは両方がその全体において本明細書に参考として援用される。））を用いて操作され、例えば、アミノ酸の置換、欠失、および/または挿入を作製するように異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成し得る。

20

【0367】

特定の実施形態において、重鎖および/または軽鎖の可変ドメインのアミノ酸配列は、相補性決定領域(CDR)の配列の同定のために、当該分野において周知の方法によって（例えば、配列超可変性の領域を決定するために、他の重鎖および軽鎖の可変領域の既知のアミノ酸配列と比較することによって）調べられ得る。慣用的な組換えDNA技術を用いて、1つ以上のCDRが、前述のようにフレームワーク領域内に（例えば、非ヒト抗体をヒト化するために、ヒトフレームワーク領域中に）挿入され得る。このフレームワーク領域は天然に存在し得るか、またはコンセンサスフレームワーク領域であり得、そして好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る（例えば、列挙したヒトフレームワーク領域については、Chothiaら、J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998)を参照のこと）。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組み合わせによって生成されたポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、上記に議論されるように、1つ以上のアミノ酸置換は、フレームワーク領域内で作製され得、そして好ましくは、そのアミノ酸置換は、抗体のその抗原への結合を改善する。さらに、このような方法は、1つ以上の鎖内ジスルフィド結合が欠如した抗体分子を産生するために、鎖内ジスルフィド結合に関与する1つ以上の可変領域のシステイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製するために使用され得る。ポリヌクレオチドへの他の変更は、本発明によって、および当該分野の技術において包含される。

30

40

【0368】

ヒトIgG4定常領域に導入され得る例示的な変更としては、以下が挙げられる（配列番号82に対応するアミノ酸位置）：A69のVによる置換、L76のFによる置換、K79のQによる置換、R97のTによる置換、S100のRによる置換、Y102のCによる置換、G103のCによる置換、P104のVによる置換、P105のEによる置換、S108のPによる置換、E113のPによる置換、L115のEまたはVによる置換

50

、G 1 1 6 の A による置換、Q 1 4 8 の H による置換、V 1 6 2 の M による置換、Y 1 8 0 の F による置換、L 1 8 9 の V による置換、S 2 1 0 の A による置換、S 2 1 1 の P による置換、A 2 1 9 の T による置換、Q 2 3 5 の R による置換、A 2 5 8 の S による置換、V 2 7 7 の M による置換、R 2 8 9 の K による置換、E 2 9 9 の Q による置換、V 3 0 2 の I による置換、および / または L 3 2 5 の P による置換。Reddyらは、L 1 1 5 の E による置換および S 1 0 8 の P による置換が、Fc の結合および CD 4 + T 細胞の欠乏を軽減することを報告した (M. P. Reddyら、J. Immunol. 164 : 1925 - 1933 (2000))。

#### 【0369】

いくつかの用途のために、例えば、本発明の抗体のインビトロ親和性成熟について、ファージライブラリーディスプレイにおける単鎖抗体または Fab フラグメントのように本発明の1つ以上の抗体の重鎖および軽鎖の VH ドメインおよび VL ドメインを発現することが有用であり得る。例えば、本発明の1つ以上の抗体の VH ドメインおよび VL ドメインをコードする cDNA は、ファージディスプレイライブラリーを使用して、全てのあり得る組み合わせにおいて発現され得、改善した親和性または改善したオフレートのような好ましい結合特徴を有する G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドと結合する VH / VL 組み合わせの選択を可能にする。さらに、VH および VL セグメント (特に、本発明の1つ以上の抗体の VH ドメインおよび VL ドメインの CDR 領域) は、インビトロで変異され得る。ファージディスプレイライブラリーにおける「変異」CDR を有する VH ドメインおよび VL ドメインの発現は、改善した親和性または改善したオフレートのような好ましい結合特徴を有する G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドと結合する VH / VL 組み合わせの選択を可能にする。

#### 【0370】

ファージディスプレイ方法において、機能的抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。特に、VH ドメインおよび VL ドメインをコードする DNA 配列は、動物の cDNA ライブラリー (例えば、ヒトまたはマウスのリンパ系組織の cDNA ライブラリー) または合成 cDNA ライブラリーから増幅される。VH ドメインおよび VL ドメインをコードする DNA は、PCR により csfv リンカーによって共に結合され、そして、ファージミドベクター (例えば、pCANTAB6 または pComb3 HSS) にクローニングされる。このベクターは、E. coli にエレクトロポレーションされ、そして、E. coli は、ヘルパーファージに感染される。これらの方法において用いられるファージは、代表的には、fd および M13 を含む糸状ファージであり、VH ドメインおよび VL ドメインは、通常、ファージ遺伝子 III またはファージ遺伝子 VII のいずれかに組換え的に融合される。目的の抗原に結合する抗原結合ドメイン (すなわち、G タンパク質ケモカインレセプターレセプターポリペプチドまたはそのフラグメント) を発現するファージは、選択され得るかまたは抗原を用いて同定され得る (例えば、標識された抗原または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕獲された抗原を使用して)。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例としては、以下に開示される方法が挙げられるが、これらに限定されない: Brinkman, U. ら、J. Immunol. Methods 182 : 41 ~ 50 (1995); Ames, R. S. ら、J. Immunol. Methods 184 : 177 ~ 186 (1995); Kettleborough, C. A. ら、Eur. J. Immunol. 24 : 952 ~ 958 (1994); Persic, L. ら、Gene 187 : 9 ~ 18 (1997); Burton, D. R. ら、Advances in Immunology 57 : 191 ~ 280 (1994); PCT / GB91 / 01134; WO 90 / 02809; WO 91 / 10737; WO 92 / 01047; WO 92 / 18619; WO 93 / 11236; WO 95 / 15982; WO 95 / 20401; および WO97 / 13844; ならびに米国特許第 5,698,426 号、同第 5,223,409 号、同第 5,403,484 号、同第 5,580,717 号、同第 5,427,908 号、同第 5,750,753 号、同第 5,8

10

20

30

40

50

21, 047号、同第5, 571, 698号、同第5, 427, 908号、同第5, 516, 717号、同第5, 780, 225号、同第5, 658, 727号、同第5, 733, 743号、および同第5, 969, 108号(これらの各々は、本明細書中にその全体が参考として援用される)。

#### 【0371】

さらに、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせることによって、「キメラ抗体」を産生するために開発された技術(Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 851-855(1984); Neubergerら、Nature 312: 604-608(1984); Takedaら、Nature 314: 452-454(1985))が使用され得る。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、このような分子は、マウスmAbおよびヒト免疫グロブリンの定常領域由来の変領域を有する(例えば、ヒト化抗体)。

10

#### 【0372】

あるいは、単鎖抗体の産生に関して記載された技術(米国特許第4, 946, 778号; Bird、Science 242: 423-42(1988); Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883(1988); およびWardら、Nature 334: 544-54(1989))が、単鎖抗体の産生に適応され得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントおよび軽鎖フラグメントがアミノ酸架橋を介して連結されることによって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E. coliにおける機能性Fvフラグメントのアセンブリのための技術もまた、使用され得る(Skerreraら、Science 242: 1038-1041(1988))。

20

#### 【0373】

(抗体を産生する方法)

本発明の抗体は、抗体を合成するための当該分野で公知の任意の方法によって、特に、化学合成によって、細胞内免疫(すなわち、内部抗体技術)、または、好ましくは、組換え発現技術によって産生され得る。抗体を産生する方法としては、ハイブリドーマ技術、EBV形質転換、および本明細書中に考察される他の方法ならびに以下に議論されるような組換えDNA技術の使用を含むが、これらに限定されない。

30

#### 【0374】

本発明の抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログ(例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖または本発明の単鎖抗体)の組換え発現は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を必要とする。一旦、本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、あるいはそれらの部分(好ましくは、重鎖または軽鎖の変領域を含有する)をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって生成され得る。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドの発現によってタンパク質を調製するための方法は、本明細書に記載される。当業者に周知の方法は、抗体をコードする配列ならびに適切な転写制御シグナルおよび翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターの構築のために使用され得る。これらの方法には、例えば、インビトロの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボの遺伝子組換えが挙げられる。従って、本発明は、プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体分子、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖の変領域をコードするヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。このようなベクターは、抗体分子の定常領域(例えば、PCT公開WO86/05807; PCT公開WO89/01036; および米国特許第5, 122, 464号を参照のこと)をコードするヌクレオチド配列を含み得、そしてこの抗体の変領域は、重鎖または軽鎖の全体の発現のためにこのようなベクターにクローニングされ得る。

40

#### 【0375】

50

この発現ベクターは、従来技術によって宿主細胞へと移入され、そしてこのトランスフェクトされた細胞は、次いで、本発明の抗体を産生するために、従来技術によって培養される。従って、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結された、本発明の抗体、あるいはその重鎖もしくは軽鎖、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二重鎖抗体の発現についての好ましい実施形態において、重鎖および軽鎖の両方をコードするベクターは、以下に詳述されるように、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞中に同時発現され得る。

#### 【0376】

種々の宿主発現ベクター系は、本発明の抗体分子を発現させるために利用され得る。このような宿主発現系は、目的のコード配列が産生され、かつ続いて精製され得るビヒクルを表わすが、また、適切なヌクレオチドをコードする配列で形質転換またはトランスフェクトされる場合に、インサイチュで本発明の抗体分子を発現し得る細胞を表わす。これらには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体をコードする配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌（例えば、*E. coli*、*B. subtilis*）のような微生物；抗体をコードする配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*）；抗体をコードする配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）に感染した植物細胞系または抗体をコードする配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞系；あるいは哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物のウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3、NSO細胞）。好ましくは、*Escherichia coli*のような細菌細胞、そしてより好ましくは、特に、組換え抗体分子全体の発現のために真核生物細胞が、組換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーターエレメントのようなベクターと組み合わせられた、チャイニーズハムスターの卵巣細胞（CHO）のような哺乳動物細胞が、抗体のための効果的な発現系である（Foelckingerら、*Gene* 45:101(1986)；Cockettら、*Bio/Technology* 8:2(1990)）。

#### 【0377】

細菌系において、多くの発現ベクターが、抗体分子の発現を意図する使用に依存して有利に選択され得る。例えば、多量のこのようなタンパク質が産生されるべき場合、抗体分子の薬学的組成物の生成のために、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指向するベクターが所望され得る。このようなベクターには、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体をコードする配列がlacZをコードする領域と共にベクターにインフレーム（in frame）で個別に連結され得、その結果、融合タンパク質が産生される*E. coli*発現ベクターpUR278（Rutherfordら、*EMBO J.* 2:1791(1983)）；pINベクター（Inouye & Inouye、*Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109(1985)；Van Heeke & Schuster、*J. Biol. Chem.* 24:5503-5509(1989)）など。pGEXベクターもまた、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として、外来性ポリペプチドを発現させるために使用され得る。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、そして溶解した細胞から、マトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着および結合、それに続く遊離グルタチオン存在化での溶出によって容易に精製され得る。このpGEXベクターは、トロンピンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、その結果、このクローニングされた標的遺伝子産物は、GST部分から放出され得る。

10

20

30

40

50

## 【0378】

昆虫系においては、*Autographa californica*核多角体病ウイルス(*AcNPV*)は、外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda*細胞において増殖する。抗体をコードする配列は、このウイルスの非必須の領域(例えばポリヘドリン遺伝子)に個々にクローニングされ得、そして*AcNPV*プロモーター(例えばポリヘドリンプロモーター)の制御下に配置され得る。

## 【0379】

哺乳動物宿主細胞においては、多数のウイルスに基づく発現系が利用され得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合においては、目的の抗体をコードする配列は、アデノウイルスの転写/翻訳制御複合体、例えば後期プロモーターおよび3つの部分に分かれるリーダー配列、に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボでの組換えによって、アデノウイルスゲノムに挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域(例えば、E1またはE3領域)における挿入は、生存可能で、感染した宿主において抗体分子を発現する能力のある組換えウイルスを生じる(例えば、Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:355-359 (1984)を参照のこと)。特異的開始シグナルはまた、挿入された抗体をコードする配列の効率的な翻訳のために必要とされ得る。これらのシグナルは、ATG開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに、この開始コドンは、挿入部分全体の翻訳を確実にするために、所望されるコード配列のリーディングフレームと相が同じでなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、種々の起源(天然および合成の両方)であり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター、などの含有によって高められ得る(Bittnerら、*Methods in Enzymol.* 153:51-544 (1987)を参照のこと)。

## 【0380】

さらに、宿主細胞系統は、選択され得、これは挿入配列の発現を調節するか、または所望される特異的な様式で遺伝子産物を改変し、そしてプロセッシングする。タンパク質産物のこのような改変(例えばグリコシル化)およびプロセッシング(例えば切断)は、タンパク質の機能のために重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の、翻訳後プロセッシングおよび改変のための、特徴的で特異的な機構を有する。適切な細胞株または宿主系は、発現された外来タンパク質の正確な改変およびプロセッシングを確実にするように選択され得る。この目的のために、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化、主要な転写産物の正確なプロセッシングのための細胞機構を有する、真核生物宿主細胞が、使用され得る。このような哺乳動物宿主細胞は、CHO、VERY、BHK、Hela、COS、MDCK、293、3T3、WI38、そして特に、例えば、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47Dのような乳癌細胞株、ならびに、例えば、CRL7030およびHs578Bstのような正常な乳腺細胞株、を含むがこれらに限定されない。

## 【0381】

組換えタンパク質の長期間の高収率産生、安定発現が好ましい。例えば、安定に抗体分子を発現する細胞株が操作され得る。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するよりも、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、など)によって制御されるDNA、および選択可能なマーカーで形質転換され得る。外来DNAの導入に続いて、操作された細胞は、1~2日間富化培地で増殖させられ得、次いで、選択培地に切り替えられる。組換えプラスミドにおける選択可能マーカーは、選択したものに耐性を与え、そして細胞が、プラスミドをその染色体内に安定に組み込み、そして増殖して、次にクローニングされ得る。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を操作するために、有利に使用され得る。このような操作された細胞株は、直接的または間接的に抗体分子と相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において、特

10

20

30

40

50

に有用であり得る。

【0382】

多数の選択系が使用され得、この選択系は、単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ (Wiglerら、Cell 11:223 (1977))、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992))、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら、Cell 22:817 (1980)) を含むがこれらに限定されず、これらの遺伝子は、tk-、hgprt-またはaprt-細胞においてそれぞれ使用され得る。また、代謝拮抗物質耐性は、以下の遺伝子の選択の根拠として使用され得る：dhfr、これはメトトレキサートに対する耐性を与える (Wiglerら、Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980))；O'Hareら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981))；gpt、これはミコフェノール酸に対する耐性を与える (Mulligan & Berg、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981))；neo、これはアミノグリコシドG-418に対する耐性を与える (Clinical Pharmacy 12:488-505；WuおよびWu、Biotherapy 3:87-95 (1991))；Tolstoshev、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993)；Mulligan、Science 260:926-932 (1993)；ならびにMorganおよびAnderson、Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993)；1993年5月、TIB TECH 11(5):155-215)；ならびにhygro、これはハイグロマイシンに対する耐性を与える (Santerreら、Gene 30:147 (1984))。組換えDNA技術の分野で通常知られている方法は、所望の組換えクローンを選択するために、慣用的に適用され得、そしてこのような方法は、以下に記載されている：例えば、Ausubelら (編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY (1993)；Kriegler、Gene Transfer and Expression、A Laboratory Manual、Stockton Press、NY (1990)；ならびに12章および13章、Dracopolisら (編)、Current Protocols in Human Genetics、John Wiley & Sons、NY (1994)；Colberre-Garapinら、J. Mol. Biol. 150:1 (1981) (これらはその全体が本明細書中に参考として援用される)。

10

20

30

40

50

【0383】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大され得る (総説として、BebbingtonおよびHentschel、The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning、第3巻 (Academic Press、New York、1987)を参照のこと)。抗体を発現するベクター系におけるマーカーが増幅可能であると、宿主細胞の培養物に存在するインヒビターのレベルにおける増加は、マーカー遺伝子のコピーの数を増加する。増副領域は抗体遺伝子と結合しているので、抗体の産生もまた増加する (Crouseら、Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983))。

【0384】

選択マーカーとしてグルタミンシンターゼ (GS) またはDHFRを使用するベクターは、それぞれ、薬物のメチオニンスルホキシミン (sulphoximine) またはメトトレキサートの存在下で増幅され得る。グルタミンシンターゼベースのベクターの利点は、グルタミンシンターゼネガティブである細胞株 (例えば、マウス黒色腫細胞株NS0) の有効性である。グルタミンシンターゼ発現系はまた、内因性遺伝子が機能することを

妨げるためのさらなるインヒビターを提供することによって、グルタミンシンターゼ発現細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）において機能し得る。選択マーカーとして、グルタミンシンターゼを使用するベクターとしては、Stephens および Cockett, Nucl. Acids. Res. 17:7110 (1989) において記載される pEE6 発現ベクターを含むがこれらに限定されない。グルタミンシンターゼ発現系およびその成分は、PCT 公開: WO87/04462; WO86/05807; WO89/01036; WO89/10404; および WO91/06657（これらは、本明細書中に参考としてその全体が援用される）において詳細に記載される。さらに、本発明に従って使用され得るグルタミン発現ベクターは、例えば、Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, NH) を含む、供給業者から市販されている。マウス黒色腫細胞における GS 発現系を使用するモノクローナル抗体の発現および産生は、Bebbingtonら、Bio/technology 10:169 (1992) および Biblia および Robinson Biotechnol. Prog. 11:1 (1995)（これらは、本明細書中に参考としてその全体が援用される）において記載される。

10

#### 【0385】

宿主細胞は、本発明の二つの発現ベクター（重鎖由来のポリペプチドをコードする第一のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第二のベクター）で、同時トランスフェクトされ得る。この二つのベクターは、重鎖および軽鎖のポリペプチドの等しい発現を可能にする、同一の選択可能なマーカーを含み得る。あるいは、単一のベクターが使用され得、これは重鎖および軽鎖両方のポリペプチドをコードし、そして発現することができる。このような状況において、過剰の毒性の遊離重鎖を避けるために、重鎖の前に軽鎖が配置されるべきである (Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980))。重鎖および軽鎖のためのコード配列は cDNA またはゲノム DNA を含み得る。

20

#### 【0386】

一旦本発明の抗体分子が、動物によって産生されるか、化学的に合成されるか、または組換えにより発現されると、当該分野で公知の、免疫グロブリン分子の精製のための任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー（特に、プロテイン A の後に特異的抗原に対する親和性（アフィニティー）による）、およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質精製のための任意の他の標準的な技術によって、精製され得る。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、本明細書中に記載されるかまたはそうでなければ当該分野において公知の、異種ポリペプチド配列に融合され得、精製を容易にする。

30

#### 【0387】

本発明の抗体は、天然より精製された産物、化学合成手順の産物、および原核細胞宿主または真核細胞宿主（例えば、細菌、酵母、高等植物細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞が挙げられる）より組換え技術によって産生された産物を含む。組換え産生手順において使用される宿主に依存して、本発明の抗体はグリコシル化され得るか、または非グリコシル化であり得る。さらに、本発明の抗体はまた、最初の改変されたメチオニン残基を含み得、いくつかの場合、宿主媒介性のプロセッシングを生じる。

40

#### 【0388】

本発明の抗体は、当該分野で公知の技術を使用して、化学合成され得る（例えば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y. および Hunkapiller, M.ら, 1984, Nature 310:105-111 を参照のこと）。例えば、本発明の抗体のフラグメントに対応するペプチドは、ペプチド合成機の使用によって合成され得る。さらに、所望の場合、非古典的アミノ酸または化学アミノ酸アナログが、抗体のポリペプチド配列中に置換物または付加物として導入

50

され得る。非古典的アミノ酸としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：通常のアミノ酸のD型異性体、2, 4 - ジアミノ酪酸、 $\alpha$  - アミノイソ酪酸、4 - アミノ酪酸、Abu、2 - アミノ酪酸、g - Abu、e - Ahx、6 - アミノヘキサノン酸、Aib、2 - アミノイソ酪酸、3 - アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t - ブチルグリシン、t - ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、b - アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナアミノ酸（例えば、b - メチルアミノ酸、Ca - メチルアミノ酸、Na - メチルアミノ酸および一般的なアミノ酸アナログ）。さらに、アミノ酸はD体（右旋回）またはL体（左旋回）であり得る。

#### 【0389】

本発明は、翻訳の間かまたは翻訳後に示差的に修飾される（例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解性の切断、抗体分子または他の細胞性リガンドへの連結、などによる）抗体を包含する。任意の多くの化学的改変は、公知の技術（プロモシアンによる特異的切断、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH<sub>4</sub>、アセチル化、ホルミル化、酸化、還元、ツニカマイシンの存在下での代謝的合成、などが挙げられるが、これらに限定されない）によって実行され得る。

#### 【0390】

本発明に包含されるさらなる翻訳後修飾としては、以下が挙げられる：例えば、N連結型炭水化物鎖またはO連結型炭水化物鎖、N末端またはC末端のプロセッシング、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N連結型炭水化物鎖またはO連結型炭水化物鎖の化学的改変、および原核生物宿主細胞の発現の結果としてのN末端メチオニンの付加または除去。抗体はまた、検出可能な標識（例えば、抗体の検出および単離を可能にする、酵素標識、蛍光標識、放射線同位体標識、またはアフィニティー標識）を用いて改変され得る。

#### 【0391】

適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$  - ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な接合団の例としては、ストレプトアビジン/ビオチン、およびアビジン/ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、ビオチン、アンベリフェロン（*umbelliferone*）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンが挙げられる；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられる；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられる；そして適切な放射性物質の例としては、放射活性な金属イオン、例えば、 $\beta$  - エミッター（例えば、<sup>213</sup>Bi）、または他の放射性同位体（例えば、ヨウ素（<sup>131</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>123</sup>I、<sup>121</sup>I）、炭素（<sup>14</sup>C）、硫黄（<sup>35</sup>S）、トリチウム（<sup>3</sup>H）、インジウム（<sup>115m</sup>In、<sup>113m</sup>In、<sup>112</sup>In、<sup>111</sup>In）、およびテクネチウム（<sup>99</sup>Tc、<sup>99m</sup>Tc）、タリウム（<sup>201</sup>Tl）、ガリウム（<sup>68</sup>Ga、<sup>67</sup>Ga）、パラジウム（<sup>103</sup>Pd）、モリブデン（<sup>99</sup>Mo）、キセノン（<sup>133</sup>Xe）、フッ素（<sup>18</sup>F）、<sup>153</sup>Sm、<sup>177</sup>Lu、<sup>159</sup>Gd、<sup>149</sup>Pm、<sup>140</sup>La、<sup>175</sup>Yb、<sup>166</sup>Ho、<sup>90</sup>Y、<sup>47</sup>Sc、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>142</sup>Pr、<sup>105</sup>Rh、<sup>97</sup>Ru、<sup>68</sup>Ge、<sup>57</sup>Co、<sup>65</sup>Zn、<sup>85</sup>Sr、<sup>32</sup>P、<sup>153</sup>Gd、<sup>169</sup>Yb、<sup>51</sup>Cr、<sup>54</sup>Mn、<sup>75</sup>Se、<sup>113</sup>Sn、および<sup>117</sup>Tl）が挙げられる。

特定の実施形態において、本発明の抗体は、ユーロピウムで標識され得る。例えば、本発明の抗体は、DELFLIA Eu - 標識化キット（カタログ番号1244 - 302、Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA）を使用して、製造業者の指示書に従って、ユーロピウムで標識され得る。

#### 【0392】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、放射性金属（*radiometal*）イオ

10

20

30

40

50

ン ( $^{111}\text{In}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{215}\text{Bi}$  および  $^{225}\text{Ac}$  が挙げられるが、これらに限定されない) とポリペプチドとを結合体化するために有用な、大環状のキレート剤に結合される。好ましい実施形態において、本発明の抗体に結合された大環状キレート剤と会合した放射性金属は、 $^{111}\text{In}$  である。別の好ましい実施形態において、本発明の抗体ポリペプチドと結合された大環状キレート剤と会合される放射性金属イオンは、 $^{90}\text{Y}$  である。特定の実施形態において、大環状キレート剤は 1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - N, N', N'', N''' - テトラ酢酸 (DOTA)、特定の実施形態において、大環状キレート剤は、 $\alpha$  - (5 - イソチオシアナト - 2 - メトキシフェニル) - 1, 4, 7, 10 - テトラアザ - シクロドデカン - 1, 4, 7, 10 - テトラ酢酸である。他の特定の実施形態において、DOTA は、本発明の抗体と、リンカー分子を介して結合される。大環状キレート剤 (例えば、DOTA) とポリペプチドとを結合体化するために有用なリンカー分子の例としては、当該分野で一般に公知である。例えば、DeNardoら、Clin Cancer Res. 4 (10) : 2483 - 90, 1998; Petersonら、Bioconjug. Chem. 10 (4) : 553 - 7, 1999; および Zimmermanら、Nucl. Med. Biol. 26 (8) : 943 - 50, 1999 (それらの全体が本明細書により参考として援用される) を参照のこと。さらに、米国特許第 5, 652, 361号および同 5, 756, 065号 (これらは抗体に結合体化され得るキレート剤、およびそれらを作製し使用するための方法を開示する) は、それらの全体が本明細書により参考として援用される。

10

#### 【0393】

20

1つの実施形態において、本発明の抗体はビオチンで標識される。他の関連の実施形態において、本発明のビオチン化抗体は、例えば、造影剤として使用され得るか、または1つ以上のTRAILレセプターの補助レセプターまたはリガンド分子を同定するための手段として、使用され得る。

また、本発明によって、さらなる利点 (例えば、このポリペプチドの増大した溶解性、増大した安定性、および増大したインビボまたはインビトロでの循環時間、あるいは低下した免疫原性) を提供し得る、本発明の抗体の化学的改変誘導体が、提供される (米国特許第 4, 179, 337号を参照のこと)。誘導体化のための化学部分は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどのような、水溶性ポリマーから選択され得る。これらの抗体は、分子内のランダムな位置において改変され得るか、または分子内の予め定められた位置において改変され得、そして1種、2種、3種またはそれ以上の結合した化学部分を含み得る。

30

#### 【0394】

ポリマーは、任意の分子量であり得、そして分枝されていても分枝されていなくてもよい。ポリエチレングリコールに関して、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造の容易さのため、約 1 kDa と約 100 kDa との間である (用語「約」は、ポリエチレングリコールの調製において、定まった分子量というよりも、いくらかの分子はより大きい重量であり、いくらかはより小さい重量であることを示す)。所望の治療プロフィール (例えば、所望される徐放性の持続期間、存在する場合に生物学的活性の効果、取り扱いにおける容易さ、抗原性の程度またはその欠如、および治療タンパク質または治療アナログに対するポリエチレングリコールの他の既知の効果) に依存して、他のサイズを使用してもよい。例えば、ポリエチレングリコールは、以下の平均分子量を有し得る：約 200 kDa、約 500 kDa、約 1000 kDa、約 1500 kDa、約 2000 kDa、約 2500 kDa、約 3000 kDa、約 3500 kDa、約 4000 kDa、約 4500 kDa、約 5000 kDa、約 5500 kDa、約 6000 kDa、約 6500 kDa、約 7000 kDa、約 7500 kDa、約 8000 kDa、約 8500 kDa、約 9000 kDa、約 9500 kDa、約 10,000 kDa、約 10,500 kDa、約 11,000 kDa、約 11,500 kDa、約 12,000 kDa、約 12,500 kDa、約 13,000 kDa、約 13,500 kDa、約 14,000 kDa、約 14,500 kDa、

40

50

約 15,000 kDa、約 15,500 kDa、約 16,000 kDa、約 16,500 kDa、約 17,000 kDa、約 17,500 kDa、約 18,000 kDa、約 18,500 kDa、約 19,000 kDa、約 19,500 kDa、約 20,000 kDa、約 25,000 kDa、約 30,000 kDa、約 35,000 kDa、約 40,000 kDa、約 50,000 kDa、約 55,000 kDa、約 60,000 kDa、約 65,000 kDa、約 70,000 kDa、約 75,000 kDa、約 80,000 kDa、約 85,000 kDa、約 90,000 kDa、約 95,000 kDa、または約 100,000 kDa。

#### 【0395】

上に注記したように、ポリエチレングリコールは分枝した構造を有し得る。分枝したポリエチレングリコールは、例えば、米国特許第 5,643,575 号、Morpurgo ら、Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996) ; Vorobjev ら、Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999) ; および Caliceti ら、Bioconj. Chem. 10:638-646 (1999) に記載される。これらの各々の開示は、本明細書中で参考として援用される。

10

#### 【0396】

ポリエチレングリコール分子（または他の化学部分）は、抗体の機能に対する効果または抗体の抗原ドメインを考慮して、抗体に結合されるべきである。当業者に利用可能な多くの結合方法が存在する。例えば、EP 0 401 384（本明細書中で参考として援用される）（PEGをG-CSFに結合させる）。また、Malik ら、Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992)（塩化トレスル（tresyl chloride）を使用したGM-CSFのペグ化（pegylation）を報告する）も参照のこと。例えば、ポリエチレングリコールは、反応性基（例えば、遊離アミノ基または遊離カルボキシル基）を介してアミノ酸残基により共有結合され得る。反応性基は、活性化されたポリエチレングリコール分子が結合し得る基である。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、リジン残基およびN末端アミノ酸残基が挙げられる；遊離カルボキシル基を有する残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、およびC末端アミノ酸残基が挙げられる。スルフヒドリル基もまた、ポリエチレングリコール分子を結合するための反応性基として使用され得る。アミノ基における結合（例えば、N末端またはリジン基における結合）が、治療目的に好ましい。

20

30

#### 【0397】

上記に示されるように、ポリエチレングリコールは、多くのアミノ酸残基のうちの任意のものとの連結を介してタンパク質（例えば、抗体）に結合され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、リジン残基、ヒスチジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基またはシステイン残基への共有結合を介して、タンパク質と連結され得る。1つ以上の反応化学を使用して、ポリエチレングリコールと、タンパク質の特定のアミノ酸残基（例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、またはシステイン）とを結合し得るか、またはポリエチレングリコールと、タンパク質の1つより多くの型のアミノ酸残基（例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システインまたはこれらの組合せ）とを結合し得る。

40

#### 【0398】

重鎖もしくは軽鎖のいずれか、またはその両方のN末端において化学的に改変された抗体が、特に所望され得る。例示としてポリエチレングリコールを使用して、種々のポリエチレングリコール分子（分子量、分枝型、などによる）から、反応混合物中のポリエチレングリコール分子対タンパク質（またはペプチド）分子の比率、実施されるべきペグ化の反応型、およびN末端にペグ化された、選択されたタンパク質を取得する方法が、選択され得る。N末端にペグ化された調製物を取得する方法（すなわち、必要な場合、他のモノペグ化された部分からこの部分を分離すること）は、ペグ化されたタンパク質分子集団からの、N末端にペグ化された物質の精製により得る。N末端における選択的な化学的

50

改変は、還元性アルキル化によって、達成され得、この還元性アルキル化は、特定のタンパク質における誘導体化に利用可能な、異なる型の第一級アミノ基の示差的な反応性（リジン対N末端）を利用する。適切な反応条件の下で、カルボニル基を有するポリマーを用いたN末端におけるタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が、達成される。

#### 【0399】

上記に示されるように、本発明の抗体のペグ化は、多くの手段によって達成され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、直接的にかまたは介在性のリンカーによって、抗体と結合され得る。ポリエチレングリコールとタンパク質とを結合するための、リンカー無し

10

#### 【0400】

介在性リンカーを用いずに、ポリエチレングリコールを直接的に抗体のアミノ酸残基に結合するための1つの系は、トレシル化MPEGを使用する。これは、塩化トレシル（ $\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ ）を使用する、モノメトキシ（monmethoxy）ポリエチレングリコール（MPEG）の改変によって達成され得る。タンパク質とトレシル化MPEGとの反応の際、ポリエチレングリコールは、タンパク質のアミン基に直接結合される。

20

#### 【0401】

ポリエチレングリコールはまた、多くの異なる介在性リンカーを使用して、抗体に結合され得る。例えば、米国特許第5,612,460号（この開示の全体が本明細書中で参考として援用される）は、ポリエチレングリコールとタンパク質とを繋ぐためのウレタンリンカーを開示する。ポリエチレングリコールがリンカーによって抗体に結合される、抗体-ポリエチレングリコール結合体はまた、抗体と化合物（例えば、MPEG-スクシンイミジルスクシナート、1,1'-カルボニルジイミダゾールで活性化されたMPEG、MPEG-2,4,5-トリクロロフェニルカルボネート、MPEG-p-ニトロフェニルカルボネート、および種々のMPEGスクシナート誘導体）との反応によって、作製され得る。多くのさらなるポリエチレングリコール誘導体およびポリエチレングリコールとタンパク質とを結合するための反応化学は、WO98/32466（この開示の全体が本明細書中で参考として援用される）に記載される。本明細書中に記載される反応化学を使用して作製されたペグ化抗体産物は、本発明の範囲内に含まれる。

30

#### 【0402】

本発明の各々の抗体に結合されるポリエチレングリコール部分の数（すなわち、置換の程度）はまた、変動し得る。例えば、本発明のペグ化抗体は、平均して、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、12個、15個、17個、20個またはそれ以上のポリエチレングリコール分子に連結され得る。同様に、置換の平均の程度は、例えば、抗体分子あたり、1~3個、2~4個、3~5個、4~6個、5~7個、6~8個、7~9個、8~10個、9~11個、10~12個、11~13個、12~14個、13~15個、14~16個、15~17個、16~18個、17~19個、または18~20個のポリエチレングリコール部分の範囲内である。置換の程度を決定するための方法が、例えば、Delgadoら、Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys. 9:249-304（1992）において考察される。

40

#### 【0403】

（抗体結合体）

本発明は、組換えにより融合されるかまたは化学的に、本発明のポリペプチド（または

50

その部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100個のアミノ酸)に結合されて(共有結合および非共有結合の両方を含む)、融合タンパク質を生成する抗体、を含む。この融合は、直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。この抗体は、本発明のポリペプチド(またはその部分、好ましくはこのポリペプチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100個のアミノ酸)以外の抗原に特異的であり得る。例えば、インビトロまたはインビボのいずれにおいても、本発明のポリペプチドを特定の細胞表面のレセプターに特異的な抗体に融合または結合させることによって、特定の細胞のタイプに対して、本発明のポリペプチドを標的にするために、抗体が使用され得る。本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、異種タンパク質(例えば、免疫グロブリンFcポリペプチドまたはヒト血清アルブミンポリペプチド)のN末端またはC末端のいずれかに融合され得る。本発明の抗体は、アルブミン(組換えヒト血清アルブミン(例えば、米国特許第5,876,969号(1999年3月2日公開)、欧州特許第0413622号および米国特許第5,766,883号(1998年6月16日公開)(本明細書中にその全体が参考として援用される)を含むがこれらに限定されない)に融合され得、キメラポリペプチドを生じる。好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、ヒト血清アルブミンの成熟形態(すなわち、欧州特許第0322094号の図1および2において示されるようにヒト血清アルブミンのアミノ酸1~585)(これは、本明細書中にその全体が参考として援用される)と融合される。別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、米国特許第5,766,883号(本明細書中にその全体が参考として援用される)に記載されるように、ヒト血清アルブミンのアミノ酸残基1~zを含むか、それからなるポリペプチドフラグメントと融合され、ここで、zは、369~419の整数である。本発明の融合タンパク質をコードするポリペプチドもまた、本発明によって包含される。このような融合タンパク質は、例えば、精製を容易にし、そして、インビボ半減期を増加し得る。本発明のポリペプチドに融合または結合される抗体はまた、インビトロ免疫アッセイおよび当該分野で公知の方法を使用する精製方法において使用され得る。例えば、Harborら、上記、およびPCT公開第WO93/21232号;EP439,095;Naramuraら、Immunol.Lett.39:91-99(1994);米国特許第5,474,981号;Gilliesら、PNAS89:1428-1432(1992);Fellら、J.Immunol.146:2446-2452(1991)を参照のこと。これらは、その全体が参考として援用される。

#### 【0404】

本発明はさらに、可変領域以外の抗体のドメインに融合または結合された、本発明のポリペプチドを含む組成物を含む。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体のFc領域、またはその部分に融合または結合され得る。本発明のポリペプチドに融合された抗体部分は、定常領域、ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、またはそのドメイン全体もしくは部分任意の組合せを含み得る。これらのポリペプチドはまた、上記の抗体の部分に融合または結合され得、多重体を形成する。例えば、本発明のポリペプチドに融合されたFc部分は、このFc部分の間のジスルフィド結合を通して二量体を形成し得る。より高度の多重体形態は、ポリペプチドをIgAおよびIgMの部分に融合させることによって作製され得る。本発明のポリペプチドを抗体部分に融合または結合させるための方法は、当該分野において公知である。例えば、米国特許第5,336,603号;同第5,622,929号;同第5,359,046号;同第5,349,053号;同第5,447,851号;同第5,112,946号;EP307,434;EP367,166;PCT公開第WO96/04388号;第WO91/06570号;Ashkenaziら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA88:10535-10539(1991);Zhengら、J.Immunol.154:5

10

20

30

40

50

590-5600(1995); および Vilra, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11337-11341(1992) (前記の参考文献はその全体が参考として援用される)を参照のこと。

#### 【0405】

上で考察されたように、配列番号2のポリペプチドもしくは寄託されたクローンによってコードされるポリペプチド、ポリペプチドフラグメント、または改変体に対応するポリペプチドは、このポリペプチドのインビボ半減期を増大させるため、または当該分野で公知の方法を使用する免疫アッセイにおいて使用するために、上記の抗体部分に融合または結合され得る。さらに、配列番号2のポリペプチドもしくは寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドに対応するポリペプチドを、上記の抗体部分に融合または結合して、精製を容易にし得る。1つの報告された例は、ヒトCD4ポリペプチドの最初の2つのドメイン、および哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載している(EP 394, 827; Traunekerら、Nature 331: 84-86(1988))。ジスルフィド連結二量体構造(IgGに起因する)を有する抗体に融合または結合される、本発明のポリペプチドもまた、単量体分泌タンパク質またはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子に結合しそして中和するのにさらに効率的であり得る(Fountoulakisら、J. Biochem. 270: 3958-3964(1995))。多くの場合、融合タンパク質のFc部分は、治療および診断において有益であり、従って、例えば、改良された薬物動態学的な特性を生じ得る(EP A 232, 262)。あるいは、融合タンパク質が発現され、検出され、そして精製された後に、Fc部分を欠失させることが望ましい。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、Fc部分は、治療および診断を妨害し得る。例えば、薬物の発見において、hIL-5のようなヒトタンパク質は、hIL-5のアンタゴニストを同定するための高スループットスクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合されてきた(Bennettら、J. Molecular Recognition 8: 52-58(1995); Johansonら、J. Biol. Chem. 270: 9459-9471(1995)を参照のこと)。

10

20

#### 【0406】

さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントは、精製を容易にするペプチドのような、マーカー配列に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけヘキサ-ヒスチジンペプチド(例えば、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)において提供されるタグ)であり、これらの多くは市販されている。例えば、Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824(1989)に記載されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する「HA」タグ(Wilsonら、Cell 37: 767(1984))、および「flag」タグを含むが、これに限定されない。

30

#### 【0407】

本発明は、診断剤または治療剤に結合される、抗体またはそのフラグメントをさらに含む。抗体は、例えば、臨床上の試験手順(例えば、所定の処置レジメンの効力を決定するため)の一部として、腫瘍の発生または進行をモニターするために、診断的に使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質と連結させることによって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々の陽電子放射断層撮影を使用する陽電子放射金属、および非放射性常磁性金属イオン、が挙げられる。この検出可能な物質は、抗体(またはそのフラグメント)に対して、直接的または間接的のいずれかで、当該分野で公知の技術を使用する媒介物(例えば、当該分野で公知のリンカーなど)を介して、連結または結合され得る。例えば、本発明に従う診断薬としての使用のための抗体に結合され得る金属イオンに関しては、米国特許第4,741,900号を参照のこと。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオ

40

50

キシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；ならびに、適切な放射性物質の例としては、ヨウ素 ( $^{121}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ )、炭素 ( $^{14}\text{C}$ )、硫黄 ( $^{35}\text{S}$ )、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、インジウム ( $^{111}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 $^{115\text{m}}\text{In}$ )、テクネチウム ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、タリウム ( $^{201}\text{Tl}$ )、ガリウム ( $^{67}\text{Ga}$ )、パラジウム ( $^{103}\text{Pd}$ )、モリブデン ( $^{99}\text{Mo}$ )、キセノン ( $^{133}\text{Xe}$ )、フッ素 ( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、および $^{97}\text{Ru}$ が挙げられる。

#### 【0408】

特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドは、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、および $^{153}\text{Sm}$ を含むがこれらに限定されない放射性金属イオンをポリペプチドに結合体化するために有用な大環状のキレート剤に結合される。好ましい実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに結合した大環状キレート剤と結合する放射性金属イオンは、 $^{111}\text{In}$ である。別の好ましい実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに結合された大環状キレート剤と結合する放射性金属イオンは、 $^{90}\text{Y}$ である。特定の実施形態において、大環状キレート剤は、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-テトラ酢酸(DOTA)である。別の実施形態において、DOTAは、リンカー分子を介して、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに結合される。ポリペプチドへDOTAを結合体化するために有用なリンカー分子の例は、当該分野で一般に公知であり、例えば、DeNardoら、Clin Cancer Res. 4(10):2483-90, 1998; Petersonら、Bioconjug. Chem. 10(4):553-7, 1999; および Zimmermanら、Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, 1999(これらは、本明細書中にその全体が参考として援用される)を参照のこと。さらに、抗体に結合体化され得るキレート剤およびそれを作製および使用するための方法を開示する、米国特許第5,652,361号および同第5,756,065号は、本明細書中にその全体が参考として援用される。米国特許第5,652,361号および同第5,756,065号は、抗体にキレート剤を結合体化することに焦点をあてるが、当業者は、キレート剤を他のポリペプチドに結合体化するために、そこに開示された方法を容易に調整し得る。

#### 【0409】

細胞毒または細胞毒性薬剤は、細胞に対して有害な任意の薬剤を含む。例としては、パクリタキセル(paclitaxol)、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド(tenoposide)、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン(dihydroxyanthracin dione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD, 1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにこれらのアナログまたはホモログ、が挙げられる。治療剤は、代謝拮抗物質(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、クロルメチン(mechlorethamine)、チオエパ(thioepa)クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シ

クロホスファミド (cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにcis-ジクロロジアミン白金 (II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン (例えば、ダウノルビシン (以前はダウノマイシン) およびドキシソルビシン)、抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン (以前はアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン (anthramycin) (AMC))、ならびに抗有糸分裂剤 (例えばビンクリスチンおよびビンブラスチン)、を含むが、それらに限定されない。

#### 【0410】

本発明の抗体結合体は、所定の生物学的応答を改変するために使用され得、治療剤または薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、例えば、毒素 (例えばアブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素)；タンパク質 (例えば、腫瘍壊死因子、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、アポトーシス剤 (例えば、TNF- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、AIM-1 (国際公開第WO97/33899号を参照のこと)、AIM-2 (国際公開第WO97/34911号を参照のこと)、Fasリガンド (Takahashiら、Int. Immunol. 6:1567-1574 (1994))、VEGF (国際公開第WO99/23105号を参照のこと))、血栓症薬もしくは抗脈管形成薬 (例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン)；または生物学的応答改変剤 (例えばリンホカイン、インターロイキン-1 (「IL-1」)、インターロイキン-2 (「IL-2」)、インターロイキン-6 (「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G-CSF」)、または他の増殖因子など)、が挙げられ得る。

10

20

#### 【0411】

抗体はまた、固体支持体に付着させられ得、この固体支持体は、標的抗原の免疫アッセイまたは精製に特に有用である。このような固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレン、が挙げられるがそれらに限定されない。

#### 【0412】

このような治療部分を抗体に結合する技術は、周知であり、例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら (編)、243-56頁 (Alan R. Liss, Inc. 1985)；Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery (第二版)、Robinsonら (編)、623-53頁 (Marcel Dekker, Inc. 1987)；Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら (編)、475-506頁 (1985)；「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら (編)、303-16頁 (Academic Press 1985)、およびThorpeら、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev. 62:119-58 (1982)を参照のこと。

30

40

50

## 【0413】

あるいは、抗体は、Segalにより米国特許第4,676,980号(その全体が参考として本明細書中で援用される)に記載されるように、二次抗体に結合され、抗体ヘテロ結合体を形成し得る。

## 【0414】

単独または細胞毒因子および/もしくはサイトカインと組合せて投与される抗体(その抗体に結合する治療部分を有するまたは有さない)は、治療剤として使用され得る。

## 【0415】

(免疫表現型分類(immunophenotyping))

本発明の抗体は、細胞株および生物学的サンプルの免疫表現型分類のために利用され得る。本発明の遺伝子の翻訳生成物は、細胞特異的マーカーとして、あるいはより詳細には、特定の細胞型の分化および/または成熟の種々の段階で示差的に発現される細胞マーカーとして有用であり得る。特異的エピトープ、またはエピトープの組み合わせに対して指向されるモノクロナール抗体は、マーカーを発現する細胞集団のスクリーニングを可能とする。種々の技術が、マーカーを発現する細胞集団をスクリーニングするために、モノクロナール抗体を用いて利用され得、そしてその技術には、抗体でコーティングされた磁気ビーズを用いる磁気分離、固体マトリクス(すなわち、プレート)に付着した抗体を用いる「パンニング」、ならびにフローサイトメトリー(例えば、米国特許第5,985,660号;およびMorrissonら、Cell, 96:737-49(1999)を参照のこと)が挙げられる。

10

20

## 【0416】

これらの技術は、血液学的悪性腫瘍(すなわち、急性白血病患者における微小残存病変(minimal residual disease)(MRD))および移植片対宿主病(GVHD)を予防するための移植術における「非自己」細胞と共に見出され得るような、細胞の特定集団のスクリーニングを可能にする。あるいは、これらの技術は、ヒト臍帯血において見出され得るような増殖および/または分化を受け得る、造血幹細胞および前駆細胞のスクリーニングを可能にする。

## 【0417】

(抗体結合アッセイ)

本発明の抗体は、免疫特異的結合について、当該分野で公知の任意の方法によってアッセイされ得る。使用され得る免疫アッセイは、競合的および非競合的アッセイ系を含むがこれに限定されない。このアッセイ系は以下のような技術を使用する、少し例を挙げると、BIACore分析(例えば、実施例59を参照)、FACS(蛍光細胞分析分離装置)分析(例えば、実施例54を参照)、免疫蛍光検査(例えば、実施例64および65を参照)、放射性免疫アッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)(例えば、実施例54を参照)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射分析アッセイ、蛍光免疫アッセイ、プロテインA免疫アッセイ。このようなアッセイは、当該分野で、慣習的および周知である(例えば、Ausubelら(編)、1994、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、John Wiley & Sons Inc., New Yorkを参照のこと。これはその全体が本明細書中で参考として援用される)。典型的な免疫アッセイは、以下に簡単に記載される(しかし限定として意図されない)。

30

40

## 【0418】

免疫沈降プロトコルは、一般に、RIPA緩衝液(1%NP-40またはTriton X-100、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、0.15M NaCl、0.01Mリン酸ナトリウム(pH7.2)、1%Trasyol)のような、タンパク質ホスファターゼおよび/またはプロテアーゼインヒビター(例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、パナジウム酸ナトリウム)を補充した溶解緩衝液中で、細胞の集団を溶解する工程、目的の抗体を細胞溶解物に添加する工程、4 である時間(例えば

50

、1～4時間)インキュベートする工程、プロテインAおよび/またはプロテインGのセファロースビーズを細胞溶解物に添加する工程、約1時間以上、4でインキュベートする工程、ビーズを溶解緩衝液で洗浄する工程およびビーズをSDS/サンプル緩衝液中に再懸濁する工程、を包含する。目的の抗体が特定の抗原を免疫沈降する能力は、例えば、ウェスタンブロット分析によって評価され得る。当業者は、抗原に対する抗体の結合を増加し、そしてバックグラウンドを減少する(例えば、セファロースビーズとともに細胞溶解物を予め洗浄する)ように改変され得るパラメータに関して、よく知っている。免役沈降プロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら(編)、1994、Current Protocols in Molecular Biology、Vol. 1、John Wiley & Sons, Inc., New York (10.16.1)を参照のこと。

10

## 【0419】

ウェスタンブロット分析は一般的に、タンパク質サンプルを調製する工程、タンパク質サンプルのポリアクリルアミドゲルでの電気泳動(例えば抗原の分子量によって8%～20%のSDS-PAGE)、タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲルからメンブレン(例えばニトロセルロース、PVDFまたはナイロン)へ移す工程、ブロッキング溶液(例えば、3%のBSAまたは無脂肪ミルクを含むPBS)中でメンブレンをブロッキングする工程、メンブレンを洗浄緩衝液(例えば、PBS-Tween 20)中で洗浄する工程、ブロッキング緩衝液で希釈された一次抗体(目的の抗体)を用いてメンブレンをブロッキングする工程、洗浄緩衝液中でメンブレンを洗浄する工程、ブロッキング緩衝液で希釈された、酵素基質(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ)または放射性分子(例えば<sup>32</sup>Pまたは<sup>125</sup>I)に結合した二次抗体(これは一次抗体(例えば抗ヒト抗体)を認識する)でメンブレンをブロッキングする工程、洗浄緩衝液中でメンブレンを洗浄する工程、および抗原の存在を検出する工程、を包含する。当業者は、検出されるシグナルを増加し、そしてバックグラウンドノイズを減少するように改変され得るパラメータをよく知っている。ウェスタンブロットプロトコルに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら(編)、1994、Current Protocols in Molecular Biology、Vol. 1、John Wiley & Sons, Inc., New York (10.8.1)を参照のこと。

20

## 【0420】

ELISAは、抗原を調製する工程、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルをその抗原でコーティングする工程、酵素基質(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)のような検出可能な化合物に結合した目的の抗体をそのウェルに添加し、そして一定時間インキュベートする工程、および抗原の存在を検出する工程を含む。ELISAにおいて、目的の抗体は、検出可能な化合物に結合している必要はない;その代わりに、検出可能な化合物に結合した第二の抗体(目的の抗体を認識する)がウェルに添加され得る。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体がウェルにコーティングされ得る。この場合、検出可能な化合物に結合した第二の抗体が、コーティングされたウェルへの目的の抗原の添加に続いて、添加され得る。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように改変され得るパラメータ、および当該分野において公知のELISAの他のバリエーションに関して、認め得る。ELISAに関するさらなる考察については、例えば、Ausubelら編、1994、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、John Wiley & Sons, Inc., New York, 11.2.1を参照のこと。

30

40

## 【0421】

抗体の抗原に対する結合親和性および抗体-抗原相互作用のオフレート(off-rate)が、競合結合アッセイにより決定され得る。競合結合アッセイの一つの例は、ラジオイムノアッセイであり、ラジオイムノアッセイは、標識した抗原(例えば、<sup>3</sup>Hまたは<sup>125</sup>I)、またはそれらのフラグメントまたは改変体と、漸増量の非標識抗原の存在下での目的の抗体とのインキュベーション、および標識した抗原に結合した抗体の検出を

50

む。目的の抗体の、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する親和性、および結合オフレートは、スキャッチャードプロット分析によるデータから決定され得る。第二の抗体との競合はまた、ラジオイムノアッセイを用いて決定され得る。この場合、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）は、漸増量の非標識第二抗体の存在下で、標識した化合物（例えば、<sup>3</sup>Hまたは<sup>125</sup>I）に結合した目的の抗体とともにインキュベートされる。2つの抗体間におけるこの種の競合アッセイはまた、2つの抗体が同じであるか、密接に関係する（例えば、重なり合う）か、または異なるエピトープに結合するか否かを決定するために使用され得る。

#### 【0422】

好ましい実施形態において、BIACore反応速度分析を使用して、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のフラグメントへの、抗体（抗体フラグメントおよびその改変体を含む）の結合のオンレートおよびオフレートを決定する。BIACore反応速度分析は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を、実施例59に記載される様に、表面に固定化したチップと抗体との結合および解離を分析する工程を含む。

10

#### 【0423】

（治療用途）

本発明はさらに、抗体を基礎とした治療に関し、この治療は、本発明の抗体を、1つ以上の開示された疾患、障害、または状態を処置するために、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトの患者に投与する工程を含む。本発明の治療化合物としては、本発明の抗体（本明細書中に記載するような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体を含む）ならびに本発明の抗体をコードする核酸（本明細書中に記載するような、それらのフラグメント、アナログおよび誘導体ならびに抗イデオタイプ抗体を含む）が挙げられるがこれらに限定されない。本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患、障害または状態（本明細書中に記載する任意の1つ以上の疾患、障害、または状態を含むがこれらに限定されない）を処置、阻害または予防するために使用され得る。本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患、障害または状態の処置および/または予防は、それらの疾患、障害または状態に関連した症状を緩和する工程を含むがこれに限定されない。本発明の抗体は、当該分野で公知であるか、または本明細書中に記載されるように、薬学的に受容可能な組成物中に提供され得る。

20

30

#### 【0424】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の1つの要約は、身体内で局所的にまたは全身的に、あるいは（例えば、補体（CDC）により、またはエフェクター細胞（ADCC）により媒介されるような）抗体の直接的細胞傷害性により、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを結合させることを含む。これらのアプローチのいくつかは、より詳細に以下に記載される。本明細書中で提供される教示を与えられれば、当業者は、過度の実験なしに、診断上の目的、モニタリングの目的あるいは治療上の目的のために、本発明の抗体を使用する方法がわかる。

#### 【0425】

本発明の抗体は、例えば、抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性を増加させるために役立つ、他のモノクローナル抗体またはキメラ抗体、あるいはリンホカインまたは造血増殖因子（例えば、IL-2、IL-3およびIL-7など）と組み合わせて有利に利用され得る。

40

#### 【0426】

本発明の抗体は、単独で、または他の型の処置（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン治療、免疫治療、抗腫瘍剤、および抗レトロウイルス剤）（以下の実施例28を参照）との組み合わせで投与され得る。非常に好ましい実施形態において、本発明の抗体は、単独または抗レトロウイルス剤との組み合わせにおいて投与され得る（以下の実施例28を参照）。一般的に、（抗体の場合には）患者の種と同じ種である種起源または種反応性

50

の生成物の投与が好ましい。従って、好ましい実施形態においては、ヒトの抗体、フラグメント誘導体、アナログ、または核酸が、治療または予防のために、ヒトの患者に投与される。

【0427】

本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に関するイムノアッセイ、およびそれらに関連した障害の治療の両方のために、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する、高親和性および/または強力な、インビボでの阻害抗体および/または中和抗体、それらのフラグメント、またはその領域を使用することが好ましい。このような抗体、フラグメント、または領域は、好ましくは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（それらのフラグメントを含む）に対して親和性を有する。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-2}$  M、 $10^{-2}$  M、 $5 \times 10^{-3}$  M、 $10^{-3}$  M、 $5 \times 10^{-4}$  M、 $10^{-4}$  Mより小さい解離定数すなわちKdを有する結合親和性が挙げられる。より好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-5}$  M、 $10^{-5}$  M、 $5 \times 10^{-6}$  M、 $10^{-6}$  M、 $5 \times 10^{-7}$  M、 $10^{-7}$  M、 $5 \times 10^{-8}$  M、または $10^{-8}$  Mより小さい解離定数すなわちKdを有する結合親和性が挙げられる。さらに最も好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-9}$  M、 $10^{-9}$  M、 $5 \times 10^{-10}$  M、 $10^{-10}$  M、 $5 \times 10^{-11}$  M、 $10^{-11}$  M、 $5 \times 10^{-12}$  M、 $10^{-12}$  M、 $5 \times 10^{-13}$  M、 $10^{-13}$  M、 $5 \times 10^{-14}$  M、 $10^{-14}$  M、 $5 \times 10^{-15}$  M、または $10^{-15}$  Mより小さい解離定数すなわちKdを有する結合親和性が挙げられる。

10

【0428】

（遺伝子治療）

特定の実施形態において、抗体またはその機能的誘導体をコードする配列を含む核酸は、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連した疾患または障害を処置、阻害または予防するために、遺伝子治療の目的で投与される。遺伝子治療とは、発現したか、または発現可能な核酸の、被験体への投与により行われる治療をいう。本発明のこの実施形態において、核酸は、それらのコードされたタンパク質を産生し、そのタンパク質は治療効果を媒介する。

20

【0429】

当該分野で利用可能な遺伝子治療のための任意の方法は、本発明に従って使用され得る。例示的な方法が以下に記載される。

30

【0430】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspielら、*Clinical Pharmacy* 12: 488 - 505 (1993); WuおよびWu, *Biotherapy* 3: 87 - 95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573 - 596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926 - 932 (1993); ならびにMorganおよびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191 - 217 (1993); May, *TIBTECH* 11(5): 155 - 215 (1993)を参照のこと。使用され得る、組換えDNA技術分野において一般的に公知である方法は、Ausubelら（編）、*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)に記載される。

40

【0431】

好ましい局面において、化合物は抗体をコードする核酸配列を含有し、上記核酸配列は、適切な宿主において、抗体、またはそのフラグメントもしくはキメラタンパク質、あるいはその重鎖もしくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸配列は、抗体コード領域に作動可能に連結したプロモーターを有し、上記プロモーターは誘導性であるかまたは構成性であり、そして必要に応じて組織特異的である。別の特定の

50

実施形態においては、抗体をコードする配列および任意の他の所望の配列がゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接した核酸分子が使用され、それにより抗体をコードする核酸の染色体内の発現を提供する (K o l l e r および S m i t h i e s , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 86 : 8932 - 8935 (1989) ; Z i j l s t r a ー , N a t u r e 342 : 435 - 438 (1989) ) 。 特定の実施形態において、発現した抗体分子は単鎖抗体であるか ; あるいはこの核酸配列は、この抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする配列またはそのフラグメントを含む。

【0432】

核酸の患者への送達は、直接的 (この場合、患者は核酸または核酸保有ベクターに直接的に曝される) か、または間接的 (この場合、細胞は最初にインビトロで核酸で形質転換され、次いで患者に移植される) のいずれかであり得る。これらの2つのアプローチは、インビボ遺伝子治療として、またはエキソビボ遺伝子治療としてそれぞれ公知である。

10

【0433】

特定の実施形態において、核酸配列はインビボで直接的に投与され、そこで核酸配列は発現されて、コードされた産物を産生する。これは、当該分野で公知の多数の方法などのいずれかにより (例えば、それらを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれを細胞内になるように投与することにより (例えば、欠損性または弱毒化したレトロウイルスまたは他のウイルスベクター (米国特許第4,980,286号を参照のこと) を用いた感染により)、あるいは、裸のDNAの直接注射により、あるいは、微粒子ボンバードメント (例えば、遺伝子銃 ; B i o l i s t i c , D u p o n t ) の使用により、あるいは脂質もしくは細胞表面のレセプターでコーティングするか、または薬剤をトランスフェクトすることにより、リポソーム、微粒子、もしくはマイクロカプセル中へのカプセル化により、あるいは、それらを核に進入することが公知であるペプチドと結合させて投与することにより、レセプター媒介のエンドサイトーシスを受けるリガンドとそれを結合させて投与することにより (例えば、W u および W u , J . B i o l . C h e m . 262 : 4429 - 4432 (1987) を参照のこと) (レセプターを特異的に発現する細胞型を標的にするために用いられ得る) 達成され得る。別の実施形態において、核酸 - リガンド複合体が形成され得、ここで、このリガンドはエンドソームを破壊するフソジェニック ( f u s o g e n i c ) ウイルス性ペプチドを含み、核酸がリソソーム分解を回避するようにする。さらに別の実施形態において、核酸は、特異的なレセプターを標的とすることにより、細胞特異的な取り込みおよび発現についてインビボで標的とされ得る (例えば、P C T 公開第 W O 9 2 / 0 6 1 8 0 号 ; 同第 W O 9 2 / 2 2 6 3 5 号 ; 同第 W O 9 2 / 2 0 3 1 6 号 ; 同第 W O 9 3 / 1 4 1 8 8 号、同第 W O 9 3 / 2 0 2 2 1 号を参照のこと) 。 あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして相同組換えにより、発現のために宿主細胞DNA中に組み込まれ得る (K o l l e r および S m i t h i e s , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 86 : 8932 - 8935 (1989) ; Z i j l s t r a ー , N a t u r e 342 : 435 - 438 (1989) ) 。

20

30

【0434】

特定の実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸配列を含むウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが用いられ得る (M i l l e r ー , M e t h . E n z y m o l . 217 : 581 - 599 (1993) を参照のこと) 。 これらのレトロウイルスベクターは、ウイルス性ゲノムの正確なパッケージングおよび宿主細胞DNAへの正確な組み込みのために必要な構成要素を含む。遺伝子治療において使用される抗体をコードする核酸配列は、一つ以上のベクター中にクローン化され、これは、患者内への遺伝子の送達を容易にする。レトロウイルスベクターに関するさらなる詳細は、B o e s e n ー , B i o t h e r a p y 6 : 291 - 302 (1994) (これは、幹細胞を化学療法に対してより耐性にするために、m d r I 遺伝子を造血性幹細胞に送達するための、レトロウイルスベクターの使用を記載する) に見出され得る。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明する他の参考文献は、以下である。 : C l o w e s ー , J . C l i n . I n v e s t . 93 : 644 - 651 (1994) ; K i e m ー , B l

40

50

ood 83:1467-1473 (1994); Salmons および Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); ならびに Grossman および Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993)。

【0435】

アデノウイルスは、遺伝子治療において使用され得る他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、特に、気道上皮へ遺伝子を送達するための魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、自然に気道上皮に感染し、そこで軽い疾患を起こす。アデノウイルスに基づく送達系の他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染し得るという利点を有する。Kozarsky および Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993) は、アデノウイルスに基づく遺伝子治療の概説を示す。Boutら, Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) は、アカゲザルの気道上皮に遺伝子を移入するためのアデノウイルスベクターの使用を実証した。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rosenfeldら, Science 252:431-434 (1991); Rosenfeldら, Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeliら, J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); PCT公開第WO94/12649号; および Wangら, Gene Therapy 2:775-783 (1995) に見出され得る。好ましい実施形態において、アデノウイルスベクターが使用される。

10

20

【0436】

アデノ随伴ウイルス(AAV)はまた、遺伝子治療における使用について提案されてきた(Walshら, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); 米国特許第5,436,146号)。

【0437】

遺伝子治療への別のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、またはウイルス感染のような方法により、組織培養中の細胞へ遺伝子を移入する工程を含む。通常、移入の方法は、選択マーカーの細胞への移入を含む。次いで、細胞は、移入された遺伝子を取り込みそして発現している細胞を単離するために選沢下に置かれる。それらの細胞は次いで、患者に送達される。

30

【0438】

この実施形態においては、得られた組換え細胞のインピボ投与の前に、核酸が細胞に導入される。このような導入は、当該分野において公知の任意の方法により実施され得、それらの方法としては以下が挙げられるがこれらに限定されない: トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルスベクターまたはバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介の遺伝子移入、マイクロセル(microcell)媒介の遺伝子移入、スフェロプラスト融合など。外来遺伝子の細胞への導入については、当該分野において多数の技術が公知であり(例えば、Loeffler および Behr, Meth. Enzymol. 217:599-618 (1993); Cohenら, Meth. Enzymol. 217:618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92m (1985) を参照のこと)、そしてレシピエント細胞の必要な発生的および生理学的機能が破壊されない場合、本発明に従って使用され得る。この技術は、核酸の細胞への安定した移入を提供するはずであり、その結果、核酸は、細胞により発現可能であり、そして好ましくは、遺伝性であり、そしてその細胞の子孫により発現可能である。

40

【0439】

得られた組換え細胞は、当該分野において公知の様々な方法により、患者へ送達され得る。組換え血球(例えば、造血幹細胞または造血前駆細胞)は、好ましくは、静脈内に投与される。使用が考えられる細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、そして

50

当業者により決定され得る。

【0440】

遺伝子治療の目的のために核酸が導入され得る細胞は、任意の所望の入手可能な細胞型を包含し、そして以下を含むがそれらに限定されない：上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球のような血球；種々の幹細胞または前駆細胞、特に、造血幹細胞または造血前駆細胞（例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児の肝臓などから得られるような細胞）。

【0441】

好ましい実施形態において、遺伝子治療に使用される細胞は、患者に対して自己である。

10

【0442】

遺伝子治療において組換え細胞が使用される実施形態において、抗体をコードする核酸配列は、細胞またはそれらの子孫により核酸配列が発現可能であるように細胞に導入され、次いで組換え細胞は、治療的効果のためにインビボで投与される。特定の実施形態において、幹細胞または前駆細胞が用いられる。インビトロで単離され得、そしてインビトロで保存され得る任意の幹細胞および/または前駆細胞は、本発明のこの実施形態に従って潜在的に使用され得る（例えば、PCT公開第WO94/08598号：StempleおよびAnderson, Cell 71:973-985(1992)；Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229(1980)；ならびにPittelkowおよびScott, Mayo Clinic Proc. 61:771(1986)を参照のこと）。

20

【0443】

特定の実施形態において、遺伝子治療の目的で導入される核酸は、コード領域に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含有し、その結果、核酸の発現は、適切な転写誘導因子の存在または非存在を制御することにより制御可能である。

【0444】

本発明の化合物または薬学的組成物は、好ましくは、ヒトでの使用の前にインビトロで、次いでインビボで、所望の治療活性または予防活性について試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の治療有用性または予防有用性を実証するためのインビトロアッセイとしては、細胞株または患者組織サンプルに対する化合物の効果が挙げられる。細胞株および/または組織サンプルに対する化合物または組成物の効果は、当業者に公知である技術（ロゼット形成アッセイおよび細胞溶解アッセイが挙げられるがこれらに限定されない）を利用して決定され得る。本発明に従って、特定の化合物の投与が示されるかどうかを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられ、このアッセイでは、患者組織サンプルが培養において増殖され、そして化合物に曝されるか、そうでなければ化合物が投与され、そして、組織サンプルに対するそのような化合物の効果が観察される。

30

【0445】

（治療的/予防的な投与および組成物）

40

本発明は、被験体への有効量の本発明の化合物または薬学的組成物、好ましくは本発明の抗体の投与による処置、阻害および予防の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は実質的に精製される（例えば、その効果を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質は実質的にない）。被験体は好ましくは、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物が挙げられるがそれらに限定されない動物であり、そして好ましくは哺乳動物であり、そして最も好ましくはヒトである。

【0446】

化合物が核酸または免疫グロブリンを含む場合に使用され得る処方物および投与方法は、上記に記載され；さらなる適切な処方物および投与経路は、本明細書中で以下に記載されたものの中から選択され得る。

50

## 【0447】

種々の送達系が公知であり、そして本発明の化合物を投与するために用いられ得る（例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル中でのカプセル化、この化合物の発現が可能な組み換え細胞、レセプター媒介エンドサイトーシス（例えば、WuおよびWu, J. Biol. Chem. 262: 4429 - 4432 (1987)を参照のこと）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築など）。導入方法としては、皮内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が挙げられるがそれらに限定されない。化合物または組成物は、任意の好都合な経路により（例えば、注入またはポラス注射により、上皮または粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など）を通しての吸収により）投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。さらに、本発明の薬学的化合物または組成物を、任意の適切な経路（脳室内注射および鞘内注射を包含する；脳室内注射は、例えば、Ommayaリザーバのようなりザーバに取り付けられた脳室内カテーテルにより容易にされ得る）により中枢神経系に導入することが望まれ得る。例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアゾール化剤を用いた処方により、肺投与もまた使用され得る。

10

## 【0448】

特定の実施形態において、本発明の薬学的化合物または組成物を、処置の必要な領域に局所的に投与することが望まれ得る；これは、制限する目的ではないが、例えば、手術中の局部注入、局所適用（例えば、手術後の創傷包帯との組み合わせ）により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラント（このインプラントは、シアラストック（sialastic）膜のような膜または繊維を含む、多孔性、非多孔性、またはゼラチン様材料である）により達成され得る。好ましくは、抗体を含む本発明のタンパク質を投与する場合、タンパク質が吸収されない材料を使用するために注意が払われなければならない。

20

## 【0449】

別の実施形態において、化合物または組成物は、小胞、特に、リポソーム中へ送達され得る（Langer, Science 249: 1527 - 1533 (1990); Treatら, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler（編）, Liss, New York, 353 ~ 365頁 (1989); Lopez-Berestein, 同書317 ~ 327頁を参照のこと；広く同書を参照のこと）。

30

## 【0450】

さらに別の実施形態において、化合物または組成物は制御された放出システム中で送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが用いられ得る（Langer, (前出); Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwaldら, Surgery 88: 507 (1980); Saudekら, N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989)を参照のこと）。別の実施形態において、高分子材料が用いられ得る（Medical Application of Controlled Release, LangerおよびWise（編）, CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall（編）, Wiley, New York (1984); RangerおよびPeppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61 (1983)を参照のこと；Levyら, Science 228: 190 (1985); Duringら, Ann. Neurol. 25: 351 (1989); Howardら, J. Neurosurg. 71: 105 (1989)もまた参照のこと）。さらに別の実施形態において、制御された放出システムは、治療標的、即ち、脳の近くに置かれ得、従って、

40

50

全身用量の一部のみを必要とする（例えば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release, (前出), 第2巻, 115~138頁(1984)を参照のこと）。

【0451】

他の制御された放出システムは、Langerにより総説において議論される（Science 249:1527-1533(1990)）。

【0452】

本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である、具体的な実施形態において、その核酸は、それを適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてそれが細胞内になるように投与することにより（例えば、レトロウイルスベクターの使用により（米国特許第4,980,286号を参照のこと）、または直接注射により、または微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont）の使用により、または脂質もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクト剤でコーティングすることにより、または核に入ることが公知であるホメオボックス様ペプチドと結合させて投与すること（例えば、Joliotら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868(1991)を参照のこと）などにより、そのコードされたタンパク質の発現を促進するようにインビボで投与され得る。あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして、発現のために相同組換えにより宿主細胞DNA内に組み込まれ得る。

【0453】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。このような組成物は、治療有効量の化合物、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。具体的な実施形態において、用語「薬学的に受容可能な」とは、動物における、そしてさらに特にヒトにおける使用のために、連邦規制当局もしくは米国政府により認められたか、または米国薬局方もしくは他の一般に認められた薬局方に列挙されたことを意味する。用語「キャリア」とは、治療剤とともに投与される、希釈剤、アジュバンド、賦形剤、またはビヒクルをいう。このような薬学的なキャリアは、水および油（石油起源、動物起源、植物起源、または合成起源の油（例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油など）を含む）のような滅菌した液体であり得る。水は、薬学的組成物が静脈内に投与される場合に、好ましいキャリアである。生理食塩水溶液、ならびにデキストロスおよびグリセロールの水溶液はまた、特に注射可能な溶液のために、液体キャリアとして使用され得る。適切な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、フラワー、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物はまた、所望されるならば、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含み得る。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出処方物などの形態を取り得る。この組成物は、従来の結合剤およびトリグリセリドのようなキャリアとともに、坐剤として処方され得る。経口処方物は、薬学的等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準キャリアを含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。このような組成物は、治療有効量の化合物を、好ましくは精製された形態で、適切な量のキャリアとともに含んで、患者への適切な投与のための形態を提供する。処方物は、投与形態に適すべきである。

【0454】

好ましい実施形態において、組成物は、慣用手順に従って、ヒトへの静脈内投与のために採用された薬学的組成物として、処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液の溶液である。必要な場合、組成物はまた、可溶化剤および注射の部位での痛みを緩和するリグノカインのような局部麻酔を含み得る。一般的には、成分は、別々にかまたは単一投薬形態と一緒に混合してのどちらかで、例えば、一定量の活性薬剤を示すアンプルまたは小袋（sachette）のような密封された容器中の凍結乾

10

20

30

40

50

燥粉末または水を含まない濃縮物として供給される。組成物が注入により投与されるべき場合には、組成物は、滅菌した薬学的等級の水または生理食塩水を含む注入ボトルに分配され得る。組成物が注射により投与される場合、成分が投与の前に混合され得るように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

【0455】

本発明の化合物は、中性のまたは塩の形態として処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するもののようなアニオンとともに形成される塩、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第2鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するもののようなカチオンとともに形成される塩が挙げられる。

10

【0456】

この処置（本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性と関連する疾患または障害の抑制および予防）において効果的である本発明の化合物の量は、標準的な臨床技術により決定され得る。さらに、インビトロアッセイは、必要に応じて、使用して最適な投薬量の範囲を同定するのを助け得る。処方において使用されるべき正確な用量はまた、投与の経路、および疾患または障害の重篤さに依存し、そして開業医の判断および各患者の状況に従って決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から外挿され得る。

【0457】

抗体に関して、患者に投与される投薬量は、代表的に、患者の体重1kgあたり0.1mg~100mgである。好ましくは、患者に投与される投薬量は、患者の体重1kgあたり0.1mgと20mgとの間であり、より好ましくは、患者の体重1kgあたり1mg~10mgである。一般に、ヒト抗体は、外来ポリペプチドへの免疫応答に起因して、他種由来の抗体よりもヒト体内で長い半減期を有する。従って、ヒト抗体の低い投薬量および頻度の低い投与は、しばしば可能である。さらに、本発明の抗体の投与の投薬量および頻度は、改変（例えば、脂溶化（lipidation）のような）による抗体の取り込みおよび組織浸透（例えば、脳への）を増強することにより減少され得る。

20

【0458】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の一つ以上の成分で満たされている一つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。薬学的製品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制している政府機関により規定される形式における通告は、このような容器に、必要に応じて伴ない得る。この通告は、ヒトの投与のための製造、使用または販売のこの機関による認可を反映する。

30

【0459】

（診断および画像化）

目的のポリペプチドに特異的に結合する標識化抗体、ならびにその誘導体およびそのアナログは、診断目的のために使用されて、本発明のポリペプチドの異常な発現および/または活性に関連する疾患、障害および/または状態を検出、診断またはモニターし得る。本発明は、目的のポリペプチドの異常な発現の検出を提供し、これは、（a）目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および（b）この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベルと比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、異常な発現を示す。

40

【0460】

本発明は、障害を診断するための診断アッセイを提供し、このアッセイは、（a）目的のポリペプチドに特異的な1つ以上の抗体を使用して、個体の細胞または体液中の目的のポリペプチドの発現をアッセイする工程、および（b）この遺伝子発現レベルと標準的な遺伝子発現のレベルを比較する工程、を包含し、これによって、その標準的な発現レベル

50

と比較されるアッセイされたポリペプチド遺伝子発現レベルの増加または減少が、特定の障害を示す。癌に関して、個体由来の生検組織における比較的高い量の転写物の存在は、疾患の発生についての素因を示し得るか、または実際の臨床症状の出現前に疾患を検出するための手段を提供し得る。この型のより決定的な診断は、保健専門家に予防手段を使用させること、またはより早期の積極的な処置を可能にし得、これにより、癌の発生またはさらなる進行を予防する。

#### 【0461】

本発明の抗体を使用して、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を使用して生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイに使用し得る（例えば、Jalkanenら、*J. Cell. Biol.* 101: 976 - 985 (1985)；Jalkanenら、*J. Cell. Biol.* 105: 3087 - 3096 (1987)を参照のこと）。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な、抗体に基づく他の方法としては、イムノアッセイ（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）および放射免疫アッセイ（RIA））が挙げられる。適切な抗体アッセイ標識は、当該分野において公知であり、そして酵素標識（例えば、グルコースオキシダーゼ）；放射性同位体（例えば、ヨウ素（<sup>125</sup>I、<sup>121</sup>I）、炭素（<sup>14</sup>C）、硫黄（<sup>35</sup>S）、トリチウム（<sup>3</sup>H）、インジウム（<sup>112</sup>In）、およびテクネチウム（<sup>99</sup>Tc））；発光標識（例えば、ルミノール）；ならびに蛍光標識（例えば、フルオレセインおよびローダミン）、ならびにビオチンが挙げられる。

10

#### 【0462】

本発明の1つの局面は、動物、好ましくは哺乳動物、そして最も好ましくはヒトにおける、目的のポリペプチドの異常な発現と関連する疾患または障害の検出および診断である。1つの実施形態において、診断は、a) 目的のポリペプチドに特異的に結合する有効量の標識化分子を被験体に（例えば、非経口的に、皮下に、または腹腔内に）投与する工程；b) このポリペプチドが発現する被験体内の部位でこの標識化分子が優先的に濃縮することを可能にするために（および結合していない標識化分子がバックグラウンドレベルまで除去されるために）投与後、時間間隔を待つ工程；c) バックグラウンドレベルを決定する工程；およびd) この被験体中の標識化分子を検出する工程、を包含し、その結果、このバックグラウンドレベルを越える標識化分子の検出は、この被験体が目的のポリペプチドの異常な発現と関連する特定の疾患または障害を有することを示す。バックグラウンドレベルは、特定の系について以前に決定された標準的な値と、検出された標識化分子の量を比較する工程を包含する種々の方法により決定され得る。

20

30

#### 【0463】

被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、約5～20ミリキュリーの<sup>99m</sup>Tcの範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、S. W. Burchielら、「*Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments*」(*Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer*の第13章、S. W. BurchielおよびB. A. Rhodes編、Masson Publishing Inc. (1982)に記載される。

40

#### 【0464】

用いられる標識の型および投与の様式を含む、いくつかの変要素に依存して、標識された分子が被験体の部位に優先的に濃縮し、そして結合されていない標識された分子がバックグラウンドレベルまで一掃されることを可能にする、投与後の時間間隔は、6～48時間または6～24時間または6～12時間である。別の実施形態においては、投与後の時間間隔は、5～20日間または5～10日間である。

#### 【0465】

50

1つの実施形態においては、疾患または障害のモニタリングは、その疾患または障害を診断するための方法を繰り返すこと（例えば、最初の診断後1ヶ月、最初の診断後6ヶ月、最初の診断後1年など）により行われる。

【0466】

標識された分子の存在は、インビボ走査について当該分野において公知の方法を用いて、患者から検出され得る。これらの方法は、用いられる標識の型に依存する。当業者は、特定の標識を検出するための適切な方法を決定し得る。本発明の診断方法において用いられ得る方法およびデバイスとしては、限定はされないが、コンピューター断層撮影（CT）、陽子（positron）射出断層撮影法（PET）のような全身走査、磁気共鳴画像法（MRI）、および超音波検査法が挙げられる。

10

【0467】

特定の実施形態においては、この分子は放射性同位体で標識され、そして放射線応答性の外科用機器を用いて患者から検出される（Thurstonら、米国特許第5,441,050号）。別の実施形態においては、この分子は蛍光化合物で標識され、そして蛍光応答性の走査機器を用いて患者から検出される。別の実施形態においては、この分子は陽電子射出金属で標識され、そして陽子射出断層撮影法を用いて患者（patient）から検出される。さらに別の実施形態においては、この分子は常磁性標識で標識され、そして磁気共鳴画像法（MRI）を用いて患者から検出される。

【0468】

（キット）

20

本発明は、上記の方法において使用され得るキットを提供する。1つの実施形態において、キットは、1つ以上の容器において、本発明の抗体、好ましくは精製した抗体を備える。特定の実施形態において、本発明のキットは、エピトープを含む実質的に単離されたポリペプチドを備える。このエピトープは、キット中に含まれる抗体と特異的に免疫反応する。好ましくは、本発明のキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体をさらに備える。別の特定の実施形態において、本発明のキットは、目的のポリペプチドへの抗体の結合を検出するための手段を備える（例えば、この抗体は、検出可能な基質（例えば、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物もしくは発光化合物）に結合体化されるか、または一次抗体を認識する二次抗体が、検出可能な基質と結合体化され得る）。

【0469】

30

本発明の別の特定の実施形態において、キットは、増殖性および/または癌性のポリヌクレオチドおよびポリペプチドに対して特異的な抗体を含む血清のスクリーニングに使用するための診断キットである。このようなキットは、目的のポリペプチドと反応しないコントロール抗体を備え得る。このようなキットは、エピトープを含む実質的に単離されたポリペプチド抗原を備え得る。このエピトープは、少なくとも1つの抗ポリペプチド抗原抗体と特異的に免疫反応する。さらに、このようなキットは、抗原に対する上記の抗体の結合を検出するための手段を備える（例えば、抗体は、蛍光化合物（例えば、フローサイトメトリーにより検出され得るフルオレセインまたはローダミン）と結合体化され得る）。特定の実施形態において、キットは、組換え的に産生されたポリペプチド抗原または化学的に合成されたポリペプチド抗原を備え得る。キットのポリペプチド抗原はまた、固体支持体に付着され得る。

40

【0470】

より特定の実施形態において、上記のキットの検出手段は、上記のポリペプチド抗原が付着する固体支持体を備える。このようなキットはまた、非付着レポーター標識化抗ヒト抗体を備え得る。この実施形態において、ポリペプチド抗原への抗体の結合は、上記のレポーター標識化抗体の結合によって検出され得る。

【0471】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清のスクリーニングにおいて使用するための、診断キットを含む。この診断キットは、ポリペプチド抗原またはポリヌクレオチド抗原と特異的に免疫反応する実質的に単離された抗体、お

50

よびこの抗体へのこのポリヌクレオチド抗原またはポリペプチド抗原の結合を検出するための手段を備える。1つの実施形態において、抗体は、固体支持体に付着される。特定の実施形態において、抗体は、モノクロナール抗体であり得る。キットのこの検出手段は、二次標識化モノクロナール抗体を含み得る。あるいは、またはさらに、この検出手段は、標識化競合抗原を含み得る。

**【0472】**

1つの診断構成において、試験血清を、本発明の方法により得られる表面結合抗原を有する固相試薬と反応させる。特定の抗原抗体とこの試薬との結合、および洗浄することによる結合していない血清成分の除去の後、この試薬をレポーター標識化抗ヒト抗体と反応させて、固体支持体上に、結合した抗抗原抗体の量に比例して、この試薬にレポーターを結合させる。この試薬を再び洗浄して、結合していない標識化抗体を除去し、そしてこの試薬と会合するレポーターの量を決定する。代表的に、レポーターは、酵素であり、この酵素は、適切な蛍光性基質、発光性基質または比色用基質（Sigma, St. Louis, MO）の存在下で固相をインキュベートすることにより検出される。

10

**【0473】**

上記アッセイにおいて、固体表面試薬は、固体支持体物質（例えば、ポリマービーズ、ディップスティック、96ウェルプレートまたは濾過材料）へGタンパク質材料を付着することについての公知の技術によって調製される。これらの付着法は、一般に、支持体へのタンパク質の非特異的吸着またはタンパク質の共有結合性の付着（代表的に、固体支持体上の化学的反応基に対して遊離のアミン基（例えば、活性化カルボキシル基、ヒドロキシル基、もしくはアルデヒド基）による）を包含する。あるいは、ストレプトアビジンコートプレートが、ビオチン化抗原と組み合わせて使用され得る。

20

**【0474】**

従って、本発明は、この診断方法を実施するためのアッセイ系またはキットを提供する。このキットは、一般に、表面に結合した組換え抗原を有する支持体、および表面に結合した抗抗原抗体を検出するためのレポーター標識化抗ヒト抗体を含む。

**【0475】**

（融合タンパク質）

任意のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）は、融合タンパク質を産生するために使用され得る。例えば、このGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドは、第2のタンパク質と融合される場合、抗原性タグとして使用され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドに対して惹起される抗体は、そのGタンパク質ケモカインレセプターに結合することによって、第2のタンパク質を間接的に検出するために使用され得る。さらに、分泌されるタンパク質は、細胞位置を輸送シグナルに基づいて標的化するので、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドは、他のタンパク質に一旦融合されると標的化分子として使用され得る。

30

**【0476】**

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドと融合され得るドメインの例は、異種シグナル配列のみならず、他の異種機能性領域をも含む。融合は、必ずしも直接的である必要はないが、リンカー配列を介して起こり得る。

40

**【0477】**

特定の好ましい実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドがm-nとして上記されているものである、融合タンパク質を含む。好ましい実施形態において、本願は、本明細書中に記載される特定のN末端欠失およびC末端欠失のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である、核酸に関する。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、本発明により包含される。

**【0478】**

さらに、融合タンパク質はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリ

50

ペプチドの特徴を改良するために操作され得る。例えば、さらなるアミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域が、宿主細胞からの精製または続く取り扱いおよび貯蔵の間の安定性および持続性を改良するためにGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドのN末端へ付加され得る。また、ペプチド部分は精製を容易にするためにGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドへ付加され得る。このような領域は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの最終調製の前に除去され得る。ポリペプチドの取り扱いを容易にするためのペプチド部分の付加は、当該分野でよく知られる慣用の技術である。

#### 【0479】

当業者に理解されるように、本発明のポリペプチドおよび上記のそれらのエピトープ保有フラグメントは、異種ポリペプチド配列と組み合わせられ得る。例えば、本発明のポリペプチド(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、免疫グロブリン(IgA、IgE、IgG、IgM)の定常ドメインまたはそれらの部分(CH1、CH2、CH3、またはそれらの任意の組み合わせおよびそれらの部分)と融合され得、キメラポリペプチドを生じる。別の非制限的な例としては、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、アルブミン(組換えヒト血清アルブミンまたはそのフラグメントもしくは改変体(例えば、1999年3月2日発行の米国特許第5,876,969号、欧州特許第0413622号、および1998年6月16日発行の米国特許第5,766,883号(これらは、本明細書によってその全体において参考として援用される)を含む)を参照のこと)を含むが、限定はされない)と融合され得る。好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、ヒト血清アルブミンの成熟形態(すなわち、欧州特許第0322094号(これは、本明細書中にその全体が参考として援用される)の図1および2に示されるようなヒト血清アルブミンのアミノ酸1~585)と融合される。別の好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、米国特許第5,766,883号(これは、本明細書中にその全体が参考として援用される)に記載されるように、ヒト血清アルブミンのアミノ酸残基1~zを含むかまたはそれらからなるポリペプチドフラグメントと融合され、ここで、zは、369~419の整数である。本発明のポリペプチドおよび/または抗体(そのフラグメントまたは改変体を含む)は、異種タンパク質(例えば、免疫グロブリンFcポリペプチドまたはヒト血清アルブミンポリペプチド)のN末端またはC末端のいずれかに融合され得る。本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、本発明によって含まれる。

#### 【0480】

このような融合タンパク質は、精製を容易にし、そしてインビボでの半減期の増大を示す。1つの報告された例は、ヒトCD4-ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質を記載する(EP394,827; Traunckerら、Nature, 331:84~86(1988))。ジスルフィド結合二量体構造(IgGに起因する)を有する融合タンパク質はまた、単量体分泌ポリペプチドまたはタンパク質フラグメント単独よりも、他の分子の結合および中和においてより効果的であり得る(Fountoulakisら、J. Biochem., 270:3958-3964(1995))。

#### 【0481】

同様に、EP-A-O464533(カナダ国対応特許第2045869号)は、別のヒトタンパク質またはその部分とともに免疫グロブリン分子の定常領域の種々の部分を含む融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質のFc部分は、治療および診断において有益であり、従って、例えば、改良された薬物動態学的な特性を生じ得る(EP-A0232262)。あるいは、融合タンパク質が発現され、検出され、そして精製された後に、Fc部分を欠失させることが望ましい。例えば、融合タンパク質が免疫化のための抗原として使用される場合、Fc部分は、治療および診断を妨害し得る。例えば、薬物の発見において、hIL-5のようなヒトタンパク質は、hIL-5のアン

タグニストを同定するための高スループットスクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合されてきた(D. Bennetら、J. Molecular Recognition 8:52-58(1995); K. Johansonら、J. Biol. Chem. 270:9459-9471(1995)を参照のこと)。

【0482】

さらに、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドはマーカー配列(例えば、Gタンパク質ケモカインレセプターの精製を容易にするペプチド)に融合され得る。好ましい実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、とりわけヘキサ-ヒスチジンペプチド(例えば、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)において提供されるタグ)であり、これらの多くが市販されている。例えば、Gentzら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989)に記載されるように、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の都合の良い精製を提供する。精製のために有用な別のペプチドタグである「HA」タグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する(Wilsonら、Cell 37:767(1984))。

10

【0483】

従って、任意のこれらの上の融合物は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドまたはそのポリペプチドを使用して操作され得る。

【0484】

(ベクター、宿主細胞、およびタンパク質産生)

本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドを含むベクター、宿主細胞、および組換え技術によるポリペプチドの産生に関連する。例えば、ベクターは、ファージベクター、プラスミドベクター、ウイルスベクター、またはレトロウイルスベクターであり得る。レトロウイルスベクターは、複製コンピテント、または複製欠損であり得る。後者の場合、一般的にウイルス増殖は、補完性(complementing)宿主細胞にのみ生じる。

20

【0485】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドは、宿主における増殖のために選択マーカーを含むベクターに連結され得る。一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈澱物のような沈澱物、または荷電脂質との複合体において導入される。ベクターがウイルスである場合、ウイルスベクターは、適切なパッケージング細胞株を使用してインビトロでパッケージングされ、次いで宿主細胞に形質導入され得る。

30

【0486】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド挿入物は、適切なプロモーター(いくつか挙げれば、例えば、ファージPLプロモーター、E. coli lacプロモーター、trpプロモーター、phoAプロモーターおよびtacプロモーター、SV40初期プロモーターおよびSV40後期プロモーター、ならびにレトロウイルスLTRのプロモーター)に作動可能に連結されるべきである。他の適切なプロモーターは当業者に公知である。発現構築物はさらに、転写開始、転写終結のための部位、および転写領域において、翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。構築物によって発現される転写物のコード部分は、好ましくは、始めに翻訳開始コドン、および翻訳されるためのポリペプチドの末端に適切に位置される終結コドン(UAA、UGAまたはUAG)を含む。

40

【0487】

示されるように、発現ベクターは、好ましくは少なくとも1つの選択マーカーを含む。このようなマーカーは、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、G418、グルタミンシンターゼまたはネオマイシン耐性遺伝子、ならびにE. coliおよび他の細菌において培養するためのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子を含む。適切な宿主の代表的な例は、細菌細胞(例えば、E. coli、StreptomycesおよびSalmonella typhimurium細胞); 酵母細胞の

50

ような真菌細胞（例えば、*Saccharomyces cerevisiae*または*Pichia pastoris*（ATCC受託番号201178））；*Drosophila S2*および*Spodoptera Sf9*細胞のような昆虫細胞；CHO細胞、NSO細胞、COS細胞、293細胞、およびBowesメラノーマ細胞のような動物細胞；ならびに植物細胞を含むが、これらに限定されない。上記の宿主細胞のための適切な培養培地および条件は、当該分野で公知である。

#### 【0488】

グルタミンシンターゼ（GS）またはDHFRを選択マーカーとして使用するベクターは、それぞれメチオニンスルホキシミン薬物またはメトトレキセート薬物の存在において増幅され得る。選択マーカーによってコードされる酵素の機能を阻害する薬物の有効性は、ベクター配列が、宿主細胞のDNAに組み込み後に、増幅されている細胞株の選択を可能にする。グルタミンシンターゼベースのベクターの利点は、グルタミンシンターゼ陰性である細胞株（例えば、マウス骨髄腫細胞株、NSO）の有効性である。グルタミンシンターゼ発現系はまた、グルタミンシンターゼ発現細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）において機能して、さらなるインヒビターを提供することで内因性遺伝子の機能化を阻害し得る。グルタミンシンターゼを選択マーカーとして使用するベクターとしては、StephensおよびCockett、*Nucl. Acids. Res.* 17:7110（1989）に記載されるpEE6発現ベクターが挙げられる。グルタミンシンターゼ発現系およびそれらの成分は、PCT公報：WO87/04462；WO86/05807；WO89/01036；WP89/10404；およびWO91/06657（本明細書中に参考としてその全体が援用される）に詳述される。さらに、本発明に従って使用され得るグルタミンシンターゼ発現ベクターは、供給業者（例えば、Lonza Biologics, Inc.（Portsmouth, NH）が挙げられる）から市販される。マウス骨髄腫細胞におけるGS発現系を使用するモノクローナル抗体の発現および産生は、Bebbingtonら、*Bio/technology* 10:169（1992）ならびにBibliaおよびRobinson *Biotechnol. Prog.* 11:1（1995）（参考として本明細書中に援用される）に記載される。

#### 【0489】

細菌における使用のために好ましいベクターの中には、pQE70、pQE60およびpQE-9（QIAGEN, Inc.から入手可能）；pBluescriptベクター、Phagescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A（Stratagene Cloning Systems, Inc.から入手可能）；およびptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5（Pharmacia Biotech, Inc.から入手可能）を含む。好ましい真核生物ベクターの中には、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG（Stratageneから入手可能）；ならびにpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL（Pharmaciaから入手可能）がある。酵母菌系における使用のための好ましい発現ベクターは、pYES2、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZalph、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、pPIC9K、およびPAO815（すべてInvitrogen, Carlsbad, CAから入手可能）を含むが、これらに限定されない。他の適切なベクターは当業者に容易に明らかである。

#### 【0490】

宿主細胞への構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、または他の方法によってもたらされ得る。このような方法は、Davissら、*Basic Methods In Molecular Biology*（1986）のような多くの標準的研究室マニュアルに記載される。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドは、実際、組換えベクターを欠損する宿主細胞によって発現され得ることが特に意図される。

## 【0491】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドは、硫酸アンモニウム沈澱またはエタノール沈澱、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって組換え細胞培養物から回収され得、そして精製され得る。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)が精製のために使用される。

## 【0492】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド、および好ましくは分泌形態はまた、以下から回収され得る：直接単離されるかまたは培養されるかにかかわらず、体液、組織および細胞を含む天然の供給源から精製された産物；化学的合成手順の産物；ならびに、例えば、細菌細胞、酵母細胞、高等植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞を含む、原核生物宿主または真核生物宿主から組換え技術によって産生された産物。組換え産生手順に使用される宿主に依存して、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドは、グリコシル化されてもまたはグリコシル化されていなくてもよい。さらに、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドもまた、宿主媒介プロセスの結果として、いくつかの場合において、最初の改変されたメチオニン残基を含み得る。従って、一般に、翻訳開始コドンによってコードされるN末端メチオニンが、すべての真核生物細胞における翻訳後の任意のタンパク質から高い効率で除去されることは当該分野において周知である。ほとんどのタンパク質においてN末端メチオニンもまた、ほとんどの原核生物において効果的に除去されるが、いくつかのタンパク質について、この原核生物除去プロセスは、N末端メチオニンが共有結合するアミノ酸の性質に依存しており、非効率的である。

## 【0493】

1つの実施形態においては、酵母 *Pichia pastoris* は、真核生物系においてGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質を発現するために用いられる。*Pichia pastoris* は、メタノールをその唯一の炭素源として代謝し得るメチロトロフィック(methylotrophic)酵母である。メタノール代謝経路における主なステップは、O<sub>2</sub>を用いてメタノールを酸化し、ホルムアルデヒドにすることである。この反応は、酵素アルコールオキシダーゼにより触媒される。メタノールをその唯一の炭素源として代謝するために、*Pichia pastoris* は、O<sub>2</sub>に対するアルコールオキシダーゼの相対的に低い親和性にいくぶん起因して、高いレベルのアルコールオキシダーゼを産生しなければならない。従って、主要な炭素源としてのメタノールによる増殖培地において、2つのアルコールオキシダーゼ遺伝子(AOX1)のうち1つのプロモーター領域は、非常に活性である。メタノールの存在下において、AOX1遺伝子から産生されるアルコールオキシダーゼは、*Pichia pastoris* 中の総可溶性タンパク質のおよそ30%までを構成する。Ellis, S. B.ら、*Mol. Cell. Biol.* 5: 1111-21 (1985); Koutz, P. J.ら、*Yeast* 5: 167-77 (1989); Tschopp, J. F.ら、*Nucl. Acids Res.* 15: 3859-76 (1987)を参照のこと。従って、全体または一部のAOX1調節配列の転写調節下で、異種コード配列(例えば、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド)は、メタノールの存在下で増殖した*Pichia*酵母において例外的に高いレベルで発現される。

## 【0494】

1つの例においては、プラスミドベクター pPIC9K は、本明細書中に記述されるように、本質的に以下に記載されるような *Pichia* 酵母系において本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドをコードするDNAを発現するために用いられる：「*Pichia Protocols: Methods in Molecular Biology*」、D. R. Higgins および J. Cregg 編、The

10

20

30

40

50

Humana Press, Totowa, NJ, 1998。この発現ベクターは、多重クローニング部位の上流に位置する *Pichia pastoris* アルカリホスファターゼ (PHO) 分泌シグナルペプチド (すなわち、リーダーペプチド) に連結した強い AOX1 プロモーターの効力により、本発明の G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) タンパク質の発現および分泌を可能にする。

【0495】

多くの他の酵母ベクターは、当業者が容易に理解するように、提案される発現構築物が、転写、翻訳、分泌 (所望される場合) などのために適切に配置されたシグナル (必要ならばインフレーム AUG を含む) を提供する限り、pPIC9K (例えば、pYES2、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZ、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、および PAO815) の代わりに用いられ得る。

10

【0496】

別の実施形態においては、異種コード配列 (例えば、本発明の G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドのような) の高レベルの発現は、本発明の異種ポリヌクレオチドを発現ベクター (例えば、pGAPZ または pGAPZ のような) にクローニングすることにより達成され得、そしてメタノールの非存在下で酵母培養物を増殖させる。

【0497】

本明細書において議論されるベクター構築物を含む宿主細胞を含むことに加えて、本発明はまた、脊椎動物起源 (特に、哺乳動物起源) の一次 (primary) 宿主細胞、二次 (secondary) 宿主細胞、および不死化宿主細胞を含む。これらの宿主細胞は、内因性の遺伝物質 (例えば、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) コード配列) を欠失または置換するように操作されており、そして / または G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドと作動可能に連結された遺伝物質 (例えば、異種ポリヌクレオチド配列) を含むように操作され、そして内因性の G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドを活性化、変更、および / または増幅する。例えば、当該分野で公知の技術は、相同組換えを介して、異種制御領域 (例えば、プロモーターおよび / またはエンハンサー) および内因性 G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチド配列を作動可能に連結するために使用され得、その結果、

20

30

【0498】

さらに、本発明のポリペプチドは、当該分野で公知の技術を用いて化学合成され得る (例えば、Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.Y. および Hunkapillerら, *Nature*, 310: 105-111 (1984) を参照のこと)。例えば、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチド配列のフラグメントに対応するポリペプチドは、ペプチド合成機の使用により合成され得る。さらに、所望の場合、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸アナログが、置換または付加として G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチド配列に導入され得る。非古典的アミノ酸としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 通常のアミノ酸の D 異性体、2, 4 - ジアミノ酪酸、 $\alpha$  - アミノイソ酪酸、4 - アミノ酪酸、Abu、2 - アミノ酪酸、g - Abu、e - Ahx、6 - アミノヘキサミン酸、Aib、2 - アミノイソ酪酸、3 - アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノ

40

50

ルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、b-アラニン、フルオロアミノ酸、デザイナ-アミノ酸（例えば、b-メチルアミノ酸）、Ca-メチルアミノ酸、Na-メチルアミノ酸、および一般のアミノ酸アナログ。さらにアミノ酸はD（右旋性）またはL（左旋性）であり得る。

【0499】

本発明は、翻訳の間または翻訳後に、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、抗体分子または他の細胞性リガンドへの結合などによって示差的に改変されるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを含む。任意の多数の化学的改変は、以下を含むがこれらに限定されない公知の技術によって実施され得る：臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、 $\text{NaBH}_4$ による特異的化学的切断；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；ツニカマイシンの存在下での代謝合成；など。

10

【0500】

本発明によって含まれるさらなる翻訳後修飾としては、例えば、以下などが挙げられる：N結合型もしくはO結合型の炭水化物鎖（N末端またはC末端のプロセッシング）、アミノ酸バックボーンへの化学部分の結合、N結合型もしくはO結合型の炭水化物鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加もしくは欠失。このポリペプチドはまた、検出可能な標識（例えば、酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識）を用いて改変して、このタンパク質の検出および単離が可能にされ得る。

20

【0501】

本発明によってまた、さらなる利点（例えば、このポリペプチドの溶解度、安定性および循環時間の増加、または免疫原性の減少）を提供し得る、本発明のポリペプチドの化学修飾誘導体が提供される（米国特許第4,179,337号を参照のこと）。誘導体化のための化学部分は、水溶性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなど）から選択され得る。このポリペプチドは、この分子内のランダムな位置で、またはこの分子内の所定の位置で改変され得、そして1、2、3以上の結合した化学部分を含み得る。

30

【0502】

このポリマーは、任意の分子量のポリマーであり得、そして分枝状であっても非分枝状であってもよい。ポリエチレングリコールに関しては、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造の容易さのために、約1kDaと約100kDaとの間（用語「約」は、ポリエチレングリコールの調製において、いくつかの分子は示した分子量よりも重く、いくつかは示した分子量よりも軽いことを示す）である。所望の治療プロフィール（例えば、所望される持続放出の継続時間、（存在する場合には）生物学的活性に対する影響、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または抗原性の欠如、および治療タンパク質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の公知の影響）に依存して、他のサイズが用いられ得る。

40

【0503】

ポリエチレングリコール分子（または他の化学部分）は、このタンパク質の機能的ドメインまたは抗原性ドメインに対する影響を考慮してこのタンパク質に結合されるべきである。当業者に利用可能な多数の結合方法が存在する（例えば、本明細書中に参考として援用される、EP 0 401 384（G-CSFにPEGを結合する）、Malikら、Exp. Hematol. 20:1028-1035（1992）（塩化トレシル（tresyl chloride）を用いたGM-CSFのペグ化を報告する）もまた参照のこと）。例えば、ポリエチレングリコールは、反応性基（例えば、遊離のアミノ基またはカルボキシル基）を介してアミノ酸残基により共有結合され得る。反応性基は、活性化ポリエチレングリコール分子が結合し得る基である。遊離のアミノ基を有するアミノ酸残基としては、例えば、リジン残基およびN末端アミノ酸残基が挙げられ得る；遊離のカル

50

ボキシル基を有するアミノ酸残基としては、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびC末端アミノ酸残基が挙げられ得る。スルフヒドリル基もまた、ポリエチレングリコール分子を結合するための反応性基として用いられ得る。治療目的のために好ましいのは、アミノ基での結合（例えば、N末端またはリジン基での結合）である。

#### 【0504】

N末端で化学修飾されたタンパク質が特に所望され得る。ポリエチレングリコールを本組成物の例示として用いて、種々のポリエチレングリコール分子から（分子量、分枝などによって）、反応混合物中でのポリエチレングリコール分子のタンパク質（ポリペプチド）分子に対する比、行われるべきペグ化反応の型、および選択されたN末端ペグ化タンパク質の獲得方法を選択し得る。N末端ペグ化調製物の獲得方法（すなわち、必要な場合、この部分を他のモノペグ化部分から分離すること）は、ペグ化タンパク質分子の集団からの、N末端ペグ化物質の精製によるものであり得る。N末端修飾で化学修飾された選択的タンパク質は、特定のタンパク質における誘導体化に利用可能な異なる型の第1級アミノ基（リジン対N末端）の示差的反応性を利用する還元的アルキル化によって達成され得る。適切な反応条件下では、カルボニル基含有ポリマーを用いた、N末端でのタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。

10

#### 【0505】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドは、モノマーまたはマルチマー（すなわち、ダイマー、トリマー、テトラマー、およびより高次のマルチマー）であり得る。従って、本発明は、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドのモノマーおよびマルチマー、それらの調製物、およびそれらを含む組成物（好ましくは、治療剤）。特定の実施形態では、本発明のポリペプチドは、モノマー、ダイマー、トリマーまたはテトラマーである。さらなる実施形態では、本発明のマルチマーは、少なくともダイマー、少なくともトリマー、または少なくともテトラマーである。

20

#### 【0506】

本発明により包含されるマルチマーは、ホモマーまたはヘテロマーであり得る。本明細書中で使用される場合、用語「ホモマー」は、配列番号2のアミノ酸配列に対応する、または寄託されたクローンに含まれるHDGNR10 DNAによってコードされるポリペプチド（本明細書中に記載されるようにこれらに対応する、フラグメント、改変体、スプライス改変体、および融合タンパク質を含む）のみを含む、マルチマーをいう。これらのホモマーは、同一のアミノ酸配列または異なるアミノ酸配列を有する、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを含み得る。特定の実施形態において、本発明のホモマーは、同一のアミノ酸配列を有するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドのみを含む、マルチマーである。別の特定の実施形態において、本発明のホモマーは、異なるアミノ酸配列を有するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを含む、マルチマーである。特定の実施形態において、本発明のマルチマーは、ホモダイマー（例えば、同一のアミノ酸配列または異なるアミノ酸配列を有する、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを含む）あるいはホモトリマー（例えば、同一のアミノ酸配列および/または異なるアミノ酸配列を有する、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを含む）。さらなる実施形態において、本発明のホモメリックマルチマーは、少なくともホモダイマー、少なくともホモトリマー、または少なくともホモテトラマーである。

30

40

#### 【0507】

本明細書中で使用される場合、用語ヘテロマーは、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドに加えて、異種ポリペプチド（すなわち、異なるタンパク質のポリペプチド）を含む、マルチマーをいう。特定の実施形態において、本発明のマルチマーは、ヘテロダイマー、ヘテロトリマー、またはヘテロテトラマーである。さらなる実施形態において、本発明のヘテロメリックマルチマーは、少なくともヘテロダイマー、少なくともヘテロトリマー、または少なくともヘテロテトラマーである。

50

## 【0508】

本発明のマルチマーは、疎水性結合、親水性結合、イオン性結合および/または共有結合の結果であり得、そして/または例えば、リボソーム形成によって間接的に連結され得る。従って、1つの実施形態において、本発明のマルチマー（例えば、ホモダイマーまたはホモトリマー）は、本発明のポリペプチドが溶液中で互いに接触する場合に形成される。別の実施形態において、本発明のヘテロマルチマー（例えば、ヘテロトリマーまたはヘテロテトラマー）は、本発明のポリペプチドが本発明のポリペプチドに対する抗体（本発明の融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列に対する抗体を含む）と溶液中で接触する場合に形成される。他の実施形態において、本発明のマルチマーは、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドとの共有結合および/または本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチド間での共有結合によって形成し得る。このような共有結合は、（例えば、配列番号2中に列挙されるか、またはクローンHDGNR10によってコードされるポリペプチドに含まれる）ポリペプチド配列中に含まれる1つ以上のアミノ酸残基を含み得る。一例において、この共有結合は、ネイティブな（すなわち、天然に存在する）ポリペプチドにおいて相互作用するポリペプチド配列中に位置するシステイン残基の間での架橋である。別の例において、この共有結合は、化学的操作または組換え的操作の結果である。あるいは、このような共有結合は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）融合タンパク質中の異種ポリペプチド配列に含まれる1つ以上のアミノ酸残基を含み得る。1例において、共有結合は、本発明の融合タンパク質に含まれる異種配列の間にある（例えば、米国特許第5,478,925号を参照のこと）。特定の例において、共有結合は、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター-Fc融合タンパク質に含まれる異種配列の間にある（本明細書中に記載されるように）。別の特定の例において、本発明の融合タンパク質の共有結合は、例えば、オステオプロテゲリン（osteoprotegerin）のような共有結合したマルチマーを形成し得る別のタンパク質由来の異種ポリペプチド配列の間にある（例えば、国際公開番号：WO98/49305を参照のこと、この内容は、本明細書中にその全体が参考として援用される）。別の実施形態において、本発明の2つ以上のポリペプチドは、ペプチドリンカーを介して結合される。例として、米国特許第5,073,627（参考として援用される）に記載されるこれらのペプチドリンカーが挙げられる。ペプチドリンカーによって分離される本発明の複数のポリペプチドを含むタンパク質は、慣用的な組換えDNA技術を使用して生成され得る。

10

20

30

## 【0509】

本発明のマルチマーポリペプチドを調製するための別の方法は、ロイシンジッパーポリペプチド配列またはイソロイシンジッパーポリペプチド配列に融合された本発明のポリペプチドの使用を含む。ロイシンジッパードメインおよびイソロイシンジッパードメインは、そのドメインが見出されるタンパク質のマルチマー形成を促進するポリペプチドである。ロイシンジッパーは元々、いくつかのDNA結合Gタンパク質において同定され（Landshulzら, Science 240:1759, (1988)）、そしてそれ以来種々の異なるタンパク質において見出されている。とりわけ公知のロイシンジッパーは、ダイマー形成またはトリマー形成をする、天然に存在するペプチドおよびその誘導体である。本発明の可溶性マルチマータンパク質を生成するために適切なロイシンジッパードメインの例は、本明細書中に参考として援用されるPCT出願WO94/10308に記載されるロイシンジッパードメインである。溶液中でダイマー形成またはトリマー形成をするポリペプチド配列に融合された本発明のポリペプチドを含む組換え融合タンパク質は、適切な宿主細胞中で発現され、そして得られる可溶性マルチマー融合タンパク質は、当該分野で公知の技術を用いて培養上清から回収される。

40

## 【0510】

本発明のトリマーポリペプチドは、増強された生物学的活性の利点を提供し得る。好ましいロイシンジッパー部分およびイソロイシン部分は、トリマーを優先的に形成する部分である。1例は、本明細書中に参考として援用されるHoppeら（FEBS Lett

50

ers 344:191, (1994)) および米国特許出願第08/446,922号に記載されるような肺サーファクタントプロテインD (SPD) に由来するロイシンジッパーである。天然に存在するトリマータンパク質由来の他のペプチドは、本発明のトリマーポリペプチドの調製において用いられ得る。

#### 【0511】

別の例では、本発明のタンパク質は、Flag (登録商標) ポリペプチド配列を含む本発明の融合タンパク質に含まれるFlag (登録商標) ポリペプチド配列間の相互作用によって結合される。さらなる実施形態では、本発明のタンパク質の結合は、本発明のFlag (登録商標) 融合タンパク質に含まれる異種ポリペプチド配列と抗Flag (登録商標) 抗体との間の相互作用によって結合する。

10

#### 【0512】

本発明のマルチマーは、当該分野で公知の化学技術を使用して生成され得る。例えば、本発明のマルチマーに含まれることが所望されるポリペプチドは、当該分野で公知のリンカー分子およびリンカー分子長最適化技術を使用して、化学的に架橋され得る (例えば、米国特許第5,478,925号 (これはその全体が本明細書中で参考として援用される) を参照のこと)。さらに、本発明のマルチマーは、当該分野で公知の技術を使用して生成されて、マルチマー中に含まれることが所望されるポリペプチドの配列内に位置するシステイン残基間に、1つ以上の分子間架橋を形成し得る (例えば、米国特許第5,478,925号 (これは、本明細書中にその全体が参考として援用される) を参照のこと)。さらに、本発明のポリペプチドは、このポリペプチドのC末端またはN末端へのシステインまたはビオチンの付加により慣用的に改変され得、そして当該分野で公知の技術が、1つ以上のこれらの改変されたポリペプチドを含むマルチマーを生成するために適用され得る (例えば、米国特許第5,478,925号 (これはその全体が本明細書中で参考として援用される) を参照のこと)。さらに、当該分野で公知の技術は、本発明のマルチマーに含まれることを所望されるポリペプチド成分を含むリボソームを生成するために適用され得る (例えば、米国特許第5,478,925号 (これはその全体が本明細書中で参考として援用される) を参照のこと)。

20

#### 【0513】

あるいは、本発明のマルチマーは、当該分野で公知の遺伝子操作技術を用いて生成され得る。1つの実施形態では、本発明のマルチマーに含まれるポリペプチドは、本明細書中に記載されるかさもなくば当該分野で公知の融合タンパク質技術を用いて組換え生成される (例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第5,478,925号を参照のこと)。特定の実施形態では、本発明のホモダイマーをコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、リンカーポリペプチドをコードする配列に連結し、次いでさらに元々のC末端からN末端の方向とは逆方向でポリペプチドの翻訳産物をコードする合成ポリヌクレオチド (リーダー配列を欠く) に連結することによって生成される (例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第5,478,925号を参照のこと)。別の実施形態では、本明細書中に記載されるかさもなくば当該分野で公知の組換え技術を適用して、膜貫通ドメイン (または疎水性もしくはシグナルペプチド) を含み、そして膜再構成技術によってリボソームに組み込まれ得る、本発明の組換えポリペプチドを生成する (例えば、本明細書中にその全体が参考として援用される、米国特許第5,478,925号を参照のこと)。

30

40

#### 【0514】

(Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドの使用)

本明細書中で同定されたGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドは、試薬として多数の方法において使用され得る。以下の説明は例示的であるとみなされるべきであり、そして公知の技術を利用する。

#### 【0515】

実際の配列データ (反復多型性) に基づく染色体マーキング試薬は現在ほとんど利用可能ではないため、新しい染色体マーカーを同定する必要性が存在するままである。

50

## 【0516】

簡単に言うと、配列は、配列番号1で示される配列からまたは寄託されたクローンからPCRプライマー（好ましくは15～25bp）を調製することによって染色体にマッピングされ得る。プライマーが、ゲノムDNA中の1つより多くの予測されたエキソンにまたがらないように、プライマーは、コンピューター分析を使用して選択され得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングのために使用される。配列番号1にまたは寄託されたクローンに対応するヒトGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）遺伝子を含むハイブリッドのみが、増幅されたフラグメントを産生する。

## 【0517】

同様に、体細胞ハイブリッドは、特定の染色体に対してポリヌクレオチドをPCRマッピングする迅速な方法を提供する。単一のサーマルサイクラーを使用して1日あたり3つ以上のクローンが割り当てられ得る。さらに、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドの下位位置決定（sublocalization）は、特定の染色体フラグメントのパネルを用いて達成され得る。使用され得る他の遺伝子マッピング戦略は、インサイチュハイブリダイゼーション、標識フローソート（labeled flow sorted）染色体でのプレスクリーニング、および染色体特異的cDNAライブラリーを構築するためのハイブリダイゼーションによる前選択を含む。

## 【0518】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドの正確な染色体位置はまた、中期染色体スプレッド（spread）の蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（FISH）を使用して獲得され得る。この技術は500または600塩基ほどの長さのポリヌクレオチドを使用する；しかし2,000～4,000bpのポリヌクレオチドが好ましい。この技術の総説に関しては、Vermaら、「Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques」, Pergamon Press, New York (1988)を参照のこと。

## 【0519】

染色体マッピングについては、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドは、個々に（単一染色体またはその染色体上の単一部位をマークするために）またはパネルで（複数部位および/または複数染色体をマークするために）使用され得る。好ましいポリヌクレオチドは、cDNAまたはゲノムクローンの非コード領域に対応する。これは、コード配列が遺伝子ファミリー内におそらく保持され、従って染色体マッピングの間の交差ハイブリダイゼーションの機会が増加するからである。

## 【0520】

一旦、ポリヌクレオチドが正確な染色体位置にマップされると、ポリヌクレオチドの物理的位置は、連鎖分析において使用され得る。連鎖分析は、染色体位置と特定の疾患の提示との間の同時遺伝（coinheritance）を確立する。（疾患マッピングデータは、例えば、V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (Johns Hopkins University Welch Medical Libraryを通してオンラインで利用可能である)において見い出される)。1メガベースマッピング解像度および20kbあたり1遺伝子と仮定すると、疾患と関連する染色体領域に正確に位置決定されるcDNAは、50～500の潜在的な原因遺伝子のうちの1つであり得る。

## 【0521】

従って、一旦、同時遺伝が確立されると、罹患個体と非罹患個体との間でのGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび対応する遺伝子における差異が試験され得る。まず、染色体中の可視的構造変化（例えば、欠失または転座）は染色体スプレッドにおいて、またはPCRによって試験される。構造的変化が存在しない場合、点変異の存在が確認される。何人かのまたは全ての罹患個体で観察されたが、正常な個体では観察されなかった変異は、この変異がこの疾患を引き起こし得ることを示す。しか

10

20

30

40

50

し、いくつかの正常な個体由来の G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリペプチドおよび対応する遺伝子の完全な配列決定は、変異を多型性と区別するために要求される。新しい多型性が同定される場合、この多型ポリペプチドはさらなる連鎖分析のために使用され得る。

【 0 5 2 2 】

さらに、非罹患個体と比較した、罹患個体の遺伝子の増加または減少した発現が、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリヌクレオチドを使用して評価され得る。任意のこれらの変化 ( 変化した発現、染色体再配置、または変異 ) は、診断マーカーまたは予後マーカーとして使用され得る。

【 0 5 2 3 】

従って、本発明はまた、障害の診断の間に有用な診断方法を提供し、この方法は、個体由来の細胞または体液中の本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、および測定された遺伝子発現レベルをポリヌクレオチド発現レベルの標準レベルと比較する工程を包含し、これによって、標準と比較して、遺伝子発現レベルの増加または減少が、障害の指標になる。

【 0 5 2 4 】

なお別の実施形態では、本発明は、サンプルを、試験被験体に由来する増殖性および / または癌性のポリヌクレオチドの存在について分析するためのキットを含む。一般的実施形態において、このキットは、本発明のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチドプローブ、および適切な容器を備える。この特定の実施形態では、このキットは、本発明のポリヌクレオチドの内部領域を規定する 2 つのポリヌクレオチドプローブを含み、ここで各プローブは、この領域に対して内部に 3 1 ' マー末端を含む 1 つの鎖を有する。さらなる実施形態では、このプローブは、ポリメラーゼ連鎖反応増幅のためのプライマーとして有用であり得る。

【 0 5 2 5 】

障害の診断が既に従来方法によって行われている場合、本発明は、予後のインジケータ ( i n d i c a t o r ) として有用であり、それによって増強または抑制された本発明のポリヌクレオチド発現を示す患者が、標準レベルにより近いレベルでこの遺伝子を発現する患者と比較して悪い臨床結果を経験する。

【 0 5 2 6 】

「本発明のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する ( こと ) 」とは、本発明のポリペプチドのレベルまたはこのポリペプチドをコードする m R N A のレベルを、第 1 の生物学的サンプルにおいて直接的 ( 例えば、絶対のタンパク質レベルまたは m R N A レベルを決定または評価することによって ) または相対的 ( 例えば、第 2 の生物学的サンプル中のポリペプチドレベルまたは m R N A レベルに対して比較することによって ) のいずれかで定性的または定量的に測定または評価することを意図する。好ましくは、第 1 の生物学的サンプル中のポリペプチドレベルまたは m R N A レベルが測定または評価され、そして標準のポリペプチドレベルまたは m R N A レベルに対して比較され、この標準は、障害を有さない個体から得られる第 2 の生物学的サンプルから得られるかまたは障害を有さない個体の集団由来のレベルを平均することによって決定される。当該分野で認識されるように、一旦標準的なポリペプチドレベルまたは m R N A レベルが公知になれば、これを、比較のための標準として反復して用い得る。

【 0 5 2 7 】

「生物学的サンプル」とは、本発明のポリペプチドまたは m R N A を含む、個体、体液、細胞株、組織培養物または他の供給源から得られる任意の生物学的サンプルを意図する。示されるように、生物学的サンプルは、本発明のポリペプチドを含む体液 ( 例えば、精液、リンパ、血清、血漿、尿、滑液および髄液 ) 、および本発明のポリペプチドを発現することが見出された他の組織供給源を含む。哺乳動物から組織生検および体液を得るための方法は、当該分野で周知である。生物学的サンプルが m R N A を含む場合、組織生検が好ましい供給源である。

10

20

30

40

50

## 【0528】

上記で提供された方法は好ましくは、ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドが固体支持体に結合される、診断方法および/またはキットに適用され得る。1つの例示的な方法では、この支持体は、米国特許第5,837,832号、同第5,874,219号および同第5,856,174号に記載される、「遺伝子チップ」または「生物学的チップ」であり得る。さらに、本発明のポリヌクレオチドが結合されたこのような遺伝子チップを用いて、このポリヌクレオチド配列と、試験被験体から単離されたポリヌクレオチドとの間の多型性を同定し得る。このような多型性の知見(すなわち、それらの位置ならびにそれらの存在)は、癌性の疾患および状態を含む多くの障害についての疾患の遺伝子座を同定する際に有益である。このような方法は、米国特許第5,858,659号および同第5,856,104号に記載される。上記に参照した米国特許は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

10

## 【0529】

本発明は、化学的に合成された(すなわち、ペプチド核酸(PNA)として再現された)または当該分野で公知の他の方法に従って合成された、本発明のポリヌクレオチドを包含する。PNAの使用は、ポリヌクレオチドが固体支持体、すなわち、遺伝子チップに取り込まれる場合、好ましい形態として役立つ。本発明の目的のために、ペプチド核酸(PNA)は、ポリアミド型のDNAアナログであり、そしてアデニン、グアニン、チミンおよびシトシンについての単量体単位が市販されている(Perceptice Biosystems)。DNAの特定の成分(例えば、リン、酸化リンまたはデオキシリボース誘導体)は、PNA中に存在しない。P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg および O. Buchardt, Science 254, 1497 (1991); ならびに M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden および P. E. Nielsen, Nature 365, 666 (1993) によって開示されるように、PNAは、相補的なDNA鎖に対して特異的かつ緊密に結合し、そしてヌクレアーゼによって分解されない。実際、PNAは、DNA自体が結合するよりも強力にDNAに結合する。これはおそらく、2つの鎖の間に静電斥力が存在せず、そしてまたポリアミド骨格がより可撓性が高いことによる。これによって、PNA/DNA二重鎖は、DNA/DNA二重鎖よりも広範囲のストリンジェンシー条件下で結合し、多重鎖ハイブリダイゼーションを行うのをより容易にする。強力な結合に起因して、DNAを用いてよりも小さいプローブが用いられ得る。さらに、おそらく、単一の塩基ミスマッチが、PNA/DNAハイブリダイゼーションを用いて決定され得る。なぜなら、PNA/DNAの15マーにおける単一のミスマッチは、DNA/DNAの15マー二重鎖については4 ~ 16 であるのに対して、融点( $T_m$ )を8 ~ 20 低下させるからである。また、PNA中に電荷基が存在しないことは、ハイブリダイゼーションが、低いイオン強度で行われ得、そして分析の間の塩によって可能な妨害を減少させることを意味する。

20

30

## 【0530】

本発明は、哺乳動物における癌の検出のために有用である。特に、本発明は、以下を含むがこれらに限定されない、病理学的細胞増殖新形成の診断の間に有用である: 急性骨髄性白血病(急性単球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性骨髄単球性白血病、急性赤白血病、急性巨核球性白血病、および急性未分化白血病などを含む); および慢性骨髄性白血病(慢性骨髄単球性白血病、慢性顆粒球性白血病などを含む)。好ましい哺乳動物としては、有尾猿(monkey)、無尾猿(ape)、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギおよびヒトが挙げられる。特に好ましいのは、ヒトである。

40

## 【0531】

病理学的細胞増殖性の疾患、障害および/または状態はしばしば、癌原遺伝子の不適切な活性化に関連する(Gelmann, E. P.ら, 「The Etiology of Acute Leukemia: Molecular Genetics and V

50

iral Oncology」, Neoplastic Diseases of the Blood, 第1巻, Wiernik, P. H.ら編, 161-182 (1985) )。新形成は現在、ウイルス配列の染色体への挿入、より活性に転写される領域への遺伝子の染色体転座、または何らかの他の機構による、正常な細胞遺伝子産物の定性的変化から、または遺伝子発現の定量的改変から生じると考えられている (Gelmannら、前出)。特定の遺伝子の変異または変更された発現が、他の組織および他の細胞型の中でも、いくつかの白血病の病因と関与するようである (Gelmannら、前出)。実際、いくつかの動物新形成に関与する癌遺伝子のヒト対応物は、ヒトの白血病および癌腫のいくつかの症例において増幅または転座されている (Gelmannら、前出)。

#### 【0532】

例えば、c-myc発現は、非リンパ球性白血病細胞株HL-60において高度に増幅される。HL-60細胞が増幅を止めるように化学的に誘導される場合、c-mycのレベルは、ダウンレギュレートされることが見出される (国際公開番号WO91/15580号)。しかし、c-mycまたはc-mybの5'末端に相補的であるDNA構築物へのHL-60細胞の暴露が、c-mycタンパク質またはc-mybタンパク質の発現をダウンレギュレートする対応するmRNAの翻訳をブロックし、処理した細胞の細胞増殖および分化の停止を引き起こすことが示されている (国際公開番号WO91/15580号; Wickstromら、Proc. Natl. Acad. Sci. 85:1028 (1988); Anfossiら、Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3379 (1989))。しかし、当業者は、増殖表現型を示すことが公知である種々の起源の多数の細胞および細胞型を考慮すれば、本発明の有用性が造血性の細胞および組織の増殖性の疾患、障害および/または状態の処置に限定されないことを認識する。

#### 【0533】

前記に加えて、ポリヌクレオチドは、三重らせん形成またはアンチセンスDNAもしくはRNAを通して遺伝子発現を制御するために使用され得る。アンチセンス技術は、例えば、Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991), 「Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression」, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)において考察される。三重らせん形成は例えば、Leeら、Nucleic Acids Research 6:3073 (1979); Cooneyら、Science 241:456 (1988); およびDervanら、Science 251:1360 (1991)において考察される。両方の方法は、相補的DNAまたは相補的RNAへのポリヌクレオチドの結合に依存する。これらの技術に関して、好ましいポリヌクレオチドは通常、20~40塩基長のオリゴヌクレオチドであり、そして転写に関与する遺伝子領域 (三重らせん - Leeら、Nucleic Acids Res. 6:3073 (1979); Cooneyら、Science 241:456 (1988); およびDervanら、Science 251:1360 (1991)を参照のこと) またはmRNA自体 (アンチセンス - Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxy-nucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988))のいずれかに相補的である。三重らせん形成は、最適にはDNAからのRNA転写の遮断を生じるが、アンチセンスRNAハイブリダイゼーションは、ポリペプチドへのmRNA分子の翻訳を阻止する。両方の技術は、モデル系において効果的であり、そして本明細書に開示される情報は、疾患を処置または予防するための試みにおいて、アンチセンスまたは三重らせんポリヌクレオチドを設計するために使用され得る。

#### 【0534】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドはまた、遺伝子治療において有用である。遺伝子治療の1つの目標は、遺伝子欠損を修正する試みにおいて、欠損遺伝子を有する生物へ正常遺伝子を挿入することである。Gタンパク質ケモカインレセ

10

20

30

40

50

プター (CCR5) は、高度に正確な様式でこのような遺伝欠損を標的とする手段を提供する。別の目標は、宿主ゲノム中には存在しなかった新しい遺伝子を挿入し、それによって宿主細胞中に新しい形質を生成することである。

#### 【0535】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドはまた、微小な生物学的サンプルから個体を同定するために有用である。例えば、米軍は、その職員を同定するために制限フラグメント長の多型性 (RFLP) の使用を考慮している。この技術において、個体のゲノムDNAは1つ以上の制限酵素で消化され、そして職員を同定するため固有なバンドを生じるためのサザンブロットについてプローブされる。この方法は、「認識票 (Dog tag)」 (これは、失われたり、交換されたり、または盗まれたりすることにより、ポジティブな同定を困難にし得る) の現在の限界を受けない。Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドは、RFLPのためのさらなるDNAマーカーとして使用され得る。

10

#### 【0536】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドはまた、個体のゲノムの選択された部分の実際の塩基ごとのDNA配列を決定することによって、RFLPに対する代替物として使用され得る。これらの配列は、このような選択されたDNAを増幅しそして単離するためにPCRプライマーを調製するために使用され得、次いで、この選択されたDNAは、配列決定され得る。各個体が固有のセットのDNA配列を有するので、この技術を使用して、個体が同定され得る。一旦、固有のIDデータベースが個体について確立されると、その個体が生存していようとまたは死亡していようとにかかわらず、その個体のポジティブ同定が、極めて小さな組織サンプルからなされ得る。

20

#### 【0537】

法医学生物学もまた、本明細書に開示されるようなDNAに基づく同定技術を使用して利益を得る。組織 (例えば、髪または皮膚)、または体液 (例えば、血液、唾液、精液、滑液、羊水、乳汁、リンパ、肺痰 (pulmonary sputum) またはサーファクタント、尿、糞便物質など) のような非常に小さな生物学的サンプルから得られたDNA配列は、PCRを使用して増幅され得る。ある先行技術において、DQaクラスII HLA遺伝子のような多型性遺伝子座から増幅された遺伝子配列は、個体を同定するための法医学生物学において使用される。(Erllich, H., PCR Technology, Freeman and Co. (1992))。一旦、これらの特異的多型性遺伝子座が増幅されると、これらは1つ以上の制限酵素で消化される。これは、DQaクラスII HLA遺伝子に対応するDNAでプローブされたサザンブロットについてのバンドの同定セットを生じる。同様に、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドは、法医学的目的のための多型性マーカーとして使用され得る。

30

#### 【0538】

また、特定の組織の供給源を同定し得る試薬についての必要性が存在する。例えば、未知の起源の組織が提供される場合、法医学においてこのような必要性が生じる。適切な試薬は、例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 配列から調製される、特定の組織に特異的なDNAプローブまたはプライマーを含み得る。このような試薬のパネルは、種および/または器官型によって組織を同定し得る。同様の様式で、これらの試薬は、夾雑物について組織培養物をスクリーニングするために使用され得る。

40

#### 【0539】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) は、マクロファージおよび記憶T細胞において発現されるので、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドは、生物学的サンプル中の組織または細胞型の示差的同定のためのハイブリダイゼーションプローブとして有用である。同様に、ポリペプチドおよびGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドに対する抗体は、組織または細胞型の示差的同定のための免疫学的プローブの提供に有用である。さらに、上記組織または細胞、またはこれらの細胞が役割を果たす組織または細胞において、標準のGタンパク質ケモカインレセプ

50

ター（CCR5）遺伝子発現レベル（すなわち、その免疫系関連障害を有さない個体由来の健常組織または体液中のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現レベル）に対して有意により高いか、またはより低いレベルのGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）遺伝子の発現が、このような障害を有する個体から採取された特定の組織もしくは細胞型（例えば、癌性組織および創傷組織）または体液（例えば、血清、血漿、尿、滑液および髄液）の中で、慣用的に検出され得る。

【0540】

従って、本発明は、障害の診断方法を提供する。この方法は、以下：（a）個体の細胞または体液におけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）遺伝子発現レベルをアッセイする工程；（b）Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）遺伝子発現レベルと標準的なGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）遺伝子発現レベルとを比較する工程を包含し、これにより、標準的な発現レベルと比較したアッセイしたGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）遺伝子発現レベルの増加または減少が、免疫系または免疫系に関する障害を示す。

10

【0541】

さらなる実施形態において、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプターに対する免疫応答を惹起するためのワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド、あるいはそのフラグメントまたは改変体を用いる方法を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプターに対する体液性（抗体媒介）免疫応答を惹起するためのDNAワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド、あるいはそのフラグメントまたは改変体を用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプターに対する免疫応答を惹起するためのDNAワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の1つ以上の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸89-102、167-195、および/または261-274）のヌクレオチド配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する免疫応答を惹起するためのDNAワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第1の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸89-102）のヌクレオチド配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する免疫応答を惹起するためのDNAワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第2の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸167-195）のヌクレオチド配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する免疫応答を惹起するためのDNAワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第3の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸261-274）のヌクレオチド配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを用いる方法を提供する。

20

30

40

【0542】

他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプターに対する体液性免疫応答を惹起するためのDNAワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の1つ以上の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸89-102、167-195、および/または261-274）のヌクレオチド配列を含む、Gタンバ

50

ク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する体液性免疫応答を惹起するためのDNAワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第1の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸89-102）のヌクレオチド配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する体液性免疫応答を惹起するためのDNAワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第2の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸167-195）のヌクレオチド配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する体液性免疫応答を惹起するためのDNAワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第3の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸261-274）のヌクレオチド配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを用いる方法を提供する。

10

#### 【0543】

別の実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）、あるいはそのフラグメントまたは改変体を含むか、またはこれらからなる、DNAワクチンを提供する。別の好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の1つ以上の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸89-102、167-195、および/または261-274）のヌクレオチド配列をコードするGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを含むか、またはこれらからなる、DNAワクチンを提供する。別の好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第1の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸89-102）のヌクレオチド配列をコードするGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを含むか、またはこれらからなる、DNAワクチンを提供する。別の好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第2の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸167-195）のヌクレオチド配列をコードするGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを含むか、またはこれらからなる、DNAワクチンを提供する。別の好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第3の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸261-274）のヌクレオチド配列をコードするGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドを含むか、またはこれらからなる、DNAワクチンを提供する。

20

30

40

#### 【0544】

非常に好ましい実施形態では、上記のワクチンは、ウイルス感染を防ぐために、ヒトを含む動物に投与される。非常に好ましい実施形態では、上記のワクチンは、HIV感染を防ぐために、ヒトを含む動物に投与される。さらに他の非常に好ましい実施形態では、上記のワクチンは、ポックスウイルス感染を防ぐために、ヒトを含む動物に投与される。さらに他の非常に好ましい実施形態では、上記のワクチンは、サイトメガロウイルス感染を防ぐために、ヒトを含む動物に投与される。

#### 【0545】

最近では、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドは、サザンゲルにおける分子量マーカーとして、特定の細胞型における特定のmRNAの存在につ

50

いての診断プローブとして、新規のポリヌクレオチドを発見する過程での公知の配列を「サブトラクトアウト ( s u b t r a c t - o u t ) 」するためのプローブとして、「遺伝子チップ」または他の支持体への付着のためのオリゴマーを選択および作製するために、DNA免疫技術を用いる抗DNA抗体を惹起するために、ならびに免疫応答を惹起するための抗原として用いられ得る。

【0546】

(Gタンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリペプチドの使用)

Gタンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリペプチドは、多数の方法に用いられ得る。以下の記載は、例証としてみなされ、そして公知の技術を用いる。

【0547】

Gタンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリペプチドは、抗体ベースの技術を用いて生物学的サンプル中のタンパク質レベルをアッセイするために用いられ得る。例えば、組織におけるタンパク質発現は、古典的な免疫組織学的方法を用いて研究され得る ( J a l k a n e n , M . , ら、J . C e l l . B i o l . 1 0 1 : 9 7 6 - 9 8 5 ( 1 9 8 5 ) ; J a l k a n e n , M . , ら、J . C e l l . B i o l . 1 0 5 : 3 0 8 7 - 3 0 9 6 ( 1 9 8 7 ) を参照のこと)。Gタンパク質遺伝子発現を検出するために有用な、抗体に基づく他の方法としては、イムノアッセイ (例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) および放射免疫アッセイ ( R I A ) ) が挙げられる。適切な抗体アッセイ標識は、当該分野において公知であり、そして酵素標識 (例えば、グルコースオキシダーゼ)、および放射性同位体 (例えば、ヨウ素 ( 1 2 5 I 、 1 2 1 I ) 、炭素 ( 1 4 C ) 、硫黄 ( 3 5 S ) 、トリチウム ( 3 H ) 、インジウム ( 1 1 2 I n ) 、およびテクネチウム ( 9 9 T c ) ) 、ならびに蛍光標識 (例えば、フルオレセインおよびローダミン)、ならびにビオチンが挙げられる。

【0548】

生物学的サンプル中のGタンパク質レベルをアッセイすることに加えて、タンパク質はまた、画像化によりインビボで検出され得る。タンパク質をインビボで画像化するための抗体の標識またはマーカーとしては、X線ラジオグラフィー、NMRまたはESRにより検出可能なものが挙げられる。X線ラジオグラフィーについては、適切な標識は、検出可能な放射線を発するが、被験体に対して明白には有害ではないバリウムまたはセシウムのような放射性同位体を含む。NMRおよびESRに適切なマーカーには、例えば重水素のような検出可能な特徴的なスピンを有するものが含まれ、これは、関連したハイブリドーマのための栄養素を標識することにより抗体に取り込まれ得る。

【0549】

放射性同位体 (例えば、131I、112In、99mTc)、放射線不透過性物質、または核磁気共鳴により検出可能な材料のような適切な検出可能な画像化部分で標識された、タンパク質特異的抗体または抗体フラグメントは、哺乳動物に (例えば、非経口的、皮下、または腹腔内に) 導入される。被験体のサイズおよび用いられる画像化システムは、診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定することが当該分野で理解される。放射性同位体部分の場合には、ヒト被験体について、注射される放射能の量は、通常、99mTcの約5~20ミリキュリーの範囲である。次いで、標識された抗体または抗体フラグメントは、特定のタンパク質を含む細胞の位置に優先的に蓄積される。インビボ腫瘍画像化は、S . W . B u r c h i e l ら、*Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments*、(Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancerの第13章、S . W . B u r c h i e l およびB . A . R h o d e s 編、Masson Publishing Inc. (1982)) に記載される。

【0550】

従って、本発明は、障害の診断方法を提供し、この方法は、(a) 個体の細胞または体液中のGタンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリペプチドの発現をアッセイす

10

20

30

40

50

る工程；(b)この遺伝子発現レベルを標準の遺伝子発現レベルと比較する工程を包含し、これによって、標準的な発現レベルと比較して、アッセイされたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの遺伝子発現レベルの増加または減少が、障害の指標になる。癌に関しては、個体由来の生検組織中での比較的多量の転写物の存在は、この疾患の発症の素因を示し得るか、または実際の臨床症状の出現前にこの疾患を検出するための手段を提供し得る。この型のより決定的な診断は、保健専門家が、より早期に予防的測定または積極的処置を用い、それによって癌の発症またはさらなる進行を予防することを可能にし得る。

#### 【0551】

さらに、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドを用いて疾患を処置、予防および/または診断し得る。例えば、患者には、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド(例えば、インスリン)の非存在またはレベルの減少を置換すること、異なるポリペプチド(例えば、ヘモグロビンBに対するヘモグロビンS、SOD、カタラーゼ、DNA修復タンパク質)の非存在またはレベルの減少を補充すること、ポリペプチド(例えば、癌遺伝子または腫瘍抑制剤)の活性を阻害すること、ポリペプチドの活性を(例えば、レセプターに結合することによって)活性化すること、遊離リガンド(例えば、炎症を低減させる際に用いられる可溶性TNFレセプター)について、膜結合レセプターと競合させることによって膜結合レセプターの活性を減少させること、または所望の応答(例えば、血管の増殖阻害、増殖細胞または組織に対する免疫応答の増強)をもたらすことに取り組む際に、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドが投与され得る。

#### 【0552】

同様に、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに対する抗体もまた使用されて疾患を処置、予防および/または診断し得る。例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに対する抗体の投与によって、そのポリペプチドに結合して、そしてそのポリペプチドの過剰産生を低減し得る。同様に、抗体の投与によって、例えば、膜に結合したポリペプチド(レセプター)へ結合することにより、そのポリペプチドを活性化し得る。

#### 【0553】

さらなる実施形態において、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプターに対する免疫応答を惹起するためのワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド、あるいはそのフラグメントまたは改変体を用いる方法を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプターに対する体液性(抗体媒介)免疫応答を惹起するためのDNAワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド、あるいはそのフラグメントまたは改変体を用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプターに対する免疫応答を惹起するためのワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の1つ以上の細胞外ループ(すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド(配列番号22)のアミノ酸89-102、167-195、および/または261-274)のアミノ酸配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に対する免疫応答を惹起するためのワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の第1の細胞外ループ(すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド(配列番号22)のアミノ酸89-102)のアミノ酸配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に対する免疫応答を惹起するためのワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の第2の細胞外ループ(すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド(配列番号22)のアミノ酸167-195)のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する免疫応答を惹起するためのワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第3の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸261-274）のアミノ酸配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを用いる方法を提供する。

【0554】

他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプターに対する体液性免疫応答を惹起するためのワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の1つ以上の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸89-102、167-195、および/または261-274）のアミノ酸配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する体液性免疫応答を惹起するためのワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第1の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸89-102）のアミノ酸配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する体液性免疫応答を惹起するためのワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第2の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸167-195）のアミノ酸配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを用いる方法を提供する。他の非常に好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する体液性免疫応答を惹起するためのワクチンとして、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第3の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸261-274）のアミノ酸配列を含む、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを用いる方法を提供する。

【0555】

別の実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチド、あるいはそのフラグメントまたは改変体を含むか、またはこれらからなる、ワクチンを提供する。別の好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の1つ以上の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸89-102、167-195、および/または261-274）のアミノ酸配列をコードするGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを含むか、またはこれらからなる、ワクチンを提供する。別の好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第1の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸89-102）のアミノ酸配列をコードするGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを含むか、またはこれらからなる、ワクチンを提供する。別の好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第2の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸167-195）のアミノ酸配列をコードするGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを含むか、またはこれらからなる、ワクチンを提供する。別の好ましい実施形態では、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の第3の細胞外ループ（すなわち、配列番号2または寄託されたクローンによりコードされるポリペプチド（配列番号22）のアミノ酸261-274）のアミノ酸配列をコードす

10

20

30

40

50

る G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドを含むか、またはこれらからなる、DNA ワクチンを提供する。

【0556】

非常に好ましい実施形態では、上記のワクチンは、ウイルス感染を防ぐために、ヒトを含む動物に投与される。非常に好ましい実施形態では、上記のワクチンは、HIV 感染を防ぐために、ヒトを含む動物に投与される。さらに他の非常に好ましい実施形態では、上記のワクチンは、ボックスウイルス感染を防ぐために、ヒトを含む動物に投与される。さらに他の非常に好ましい実施形態では、上記のワクチンは、サイトメガロウイルス感染を防ぐために、ヒトを含む動物に投与される。

【0557】

最近、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドは、当該分野で周知の方法を用いる、SDS-PAGE ゲルまたは分子篩ゲル濾過カラムにおける分子量マーカーとして用いられ得る。G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドはまた、抗体を惹起するために用いられ得る。次いで、これは、宿主細胞の形質転換を評価する方法として、組換え細胞からのタンパク質発現を測定するために用いられる。さらに、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドは、以下の生物学的活性を試験するために用いられ得る。

【0558】

(遺伝子治療方法)

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置または予防するための遺伝子治療方法に関する。この遺伝子治療法は、本発明の G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドの発現を達成するために、核酸 (DNA、RNA、およびアンチセンス DNA または RNA) 配列を動物へ導入することに関する。この方法は、プロモーター、および標的組織によるこのポリペプチドの発現のために必要な任意の他の遺伝的エレメントに作動可能に連結された、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを必要とする。このような遺伝子治療および送達の技術は、当該分野で公知であり、例えば、本明細書中に参考として援用される WO 90 / 11092 を参照のこと。

【0559】

従って、例えば、患者由来の細胞は、エキソピボで G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチド (DNA または RNA) を用いて操作され得、この操作された細胞は次いで、このポリペプチドで処置されるべき患者に提供される。このような方法は、当該分野で周知である。例えば、Belldegrunら, J. Natl. Cancer Inst., 85: 207-216 (1993); Ferrantiniら, Cancer Research, 53: 107-1112 (1993); Ferrantiniら, J. Immunology 153: 4604-4615 (1994); Kaido, T.ら, Int. J. Cancer 60: 221-229 (1995); Oguraら, Cancer Research 50: 5102-5106 (1990); Santodonatoら, Human Gene Therapy 7: 1-10 (1996); Santodonatoら, Gene Therapy 4: 1246-1255 (1997); および Zhangら, Cancer Gene Therapy 3: 31-38 (1996) を参照のこと。これらの文献は、本明細書中に参考として援用される。1つの実施形態では、操作される細胞は、動脈細胞である。この動脈細胞は、動脈、動脈周囲の組織への直接注射によって、またはカテーテル注射によって患者に再度導入され得る。

【0560】

以下でより詳細に考察するように、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチド構築物は、注射可能な物質を動物の細胞へ送達する任意の方法 (例えば、組織 (心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓など) の間隙空間への注射) によって送達され得る。G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受

10

20

30

40

50

容可能な液体または水性キャリアにて送達され得る。

【0561】

1つの実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドは、裸のポリヌクレオチドとして送達される。用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAは、細胞への侵入を補助、促進または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル（ウイルス配列、ウイルス粒子、リボソーム処方物、リポフェクチン、または沈殿剤などを含む）も含まない配列をいう。しかし、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドはまた、リボソーム処方物中で送達され得、そしてリポフェクチン処方物などは、当業者に周知の方法によって調製され得る。このような方法は、例えば、本明細書中に参考として援用される、米国特許第5,593,972号、同第5,589,466号および同第5,580,859号に記載される。

10

【0562】

遺伝子治療方法において使用されるGタンパク質ケモカインレセプターポリヌクレオチドベクター構築物は好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列を含まない、構築物である。適切なベクターとしては、Stratageneから入手可能なpWLEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG；Pharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL；ならびにInvitrogenから入手可能なpEF1/V5、pcDNA3.1、およびpRc/CMV2が挙げられる。他の適切なベクターは、当業者に容易に明白である。

20

【0563】

当業者に公知の任意の強力なプロモーターは、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド配列の発現を駆動するために用いられ得る。適切なプロモーターとしては、アデノウイルスプロモーター（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター）；または異種プロモーター（例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター）；RSウイルス（RSV）プロモーター；誘導性プロモーター（例えば、MMTプロモーター、メタロチオネインプロモーター）；熱ショックプロモーター；アルブミンプロモーター；ApoAⅠプロモーター；ヒトグロビンプロモーター；ウイルスチミジンキナーゼプロモーター（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター）；レトロウイルスLTR；b-アクチンプロモーター；およびヒト成長ホルモンプロモーターが挙げられる。このプロモーターはまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）についてネイティブなプロモーターであり得る。

30

【0564】

他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸配列を標的細胞に導入する1つの主要な利点は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製DNA配列が細胞に導入されて、6ヶ月までの期間の間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

【0565】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織（筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を包含する）の間隙空間に送達され得る。この組織の間隙空間は、器官組織の細網線維間の、細胞間の液体ムコ多糖類基質、血管または室の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維、あるいは結合組織鞘性筋肉細胞（connective tissue ensheathing muscle cell）内または骨の裂孔中の同じ基質を包含する。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下で議論される理由のために好ましい。本発明のポリヌクレオチド構築物は、これらの細胞を含む組織への注射によって、好都合に送達され得る。本発明のポリヌクレオチド構築物は、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞（例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞

40

50

）において達成され得る。インビボでの筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発現する能力において、特に適格である。

【0566】

裸の核酸配列注射のために、DNAまたはRNAの有効投薬量は、約0.05mg/kg体重から約50mg/kg体重の範囲にある。好ましくは、この投薬量は、約0.005mg/kgから約20mg/kgであり、そしてより好ましくは約0.05mg/kgから約5mg/kgである。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注射の組織部位に応じて変化する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。

【0567】

好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注射経路による。しかし、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に、肺または気管支の組織、咽喉または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)DNA構築物が、血管形成術の間にこの手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達され得る。

【0568】

裸のポリヌクレオチドは、送達部位での直接の針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、およびいわゆる「遺伝子銃」を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知の任意の方法によって送達される。これらの送達方法は、当該分野で公知である。

【0569】

この構築物はまた、ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、沈殿剤などのような送達ビヒクルを用いて送達され得る。このような送達方法は、当該分野で公知である。

【0570】

特定の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド構築物は、リポソーム調製物中で複合体化している。本発明にて使用するためのリポソーム調製物は、カチオン性(正に荷電した)、アニオン性(負に荷電した)および中性の調製物を包含する。しかしながら、カチオン性リポソームとポリアニオン性核酸との間で強固な荷電複合体を形成し得るので、カチオン性リポソームが特に好ましい。カチオン性リポソームは、機能的形態において、プラスミドDNA(本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:7413~7416(1987)); mRNA(本明細書中で参考として援用される、Maloneら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:6077~6081(1989)); および精製された転写因子(本明細書中で参考として援用される、Debsら、J. Biol. Chem.、265:10189~10192(1990))の細胞内送達を媒介することが示されている。

【0571】

カチオン性リポソームは容易に入手可能である。例えば、N[1-2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリエチルアンモニウム(DOTMA)リポソームは特に有用であり、そして登録商標LipofectinのもとにGIBCO BRL, Grand Island, N.Y. (本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:7413~7416(1987))をもまた参照のこと、)より入手可能である。他の市販のリポソームとしては、トランスフェクテース(transfectace)(DDAB/DOPE)およびDOTAP/DOPE(Boehringer)が挙げられる。

【0572】

当該分野で周知の技術を使用して、他のカチオン性リポソームを、容易に入手可能な物質より調製し得る。DOTAP(1,2-ビス(オレオイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)リポソームの合成の記述に関して、例えばPCT公開第WO 90/11092号(本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。DOTMAリポ

10

20

30

40

50

ソームの調製は文献にて説明されており、例えば、本明細書中で参考として援用される、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84:7413~7417を参照のこと。類似した方法を使用して、他のカチオン性脂質物質よりリポソームを調製し得る。

#### 【0573】

同様に、アニオン性リポソームおよび中性リポソームは、例えば、Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.) から容易に入手可能であり、または容易に入手可能な物質を使用して簡単に調製され得る。そのような物質としてはとりわけ、ホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)が挙げられる。これらの物質はまた、DOTMA出発物資およびDOTAP出発物質と適切な割合において混合され得る。これらの物質を使用してリポソームを生成する方法は、当該分野で周知である。

10

#### 【0574】

例えば、商業的に、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)を種々の組み合わせにおいて使用し、コレステロールを添加してもしなくても、従来のリポソームを生成し得る。従って、例えば、超音波処理バイアル中への窒素ガス流下で、DOPGおよびDOPCの各50mgを乾燥することにより、DOPG/DOPC小胞を調製し得る。このサンプルを一晚真空ポンプ下に置き、そして次の日、脱イオン水で水和する。次いで、浴が、15ECで循環している間、最大設定にて、逆位カップ(浴タイプ)プローブを装備したHeat Systems モデル350超音波処理器を使用して、このサンプルを栓をしたバイアル中にて2時間超音波処理する。あるいは、負に荷電した小胞を、超音波処理なしで調製して多重膜小胞を生成し得るか、または核孔膜(nucleopore membrane)を通して押し出すことにより別々の大きさの単膜小胞を生成し得る。他の方法は、当業者に公知でありそして利用可能である。

20

#### 【0575】

このリポソームとしては、多重膜リポソーム(MLV)、小さな単膜リポソーム(SUV)または大きな単膜リポソーム(LUV)が挙げられ得、SUVが好ましい。当該分野で周知の方法を使用して、種々のリポソーム-核酸複合体が調製される。例えば、本明細書中で参考として援用される、Straubingerら、Methods of Immunology、101:512~527(1983)を参照のこと。例えば、核酸を含有するMLVは、ガラスチューブの壁面にリン脂質の薄膜を堆積させ、そしてその後、カプセル化されるべき物質の溶液で水和することによって調製され得る。SUVはMLVの長期超音波処理により調製され、単膜リポソームの均質集団を生成する。封入されるべき物質を、予め形成されたMLVの懸濁液に添加し、次いで、超音波処理する。カチオン性脂質を含むリポソームを使用する場合、乾燥した脂質膜を、滅菌水または10mM Tris/NaClのような等張性緩衝溶液のような適切な溶液中に再懸濁し、超音波処理し、次いで、予め形成されたりポソームをDNAと直接混合する。正に荷電したりポソームのカチオン性DNAへの結合に起因して、リポソームおよびDNAは非常に安定な複合体を形成する。SUVは、小核酸フラグメントを用いての用途を見出す。LUVは、当該分野で周知の多くの方法により調製される。一般に使用される方法としては、Ca<sup>2+</sup>-EDTAキレート化(Papahadjopoulosら、Biochim. Biophys. Acta、394:483(1975); Wilsonら、Cell、17:77(1979)); エーテル注入(Deamerら、Biochim. Biophys. Acta、443:629(1976); Ostroら、Biochem. Biophys. Res. Commun.、76:836(1977); Fraleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、76:3348(1979)); 界面活性剤透析(

30

40

50

Enochら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、76:145(1979)；および逆相エバポレーション(REV)(Fraleyleら、J. Biol. Chem.、255:10431(1980)；Szokaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、75:145(1978)；Schaefer-Ridderら、Science、215:166(1982)が挙げられ、これらの文献は本明細書中で参考として援用される。

【0576】

一般に、DNAのリポソームに対する割合は約10:1から約1:10までである。好ましくは、その割合(ratio)は約5:1から約1:5までである。より好ましくは、その割合は約3:1から約1:3までである。さらにより好ましくは、その割合は約1:1である。

10

【0577】

米国特許第5,676,954号(本明細書中で参考として援用される)はカチオン性リポソームキャリアと複合体化された遺伝物質のマウスへの注入について報告する。米国特許第4,897,355号、同第4,946,787号、同第5,049,386号、同第5,459,127号、同第5,589,466号、同第5,693,622号、同第5,580,859号、同第5,703,055号および国際公開第WO94/9469号(これらは本明細書中で参考として援用される)は、DNAを細胞および哺乳動物にトランスフェクトする際に使用するためのカチオン性脂質を提供する。米国特許第5,589,466号、同第5,693,622号、同第5,580,859号、同第5,703,055号および国際公開第WO94/9469号(これらは本明細書中で参考として援用される)は、DNA-カチオン性脂質複合体を哺乳動物に送達する方法を提供する。

20

【0578】

特定の実施形態において、Gタンパク質ケモカインレセプターをコードする配列を含むRNAを含むレトロウイルス粒子を使用して、エキソピボまたはインピボで細胞を操作する。レトロウイルスプラスミドベクターを誘導し得るレトロウイルスとしては、モロニーマウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、ニワトリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0579】

このレトロウイルスプラスミドベクターを使用して、パッケージング細胞株を形質導入し、プロデューサー細胞株を形成する。トランスフェクトされ得るパッケージング細胞株の例としては、その全体が本明細書中で参考として援用される、Miller、Human Gene Therapy、1:5~14(1990)にて記載されるようなPE501、PA317、R-2、R-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、RCRE、RCRIP、GP+E-86、GP+envAm12およびDAN細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。このベクターは、当該分野で公知の任意の手段により、パッケージング細胞を形質導入し得る。そのような手段としては、エレクトロポレーション、リポソームの使用、およびCaPO<sub>4</sub>沈殿が挙げられるが、それらに限定されない。1つの代替法において、このレトロウイルスプラスミドベクターをリポソームにカプセル化するか、または脂質に結合して、次いで宿主に投与し得る。

40

【0580】

このプロデューサー細胞株は、Gタンパク質ケモカインレセプターをコードするポリヌクレオチドを含む感染性レトロウイルスベクター粒子を産生する。次いで、そのようなレトロウイルスベクター粒子を使用して、インピトまたはインピボのどちらかにおいて、真核生物細胞を形質導入し得る。この形質導入された真核生物細胞は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドを発現する。

【0581】

特定の他の実施形態において、アデノウイルスベクター中に含まれるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドを用いて、エキソピボまたはインピボで

50

細胞を操作する。アデノウイルスは、それがGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)をコードし、そして発現し、それと同時に通常の溶解性ウイルス生活環にて複製するその能力に関して不活性化されるように操作され得る。アデノウイルス発現は、そのウイルスDNAの宿主細胞染色体への組み込み無しに達成され、その結果、挿入性変異誘発についての心配が軽減される。さらに、アデノウイルスは、何年もの間、腸の生ワクチンとして優れた安全側面を伴って使用されている(Schwartz et al., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 109: 233-238 (1974))。最終的に、アデノウイルス媒介性遺伝子移入が、コトラットの肺へのE1-アンチトリプシンおよびCFTRの移入を含む多くの例において実証されている(Rosenfeld et al., *Science*, 252: 431~434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell*, 68: 143~155 (1992))。さらに、ヒト癌における原因物質としてアデノウイルスを確立しようとする広範な研究は、一様に否定的であった(Green et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 6606 (1979))。

#### 【0582】

本発明において有用である適切なアデノウイルスベクターが、例えば、Kozarsky et al., *Wilson, Curr. Opin. Genet. Devel.*, 3: 499~503 (1993); Rosenfeld et al., *Cell*, 68: 143~155 (1992); Engelhardt et al., *Human Genet. Ther.*, 4: 759~769 (1993); Yang et al., *Nature Genet.*, 7: 362~369 (1994); Wilson et al., *Nature*, 365: 691~692 (1993); および米国特許第5,652,224号に記載されており、これらは本明細書中で参考として援用される。例えば、アデノウイルスベクターAd2が有用であり、そしてヒト293細胞にて増殖され得る。これらの細胞は、アデノウイルスのE1領域を含み、そして構成的にE1aおよびE1bを発現し、このことは、このベクターから欠失している遺伝子の産物を提供することによって欠損アデノウイルスを補完する。Ad2に加えて、他の多様なアデノウイルス(例えば、Ad3、Ad5、およびAd7)もまた、本発明において有用である。

#### 【0583】

好ましくは、本発明において使用されるアデノウイルスは、複製欠損性である。複製欠損アデノウイルスは、感染性粒子を形成するために、ヘルパーウイルスおよび/またはパッケージング細胞株の助けを必要とする。得られたウイルスは、細胞に感染する能力があり、そしてプロモーターに作動可能に連結された目的のポリヌクレオチドを発現し得るが、ほとんどの細胞にて複製し得ない。複製欠損アデノウイルスは、次の遺伝子: E1a、E1b、E3、E4、E2aまたはL1からL5までのすべてまたは一部のうちの1つ以上にて欠失され得る。

#### 【0584】

特定の他の実施形態において、アデノ随伴ウイルス(AAV)を使用して、エキソビポまたはインビポでこの細胞を操作する。AAVは、感染性粒子を生成するためにヘルパーウイルスを必要とする、天然に存在する欠損ウイルスである(Muzyczka et al., *Curr. Topics in Microbiol. Immunol.*, 158: 97 (1992))。AAVはまた、非分裂細胞の中にそのDNAを組み込み得る数少ないウイルスの中の1つである。300塩基対程度の小さいAAVを含むベクターがパッケージされ得、そして組み込み得るが、外来性DNAのためのスペースは約4.5kbに限られる。そのようなAAVの生成および使用の方法は当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,139,941号、同第5,173,414号、同第5,354,678号、同第5,436,146号、同第5,474,935号、同第5,478,745号および同第5,589,377号を参照のこと。

#### 【0585】

例えば、本発明において使用するために適切なAAVベクターは、DNA複製、キャプシド形成、および宿主細胞組み込みに必要な配列すべてを含む。Sambrook et al., *M*

10

20

30

40

50

olecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press (1989)において見いだされる方法のような、標準的クローニング方法を使用して、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド構築物を、このAAVベクターに挿入する。次いで、リポフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などを含む、任意の標準的技術を使用して、この組換えAAVベクターを、ヘルパーウイルスに感染しているパッケージング細胞にトランスフェクトする。適切なヘルパーウイルスとしては、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、ワクシニアウイルス、またはヘルペスウイルスが挙げられる。一旦パッケージング細胞がトランスフェクトおよび感染されると、それらはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチド構築物を含む感染性AAVウイルス粒子を生成する。次いで、エキソピボまたはインピボのいずれかで、これらのウイルス粒子を使用して真核生物細胞を形質導入する。この形質導入細胞は、そのゲノムに組み込まれたGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチド構築物を含み、そして所望される遺伝子産物を発現する。

10

20

30

40

50

#### 【0586】

遺伝子治療の別の方法は、相同組換え (例えば、米国特許第5,641,670号、1997年6月24日発行; 国際公開第WO96/29411号、1996年9月26日公開; 国際公開第WO94/12650号、1994年8月4日公開; Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86:8932~8935 (1989); および Zijlstraら、Nature、342:435~438 (1989) を参照のこと) を介して、異種制御領域および内在性ポリヌクレオチド配列 (例えば、目的のポリペプチド配列をコードしている配列) を作動可能に連結する工程を含む。この方法は、標的細胞中に存在しているが、通常はその細胞中で発現しないかまたは所望するよりも低いレベルで発現する、遺伝子の活性化を含む。

#### 【0587】

当該分野で既知の標準的技術を使用して、ポリヌクレオチド構築物を作製する。この構築物は、プロモーターを、そのプロモーターに隣接した標的配列とともに含む。適切なプロモーターが、本明細書中に記載されている。標的配列は、内在性配列に対して十分に相補的であり、プロモーター-標的化配列と内在性配列との相同組換えを可能にする。標的配列は、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の所望される内在性ポリヌクレオチド配列の5'末端の十分近くに存在し、それゆえ、相同組換えに際して、プロモーターは、内在性配列に作動可能に連結される。

#### 【0588】

このプロモーターおよび標的化配列は、PCRを使用して増幅され得る。好ましくは、この増幅されたプロモーターは、5'末端および3'末端に別の制限酵素部位を含む。好ましくは、第1の標的化配列の3'末端は、増幅されたプロモーターの5'末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第2の標的化配列の5'末端は、増幅されたプロモーターの3'末端と同じ制限部位を含む。増幅されたプロモーターおよび標的化配列を消化し、そしてともに連結する。

#### 【0589】

裸のポリヌクレオチドとしてか、もしくは上記により詳細に記載されるようなリボソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、ウイルス全体、リポフェクション、沈殿剤などのようなトランスフェクション促進剤と一緒にかのいずれかで、このプロモーター-標的化配列構築物を細胞に送達する。直接針注射、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、粒子加速器などを含む任意の方法により、Pプロモーター-標的化配列を送達し得る。この方法を、下記により詳細に記載する。

#### 【0590】

プロモーター-標的化配列構築物は、細胞により取り込まれる。この構築物と内在性配列との間に相同組換えが起こり、その結果、内在性Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 配列は、このプロモーターの制御下に配置される。次いで、このプロモーター

は、内在性 G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) 配列の発現を駆動する。

【 0 5 9 1 】

G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) をコードするポリヌクレオチドは、他の新脈管形成タンパク質をコードする他のポリヌクレオチドと一緒に投与され得る。新脈管形成タンパク質としては、酸性および塩基性の線維芽細胞増殖因子、 V E G F - 1、 V E G F - 2、 V E G F - 3、上皮増殖因子 および、血小板由来の内皮細胞増殖因子、血小板由来増殖因子、腫瘍壊死因子、肝細胞増殖因子、インスリン様増殖因子、コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球 / マクロファージコロニー刺激因子、および一酸化窒素シンターゼが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 5 9 2 】

好ましい実施形態では、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) をコードするポリヌクレオチドは、そのタンパク質の分泌を促進する分泌シグナル配列を含む。代表的に、このシグナル配列は、ポリヌクレオチドのコード領域の 5 ' 末端に向かってかまたは 5 ' 末端で発現される、そのポリヌクレオチドのコード領域に位置する。このシグナル配列は、目的のポリヌクレオチドに対して同種または異種であり得、そしてトランスフェクトされる細胞に対して同種または異種であり得る。さらに、当該分野で公知の方法を使用して、このシグナル配列は化学合成され得る。

【 0 5 9 3 】

その投与形態によって、治療効果を提供するのに十分な量にて 1 つ以上の分子が発現される限り、上記のポリヌクレオチド構築物のうちのいずれかの任意の投与形態が使用され得る。これは、直接針注射、全身注射、カテーテル注入、バイオリスティック ( b i o l i s t i c ) 注射器、粒子加速器 ( すなわち、「遺伝子銃」)、ゲルフォームスポンジデポ ( d e p o t )、他の市販デポ ( d e p o t ) 物質、浸透圧ポンプ ( 例えば、 A l z a ミニポンプ)、経口用または坐剤用の固形 (錠剤または丸剤) 薬学的処方物、および手術中のデカンティングまたは局所適用を含む。例えば、ラット肝臓およびラット脾臓へのリン酸カルシウム沈澱した裸のプラスミドの直接注射、または門脈へのタンパク質被覆プラスミド直接注射は、ラット肝臓における外来遺伝子の遺伝子発現をもたらした ( K a n e d a ら、 S c i e n c e、2 4 3 : 3 7 5 ( 1 9 8 9 ) )。

【 0 5 9 4 】

局所投与の好ましい方法は、直接注射によるものである。好ましくは、送達ビヒクルと複合体を形成した本発明の組換え分子は、動脈領域内部に直接注射により投与されるか、または動脈領域内部に局所投与される。動脈領域内部での組成物の局所投与とは、その組成物を動脈内に数センチメートル、好ましくは数ミリメートルで注射することを言う。

【 0 5 9 5 】

局所投与の別の方法は、外科的な創傷内またはその周辺に本発明のポリヌクレオチド構築物を接触させることである。例えば、患者は外科手術を受け得、そしてこのポリヌクレオチド構築物が創傷内部の組織表面上にコーティングされ得るか、またはその構築物が創傷内部の組織領域内に注入され得る。

【 0 5 9 6 】

全身投与において有用な治療的組成物は、本発明の標的化された送達ビヒクルに複合体化された本発明の組換え分子を含む。全身投与で使用するために適切な送達ビヒクルは、特定部位に対してそのビヒクルを標的化するリガンドを含むリポソームを含む。

【 0 5 9 7 】

全身投与の好ましい方法としては、静脈内注射、エアロゾル、経口および経皮 (局所的) 送達 が挙げられる。当該分野で標準的な方法を使用して、静脈内注射が実施され得る。当該分野で標準的な方法を使用して、エアロゾル送達もまた実施され得る ( 例えば、本明細書中で参考として援用される、 S t r i b l i n g ら、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、1 8 9 : 1 1 2 7 7 ~ 1 1 2 8 1 ( 1 9 9 2 ) を参照のこと)。動物の腸内の消化酵素による分解に耐え得るキャリアに対して本発明のポリヌクレオチド構築物を複合体化させるにより、経口送達は実施され得る。そのようなキャリアの例としては

10

20

30

40

50

、当該分野で公知であるような、プラスチックカプセルまたは錠剤が挙げられる。皮膚内へ通過し得る親油性試薬（例えば、DMSO）と本発明のポリヌクレオチド構築物を混合することによって、局所的送達は実施され得る。

【0598】

送達される物質の有効量を決定することは、例えば、その物質の化学構造および生物学的活性、動物の年齢および体重、処置を必要とする詳細な状態およびその重篤度ならびに投与経路を含む、多数の因子に依存し得る。処置の頻度は、1用量あたりの投与されるポリヌクレオチド構築物の量ならびに被験体の健康状態および病歴のような多くの因子に依存する。正確な量、投薬回数および投薬のタイミングは、主治医または獣医により決定される。

10

【0599】

本発明の治療的組成物は、任意の動物に、好ましくは哺乳動物および鳥類に、投与され得る。好ましい哺乳動物としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ウマおよびブタが挙げられ、ヒトが特に好ましい。

【0600】

（Gタンパク質ケモカインレセプターの生物学的活性）

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストもしくはアンタゴニストは、1以上の生物学的活性について試験するためのアッセイにおいて使用され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストもしくはアンタゴニストが特定のアッセイにおいて活性を示す場合、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）は、その生物学的活性に関連した疾患に関与し得る可能性がある。従って、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を使用して、その関連した疾患を処置、予防および/または診断し得る。

20

【0601】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のリガンドとしては、MIP-1、MIP-1、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、RANTESおよびEotaxinが挙げられる。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）はまた、HIVについての主要な補助レセプター（coreceptor）であり、そしてまた他の感染性因子（例えば、他のウイルス）によって認識されて、細胞内への侵入を可能にし得る。従って、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のポリヌクレオチド、そのポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストは、上記のリガンドのいずれかに関連した疾患（例えば、本明細書中に開示された疾患）を処置、予防、および診断するために有用である。非常に好ましい実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のポリヌクレオチド、そのポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストは、HIV感染および/または「HIV感染の処置および予防」と表題付けられた節に記載のようなHIV感染に関連した状態を処置、予防、および診断するために有用である。

30

【0602】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）は主に、単球およびT細胞において発現される。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の発現は、小膠細胞、樹状細胞、およびいくつかの造血幹細胞において見出される。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）リガンド（特に、RANTES、MIP-1およびMIP-1）による、マクロファージおよびリンパ球におけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性化は、主に、炎症部位（しばしば、感染部位）へのこれらの細胞型の化学的誘引を引き起こす。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）はまた、NK細胞、好酸球および好塩基球における走化性の誘導に関与し得る。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）リガンド（特に、RANTES、MIP-1およびMIP-1）による、マクロファージおよびリンパ球におけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性化は、T細胞と抗原提示細胞（例えば、樹状細胞、マクロファージおよびB

40

50

細胞)との間の相互作用を促進し得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)はまた、細胞固着および炎症部位への移行における接着分子を介する血管を通した移動に関与し得る。従って、本発明の組成物(本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体を含む)は、上記のような、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の生物学的活性における欠損に関連した疾患および/または障害の診断、予後判定、予防および/または処置において使用され得る。

【0603】

好ましい実施形態では、本発明の組成物(本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体、ならびにそれらのフラグメントおよび改変体を含む)は、以下の診断、予後判定、予防および/または処置において使用され得る：免疫機能に関連した疾患および/または障害(例えば、ウイルス感染(特に、HIV感染、ポックスウイルス感染、および/またはサイトメガロウイルス感染))；自己免疫疾患(例えば、慢性関節リウマチ、グレーブズ病および多発性硬化症)；免疫細胞走化性；炎症状態；および/または「免疫活性」に記載のもの、ならびに腫瘍性障害(例えば、以下の「過剰増殖障害」のもとで記載されたもの)。

10

【0604】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニスト(抗体を含む)は、免疫細胞の化学的誘引、免疫細胞の活性化、抗原提示、炎症およびウイルス感染が挙げられるが、これらに限定されない活性に関連した疾患および/または障害の診断、予後判定、予防および/または処置において有用である。

20

【0605】

より一般的には、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニスト(抗体を含む)は、以下に記載される疾患および/または障害の診断、予後判定、予防および/または処置において有用であり得る。

【0606】

(HIV感染の処置および予防)

CCR5は、マクロファージ向性(tropic)HIVについてのHIV補助レセプターであるので、CCR5は、HIVの感染および疾患進行、特に、HIVが優勢的にR5マクロファージ向性株である場合のHIV感染初期において、大きな影響を有する。従って、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニスト(抗体を含む)もしくはアンタゴニスト(抗体を含む)を使用して、HIV感染を診断、処置、予防、および/または改善し得る。

30

【0607】

特定の実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニスト(抗体を含む)もしくはアンタゴニスト(抗体を含む)を使用して、HIV感染に関連した疾患、障害、または状態を診断、処置、予防および/または改善し得る。HIV感染に関連した状態としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Pneumocystis carinii肺炎、るいそう症候群、カポジ肉腫、食道カンジダ症、および肺カンジダ症、播種性または肺外性の鳥結核菌細胞内複合体、播種性または肺外性のMycobacterium kansasii、サイトメガロウイルス疾患、サイトメガロウイルス網膜炎、HIV脳障害、単純ヘルペスウイルス疾患、肺外クリプトコックス症、脳のトキソプラズマ症、慢性クリプトスポリジウム症、慢性腸管クリプトスポリジウム症、免疫芽球性リンパ腫、肺外性Mycobacterium tuberculosis、肺性Mycobacterium tuberculosis、マイコバクテリア疾患、肺外マイコバクテリア疾患、パーキットリンパ腫、進行性多病巣性白質脳障害、原始脳リンパ腫(primary brain lymphoma)、慢性イソスポ

40

50

ーラ症、慢性腸管イソスポーラ症、播種性または肺外性のコクシジオイデス真菌症、サルモネラ敗血症、多発性または再発性の細菌感染、侵襲性頸部癌腫、播種性または肺外性のヒストプラズマ症、リンパ性間質性肺炎、肺リンパ過形成、再発性肺炎、重篤な免疫抑制 (severe immunosuppression) および/または AIDS 痴呆。  
【0608】

好ましい実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニスト (抗体を含む) もしくはアンタゴニスト (抗体を含む) を使用して、HIV 感染に関連した日和見感染 (例えば、ヘルペスウイルス (特に、単純ヘルペスウイルス 1 型) 感染、Mycobacterium tuberculosis 感染、またはサイトメガロウイルス感染) を診断、処置、予防、および/または改善し得る。

10

【0609】

好ましい実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニスト (抗体を含む) もしくはアンタゴニスト (抗体を含む) を使用して、HIV 感染に関連した日和見 Pneumocystis carinii 感染を診断、処置、予防、および/または改善し得る。

【0610】

好ましい実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニスト (抗体を含む) もしくはアンタゴニスト (抗体を含む) を使用して、HIV 感染に関連したカポジ肉腫を診断、処置、予防、および/または改善し得る。

20

【0611】

他の好ましい実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニスト (抗体を含む) もしくはアンタゴニスト (抗体を含む) を使用して、HIV 感染の初期段階を診断、処置、予防、および/または改善し得る。

【0612】

他の実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニスト (抗体を含む) もしくはアンタゴニスト (抗体を含む) を使用して、HIV 感染の後期段階を診断、処置、予防、および/または改善し得る。

30

【0613】

他の実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニスト (抗体を含む) もしくはアンタゴニスト (抗体を含む) を使用して、HIV 感染の後期段階を診断、処置、予防、および/または改善し得る。

【0614】

さらに他の実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニスト (抗体を含む) もしくはアンタゴニスト (抗体を含む) は、予防薬として、HIV に感染した性交パートナーを有する人物または HIV にさらされたと信じるに足る理由を有する人物 (例えば、別の個体 (または、動物) の生物学的流体と以前に接触した針で刺された人物または強姦被害者) において HIV 感染を予防するために使用される。

40

【0615】

さらに他の実施形態では、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニスト (抗体を含む) もしくはアンタゴニスト (抗体を含む) は、HIV の母体 - 胎児伝染を予防するための予防薬として使用される。

【0616】

50

## (免疫活性)

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫細胞の増殖、分化、または動員(走化性)を活性化または阻害することにより、免疫系の疾患、障害および/または状態を処置、予防および/または診断するにおいて有用であり得る。免疫細胞は、造血と呼ばれるプロセスを介して発達し、多能性幹細胞から骨髄性細胞(血小板、赤血球、好中球およびマクロファージ)およびリンパ系細胞(Bリンパ球およびTリンパ球)を生成する。これら免疫の疾患、障害および/または状態の病因は、遺伝的、体性的(somatic)(例えば、癌またはいくつかの自己免疫性の疾患、障害、および/または状態)、後天的(例えば、化学療法もしくは毒素による)または感染であり得る。さらに、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストもしくはアンタゴニストは、特定の免疫系の疾患または障害のマーカ-または検出因子(detector)として使用され得る。

10

## 【0617】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、造血活性(血球形成)を調節し得る。例えば、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、例えば、赤血球、リンパ球(B細胞またはT細胞)、骨髄性細胞(例えば、好塩基球、好酸球、好中球、肥満細胞、マクロファージ)および血小板のような血球のすべてまたはサブセットの量を増加させ得る。血球または血球のサブセットの量を減少させる能力は、以下に記載される貧血および白血球減少症の予防、検出、診断および/または処置において有用であり得る。あるいは、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、例えば、赤血球、リンパ球(B細胞またはT細胞)、骨髄性細胞(例えば、好塩基球、好酸球、好中球、肥満細胞、マクロファージ)および血小板のような血球のすべてまたはサブセットの量を減少させ得る。血球または血球のサブセットの量を減少させる能力は、例えば、好酸球増加症のような白血球増加症の予防、検出、診断および/または処置において有用であり得る。

20

30

## 【0618】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストもしくはアンタゴニストは、造血細胞の疾患、障害および/または状態を処置、予防、および/または診断するにおいて有用であり得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、特定(または、多くの)型の造血細胞の減少に関連した疾患、障害および/または状態を処置または予防する試みにおいて、造血細胞(多能性幹細胞を含む)の分化および増殖を増加させ得る。免疫不全症候群の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 血中タンパク質の疾患、障害および/または状態(例えば、無ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症)、毛細管拡張性運動失調、分類不能型免疫不全、ディ・ジョージ症候群、HIV感染、HTLV-BLV感染、白血球接着不全症候群、リンパ球減少症、食細胞殺菌性機能不全、重症複合型免疫不全(SCID)、ヴィスコット-オールドリッチ障害、貧血、血小板減少症、白血球減少症、好中球減少症、貧血または血色素尿症。あるいは、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、特定(または、多くの)型の造血細胞の増加に関連した疾患、障害および/または状態(組織球増殖症が挙げられるが、これに限定されない)を処置または予防する試みにおいて、造血細胞(多能

40

50

性幹細胞を含む)の分化および増殖を増加させ得る。

【0619】

別の実施形態では、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド、またはそのGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに対応するポリヌクレオチド、抗体、アゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、免疫系の疾患および障害を処置し得、および/または本発明のポリペプチドが発現される組織に関連した細胞によって生成される免疫応答を阻害もしくは増強し得る。

【0620】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫不全(先天性および後天性免疫不全の両方を含む)の処置、予防、診断および/または予後判定に有用であり得る。免疫グロブリンレベルB細胞機能および/またはB細胞数が減少されるB細胞免疫不全の例としては以下が挙げられる: X連鎖無ガンマグロブリン血症(ブルトン病)、X連鎖乳児無ガンマグロブリン血症、過剰IgMを伴うX連鎖免疫欠損、過剰IgMを伴う非X連鎖免疫欠損、X連鎖リンパ増殖症候群(XLP)、先天性および後天性無ガンマグロブリン血症を含む無ガンマグロブリン血症、成体発症無ガンマグロブリン血症、後期発症無ガンマグロブリン血症、異常ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症、不特定(unspecific)低ガンマグロブリン血症、劣性(recessive)無ガンマグロブリン血症(Swiss型)、選択的IgM欠損症、選択的IgA欠損症、選択的IgGサブクラス欠損症、IgGサブクラス欠損症(IgA欠損を伴うかまたは伴わない)、上昇したIgMを伴うIg欠損症、上昇したIgMを伴うIgG欠損症およびIgA欠損症、正常なIgまたは上昇したIgを伴う抗体欠損症、Ig重鎖欠損、鎖欠損、B細胞リンパ球増殖性障害(BLPD)、分類不能性免疫不全症(CVID)、分類不能型免疫不全(CVI)(後天性)および乳児の一過性低ガンマグロブリン血症。

【0621】

特定の実施形態において、毛細血管拡張性運動失調または毛細血管拡張性運動失調と関連する状態は、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドおよび/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、処置、予防、診断、および/または予後判定される。

【0622】

T細胞および/またはB細胞の機能および/または数が減少される先天性免疫不全の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: ディ・ジョージ奇形、重症複合型免疫不全(SCID)(X連鎖SCID、常染色体劣性SCID、アデノシンデアミナーゼ欠損、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ(PNP)欠損、MHCクラスII欠損(不全リンパ球症候群)、ヴィスコット-オールドリッチ症候群および毛細血管拡張性運動失調を含むが、これに限定されない)、胸腺発育不全、第三・第四臈嚢症候群、22q11.2欠損、慢性粘膜皮膚カンジダ症、ナチュラルキラー細胞欠損(NK)、特発性CD4+ Tリンパ球減少症、顕著なT細胞欠損を伴う免疫欠損(不特定)、および細胞媒介免疫の不特定の免疫欠損。

【0623】

特定の実施形態において、ディ・ジョージ奇形またはディ・ジョージ奇形に関連する状態は、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、またはそのアンタゴニストもしくはアゴニストを使用して、処置、予防、診断、および/または予後判定される。

【0624】

本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、および/またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、処置、予防、診断、および/または予後判定される他の免疫欠損症としては、慢性肉芽腫症、チェディアック-東症候群、ミエロペルオキシダーゼ欠損、白血球グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ欠損、X連鎖リンパ増殖症候群(XLP)、白血球接着欠損、補体成分欠損(C1、C2、C3、C4、C

10

20

30

40

50

5、C6、C7、C8および/またはC9欠損を含む)、細網発育不全、胸腺リンパ形成不全-発育不全、胸腺腫を伴う免疫欠損、重篤な先天性白血球減少症、免疫欠損を伴う形成異常、新生児好中球減少症、短肢(short limbed)小人症およびIgを伴うネゼロフ症候群複合免疫欠損を含むがこれらに限定されない。

【0625】

好ましい実施形態において、上記に列挙される免疫欠損および/または免疫欠損に関連する状態は、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置、予防、診断および/または予後判定される。

【0626】

好ましい実施形態では、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫欠損個体において免疫応答性をブーストするための薬剤として使用され得る。特定の実施形態では、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、B細胞免疫欠損個体および/またはT細胞免疫欠損個体において免疫応答性をブーストするための薬剤として使用され得る。

【0627】

さらに、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、止血活性(出血を止めること)または血栓崩壊活性(血餅形成)を調節し得る。例えば、止血活性または血栓崩壊活性を増大させることにより、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストもしくはアンタゴニストを使用し、血液凝固の疾患、障害および/または状態(例えば、無線維素原血症、因子欠損症(factor deficiency)、血小板の疾患、障害および/または状態(例えば、血小板減少症)、あるいは外傷、外科手術または他の原因から生じる創傷を処置または予防し得る。あるいは、止血活性または血栓崩壊活性を減少させ得るGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストもしくはアンタゴニストを使用し、凝固を阻害または溶解し得る。心臓発作(梗塞)、発作(stroke)または癒痕の処置または予防において、これらの分子は重要となり得る。

【0628】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、自己免疫性疾患、障害および/または状態を処置、予防、および/または診断するにおいて有用であり得る。多くの自己免疫性疾患、障害および/または状態は、免疫細胞による、外来物質としての自己の不適切な認識から生じる。この不適切な認識は、宿主組織の破壊へと導く免疫応答を生じる。従って、免疫応答、特にT細胞の増殖、分化または走化性を阻害し得るGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストもしくはアンタゴニストの投与は、自己免疫性疾患、障害および/または状態を予防するにおいて有効な治療であり得る。

【0629】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)によって処置、予防、および/または診断、または検出され得る自己免疫性疾患、障害および/または状態の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: アディソン病、溶血性貧血、抗リン脂質症候群、慢性関節リウマチ、皮膚炎、アレルギー性脳脊髄炎、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレーヴズ病、多発性硬化症、重症筋無力症、神経炎、眼炎、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、多発性内分泌腺症、紫斑、ライター病、スティッフマン症候群、自己免疫性甲状腺

10

20

30

40

50

炎、全身性エリテマトーデス、自己免疫性肺炎症、ギャンバレー症候群、インスリン依存性真性糖尿病、および自己免疫炎症性眼病。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの投与、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストもしくはアンタゴニストの投与は、免疫応答（特にT細胞の増殖、分化または化学走性）を阻害し得、疾患（例えば、慢性関節リウマチ）および腎疾患（例えば、糸球体腎炎、IgAネフロパシー、ループス腎炎、および膜性増殖性糸球体腎炎）の処置または予防において効果的な治療法であり得る。さらに、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの投与、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストもしくはアンタゴニストの投与は、グレーヴス病の処置に効果的であり得る。

10

## 【0630】

同様に、喘息（特にアレルギー性喘息）または他の呼吸器の問題のようなアレルギー性反応および状態もまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、またはGタンパク質ケモカインレセプターのアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置、予防、および/または診断され得る。さらに、これらの分子を用いてアナフィラキシー（抗原性分子に対する過敏症）または血液型不適合性を処置し得る。

## 【0631】

さらに、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のポリペプチドまたはポリヌクレオチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、IGE媒介アレルギー反応を処置、予防、診断および/または予後判定するために使用され得る。このようなアレルギー反応としては、喘息、鼻炎および湿疹が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、インビトロまたはインビボにおいてIGE濃度を調節するために使用され得る。

20

## 【0632】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、器官拒絶または対宿主性移植片病（GVHD）を処置、予防および/または診断するために用いられ得る。器官拒絶は、宿主免疫細胞による、免疫応答を介した移植組織の破壊により生じる。同様に、免疫応答はまた、GVHDに關与するが、この場合、外来の移植された免疫細胞は宿主組織を破壊する。免疫応答、特にT細胞の増殖、分化、または走化性を阻害するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストもしくはアンタゴニストの投与は、器官拒絶またはGVHDを予防するのに有効な治療であり得る。特定の実施形態では、免疫応答（特に、T細胞の活性化、増殖、分化、または走化性）を阻害する、本発明のポリペプチド、抗体、もしくはポリヌクレオチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、実験的アレルギー性および超急性異種移植片拒絶および慢性異種移植片拒絶を予防するにおいて有効な治療であり得る。本発明のポリペプチド、抗体もしくはポリヌクレオチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫応答（特に、T細胞の活性化、増殖、分化または化学走性）を阻害し、超急性拒絶または慢性拒絶（例えば、移植された腎臓、心臓、肺および/または膵臓島細胞の拒絶）を予防するのに効果的であり得る。さらに、本発明のポリペプチド、抗体もしくはポリヌクレオチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫応答（特にT細胞の活性化、増殖、分化または化学走性）を阻害し、移植された免疫細胞が宿主細胞（例えば、宿主の肝臓組織、肺組織または小腸組織）を破壊するのを防止するのに効果的であり得る。

30

40

## 【0633】

同様に、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドもしくはポ

50

リペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、炎症の調節のために使用され得る。例えば、本発明のポリペプチド、抗体、もしくはポリヌクレオチド、および/または本発明のアゴニストもしくはアンタゴニストは、炎症応答に關与する細胞の活性化、増殖および/または分化を阻害し得るので、これらの分子を使用して、慢性および急性の炎症状態を、予防および/または処置し得る。このような炎症状態は以下を含むがこれらに限定されない：例えば、感染に關連する炎症（例えば、敗血症性ショック、または全身炎症応答症候群）、虚血再灌流障害に關連する炎症、内毒素致死に關連する炎症、補体媒介性超急性拒絶に關連する炎症、腎炎に關連する炎症、サイトカインまたはケモカインが誘導する肺傷害に關連する炎症、炎症性腸疾患に關連する炎症、クローン病に關連する炎症、サイトカイン（例えば、TNFまたはIL-1）の過剰生成から生じる炎症、呼吸器障害（例えば、喘息およびアレルギー）；胃腸障害（例えば、炎症性腸疾患）；癌（例えば、胃癌、卵巣癌、肺癌、膀胱癌、肝臓癌、および乳癌）；CNS障害（例えば、多発性硬化症、虚血性脳損傷および/または発作、外傷性脳損傷、神経変性障害（例えば、パーキンソン病およびアルツハイマー病）、AIDS関連痴呆、およびプリオン病）；心臓血管障害（例えば、アテローム性動脈硬化症、心筋炎、心臓血管疾患、および心肺バイパス合併症）；ならびに炎症によって特徴付けられる多くのさらなる疾患、状態、および障害（例えば、肝炎、慢性関節リウマチ、痛風、外傷、腭炎、サルコイドーシス、皮膚炎、腎虚血再灌流障害、グレーブズ病、全身性エリテマトーデス、真性糖尿病、および同種異系移植拒絶）。本発明のポリペプチド、抗体もしくはポリヌクレオチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、炎症を阻害し、肝炎（例えば、C型肝炎ウイルスのようなウイルス性肝炎）ならびにT細胞媒介性肝炎および肝臓の他の炎症性状態（例えば、原発性硬化性胆管炎）を処置するのに効果的であり得る。さらに、本発明のポリペプチド、抗体もしくはポリヌクレオチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、炎症を阻害し、胃腸系の疾患（例えば、クローン病、慢性胃炎、および潰瘍性大腸炎）を処置するのに効果的であり得る。本発明のポリペプチド、抗体もしくはポリヌクレオチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、炎症を阻害し、また心臓血管系の疾患（例えば、肺性サルコイドーシス、特発性炎症性ミオパシー、アテローム性動脈硬化症、喘息、慢性閉塞性肺疾患、気腫および腹部大動脈瘤）を処置するのに効果的であり得る。

10

20

30

40

50

#### 【0634】

炎症は、基礎的な防御機構なので、炎症障害は、実質的に身体の任意の組織に影響を与え得る。従って、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗体ならびにそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、以下が挙げられるがこれらに限定されない、組織特異的な炎症障害の処置において用途を有する：副腎炎、肺炎、胆管胆嚢炎、虫垂炎、龜頭炎、眼瞼炎、気管支炎、滑液包炎、心臓炎、蜂巣炎、子宮頸炎、胆嚢炎、声帯炎、蝸牛炎（cochlititis）、大腸炎、結膜炎、膀胱炎、皮膚炎、憩室炎、脳炎、心内膜炎、食道炎、耳管炎、結合組織炎、毛包炎、胃炎、胃腸炎、歯肉炎、舌炎、肝脾炎、角膜炎、迷路炎、喉頭炎、リンパ管炎、乳腺炎、中耳炎、髄膜炎、子宮炎、粘膜炎、心筋炎、筋炎、鼓膜炎、腎炎、神経炎、精巣炎、骨軟骨炎、耳炎、心膜炎、腱周囲炎、腹膜炎、喉頭炎、静脈炎、灰白髄炎、前立腺炎、歯髓炎、網膜炎、鼻炎、卵管炎、強膜炎、強膜脈絡膜炎、陰嚢炎、静脈洞炎、脊椎炎、脂肪組織炎、口内炎、滑膜炎、耳管炎、腱炎、扁桃炎、尿道炎、および膣炎。

#### 【0635】

他の実施形態では、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、好中球、好酸球、およびマクロファージの移動、食作用、スーパーオキシド産生、抗体依存性細胞傷害性を増強するための薬剤として有用であり得る。

#### 【0636】

別の実施形態では、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴ

ニストは、白血球数の増加もしくは減少によって特徴付けられるか、または白血球数の増加もしくは減少に関連する疾患および障害を診断、予後判定、予防および/または処置するにおいて有用であり得る。白血球減少症は、白血球数が、正常未満に減少する場合に生じる。白血球減少症としては、好中球減少症およびリンパ球減少症が挙げられるが、これらに限定されない。正常と比較した白血球数の増加は、白血球増加症として公知である。身体は、感染の間に、増加した数の白血球を産生する。従って、白血球増加症は、単純に、感染を反映する通常の生理的パラメーターであり得る。あるいは、白血球増加症は、損傷または癌のような他の疾患の指標であり得る。白血球増加症 (Leukocytosis) は、好酸球増加症およびマクロファージの蓄積が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、白血球減少症を診断、予後判定、予防および/または処置するにおいて有用であり得る。他の特定の実施形態では、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、白血球増加症を診断、予後判定、予防および/または処置するにおいて有用であり得る。

10

## 【0637】

白血球減少症は、すべての型の白血球が概して減少した状態であり得るか、または特定の型の白血球の特異的枯渇であり得る。従って、特定の実施形態では、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、好中球数の減少 (好中球減少症として公知) を診断、予後判定、予防および/または処置するにおいて有用であり得る。本発明のGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストによって診断、予後判定、予防および/または処置され得る好中球減少症としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: 乳児遺伝性顆粒球増加症 (infantile genetic agranulocytosis)、家族性好中球減少症、周期性好中球減少症、食事性欠損 (例えば、ビタミンB欠損または葉酸欠損) から生じるかまたはこれに関連する好中球減少症、薬物処置 (例えば、抗生物質レジメン (例えば、ペニシリン処置)、スルホンアミド処置、抗凝固薬処置、鎮痙薬物、抗甲状腺性薬物、および癌化学療法) から生じるかまたは薬物処置に関連した好中球減少症、およびいくつかの細菌感染またはウイルス感染、アレルギー性障害、自己免疫疾患、個体が膨張した脾臓を有し (例えば、フェルティ症候群、マラリア、およびサルコイドーシス)、そしていくつかの薬物処置レジメンを有する状態に関連して生じ得る好中球破壊の増加から生じる好中球減少症。

20

30

## 【0638】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、ストレス、薬物処置 (例えば、コルチコステロイドを用いる薬物処置、癌化学療法、および/または放射線治療)、AID、および/または他の疾患 (例えば、癌、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、慢性感染、いくつかのウイルス感染、および/または遺伝性障害 (例えば、ディ・ジョージ症候群、ヴィスコット-オールドリッチ症候群、重症複合型免疫不全、毛細血管拡張性運動失調) など) から生じるかまたはそれらに関連するリンパ球減少症を含むが、これに限定されないリンパ球減少症 (Bリンパ球および/またはTリンパ球の数の減少) を診断、予後判定、予防および/または処置するにおいて有用であり得る。

40

## 【0639】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、ゴシェ病、ニーマン-ピック病、レテラー-ジーヴェ病、およびハンド-シュラー-クリスチャン病を含むが、これらに限定されない、マクロファージ数および/またはマクロファージ機

50

能に関連した疾患および障害を診断、予後判定、予防および/または処置するにおいて有用であり得る。

【0640】

別の実施形態では、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、特発性の好酸球増多症候群、好酸球増多-筋痛症候群、およびハンド-シュラー-クリスチャン病を含むが、これらに限定されない、好酸球数および/または好酸球機能に関連した疾患および障害を診断、予後判定、予防および/または処置するにおいて有用であり得る。

【0641】

さらに別の実施形態では、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、急性リンパ性(リンパ芽球性)白血病(ALL)、急性骨髄性(骨髄性(myelocytic)、骨髄性(myelogenous)、骨髄芽球性または骨髄単球性)白血病、慢性リンパ性白血病(例えば、B細胞白血病、T細胞白血病、セザリー症候群、およびヘアリーセル白血病)、慢性骨髄性(骨髄性(myeloid)、骨髄性(myelogenous)または顆粒球性)白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、および菌状息肉腫を含むが、これらに限定されない白血病およびリンパ腫を診断、予後判定、予防および/または処置するにおいて有用であり得る。本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチド、ならびに/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、ヘアリーセル白血病、T細胞リンパ腫、および成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)を診断、予知、予防および/または処置するのに効果的であり得る。

【0642】

他の実施形態において、本発明のポリペプチド、抗体、もしくはポリヌクレオチド、および/またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストは、以下に挙げられるが、これらに限定されない、免疫複合体疾患の診断、予後判定、予防、および/または処置に有用である：血清病、後連鎖球菌性糸球体腎炎(post streptococcal glomerulonephritis)、結節性多発性動脈炎、および免疫複合体誘導性脈管炎。

【0643】

本発明のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、感染性因子の処置、検出および/または予防に使用され得る。例えば、免疫応答を増大することによって、特にB細胞および/またはT細胞の増殖、活性化および/または分化を増大することによって、感染性疾患は、処置、検出、および/または予防され得る。免疫応答は、既存の免疫応答を増大するか、または新しい免疫応答を惹起するかのいずれかによって、増大され得る。あるいは、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、免疫応答を必ずしも惹起することなく、感染性因子(感染性因子を列挙する適用の節などで述べる)を直接阻害し得る。

【0644】

別の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗原に対する免疫応答性を増大するワクチンアジュバントとして使用される。特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、腫瘍特異的な免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチド、ならびに/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、樹状細胞ワクチンアジュバントとして使用される。

10

20

30

40

50

## 【0645】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗ウイルス免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。アジュバントとして本発明の組成物を用いて増強され得る抗ウイルス免疫応答としては、ウイルスおよび本明細書において記載されるかさもなければ当該分野で公知のウイルス関連疾患および症状が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下：AIDS、髄膜炎、デング熱、EBV、および肝炎(例えば、B型肝炎)からなる群より選択される、ウイルス、疾患または症状に対する免疫応答を増強するためのアジュバントとして用いられる。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、以下：HIV/AIDS、RSウイルス、デング熱、ロタウイルス、日本脳炎、インフルエンザAおよびB、パラインフルエンザ、麻疹、サイトメガロウイルス、狂犬病、フニン、チクングニヤウイルス、リフトバレー熱、単純疱疹、および黄熱病からなる群より選択されるウイルス、疾患または症状に対する免疫応答を増強するためのアジュバントとして用いられる。本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチド、ならびに/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストはまた、単純ヘルペスウイルス1型の処置に効果的である。

10

## 【0646】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗細菌性免疫応答または抗真菌性免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。アジュバントとして本発明の組成物を使用して増大され得る抗細菌性免疫応答または抗真菌性免疫応答としては、細菌または真菌、および本明細書中に記載されるか、または、さもなくば当該分野で公知の疾患または症状に関連する細菌または真菌が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、細菌または真菌、疾患、または症状(これは、破傷風、ジフテリア、ボツリスム、およびB型髄膜炎からなる群から選択される)に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

20

## 【0647】

別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、細菌または真菌、疾患、または症状(これは、*Vibrio cholerae*、*Mycobacterium leprae*、*Salmonella typhi*、*Salmonella paratyphi*、*Meisseria meningitidis*、*Streptococcus pneumoniae*、B型*streptococcus*、*Shigella spp.*、腸毒性*Escherichia coli*、腸出血性*E. coli*、*Borrelia burgdorferi*からなる群から選択される)に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

30

## 【0648】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、抗寄生生物免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。アジュバントとして本発明の組成物を使用して増大され得る抗寄生生物免疫応答としては、寄生生物、および本明細書中に記載されるかまたはさもなくば、当該分野で公知の疾患または症状に関連する寄生生物が挙げられる。特定の実施形態において、本発明の組成物は、寄生生物に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、*Plasmodium*(マラリア)または*Leishmania*に対する免疫応答を増大するためのアジュバントとして使用される。

40

## 【0649】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくは

50

はアンタゴニストはまた、例えば、単核性食細胞の漸増および活性化を予防することによって、珪肺症、サイコイドーシス、および特発性肺線維症を含む感染疾患を処置するために使用され得る。

【0650】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、本発明のポリペプチドに対する免疫媒介応答を阻害するかまたは増大するために、抗体の産生のための抗原として使用される。

【0651】

1つの実施形態として、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫系をブーストし、1つ以上の抗体(例えば、IgG、IgA、IgM、およびIgE)の量の増大を生じ、高親和性の抗体産生および免疫グロブリンクラススイッチ(例えば、IgG、IgA、IgMおよびIgE)を誘導し、および/または免疫応答を増大するために、動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ミニブタ、ニワトリ、ラクダ、ヤギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、およびヒト、最も好ましくはヒト)に投与される。

10

【0652】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、病原体に対するB細胞応答の刺激因子として使用される。

20

【0653】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、T細胞のアクチベーターとして使用される。

【0654】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫抑制治療を受ける前に、その個体の免疫状態を増大させる薬剤として使用される。

30

【0655】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、より高い親和性抗体を誘導するための薬剤として使用される。

【0656】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、血清の免疫グロブリン濃度を増加するための薬剤として使用される。

。

【0657】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、免疫無防備状態の個体の回復を促進するための薬剤として使用される。

40

【0658】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、高齢の集団および新生児の間の免疫応答性をブーストするための薬剤として使用される。

【0659】

50

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、骨髄移植および/または他の移植（例えば、同種異系または異種器官移植）の前、間、または後の免疫系エンハンサーとして使用される。移植に関して、本発明の組成物は、移植前、移植と同時、および/または移植後に投与され得る。特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植後、T細胞集団の回復の開始前に投与される。別の特定の実施形態において、本発明の組成物は、移植後、T細胞集団の回復の開始後であるが、B細胞集団の完全な回復の前に、まず投与される。

【0660】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、B細胞機能の後天的欠損を有する個体間で免疫応答性をブーストするための薬剤として使用される。ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび/またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与することによって改善または処置され得る、B細胞機能の後天的欠損を生じる状態としては、HIV感染、AIDS、骨髄移植、およびB細胞慢性リンパ性白血病（CLL）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0661】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、一時的な免疫欠損を有する個体において免疫応答性をブーストするための薬剤として使用される。ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチドおよび/またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを投与することによって改善または処置され得る、一時的な免疫欠損を生じる状態としては、ウイルス感染（例えば、インフルエンザ）からの回復、栄養失調に関連する状態、感染性単核細胞症からの回復、またはストレスに関連する状態、麻疹からの回復、輸血からの回復、手術からの回復が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0662】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、単球、樹状細胞および/またはB細胞による抗原提示の調節因子として使用される。1つの実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、インビトロまたはインビボで抗原提示を増強するかまたは抗原提示をアンタゴナイズする。さらに、関連する実施形態において、この抗原提示の増強またはアンタゴナイズは、抗腫瘍処置としてかまたは免疫系を調節するために有用であり得る。

30

【0663】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、個体の免疫系を、TH1細胞性応答とは反対に、体液性応答（すなわち、TH2）の発生に指向するための薬剤として使用される。

40

【0664】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、腫瘍増殖を誘導し、従って、腫瘍を抗腫瘍性薬剤に対してより感受性にするための手段として使用される。例えば、多発性骨髄腫は、緩慢に細胞分裂する（dividing）疾患であり、従って、実質的に全ての抗腫瘍性レジメンに対して不応性である。これらの細胞を、より迅速に増殖させた場合、これらの感受性プロフィールは変化するようである。

【0665】

50

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、AIDS、慢性リンパ球障害および/または分類不能性免疫不全のような病理におけるB細胞の産生の刺激因子として使用される。

【0666】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、外科手術、外傷または遺伝的欠損後のリンパ組織の生成および/または再生のための治療として使用される。別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、移植前の骨髄サンプルの前処理として使用される。

10

【0667】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、SCID患者の間で観察されるような免疫不全症/免疫欠損を生じる遺伝性障害のための遺伝子に基づく治療として使用される。

【0668】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、単球に影響を及ぼす寄生生物疾患（リーシュマニア属（Leishmania））に対して防御するために単球/マクロファージを活性化する方法として使用される。

20

【0669】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、本発明のポリペプチドによって惹起される分泌サイトカインを調節する方法として使用される。

【0670】

別の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、獣医学的医薬に適用され得るので、本明細書中に記載の1つ以上の適用において使用される。

30

【0671】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、外来因子に対する免疫応答の種々の局面または外来因子自体をブロックする方法として使用される。免疫応答の特定の局面のブロックが所望される疾患または状態の例としては、自己免疫障害（例えば、狼瘡、関節炎、自己免疫膵臓炎および慢性膵臓炎、シェーグレン症候群）、ならびに皮膚アレルギー、炎症、腸疾患、病原体に関連する損傷および/または疾患/障害に対する免疫応答性が挙げられる。

40

【0672】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、自己免疫疾患（例えば、特発性血小板減少性紫斑病、全身性エリテマトーデスおよび多発性硬化症）に関連するB細胞増殖およびIg分泌を妨げるための治療として使用される。

【0673】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストま

50

たはアンタゴニストは、内皮細胞におけるB細胞移動および/またはT細胞移動のインヒビターのとして使用される。この活性は、組織構造または同族の応答を破壊し、そして例えば、免疫応答の破壊および敗血症のブロックにおいて有用である。

【0674】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、未定量有意性の単クローン性高ガンマグロブリン血症(MGUS)、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、関連性の特発性単クローン性高ガンマグロブリン血症、およびプラズマ細胞腫のような疾患において明らかな慢性高ガンマグロブリン血症のための治療として使用される。

10

【0675】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、例えば、特定の自己免疫疾患および慢性炎症疾患および感染性疾患において、ポリペプチド走化性、ならびにマクロファージおよびそれらの前駆体の活性化、ならびに好中球、好塩基球、Bリンパ球およびいくつかのT細胞サブセット(例えば、活性化T細胞およびCD8細胞傷害性T細胞、ならびにナチュラルキラー細胞)の活性化を阻害するために使用され得る。

【0676】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストはまた、例えば、好中球の産生および移動を妨げることによって、特発性好酸球増多症候群を処置するために使用され得る。

20

【0677】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、補体媒介細胞溶解を増強または阻害するために使用される。

【0678】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、抗体依存性細胞傷害性を増強または阻害するために使用される。

30

【0679】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、例えば、動脈壁中の単球浸潤、マクロファージ浸潤および/またはT細胞浸潤を妨げることによって、アテローム性硬化症を処置するために使用され得る。

【0680】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、成人呼吸促進症候群(ARDS)を処置するために使用され得る。

40

【0681】

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、創傷および組織の修復を刺激するため、脈管形成を刺激するため、および/あるいは血管またはリンパの疾患または障害の修復を刺激するために、有用であり得る。さらに、本発明のアゴニストおよびアンタゴニストは、粘膜表面の再生を刺激するために使用され得る。

【0682】

50

特定の実施形態において、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、および/またはそのアゴニストは、一次免疫不全または後天性免疫不全、欠損性の血清免疫グロブリン産生、再発性感染、および/または免疫系機能不全により特徴付けられる障害を、診断、予後診断、処置および/または予防するために使用される。さらに、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、および/またはそのアゴニストは、関節、骨、皮膚、および/または耳下腺の感染、血行性の感染（例えば、敗血症、髄膜炎、敗血症網膜炎、および/または骨髄炎）、自己免疫疾患（例えば、本明細書中に開示されるもの）、炎症性障害、および悪性疾患、ならびに/またはこれらの感染、疾患、障害および/または悪性疾患に関連する任意の疾患または障害または状態（CVID、他の一次免疫不全、HIV疾患、CLL、再発性気管支炎、静脈洞炎、中耳炎、結膜炎、肺炎、肝炎、髄膜炎、带状疱疹（例えば、重篤な带状疱疹）、および/またはニューモシスティスカリニが挙げられるが、これらに限定されない）を、処置または予防するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドおよび/あるいはアゴニストで診断、予後診断、処置および/または予防され得る、他の疾患および障害としては、HIV感染、HTLV-BLV感染、リンパ球減少症、食細胞殺菌性機能不全、貧血、血小板減少、またはヘモグロビン尿症が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

**【0683】**

別の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、分類不能型免疫不全（「CVID」；「後天性無ガンマグロブリン血症」および「後天性低ガンマグロブリン血症」としても公知）またはこの疾患のサブセットを有する個体を処置および/または診断するために使用される。

**【0684】**

特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、癌または新生物（免疫細胞または免疫組織関連性の癌または新生物を含む）を診断、予後診断、予防および/または処置するために使用され得る。本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストによって予防、診断または処置され得る癌または新生物の例としては、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ性貧血、パーキットリンパ腫、EBV形質転換疾患、ならびに/あるいは本明細書中他の箇所の「過剰増殖障害」との表題の節に記載される疾患および障害が挙げられるが、これらに限定されない。

**【0685】**

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、ラージB細胞リンパ腫の細胞性増殖を減少するための治療として使用される。

**【0686】**

別の特定の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、慢性骨髄性白血病に関連するB細胞およびIgの関与を減少する手段として使用される。

**【0687】**

特定の実施形態において、本発明の組成物は、B細胞免疫不全個体（例えば、部分的または完全な脾摘出を受けた個体のような）において免疫応答性をブーストするための薬剤として使用される。

**【0688】**

本発明のアゴニストとしては、例えば、結合および/または阻害抗体、アンチセンス核酸、リボザイムまたは本発明のポリペプチドの可溶性形態（例えば、Fc融合タンパク質

)が挙げられる。本発明のアゴニストとしては、例えば、結合または刺激抗体、およびポリペプチドの可溶性形態（例えば、Fc融合タンパク質）が挙げられる。本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、薬学的に受容可能なキャリア（例えば、本明細書中に記載されるような）と共に組成物中で使用され得る。

**【0689】**

別の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、機能的な内因性抗体分子を産生し得ないかまたはさもなければ損われた内因性免疫系を有するが、別の動物由来の再構成されたかまたは部分的に再構成された免疫系によってヒト免疫グロブリン分子を産生し得る動物（上記の動物を含むがこれらに限定されず、そしてまたトランスジェニック動物も含む）に投与される（例えば、公開PCT出願番号WO98/24893、WO96/34096、WO96/33735およびWO91/10741を参照のこと）。このような動物への本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストの投与は、このGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストに対するモノクローナル抗体の作製に有用である。

10

**【0690】**

（走化性）

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストまたはアンタゴニストは、走化性活性を有し得る。走化性分子は、細胞（例えば、単球、線維芽細胞、好中球、T細胞、肥満細胞、好酸球、上皮細胞および/または内皮細胞）を、身体中の特定の部位（例えば、炎症、感染、または過剰増殖の部位）に誘引または動員する。次いで、動員された細胞は、その特定の外傷または異常性を撃退および/または治癒し得る。

20

**【0691】**

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストまたはアンタゴニストは、特定の細胞の走化性活性を増大し得る。次いで、これらの走化性分子は、身体中の特定の位置に標的される細胞数を増加することによって、炎症、感染、過剰増殖性の疾患、障害および/または状態、あるいは任意の免疫系障害を、処置、予防および/または診断するために使用され得る。例えば、走化性分子を使用して、損傷された位置に免疫細胞を誘引することによって、組織に対する創傷および他の外傷を処置、予防および/または診断し得る。本発明の走化性分子はまた、線維芽細胞を誘引し得、これが、創傷を処置、予防および/または診断するために使用され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストもしくはアンタゴニストは、固形腫瘍の成長を遅延または停止させるのに効果的であり得る。

30

40

**【0692】**

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストまたはアンタゴニストが走化性活性を阻害し得ることもまた、意図される。これらの分子はまた、疾患、障害および/または状態を処置、予防および/または診断するために使用され得る。従って、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストまたはアンタゴニストは、走化性のインヒビターとして使用され得る。

**【0693】**

50

## ( 感染性疾患 )

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニストまたはアンタゴニストは、感染因子を処置、予防および/または診断するために使用され得る。例えば、免疫応答を増加させることによって、特に、B細胞および/またはT細胞の増殖および分化を増加させることによって、感染性疾患が、処置、予防および/または診断され得る。免疫応答は、既存の免疫応答を増強するかまたは新たな免疫応答を惹起するかのいずれかによって、増加され得る。あるいは、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニストまたはアンタゴニストはまた、必ずしも免疫応答を誘発することなく、感染因子を直接阻害し得る。

10

## 【0694】

ウイルスは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドおよび/あるいはアゴニストまたはアンタゴニストによって処置、予防および/または診断され得る疾患または症状を引き起こし得る、感染因子の一例である。ウイルスの例としては、以下のDNAおよびRNAのウイルスおよびウイルス科が挙げられるが、これらに限定されない：アルポウイルス、アデノウイルス科、アレナウイルス科、アルテリウイルス、ビルナウイルス科、ブニヤウイルス科、カルシウイルス科、サルコウイルス科 (Circoviridae)、コロナウイルス科、デング熱ウイルス、EBV、HIV、フラビウイルス科、ヘパドナウイルス科 (肝炎)、ヘルペスウイルス科 (例えば、サイトメガロウイルス、単純ヘルペス、ヘルペス帯状疱疹)、モノネガウイルス (Mononegavirus) (例えば、パラミクソウイルス科、麻疹ウイルス、ラブドウイルス科)、オルソミクソウイルス科 (例えば、インフルエンザA型、インフルエンザB型、およびパラインフルエンザ)、パピローマウイルス、パポパウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ボックスウイルス科 (例えば、痘瘡またはワクシニア)、レオウイルス科 (例えば、ロタウイルス)、レトロウイルス科 (HTLV-I、HTLV-II、レンチウイルス)、およびトガウイルス科 (例えば、ルビウイルス属)。これらの科内に入るウイルスは、以下を含むがこれらに限定されない、種々の疾患または症状を引き起こし得る：関節炎、細気管支炎 (bronchiolitis)、RSウイルス、脳炎、眼性感染症 (例えば、結膜炎、角膜炎)、慢性疲労症候群、肝炎 (A型、B型、C型、E型、慢性活動性、デルタ)、日本脳炎B型、アルゼンチン出血熱 (Junin)、チクングニヤ (Chikungunya)、リフトバレー熱、黄熱病、髄膜炎、日和見感染症 (例えば、AIDS)、肺炎、パーキットリンパ腫、リンパ腫、水痘、出血熱、麻疹、流行性耳下腺炎、パラインフルエンザ、狂犬病、感冒、ポリオ、白血病、風疹、性感染症、皮膚病 (例えば、カポジ、いぼ)、およびウイルス血症。本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、これらの症状または疾患のいずれかを処置、予防および/または診断するために使用され得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、あるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、髄膜炎、デング熱、EBVおよび/または肝炎 (例えば、B型肝炎およびC型肝炎) を処置するために使用され得る。さらなる特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドあるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、他の市販の肝炎ワクチンの1以上に非応答性の患者を処置するために使用される。さらに特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドあるいはアゴニストまたはアンタゴニストは、AIDSを処置、予防および/または診断するために使用される。

20

30

40

## 【0695】

非常に好ましい実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、HIV感染を診断、処置、予防または回復するために使用される。

## 【0696】

50

他の非常に好ましい実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、サイトメガロウイルス感染を診断、処置、予防または回復するために使用される。

【0697】

他の非常に好ましい実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、ポックスウイルス科感染を診断、処置、予防または回復するために使用される。

【0698】

他の実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチド、ならびに/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、呼吸性シチウムウイルス感染を、診断、処置、予防または緩和するために使用される。

【0699】

同様に、疾患または症状を引き起こし得、かつ本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドあるいはアゴニストまたはアンタゴニストによって処置、予防および/または診断され得る、細菌性因子あるいは真菌性因子としては、以下のグラム陰性およびグラム陽性の細菌および細菌科ならびに真菌が挙げられるが、これらに限定されない：Actinomycetales（例えば、Corynebacterium、Mycobacterium、Norcardia）、Cryptococcus neoformans、Aspergilloles、Bacillaceae（例えば、Anthrax、Clostridium）、Bacteroidaceae、Blastomycosis、Bordetella、Borrelia（例えば、Borrelia burgdorferi）、Brucellosis、Candidiasis、Campylobacter、Coccidioidomycosis、Cryptococcosis、Dermatocycoses、E.coli（例えば、Enterotoxigenic E.coliおよびEnterohemorrhagic E.coli）、Enterobacteriaceae（Klebsiella、Salmonella（例えば、Salmonella typhi、およびSalmonella paratyphi）、Serratia、Yersinia）、Erysipelothrix、Helicobacter、Legionellosis、Leptospirosis、Listeria、Mycoplasmatales、Mycobacterium leprae、Vibrio cholerae、Neisseriaceae（例えば、Acinetobacter、Gonorrhoea、Menigococcal）、Misseriameningitidis、Pasteurellaceaeの感染症（例えば、Actinobacillus、Haemophilus（例えば、HaemophilusインフルエンザB型）、Pasteurella）、Pseudomonas、Rickettsiaceae、Chlamydiaceae、Syphilis、Shigella spp.、Staphylococcal、Meningococcal、PneumococcalならびにStreptococcal（例えば、Streptococcus pneumoniaeおよびB群Streptococcus）。これらの細菌または真菌の科は、以下を含むがこれらに限定されない疾患または症状を引き起こし得る：菌血症、心内膜炎、眼感染症（結膜炎、結核、ブドウ膜炎）、歯肉炎、日和見感染症（例えば、AIDSに関連した感染症）、爪周囲炎、プロテアーゼ関連感染症、ライター病、気道感染症（例えば、百日咳または蓄膿症）、敗血症、ライム病、ネコ引っ掻き病、赤痢、パラチフス熱、食中毒、腸チフス、肺炎、淋病、髄膜炎（例えば、髄膜炎A型およびB型）、クラミジア、梅毒、ジフテリア、ライ病、パラ結核、結核、狼瘡、ボツリヌス中毒、壊疽、破傷風、膿痂疹、リウマチ熱、猩紅熱、性感染症、皮膚病（例えば、蜂巣炎、皮膚真菌症（dermatocycoses））、毒血症、尿路感染症、創傷感染

10

20

30

40

50

症。本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、アゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状もしくは疾患を処置、予防および/または診断し得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、以下を処置、予防および/または診断するために使用される：破傷風、ジフテリア、ボツリヅム、および/またはB型髄膜炎。本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、*Y. pestis* 感染および *L. monocytogenes* 感染の処置に有効である。

#### 【0700】

さらに、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチドおよび/またはアゴニストもしくはアンタゴニストにより処置、予防および/または診断され得る、寄生生物性因子が引き起こす疾患または症状としては、以下のファミリーまたはクラスが挙げられるがこれらに限定されない：アメーバ症、バベシア症、コクシジウム症、クリプトスポリジウム症、二核アメーバ症 (*Dientamoebiasis*)、交疫、外部寄生生物性、ジアルジア鞭毛虫症、蠕虫症、リーシュマニア症、タイレリア症、トキソプラズマ症、トリパノソーマ症、およびトリコモナス (*Trichomonas*) 症、ならびに孢子虫症 (*Sporozoon*) (例えば、*Plasmodium virax*、*Plasmodium falciparum*、*Plasmodium malariae* および *Plasmodium ovale*)。これらの寄生生物は、以下を含むがこれらに限定されない種々の疾患または症状を引き起こし得る：疥癬、ツツガムシ病、眼性感染症、腸疾患 (例えば、赤痢、ジアルジア鞭毛虫症)、肝臓疾患、肺疾患、日和見感染症 (例えば、AIDS 関連)、マラリア、妊娠合併症、およびトキソプラズマ症。本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、任意のこれらの症状または疾患を処置、予防および/または診断し得る。特定の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、マラリア、*trypanosome cruzi* 誘発性心筋炎、シャーガス病およびトキソプラズマ症を処置、予防および/または診断するために使用される。

#### 【0701】

好ましくは、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、および/またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、患者に有効量のポリペプチドを投与するか、または患者から細胞を取り出して、本発明のポリヌクレオチドをこの細胞に供給し、そしてその操作した細胞を患者に戻す (エキソビボ治療) かのいずれかによるものであり得る。さらに、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、ワクチン中の抗原として用いられて、感染性疾患に対する免疫応答を惹起し得る。

#### 【0702】

(神経学的疾患)

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 組成物 (例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチド、ポリヌクレオチド、および/またはアゴニストもしくはアンタゴニスト) で処置され得る、神経系の疾患、障害および/または状態としては、軸索の切断、ニューロンの減少もしくは変性、または脱髄のいずれかを引き起こす、神経系の損傷ならびに疾患、障害および/または状態が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の方法に従って、患者 (ヒト患者および非ヒト哺乳動物患者を含む) において処置され得る神経系病変には、以下の中枢神経系 (脊髄、脳を含む) または末梢神経系のいずれかの病変が挙げられるが、これらに限定されない：(1) 虚血性病変 (ここで、神経系の一部における酸素不足により、ニューロンの損傷または死が生じ、これには、大脳梗塞もしくは虚血、または脊髄梗塞もしくは虚血が挙げられる)；(2) 外傷性病変 (身体的損傷により生じるかまたは手術に関連する病変、例えば、神経系の一部を切断する病変、または圧縮損傷を含む)；(3) 悪性病変 (ここで、神経系の一部は、神経系関連悪性疾患もしくは非神経系組織由来の悪性疾患のいずれかである悪性組織により、破壊または損傷される)；(4) 感染性病変 (ここで、神経系の一部は、例えば、膿瘍による感染の結果として、破壊または損傷されるか、あるいはヒト免疫不全ウ

10

20

30

40

50

イルス、帯状ヘルペスもしくは単純ヘルペスウイルスによる感染と関連するか、ライム病、結核、梅毒に関連する)；(5)変性病変(ここで、神経系の一部分は、変性プロセスの結果として破壊または損傷され、これには、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンティングトン舞蹈病または筋萎縮性側索硬化症(A L S)に関連する変性が挙げられるが、これらに限定されない)；(6)栄養性の疾患、障害および/または状態に関連する病変(ここで、神経系の一部分は、栄養障害または代謝障害によって破壊または損傷され、これには、ビタミンB 1 2 欠乏症、葉酸欠乏症、ヴェルニッケ病、タバコ-アルコール弱視、マルキアファ-ヴァ-ビニャーミ病(脳梁の一次変性)およびアルコール小脳変性が挙げられるが、これらに限定されない)；(7)全身性疾患に関連する神経性病変(糖尿病(糖尿病性ニューロパシー、ベル麻痺)、全身性エリテマトーデス、癌または類肉腫症が挙げられるが、これらに限定されない)；(8)毒性物質(アルコール、鉛または特定の神経毒を含む)により生じる病変；ならびに(9)脱髄性病変(ここで、神経系の一部分は、脱髄性疾患によって破壊または損傷され、これには、多発性硬化症、ヒト免疫不全ウイルス関連脊髄障害、横断脊髄障害または種々の病因、進行性多病巣性白質脳症、および橋中央ミエリン溶解が挙げられるが、これらに限定されない)。

10

20

30

40

50

#### 【0703】

好ましい実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳低酸素症の損傷効果から神経細胞を保護するために用いられる。この実施形態に従って、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)組成物は、大脳低酸素症に関連する神経細胞損傷を処置、予防および/または診断するために使用される。この実施形態の別の局面において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、大脳虚血と関連する神経細胞損傷を処置、予防および/または診断するために使用される。この実施形態の別の局面において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、は、大脳梗塞に関連する神経細胞損傷を処置、予防および/または診断するために使用される。

#### 【0704】

この実施形態の別の局面において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、発作に関連する神経細胞損傷を処置、予防および/または診断するために使用される。この実施形態の別の局面において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、発作に関連する大脳神経細胞損傷を処置、予防および/または診断するために使用される。

#### 【0705】

この実施形態のさらなる局面において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、心臓発作に関連する神経細胞損傷を処置、予防および/または診断するために使用される。この実施形態の別の局面において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(C C R 5)ポリペプチド、ポリヌクレオチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストは、心臓発作に関連する大脳神経細胞損傷を処置、予防および/または診断するために使用される。

#### 【0706】

神経系障害を処置、予防および/または診断するために有用な本発明の組成物は、ニューロンの生存または分化の促進における生物学的活性について試験することによって選択され得る。例えば(限定目的ではない)、以下の効果のいずれかを誘発する本発明のGタンパク質ケモカインレセプター組成物が、本発明に従って有用であり得る：(1)培養物中におけるニューロンの生存時間の増加；(2)培養物中またはインビボにおけるニューロンの出芽の増加；(3)培養物中またはインビボにおけるニューロン関連分子(例えば、運動ニューロンに関しては、コリンアセチルトランスフェラーゼまたはアセチルコリン

エステラーゼ)の産生の増加;あるいは(4)インビボにおけるニューロン機能不全の症状の減少。このような効果は、当該分野において公知の任意の方法によって測定され得る。好ましい、非限定的な実施形態において、ニューロンの生存の増加は、本明細書中に記載されるか、そうでなければ当該分野において公知の方法(例えば、Arakawaら(J. Neurosci. 10: 3507-3515 (1990))に記載される方法)を用いて慣習的に測定され得;ニューロンの出芽の増加は、当該分野において公知の方法(例えば、Pestronkら(Exp. Neurol. 70: 65-82 (1980))またはBrownら(Ann. Rev. Neurosci. 4: 17-42 (1981))に記載される方法)によって検出され得;ニューロン関連分子の産生の増加は、当該分野で公知でありそして測定されるべき分子に依存した技術を用いて、バイオアッセイ、酵素アッセイ、抗体結合、ノーザンブロットアッセイなどによって測定され得;そして運動ニューロン機能不全は、運動ニューロン障害の身体的症状(例えば、弱さ、運動ニューロン伝導速度または機能的障害)を評価することによって測定され得る。

#### 【0707】

特定の実施形態において、本発明に従って処置され得る運動ニューロンの疾患、障害および/または状態としては、運動ニューロンならびに神経系の他の構成要素に影響し得る、梗塞形成、感染、毒素への曝露、外傷、外科的損傷、変性疾患または悪性疾患のような疾患、障害および/または状態、ならびにニューロンに選択的に影響する疾患、障害および/または状態(例えば、筋萎縮性側索硬化症、および進行性脊髄性筋萎縮症、進行性球麻痺、原発性側索硬化症、乳児性および若年性筋萎縮、小児の進行性球麻痺(ファチオ・ロンデ症候群)、ポリオおよびポリオ後症候群、ならびに遺伝性運動感覚性ニューロパシー(シャルコー-マリー-トゥス病)を含むが、これらに限定されない)が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0708】

さらに、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、ニューロン生存;シナプス形成;伝達;神経分化などにおいて役割を果たし得る。従って、本発明の組成物(本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを含む)は、学習および/または認識の障害を含むがこれに限定されない、これらの役割に関連する疾患または障害を、診断および/または処置もしくはは予防するために使用され得る。本発明の組成物は、神経変性性疾患状態および/または行動障害の処置または予防において有用であり得る。このような神経変性性疾患状態および/または行動障害としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、ツレット症候群、精神分裂病、躁病、痴呆、偏執症、強迫性障害、恐慌性障害、学習障害、ALS、精神病、自閉、および行動変化(栄養補給、睡眠パターン、平衡、および知覚の障害を含む)。さらに、本発明の組成物は、発生中の胚に関連する発生障害、または性関連障害の処置、予防および/または検出において役割を果たし得る。

#### 【0709】

さらに、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、以下を含むが挙げられるがこれらに限定されない脳血管障害に関連する、疾患、傷害、障害または損傷からの、神経細胞の防御において有用であり得る:頸動脈疾患(例えば、頸動脈血栓症、頸動脈狭窄およびモヤモヤ病)、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、脳低酸素症、大脳動脈硬化症、大脳動静脈奇形、大脳動脈疾患、脳塞栓症および血栓(例えば、頸動脈血栓症、洞血栓症およびヴァレンベルク症候群)、脳出血(例えば、硬膜上血腫または硬膜下血腫、あるいはクモ膜下出血)、脳梗塞、脳虚血(例えば、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群、または椎骨脳底不全(vertebrobasilar insufficiency))、血管性痴呆(たとえば、多発脳梗塞性痴呆)、室周白斑、ならびに血管性頭痛(例えば、群発性頭痛および片頭痛)。

10

20

30

40

50

## 【0710】

本発明のなおさらなる局面に従って、治療目的（例えば、神経学的細胞増殖および/または分化を刺激するために）で、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを利用するためのプロセスが提供される。従って、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストは、神経学的疾患を処置および/または検出するために用いられ得る。さらに、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストは、特定の神経系の疾患または障害のマーカーまたは検出因子として用いられ得る。

10

## 【0711】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを用いて処置または検出され得る神経性疾患の例としては、以下が挙げられる：脳疾患（例えば、代謝脳疾患（母体性フェニルケトン尿症のようなフェニルケトン尿症、ビルビン酸カルボキシラーゼ欠損、ビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体欠損、ヴェルニッケ脳障害、脳水腫を含む）、小脳新生物のような脳新生物（テント下新生物、脈絡叢新生物のような脳室新生物、視床下部新生物、テント上新生物、キャナヴァン病を含む）、小脳性運動失調のような小脳疾患（脊髄小脳変性（例えば、毛細血管拡張性運動失調）、小脳性共同運動障害、フリートライヒ運動失調、マチャド-ジョセフ病、オリブ橋小脳萎縮を含む）、テント下新生物のような小脳新生物、広汎性脳硬化症（例えば、軸周囲性脳炎、球様細胞白質萎縮症、異染性白質萎縮症および亜急性硬化性汎脳炎）。

20

## 【0712】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経性疾患の例としては、以下が挙げられる：脳血管障害（例えば、頸動脈疾患（頸動脈血栓症、頸動脈狭窄症およびモヤモヤ病を含む）、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、脳酸素欠乏症、大脳動脈硬化症、大脳動静脈先天異常、大脳動脈疾患、脳塞栓症および血栓症（例えば、頸動脈血栓症、洞血栓症およびヴァレンベルク症候群）、脳出血（例えば、硬膜上血腫、硬膜下血腫およびクモ膜下出血）、脳梗塞、脳虚血（例えば、一過性脳虚血、鎖骨下動脈盗血症候群および椎骨基部不全）、血管性痴呆（例えば、多発脳梗塞性痴呆）、室周白斑（periventricular leukomalacia）、および血管性頭痛（例えば、群発性頭痛および片頭痛）。

30

## 【0713】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経性疾患の例としては、以下が挙げられる：痴呆（例えば、AIDS痴呆複合症、初老期痴呆（例えば、アルツハイマー病およびクロイツフェルト-ヤコブ病）、老年痴呆（例えば、アルツハイマー病および進行性核上性麻痺）、血管性痴呆（例えば、多発脳梗塞性痴呆）、脳炎（軸周囲性脳炎、ウイルス性脳炎（例えば、流行性脳炎、日本脳炎、セントルイス脳炎、ダニ媒介脳炎および西ナイル熱）を含む）、急性播種性脳脊髄炎、髄膜脳炎（例えば、ブドウ膜脳炎症候群、脳炎後のパーキンソン病および亜急性硬化性汎脳炎）、脳軟化症（例えば、室周白斑）、てんかん（例えば、全身てんかん（点灯麻痺を含む）、アブサンステんかん、ミオクローヌステんかん（MERRF症候群、強直性間代性てんかんを含む）、部分てんかん（例えば、複雑部分てんかん、前頭葉てんかんおよび側頭葉てんかん）、外傷後てんかん、てんかん重積持続状態（例えば、持続性部分てんかん）を含む）、およびハレルフォルデン-シュパッツ症候群。

40

## 【0714】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/ま

50

たはポリペプチド、ならびに／あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経性疾患の例としては、以下が挙げられる：水頭症（例えば、ダンディ・ウォーカー症候群および正常圧水頭症）、視床下部疾患（例えば、視床下部新生物）、大脳マラリア、ナルコレプシー（脱力発作を含む）、延髄ポリオ、大脳偽腫瘍、レット症候群、ライ症候群、視床疾患、大脳トキソプラズマ症、頭蓋内結核腫およびツェルヴェーガー症候群、中枢神経系感染（例えば、AIDS 痴呆複合症、ブレイン膿瘍、硬膜下蓄膿、脳脊髄炎（例えば、ウマ脳脊髄炎、ベネズエラウマ脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎）、ビスナ、および大脳マラリア。

【0715】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド、ならびに／あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経性疾患の例としては、以下が挙げられる：髄膜炎（例えば、クモ膜炎、無菌性髄膜炎（例えば、ウイルス性髄膜炎（リンパ球性脈絡髄膜炎を含む）、細菌性髄膜炎（ヘモフィルス髄膜炎、リステリア髄膜炎を含む）、髄膜炎菌性髄膜炎（例えば、ウォーターハウス-フリーデリックセン症候群、肺炎球菌髄膜炎および髄膜結核）、真菌類髄膜炎（例えば、クリプトコックス髄膜炎）、硬膜下滲出、髄膜脳炎（例えば、ブドウ膜髄膜脳炎症候群）、脊髄炎（例えば、横断脊髄炎）、神経梅毒（例えば、脊髄ろう）、ポリオ（延髄ポリオおよびポリオ後症候群を含む）。プリオン疾患および（例えば、クロイツフェルト-ヤコブ症候群、ウシ海綿状脳症、ゲルストマン-シュトロイスラー症候群、クールー、スクラピー）および大脳トキソプラズマ症は、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび／もしくはポリペプチド、ならびに／またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて、効果的に処置または検出され得る。

【0716】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド、ならびに／あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経性疾患の例としては、以下が挙げられる：中枢神経系新生物（例えば、脳新生物（小脳新生物（例えば、テント下新生物）、脳室新生物（例えば、脈絡叢新生物）、視床下部新生物およびテント上新生物を含む）、髄膜新生物、脊髄新生物（硬膜外新生物を含む）、脱髄疾患（例えば、キャナヴァン病）、広汎性脳硬化症（副腎脳白質ジストロフィー、軸周囲性脳炎、球様細胞白質萎縮症、異染性白質萎縮症のような広汎性脳硬化症を含む）、アレルギー性脳脊髄炎、壊死性出血性脳脊髄炎、進行性多病巣性白質脳障害、多発性硬化症、橋中央ミエリン溶解、横断脊髄炎、視神経脊髄炎、スクラピー、脊柱前弯症、慢性疲労症候群、ビスナ、高圧神経症候群、髄膜炎、脊髄疾患（例えば、先天性筋無緊張症、筋萎縮性側索硬化症）、棘筋萎縮症（例えば、ヴェルドニヒ-ホフマン病）、脊髄圧迫、脊髄新生物（例えば、硬膜外新生物）、脊髄空洞症、脊髄ろう、スティッフマン症候群、精神遅滞（例えば、Angelman症候群、ネコ鳴き症候群、ド・ランゲ症候群、ダウン症候群）、ガングリオシドーシス（例えば、ガングリオシドーシスG(M1)、ザントホフ病、テイ-サックス病）、ハートナップ病、ホモシスチン尿症、ローレンス-ムーン-ビードル症候群、レッシュ-ナイハン症候群、カエデシロップ病、ムコリピドーシス（例えば、フコース蓄積症）、神経性セロイド脂褐素沈着症、眼脳腎症候群、フェニルケトン尿症（例えば、母体フェニルケトン尿症）、プラーダー-ヴィリ症候群、レット症候群、ルービンスタイン-テービ症候群、結節硬化症、WAGR症候群、神経系異常（例えば、全前脳症、神経管欠損（例えば、無脳症（水無脳症（hydranencephaly）を含む））、アルノルト-キアーリ奇形、脳ヘルニア、髄膜瘤、髄膜脊髄瘤、および脊椎癒合不全（例えば、嚢胞性二分脊椎および潜在性二分脊椎）。

【0717】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチド、ならびに／あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを用いて処

10

20

30

40

50

置または検出され得るさらなる神経性疾患の例としては、以下が挙げられる：遺伝性感覚ニューロン障害および運動ニューロン障害（シャルコー-マリー病を含む）、遺伝性眼萎縮症、レフサム病、遺伝性痙性対麻痺、ヴェルドニッヒ-ホフマン病、遺伝性感覚ニューロン障害および自律神経ニューロン障害（例えば、先天性痛覚脱失症および家族性自律神経障害）、神経症的発現（例えば、認知不能症（ゲルストマン症候群を含む）、健忘症（例えば、逆向性健忘症）、失行症、神経因性膀胱障害、脱力発作、伝達障害（例えば、聴覚障害（難聴、部分的聴力欠損、大声（loudness）レクルートメントおよび耳鳴を含む）、言語障害（例えば、失語症（失書症、名称失語症、プロカ失語症およびヴェルニッケ失語症を含む）、失読症（例えば、後天性失読症）、言語発達障害、発語障害（例えば、失語症（名称失語症、プロカ失語症およびヴェルニッケ失語症を含む））、構音障害、伝達障害（例えば、発語障害（構語障害、反響言語、無言症およびどもりを含む）、発声障害（例えば、失声症および嚔声））、除脳硬直状態、せん妄、束形成、幻覚、髄膜症、運動障害（例えば、Angelman症候群、運動失調、アテトーシス、舞蹈病、失調症、運動低下症、筋緊張低下、ミオクロヌス、チック、斜頸および振せん）、筋緊張亢進（例えば、筋硬直（例えば、スティッフマン症候群）、筋痙性、麻痺（例えば、顔面神経麻痺（耳帯状疱疹を含む）、胃不全麻痺、片麻痺、眼筋麻痺（例えば、複視、デュエーン症候群、ホルナー症候群、慢性進行性外眼筋麻痺症（例えば、キーンズ症候群））、延髄麻痺、熱帯性痙性不全対麻痺、対麻痺（例えば、ブラウン-セカール症候群、四肢麻痺）、呼吸性麻痺および声帯麻痺、不全麻痺）、幻影肢、味覚障害（例えば、無味覚症および味覚不全）、視覚障害（例えば、弱視、失明、色覚障害、複視、半盲、暗点および正常以下の視覚）、睡眠障害（例えば、睡眠過剰（クライネ-レヴィン症候群を含む）、不眠症、および夢遊症）、痙縮（例えば、開口障害）、意識消失（例えば、昏睡、持続性植物状態および失神）および眩暈、神経筋障害（例えば、先天性筋無緊張症、筋萎縮性側索硬化症、ランバート-イートン筋無力症候群、運動ニューロン疾患、筋萎縮（例えば、棘筋萎縮、シャルコー-マリー病およびヴェルドニッヒ-ホフマン病）、ポリオ後症候群、筋ジストロフィー、重症筋無力症、萎縮性ミオトニー、先天性ミオトニー、ネマリンミオパシー、家族性周期性四肢麻痺、多発性パラミオクロヌス（paramyoclonus）、熱帯性痙性不全対麻痺およびスティッフマン症候群）、末梢神経系疾患（例えば、先端疼痛症）、アミロイドニューロパシー、自律神経系疾患（例えば、アーディー症候群、Barre-Lieou症候群、家族性自律神経障害、ホルナー症候群、反射性交感神経性ジストロフィーおよびシャイ-ドレーガー症候群）、脳神経疾患（例えば、聴神経疾患（例えば、聴神経腫（2型神経線維腫症を含む））、顔面神経疾患（例えば、顔面神経痛、メルカーソン-ローゼンタール症候群、眼球運動障害（弱視、眼振、動眼神経麻痺を含む）、眼筋麻痺（例えば、デュエーン症候群、ホルナー症候群、慢性進行性外眼筋麻痺症（キーンズ症候群を含む））、斜視（例えば、内斜視および外斜視）、視神経麻痺、視神経疾患（例えば、眼萎縮症（遺伝性眼萎縮症を含む）、視神経円板結晶腔、視神経炎（例えば、視神経脊髄炎、乳頭水腫））、三叉神経痛、声帯麻痺、脱髄疾患（例えば、視神経脊髄炎および脊柱前弯症）、および糖尿病性ニューロパシー（例えば、糖尿病足）。本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチド、ならびに/またはそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、特発性炎症性ミオパシーを効果的に処置し得る。

#### 【0718】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを用いて処置または検出され得るさらなる神経性疾患の例としては、以下が挙げられる：神経圧挫症候群（例えば、手根管症候群、足根管症候群）、胸郭出口症候群（例えば、頸肋症候群）、尺骨神経圧挫症候群、神経痛（例えば、カウザルギー、頸腕神経痛、顔面神経痛および三叉神経痛）、神経炎（例えば、実験的アレルギー性神経炎、眼神経炎、多発性神経炎、多発神経根神経炎および神経根炎（例えば、多発性神経根炎））、遺伝性運動ニューロン障害および感覚ニューロン障害（例えば、シャルコー-マリー病）、遺伝性眼萎縮症、レ

10

20

30

40

50

フサム病、遺伝性痙性対麻痺およびヴェルドニッヒ - ホフマン病、遺伝性感覚ニューロン障害および自律神経ニューロン障害（先天性痛覚脱失症および家族性自律神経障害を含む）、P O E M S 症候群、坐骨神経痛、味覚性発汗症およびテタニー）。

【0719】

（過剰増殖障害）

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストまたはアンタゴニストは、新生物を含む、過剰増殖性の疾患、障害および/または状態を、処置、予防および/または診断するために使用され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストまたはアンタゴニストは、直接的または間接的な相互作用を介して、この障害の増殖を阻害し得る。あるいは、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストまたはアンタゴニストは、過剰増殖障害を阻害し得る他の細胞を増殖し得る。

10

【0720】

例えば、免疫応答を増大させること（特に、過剰増殖障害の抗原性の質を増大させること）によって、またはT細胞を増殖、分化もしくは動員することによって、過剰増殖性の疾患、障害および/または状態を、処置、予防および/または診断し得る。既存の免疫応答を増強することによってか、または新たな免疫応答を開始することによって、この免疫応答を増大させ得る。あるいは、免疫応答を減少させることもまた、化学療法剤のような、過剰増殖性の疾患、障害および/または状態を処置、予防および/または診断する方法であり得る。

20

【0721】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストまたはアンタゴニストによって処置、予防および/または診断され得る過剰増殖性の疾患、障害および/または状態の例としては、結腸、腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、上皮小体、下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭部および頸部、神経（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部、ならびに泌尿生殖器に位置する新生物が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチド、ならびに本発明のアゴニストもしくはアンタゴニストは、乳癌、多形性グリア芽細胞腫および神経芽細胞腫の診断および/または処置に効果的である。

30

【0722】

同様に、他の過剰増殖性の疾患、障害および/または状態もまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドまたはポリペプチド、あるいはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストまたはアンタゴニストによって処置、予防および/または診断され得る。このような他の過剰増殖性の疾患、障害および/または状態の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：高ガンマグロブリン血症、リンパ球増殖性障害、パラプロテイン血症、紫斑、サルコイドーシス、セザリー症候群、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、ゴシェ病、組織球増殖症、および任意の他の過剰増殖性疾患、加えて上記に列挙した器官系に見出される新生物。

40

【0723】

1つの好ましい実施形態は、本発明のポリヌクレオチドを利用して、本発明、および/またはタンパク質融合体もしくはそのフラグメントを用いる遺伝子治療により、異常な細胞分裂を阻害する。

【0724】

従って、本発明は、異常に増殖している細胞に、本発明のポリヌクレオチドを挿入することにより細胞増殖性の疾患、障害および/または状態を処置または予防するための方法

50

を提供する。ここで、上記のポリヌクレオチドは、上記の発現を抑制する。

【0725】

本発明の別の実施形態は、個体における細胞増殖性の疾患、障害および/または状態を処置または予防する方法を提供し、この方法は、異常に増殖している細胞に本発明の1つ以上の活性な遺伝子コピーを投与する工程を包含する。好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、上記のポリヌクレオチドをコードするDNA配列を発現する際に有効な組換え発現ベクターを含む、DNA構築物である。本発明の別の好ましい実施形態において、本発明のポリヌクレオチドをコードするDNA構築物は、レトロウイルス（または、より好ましくは、アデノウイルスベクター）を利用して、処置される細胞に挿入される（参考として本明細書中に援用される、G. J. Nabelら、PNAS 1999 96:324-326を参照のこと）。最も好ましい実施形態において、このウイルスベクターは欠損性であり、そして非増殖細胞を形質転換せず、増殖細胞のみを形質転換する。さらに、好ましい実施形態において、単独でかまたは他のポリヌクレオチドとともにもしくは他のポリヌクレオチドと融合されて、増殖している細胞に挿入された本発明のポリヌクレオチドは、次いで、外部刺激（すなわち、磁性、特定の低分子、化学物質、または薬物投与など）により調節され得る。この刺激は、上記のポリヌクレオチドの上流にあるプロモーターに作用して、そのコードされたタンパク質産物の発現を誘導する。このようにして、本発明の有益な治療効果は、上記の外部刺激に基づいて、明らかに調節され得る（すなわち、本発明のポリヌクレオチドの発現を増加、減少または阻害するために）。

10

20

【0726】

本発明のポリヌクレオチドは、発癌性遺伝子または抗原の発現を抑制する際に有用であり得る。「発癌性遺伝子の発現を抑制する」により、その遺伝子の転写の抑制、その遺伝子転写物（プレメッセージ（pre-messsage）RNA）の分解、スプライシングの阻害、メッセンジャーRNAの破壊、タンパク質の翻訳後修飾の妨害、タンパク質の破壊、またはタンパク質の正常機能の阻害を意図する。

【0727】

異常に増殖する細胞に対する局所的な投与に関しては、本発明のポリヌクレオチドは、当業者に公知の任意の方法により投与され得、この方法としては、トランスフェクション、エレクトロポレーション、細胞のマイクロインジェクション、例えば、リボソームのようなビヒクルにおいて、リポフェクチン、または裸のポリヌクレオチド、または本明細書中全体を通して記載される任意の他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリヌクレオチドは、公知の遺伝子送達系（例えば、レトロウイルスベクター（Gilboa, J. Virology 44:845 (1982); Hocke, Nature 320:275 (1986); Wilsonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014; ワクシニアウイルス系（Chakrabartyら, Mol. Cell Biol. 5:3403 (1985)）または当業者に公知の他の効率的なDNA送達系（Yatesら, Nature 313:812 (1985)）が挙げられるが、これらに限定されない）により送達され得る。これらの参考文献は、例示にすぎず、そして本明細書中に参考として援用される。異常に増殖している細胞に特異的に送達するかまたはそれをトランスフェクトし、そして非分裂細胞を残す（spare）ために、当業者に公知のレトロウイルスまたはアデノウイルス（例えば、当該分野または本明細書中で記載される）送達系を利用することが好ましい。宿主DNA複製は組み込むためにレトロウイルスDNAが必要であるので、このレトロウイルスは、その生活環についての必要とされるレトロウイルス遺伝子の欠如に起因して自己複製できない。本発明のポリヌクレオチドのために、このようなレトロウイルス送達系を利用して、上記の遺伝子および構築物を、異常に増殖している細胞に標的化し、そして非分裂性の正常細胞を残す。

30

40

【0728】

本発明のポリヌクレオチドは、直接疾患部位に注射針を導くために使用される画像化デバイスの使用によって、内部器官、体腔などにおける細胞増殖性障害/疾患部位に直接送

50

達され得る。本発明のポリヌクレオチドはまた、手術介入時に疾患部位に投与され得る。

【0729】

「細胞増殖性疾患」により、器官、腔、または身体部分のいずれか1つもしくは任意の組み合わせを冒している、任意のヒトもしくは動物の疾患または障害が意味され、この疾患は、良性または悪性に拘わらず、細胞、細胞群、もしくは組織の単一または複数の局所的な異常な増殖により特徴づけられる。

【0730】

本発明のポリヌクレオチドの任意の量が、この量が、処置細胞の増殖に対して生物学的に阻害性の効果を有する限り、投与され得る。さらに、本発明の1つより多くのポリヌクレオチドを、同時に同じ部位に投与することが可能である。「生物学的に阻害性の」により、部分的または全体的な成長阻害ならびに細胞の増殖または成長の速度における減少を意味する。生物学的に阻害性の用量は、組織培養における標的の悪性細胞増殖または異常に増殖している細胞の成長、動物および細胞培養物における腫瘍増殖に対する本発明のポリヌクレオチドの効果を評価することによってか、あるいは当業者に公知の任意の他の方法によって、決定され得る。

10

【0731】

本発明はさらに、抗体に基づく治療に関し、この方法は、記載される疾患、障害および/または状態の1つ以上を処置するために、哺乳動物（好ましくはヒト）の患者に抗ポリペプチド抗体および抗ポリヌクレオチド抗体を投与する工程を包含する。抗ポリペプチド抗体および抗ポリヌクレオチド抗体（ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体）を生成するための方法は、本明細書中の他の箇所に詳細に記載される。このような抗体は、当該分野で公知のようにかまたは本明細書中に記載されるように、薬学的に受容可能な組成物中にて提供され得る。

20

【0732】

本発明の抗体が治療的に使用され得る方法の概要は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを、身体において局所的もしくは全身的にか、または抗体の直接的な細胞傷害（例えば、補体により媒介される（CDC）もしくはエフェクター細胞により媒介される（ADCC））によって、結合させる工程を包含する。これらのアプローチのいくつかは、以下により詳細に記載される。本明細書中に提供される教示があれば、当業者は、本発明の抗体を、過度の実験なくして、診断、モニタリングまたは治療の目的のために使用する方法を知る。

30

【0733】

詳細には、本発明の抗体、フラグメントおよび誘導体は、本明細書中に記載されるように、細胞増殖および/または細胞分化の疾患、障害および/または状態を有するかまたは発症している被験体を、処置するために有用である。このような処置は、単一用量または複数用量の本発明の抗体、あるいはそのフラグメント、誘導体、または結合体を投与する工程を包含する。

【0734】

本発明の抗体は、他のモノクローナル抗体もしくはキメラ抗体と組み合わせるか、またはリンホカインもしくは造血増殖因子（例えば、これは、その抗体と相互作用するエフェクター細胞の数または活性が増加するように作用する）と組み合わせ、有利に利用され得る。

40

【0735】

本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、そのフラグメントもしくは領域に対する、高親和性および/または強力なインビボ阻害抗体および/または中和抗体を使用することは、本発明のポリヌクレオチドもしくはポリペプチド（そのフラグメントを含む）に関する疾患、障害および/または状態に関するイムノアッセイおよびその治療の両方のために好ましい。このような抗体、フラグメント、または領域は、好ましくは、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド（そのフラグメントを含む）に対する親和性を有する。好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 、 $10^{-2} \text{ M}$ 、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、 $10^{-3} \text{ M}$

50

、 $5 \times 10^{-4}$  M、 $10^{-4}$  M未満の解離定数すなわち $K_d$ を有する親和性が挙げられる。より好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-5}$  M、 $10^{-5}$  M、 $5 \times 10^{-6}$  M、 $10^{-6}$  M、 $5 \times 10^{-7}$  M、 $10^{-7}$  M、 $5 \times 10^{-8}$  M、または $10^{-8}$  M未満の解離定数すなわち $K_d$ を有する親和性が挙げられる。さらにより好ましい結合親和性としては、 $5 \times 10^{-9}$  M、 $10^{-9}$  M、 $5 \times 10^{-10}$  M、 $10^{-10}$  M、 $5 \times 10^{-11}$  M、 $10^{-11}$  M、 $5 \times 10^{-12}$  M、 $10^{-12}$  M、 $5 \times 10^{-13}$  M、 $10^{-13}$  M、 $5 \times 10^{-14}$  M、 $10^{-14}$  M、 $5 \times 10^{-15}$  M、または $10^{-15}$  M未満の解離定数すなわち $K_d$ を有する親和性が挙げられる。

#### 【0736】

さらに、本発明のポリペプチドは、本明細書中の他の箇所に記載されるように、単独で、融合タンパク質として、または直接的にもしくは間接的に他のポリペプチドとの組み合わせでかのいずれかで、増殖性細胞もしくは増殖性組織の脈管形成を阻害する際に有用である。最も好ましい実施形態において、上記の抗脈管形成効果は、例えば、造血性の腫瘍特異的細胞（例えば、腫瘍関連マクロファージ）の阻害を通じて、間接的に達成され得る（本明細書中に参考として援用される、Joseph IBら、*J Natl Cancer Inst*, 90(21):1648-53(1998)を参照のこと）。本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する抗体もまた、脈管形成の直接的または間接的な阻害を生じ得る（本明細書中に参考として援用される、Witte L.ら、*Cancer Metastasis Rev.* 17(2):155-61(1998)を参照のこと）。

#### 【0737】

本発明のポリペプチド（Gタンパク質融合物を含む）、またはそのフラグメントは、アポトーシスの誘導を通じて増殖性細胞または増殖性組織を阻害する際に有用であり得る。上記のポリペプチドは、直接的または間接的のいずれかで、増殖性細胞および増殖性組織のアポトーシスを誘導するように、例えば、死ドメインレセプター（例えば、腫瘍壊死因子（TNF）レセプター1、CD95（Fas/APO-1）、TNFレセプター関連アポトーシス媒介タンパク質（TRAMP）ならびにTNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）レセプター1および2（本明細書中に参考として援用されるSchulze-Osthoff K,ら、*Eur J Biochem* 254(3):439-59(1998)を参照のこと）の活性化において作用し得る。さらに、本発明の別の好ましい実施形態において、上記のポリペプチドは、他の機構を通じて（例えば、アポトーシスを活性化する他のタンパク質の活性化において）あるいは上記タンパク質の発現を単独でまたは低分子薬物もしくはアジュバント（例えば、アポプトニン、ガレクチン、チオレドキシン、抗炎症性タンパク質）と組み合わせでかのいずれかで刺激することを通じて、アポトーシスを誘導し得る（例えば、本明細書中に参考として援用される、Mutat Res 400(1-2):447-55(1998), *Med Hypotheses* 50(5):423-33(1998), *Chem Biol Interact.* Apr 24;111-112;23-34(1998), *J Mol Med.* 76(6):402-12(1998), *Int J Tissue React*;20(1):3-15(1998)を参照のこと）。

#### 【0738】

本発明のポリペプチド（それに対するGタンパク質融合物を含む）、またはそのフラグメントは、増殖性細胞または増殖性組織の転移を阻害する際に有用である。阻害は、本明細書中他の箇所に記載されるように、ポリペプチドまたは上記ポリペプチドに対する抗体を投与することの直接的結果として、または間接的に（例えば、転移を阻害することが公知のタンパク質（例えば、 $\alpha 4$ インテグリン）の発現を活性化すること）生じ得る（例えば、本明細書中に参考として援用される、*Curr Top Microbiol Immunol* 1998;231:125-41を参照のこと）。本発明のこのような治療的影響は、単独でか、または低分子薬物もしくはアジュバントと組み合わせでかのいずれかで、達成され得る。

## 【0739】

別の実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドを含む組成物（例えば、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグに結合した、ポリペプチドまたはポリペプチド抗体を含む組成物）を、本発明のポリペプチドを発現する、標的とされた細胞に送達する方法を提供する。本発明のポリペプチドまたはポリペプチド抗体は、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグと、疎水性、親水性、イオン性および/または共有結合的な相互作用を通じて結合され得る。

## 【0740】

本発明のポリペプチド、それに対するタンパク質融合物、またはそのフラグメントは、直接的（例えば、本発明のポリペプチドで「ワクチン接種」された場合、増殖性抗原および免疫原に対して応答する免疫応答が生じる）または間接的（例えば、免疫応答を増強することが公知のタンパク質（例えば、ケモカイン）の発現を活性化することにおいて）のいずれかで、上記の抗原および免疫原に対する増殖している細胞または組織の免疫原性および/または抗原性を増強する際に有用である。

10

## 【0741】

（心臓血管障害）

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）をコードする、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストもしくはアンタゴニストを使用して、四肢虚血のような末梢動脈疾患を含む、心臓血管の疾患、障害、および/または状態を、処置、予防、および/または診断し得る。

20

## 【0742】

心臓血管の疾患、障害、および/または状態としては、動脈瘤（arterio-arterial fistula）、動静脈瘤、大脳動静脈先天異常、先天性心欠陥（congenital heart defects）、肺動脈弁閉鎖症、およびシミター症候群のような、心臓血管異常が挙げられる。先天性心欠陥としては、大動脈縮窄、三房心、冠状脈管奇形（coronary vessel anomalies）、交差心、右胸心、開存性動脈管（patent ductus arteriosus）、エプスタイン奇形、アイゼンメンガー複合体、左心室発育不全症候群、左胸心、ファロー四徴症、大血管転位症、両大血管右室起始症、三尖弁閉鎖症、動脈管遺残、および心中隔欠損症（heart septal defects）（例えば、大動脈肺動脈中隔欠損症（aortopulmonary septal defect）、心内膜床欠損症、リュタンバッシュ症候群、ファロー三徴症、心室心中隔欠損症（ventricular heart septal defects））が挙げられる。

30

## 【0743】

心臓血管の疾患、障害、および/または状態としてはまた、以下のような心臓病が挙げられる：不整脈、カルチノイド心臓病、高心拍出量（high cardiac output）、低心拍出量（low cardiac output）、心タンポナーデ、心内膜炎（細菌性を含む）、心臓動脈瘤、心停止、うっ血性心不全、うっ血性心筋症、発作性呼吸困難、心臓水腫、心肥大、うっ血性心筋症、左心室肥大、右心室肥大、梗塞後心破裂（post-infarction heart rupture）、心室中隔破裂、心臓弁疾患、心筋疾患、心筋虚血、心内膜液浸出、心外膜炎（梗塞性および結核性を含む）、気心膜炎、心膜切開後症候群、右心疾患、リウマチ性心疾患、心室機能不全、充血、心臓血管妊娠合併症（cardiovascular pregnancy complications）、シミター症候群、心血管梅毒、および心血管結核（cardiovascular tuberculosis）。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニストもしくはアンタゴニストは、肺結核症、重篤な細気管支炎、子癇前症または妊娠誘発性高血圧を効果的に処置および/または診断するために、使用され得る。

40

50

## 【0744】

不整脈としては、洞性不整脈、心房性細動、心房粗動、徐脈、期外収縮、アダムズ-ストークス症候群、脚ブロック、洞房ブロック、長QT症候群(long QT syndrome)、副収縮、ローン-ギャング-レヴァイン症候群、マヘム型早期興奮症候群(Mahaim-type pre-excitation syndrome)、ウルフ-パーキンソン-ホワイト症候群、洞不全症候群、頻拍、および心室性細動が挙げられる。頻拍としては、発作性頻拍、上室性頻拍、心室固有調律促進、房室結節性再入頻拍(atrioventricular nodal reentry tachycardia)、異所心房性頻拍、異所接合部頻拍、洞房結節性再入頻拍(sinoatrial nodal reentry tachycardia)、洞性頻拍、トルサード・ポワント、および心室性頻拍が挙げられる。

10

## 【0745】

心臓弁疾患としては、大動脈弁機能不全症、大動脈弁狭窄症、心雑音(heart murmur)、大動脈弁逸脱症、僧帽弁逸脱症、三尖弁逸脱症、僧帽弁機能不全、僧帽弁狭窄症、肺動脈弁閉鎖症、肺動脈弁機能不全、肺動脈弁狭窄症、三尖弁閉鎖症、三尖弁機能不全、および三尖弁狭窄症が挙げられる。

## 【0746】

心筋疾患としては、アルコール性心筋症、うっ血性心筋症、肥大型心筋症、弁下部性大動脈狭撃症、弁下部性肺動脈狭撃症、拘束型心筋症、シャーガス心筋症、心内膜線維弾性症、心内膜心筋線維症、キーンズ症候群、心筋再灌流障害、および心筋炎が挙げられる。

20

## 【0747】

心筋性虚血としては、狭心症、冠動脈瘤、冠動脈硬化、冠動脈血栓症、冠動脈血管痙攣、心筋梗塞、および心筋気絶(myocardial stunning)のような、冠動脈疾患が挙げられる。

## 【0748】

心臓血管疾患としてはまた、以下のような血管疾患が挙げられる：動脈瘤、血管形成異常、血管腫症、細菌性血管腫症状、ヒッペル-リンダウ疾患(Hippel-Lindau Disease)、クリベル-トルノー-ウェーバー症候群、スタージ-ウェーバー症候群、血管運動神経性水腫、大動脈疾患、高安動脈炎、大動脈炎、ルリーシュ症候群、動脈閉塞疾患、動脈炎、動脈内膜炎(enarteritis)、結節性多発性動脈炎、脳血管の疾患、脳血管の障害、および/もしくは脳血管の状態、糖尿病性血管障害、糖尿病性網膜症、塞栓症、血栓症、先端紅痛症、痔、肝静脈閉塞病、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管障害、静脈炎、肺静脈閉塞病、高血圧、低血圧、虚血、末梢血管疾患、静脈炎、肺静脈閉塞病、レーノー病、CREST症候群、網膜静脈閉塞、シミター症候群、上大静脈症候群、毛細血管拡張症、毛細血管拡張性運動失調(ataxia telangiectasia)、遺伝性出血性毛細管拡張症、精索静脈瘤、拡張蛇行静脈、静脈瘤性潰瘍、脈管炎、および静脈機能不全。

30

## 【0749】

動脈瘤としては、解離性動脈瘤、偽動脈瘤、感染した動脈瘤、破裂した動脈瘤、大動脈性動脈瘤、大脳性動脈瘤、冠動脈瘤、心動脈瘤、および腸骨動脈瘤が挙げられる。

40

## 【0750】

動脈閉塞疾患としては、動脈硬化症、間欠性跛行、頸動脈狭窄症、線維筋性形成異常、腸間膜性血管閉塞、モヤモヤ病、腎動脈閉塞、網膜動脈閉塞、および閉塞性血栓性血管炎が挙げられる。

## 【0751】

脳血管の疾患、障害、および/または状態としては、頸動脈疾患、脳のアミロイドアンギオパチー、大脳動脈瘤、大脳無酸素症、大脳動脈硬化、大脳動静脈先天異常、大脳動脈疾患、大脳の塞栓症および血栓症、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、大脳出血、硬膜上血腫、硬膜下血腫、クモ膜下出血(subarachnoid hemorrhage)、大脳梗塞、大脳虚血(一過性を含む)、鎖骨下動脈盗血症候群、室周白

50

軟化症 (periventricular leukomalacia)、血管性頭痛、群発性頭痛、片頭痛、および椎骨基部 (vertebrobasilar) 機能不全が挙げられる。

【0752】

塞栓症としては、空気塞栓症、羊水塞栓症、コレステロール塞栓症、爪先チアノーゼ症候群、脂肪塞栓症、肺動脈塞栓症、および血栓塞栓症が挙げられる。血栓症としては、冠状動脈血栓症、肝静脈血栓症、網膜静脈閉塞、頸動脈血栓症、洞血栓症、ヴァレンベルク症候群、および血栓性静脈炎が挙げられる。

【0753】

虚血としては、大脳虚血、虚血性大腸炎、仕切り症候群 (compartment syndrome)、前仕切り症候群 (anterior compartment syndrome)、心筋虚血、再灌流傷害、および末梢四肢虚血が挙げられる。脈管炎としては、大動脈炎、動脈炎、ベーチェット (Behcet) 症候群、チャージ-ストラウス症候群、粘膜皮膚リンパ節症候群、閉塞性血栓性血管炎、過敏性血管炎、シェーンライン-ヘーノホ紫斑病 (Schoenlein-Henoch purpura)、アレルギー性皮膚血管炎およびヴェーゲナー肉芽腫症が挙げられる。Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、ならびに/またはこれに対するアゴニストもしくはアンタゴニストは、巨細胞性動脈炎およびヴェーゲナー肉芽腫症のような脈管炎の処置または診断に効果的である。

10

【0754】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド、またはGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のアゴニストもしくはアンタゴニストは、危険な四肢虚血および冠動脈疾患の処置に特に有効である。

20

【0755】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドは、当該分野で公知の任意の方法を使用して投与され得、この方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：送達部位での直接の針注入、静脈内注射、局所投与、カテーテル注入、バイオリスティック注入器、粒子加速器、ゲルフォームスポンジデポ、他の市販のデポ物質、浸透圧ポンプ、経口固体薬学的処方物または坐剤固体薬学的処方物、手術の間のデカンティングまたは局所適用、エアロゾル送達。このような方法は、当該分野で公知である。Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドは、以下により詳細に記載される、治療剤の一部として投与され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドを送達する方法が、本明細書中により詳細に記載される。

30

【0756】

(糖質代謝障害の処置)

特定の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/あるいはこれらのポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニスト (抗体を含む)、ならびにそれらのポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストのフラグメントおよび改変体が、異常なグルコース代謝または細胞中への異常なグルコース取込みに関係する、疾患および障害を、診断、予後判定、処置、予防、または軽減するために使用され得る。

40

【0757】

特定の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/あるいはそのアゴニストおよび/またはアンタゴニストが、I型糖尿病 (インスリン依存性糖尿病、IDDM) を診断、予後判定、処置、予防、または軽減するために使用され得る。

【0758】

別の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/あるいはそのアゴニストおよび/またはアンタゴニストが、II型糖尿病 (インスリン抵抗性糖尿病、IDDM) を診断、予後判定、処置、予防、または軽減す

50

るために使用され得る。

【0759】

さらに、他の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/あるいはそのアンタゴニスト（特に、中和抗体または拮抗抗体）が、（I型またはII型）糖尿病に関係する状態を診断、予後判定、処置、予防、または軽減するために使用され得、このような状態としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：糖尿病性ケトアシドーシス、糖尿病性昏睡、高浸透圧性高血糖性非ケトン性昏睡、発作、精神性錯乱、嗜眠状態、心臓血管疾患（例えば、心臓病、アテローム性動脈硬化症、微小血管疾患、高血圧、発作、ならびに「心臓血管障害」の節において記載されるような他の疾患および障害）、異脂肪血症（*dyslipidemia*）、腎臓疾患（例えば、腎不全および腎症）、神経損傷、腎症、視覚障害（例えば、糖尿病性網膜症および失明）、潰瘍および創傷治癒減損（*impaired wound healing*）、感染（例えば、「感染性疾患」の節に記載されるような感染性の疾患および状態、特に、尿路および皮膚の感染性疾患）、手根管症候群およびデュブユイトラン拘縮。

10

【0760】

他の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストが、動物（好ましくは哺乳動物、そして特に好ましくはヒト）に、その動物の重量を調節するために投与される。特定の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストが、動物（好ましくは哺乳動物、そして特に好ましくはヒト）に、インスリンを含む生化学経路を調節することによってその動物の重量を制御するために投与される。なお他の実施形態において、この遺伝子に対応するポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、および/あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストが、動物（好ましくは哺乳動物、そして特に好ましくはヒト）に、インスリン様増殖因子を含む生化学経路を調節することによってその動物の重量を調節するために投与される。

20

【0761】

（抗新脈管形成活性）

新脈管形成の内因性の、刺激因子とインヒビターとの間の天然に存在する平衡は、阻害影響が優勢である平衡である。Rastinejadら、*Cell* 56:345~355 (1989)。新生血管形成が正常な生理学的条件下において生じるまれな場合（例えば、創傷治癒、器官再生、胚発生、および雌性生殖プロセス）において、新脈管形成は、厳密に調節され、そして空間的および時間的に定められる。病的な新脈管形成の条件（例えば、固形腫瘍増殖を特徴付ける）の下において、これらの調節の制御はできない。調節されていない新脈管形成は病的になり、そして多くの新生物性疾患および非新生物性疾患の進行を維持する。多くの重篤な疾患は、固形腫瘍の増殖および転移、関節炎、いくつかの型の眼の疾患、障害および/または状態ならびに乾癬を含む、異常な新生血管形成により支配される。例えば、Mosesら、*BioTech* 9:630~634 (1991)；Folkmanら、*N. Engl. J. Med.*、333:1757~1763 (1995)；Auerbachら、*J. Microvasc. Res.* 29:401~411 (1985)；Folkman、*Advances in Cancer Research*、KleinおよびWeinhouse編、Academic Press、New York、175~203頁 (1985)；Patz、*Am. J. Ophthalmol.* 94:715~743 (1982)；およびFolkmanら、*Science* 221:719~725 (1983)による概説を参照のこと。多くの病的状態において、新脈管形成のプロセスは、その疾患状態に寄与する。例えば、固形腫瘍の増殖が新脈管形成に依存することを示唆する有意なデータが蓄積されている。FolkmanおよびKlagsbrun、*Science* 235:442~447 (1987)。

30

40

【0762】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、ならびに本発明の

50

アゴニストまたはアンタゴニストの投与による新生血管形成に関連する疾患、障害および/または状態の処置を提供する。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド、またはアゴニストもしくはアンタゴニストを用いて処置し得る悪性状態および転移性状態には、本明細書に記載の悪性疾患、固形腫瘍、および癌、ならびに当該分野で公知の他のもの（このような障害の総説については、Fishmanら、*Medicine*、第2版、J. B. Lippincott Co., Philadelphia (1985)を参照のこと）が挙げられるが、これらに限定されない。従って、本発明は、新脈管形成関連疾患および/または障害の処置の方法を提供し、この方法は、治療有効量の、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを、その処置の必要な個体に投与する工程を包含する。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、癌または腫瘍を治療的に処置するかまたは予防するために、種々のさらなる方法で利用され得る。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストで処置、予防および/または診断され得る癌としては、前立腺癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、膵臓癌、喉頭癌、食道癌、精巣癌、肝臓癌、耳下腺癌、胆管癌、結腸癌、直腸癌、頸部癌、子宮癌、子宮内膜癌、腎臓癌、膀胱癌、甲状腺癌を含む、固形腫瘍；原発性腫瘍および転移；黒色腫；神経膠芽細胞腫；カポジ肉腫；平滑筋肉腫；非小細胞肺癌；結腸直腸癌；進行性(advanced)悪性疾患；および血液から生じる腫瘍（例えば、白血病）が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、皮膚癌、頭部および頸部の腫瘍、乳房腫瘍およびカポジ肉腫のような、癌を処置または予防するために、局所送達され得る。

#### 【0763】

なお他の局面において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、例えば膀胱内投与によって膀胱癌の表面形態を処置、予防および/または診断するために利用され得る。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、腫瘍に直接的に、または注射もしくはカテーテルを介して腫瘍部位付近に、送達され得る。当然のことながら、当業者が理解するように、適切な投与様式は、処置されるべき癌によって変化する。他の送達様式は本明細書中において議論される。

#### 【0764】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、癌に加えて、新脈管形成に関与する他の疾患、障害および/または状態を処置する際に有用であり得る。これらの疾患、障害および/または状態としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：良性腫瘍（例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫）；動脈硬化プラーク；眼の脈管形成疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖、ルベオシス、網膜芽細胞腫、ブドウ膜炎(uvietis)および眼の翼状片(Pterygia)（異常な血管増殖））；慢性関節リウマチ；乾癬；遅延型創傷治癒；子宮内膜症；脈管形成；顆粒化；過形成性癬痕(ケロイド)；偽関節骨折；強皮症；トラコーマ；血管接着；心筋の新脈管形成；冠状側副枝(coronary collaterals)；大脳側副枝；動静脈奇形；虚血性四肢新脈管形成；オスラー-ウェーバー(Osler-Weber)症候群；プラーク新生血管形成；毛細血管拡張症；血友病性関節；血管線維腫；線維筋性形成異常；創傷顆粒化；クローン病；およびアテローム性動脈硬化症。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、乾癬を処置するのに有用であり得る。

#### 【0765】

例えば、本発明の1つの局面において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを過形成性癬痕またはケロイドに投与する工程を包含する、過形成性癬痕およびケロイドを処置するための方法が提供される。

#### 【0766】

例えば、本発明の1つの局面において、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを過形成性癬痕またはケロイドに投与する工程を包含する、過形成性癬痕およびケロイドを処置するための方法が提供される。

本発明の1つの実施形態において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストは、過形成性癬痕またはケロイドに、これらの病変の進行を妨げるために直接注射される。この治療は、過形成性癬痕およびケロイド（例えば、やけど）の発生を生じることが知られている状態の予防処置において特に価値があり、そして好ましくは、増殖期が進行する時間（最初の傷害の約14日後）を有した後であるが、過形成性癬痕またはケロイドの発生の前に開始される。上述のように、本発明はまた、眼の新生血管形成疾患（例えば、角膜新生血管形成、血管新生緑内障、増殖性糖尿病網膜症、水晶体後線維増殖および黄斑変性を含む）を処置するための方法を提供する。

#### 【0767】

さらに、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド（アゴニストおよび/またはアンタゴニストを含む）を用いて処置、予防および/または診断され得る新生血管形成に関連する眼の疾患、障害および/または状態としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血管新生緑内障、糖尿病網膜症、網膜芽細胞腫、水晶体後線維増殖症、ブドウ膜炎、未熟児網膜症、黄斑変性、角膜移植新生血管形成、ならびに他の眼の炎症性疾患、眼の腫瘍、および脈絡膜または虹彩の新生血管形成に関連する疾患。例えば、Waltramら、Am. J. Ophthalmol. 85: 704~710 (1978) および Gartnerら、Surv. Ophthalmol. 22: 291~312 (1978) による総説を参照のこと。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチド、ならびにそのアゴニストもしくはアンタゴニストは、急性前部ブドウ膜炎および急性中間部ブドウ膜炎を効果的に処置し得る。

#### 【0768】

従って、本発明の1つの局面において、治療有効量の化合物（上記）を患者に対して、血管の形成が阻害されるように角膜に投与する工程を包含する、角膜新生血管形成（角膜移植新生血管形成を含む）のような眼の新生血管形成疾患を処置するための方法が、提供される。簡潔には、角膜は、通常には血管を欠く組織である。しかし、特定の病的状態において、毛細血管が、縁の角膜周囲脈管叢から角膜に伸長し得る。角膜が血管化する場合、角膜はまた混濁するようになり、患者の視力の衰えを生じる。角膜が完全に不透明になる（opaque）場合に、視力喪失が完全になり得る。広範な種々の疾患、障害および/または状態が、例えば、以下を含む角膜新生血管形成を生じ得る：角膜感染（例えば、トラコーマ、単純ヘルペス角膜炎、リーシュマニア症およびオンコセルカ症）、免疫学的プロセス（例えば、移植片拒絶およびスティーヴンズ-ジョンソン症候群）、アルカリやけど、外傷、炎症（任意の原因による）、毒性および栄養欠乏状態、ならびにコンタクトレンズを装着することの合併症として。

#### 【0769】

特に好ましい実施形態において、本発明は、生理食塩水（眼に用いる調製物において一般に使用される任意の保存剤および抗菌剤と組合せて）中で局所投与のために調製され得、そして点眼剤形態で投与され得る。溶液または懸濁液は、その純粋な形態で調製され得、そして1日に数回投与され得る。あるいは、上記のように調製される抗脈管形成組成物はまた、角膜に直接投与され得る。好ましい実施形態において、抗脈管形成組成物は、角膜に結合する粘膜炎接着性ポリマーとともに調製される。さらなる実施形態において、抗脈管形成因子または抗脈管形成組成物は、従来のステロイド治療に対する補助剤として利用され得る。局所治療はまた、脈管形成応答（例えば、化学的やけど）を誘導する高い可能性を有することが公知である角膜病変において予防的に有用であり得る。これらの場合において、処置（おそらくステロイドと組み合わせられる）は、その後の合併症を予防するのに補助するために直ちに開始され得る。

#### 【0770】

他の実施形態において、上記の化合物は、角膜支質に直接、顕微鏡の案内の下で眼科医によって注入され得る。好ましい注射部位は、個々の病巣の形態で変化し得るが、投与の目標は、脈管構造の前進している面に組成物を置くこと（すなわち、血管と正常な角膜との間に分散される）である。ほとんどの場合において、これは、前進している血管から角

10

20

30

40

50

膜を「防御」するための縁周囲 (peri-lim-bic) 角膜注射を含む。この方法はまた、角膜新生血管形成を予防的に防ぐために、角膜傷害の直後に利用され得る。この状況において、この物質は、角膜病巣とその所望されない潜在的な血液供給の縁との間に分散して縁周囲角膜に注射され得る。このような方法はまた、類似の様式で、移植された角膜の毛細血管浸潤を予防するために利用され得る。徐放形態において、注入は、1年に2~3回のみ必要とされ得る。ステロイドもまた、注入溶液に添加され、その注射自体から生じる炎症を低減し得る。

#### 【0771】

本発明の別の局面において、患者に、血管の形成を阻害するように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、血管新生緑内障を処置するための方法が提供される。1つの実施形態において、化合物は、初期の形態の血管新生緑内障を処置または予防するために、眼に局所投与され得る。他の実施形態において、化合物は、前方角 (anterior chamber angle) の領域に注入によって移植され得る。他の実施形態において、化合物はまた、化合物が眼房水に連続的に放出されるように、任意の位置に置かれ得る。本発明の別の局面において、患者に、血管の形成が阻害されるように、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、増殖性糖尿病性網膜症を処置するための方法が提供される。

10

#### 【0772】

本発明の特に好ましい実施形態において、増殖性糖尿病性網膜症は、網膜におけるポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストの局所濃度を増加させるために、眼房水または硝子体への注入によって処置され得る。好ましくは、この処置は、光凝固を必要とする重篤な疾患の獲得の前に開始されるべきである。

20

#### 【0773】

本発明の別の局面において、血管の形成が阻害されるように、患者に、治療有効量のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アンタゴニストおよび/またはアゴニストを眼に投与する工程を包含する、水晶体後線維増殖症を処置するための方法が、提供される。化合物は、硝子体内注射を介して、および/または眼内移植物を介して、局所投与され得る。

#### 【0774】

さらに、このポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストで処置され得る疾患、障害および/または状態としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：血管腫、関節炎、乾癬、血管線維腫、アテローム性動脈硬化症性プラーク、遅延型創傷治癒、顆粒化、血友病性関節、過形成性癒痕、偽関節骨折、オースラー-ウェーバー (Osler-Weber) 症候群、化膿性肉芽腫、強皮症、トラコーマ、および血管接着。

30

#### 【0775】

さらに、このポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストで処置され得る疾患、障害および/または状態ならびに/あるいは状況としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：固形腫瘍、血液由来の (blood born) 腫瘍 (例えば、白血病)、腫瘍転移、カポジ肉腫、良性腫瘍 (例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫)、慢性関節リウマチ、乾癬、眼の脈管形成疾患 (例えば、糖尿病性網膜症、未熟網膜症、黄斑変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ルベオーシス、網膜芽細胞腫、およびブドウ膜炎 (uvectis))、遅延型創傷治癒、子宮内膜症、脈管形成、顆粒化、過形成性癒痕 (ケロイド)、偽関節骨折、強皮症、トラコーマ、血管接着、心筋の新脈管形成、冠状側副枝 (coronary collaterals)、大脳側副枝、動静脈奇形、虚血性四肢新脈管形成、オースラー-ウェーバー症候群、プラーク新生血管形成、毛細血管拡張症、血友病性関節、血管線維腫、線維筋性形成異常、創傷顆粒化、クローン病、アテローム性動脈硬化症、産児制限薬剤 (月経を制御する、胎芽着床のために必要な血管新生を予防することによる)、病原性の結果 (例えば、ネコ引っかき病 (Rochelle minimal

40

50

ia quintosa)、潰瘍(Helicobacter pylori)、バルトネラ症および細菌性血管腫症状)のような新脈管形成を有する疾患。

【0776】

産児制限方法の1つの局面において、胎芽着床をブロックするに十分な化合物の量が、性交および受精が起こる前またはその後に投与され、そのようにして産児制限の有効な方法、おそらく「事後用(morning after)」方法を提供する。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストはまた、月経を制御することにおいて使用され得るか、または子宮内膜症の処置における腹膜洗浄液としてかもしくは腹膜移植のためのいずれかで、投与され得る。

【0777】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストは、縫合(stitch)肉芽腫を予防するために、外科縫合系に組み込まれ得る。

【0778】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストは、広範な種々の外科手順において利用され得る。例えば、本発明の1つの局面において、組成物(例えば、スプレーまたはフィルムの形態において)は、悪性組織から正常な周囲の組織を分離するため、そして/または周囲の組織への疾患の広がりを予防するために、腫瘍の除去の前に、領域をコートまたはスプレーするために利用され得る。本発明の他の局面において、組成物(例えば、スプレーの形態において)は、腫瘍をコートするため、または所望の場所において新脈管形成を阻害するために、内視鏡手順を介して送達され得る。本発明のなお他の局面において、本発明の抗脈管形成組成物でコートされている外科メッシュが、外科メッシュが利用され得る任意の手順において利用され得る。例えば、本発明の1つの実施形態において、抗脈管形成組成物を有した外科メッシュレーデン(laden)は、構造に対する支持を提供するため、そして一定の量の抗脈管形成因子を放出するために、腹部癌切除手術の間(例えば、結腸切除の後)に利用され得る。

【0779】

本発明のさらなる局面において、癌の局所的再発およびその部位での新しい血管の形成が阻害されるように、切除後にポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストを腫瘍の切除縁に投与する工程を包含する、腫瘍切除部位を処置するための方法が提供される。本発明の1つの実施形態において、抗脈管形成化合物は、腫瘍切除部位に直接投与される(例えば、塗布、ブラッシング(brushing)、または他の方法で抗脈管形成化合物で腫瘍の切除縁をコートすることによって適用される)。あるいは、抗脈管形成化合物は、投与前に公知の外科ペーストに組み込まれ得る。本発明の特に好ましい実施形態において、抗脈管形成化合物は、悪性疾患についての肝切除後および神経外科手術後に適用される。

【0780】

本発明の1つの局面において、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストは、広範な種々の腫瘍(例えば、乳房腫瘍、結腸腫瘍、脳腫瘍および肝腫瘍を含む)の切除縁に投与され得る。例えば、本発明の1つの実施形態において、抗脈管形成化合物は、切除後に、神経学的腫瘍の部位に、その部位での新しい血管の形成が阻害されるように投与され得る。

【0781】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、アゴニストおよび/またはアンタゴニストはまた、他の抗脈管形成因子とともに投与され得る。他の抗脈管形成因子の代表的な例としては以下が挙げられる: 抗侵襲性因子、レチノイン酸およびその誘導体、バクリタキセル、スラミン、メタロプロテイナーゼ-1の組織インヒビター、メタロプロテイナーゼ-2の組織インヒビター、プラスミノゲン活性化インヒビター-1、プラスミノゲン活性化インヒビター-2および種々の形態のより軽い「d群」遷移金属。

【0782】

より軽い「d群」遷移金属には、例えばバナジウム、モリブデン、タングステン、チタ

10

20

30

40

50

ン、ニオブおよびタンタル種が挙げられる。そのような遷移金属種は、遷移金属錯体を形成し得る。上記の遷移金属種の適切な錯体としては、オキソ遷移金属錯体が挙げられる。

【0783】

バナジウム錯体の代表的な例としては、バナデート錯体およびバナジル錯体のような、オキソバナジウム錯体が挙げられる。適切なバナデート錯体としては、例えばメタバナジン酸アンモニウム、メタバナジン酸ナトリウムおよびオルトバナジン酸ナトリウムのような、メタバナデート錯体およびオルトバナデート錯体が挙げられる。適切なバナジル錯体としては、例えば、バナジリアセチルアセトネートおよび硫酸バナジル（硫酸バナジルー水和物および硫酸バナジル三水和物のような、硫酸バナジル水和物を含む）が挙げられる。

10

【0784】

タングステン錯体およびモリブデン錯体の代表的な例としてはまた、オキソ錯体が挙げられる。適切なオキソタングステン錯体としては、タングステート錯体およびタングステンオキシド錯体が挙げられる。適切なタングステート錯体としては、タングステン酸アンモニウム、タングステン酸カルシウム、タングステン酸ナトリウム二水和物およびタングステン酸が挙げられる。適切なタングステンオキシドとしては、タングステン（IV）オキシドおよびタングステン（VI）オキシドが挙げられる。適切なオキソモリブデン錯体としては、モリブデート、モリブデンオキシドおよびモリブデニル錯体が挙げられる。適切なモリブデート錯体としては、モリブデン酸アンモニウムおよびその水和物、モリブデン酸ナトリウムおよびその水和物、ならびにモリブデン酸カリウムおよびその水和物が挙げられる。適切なモリブデンオキシドとしては、モリブデン（VI）オキシド、モリブデン（VI）オキシドおよびモリブデン酸が挙げられる。適切なモリブデニル錯体としては、例えばモリブデニリアセチルアセトネートが挙げられる。他の適切なタングステン錯体およびモリブデン錯体としては、例えばグリセロール、酒石酸および糖由来の、ヒドロキソ誘導体が挙げられる。

20

【0785】

広範な種々の他の抗脈管形成因子もまた、本発明の状況において利用され得る。代表的な例としては、以下が挙げられる：血小板因子4；硫酸プロタミン；硫酸化キチン誘導体（クイーンクラブ（queen crab）の殻から調製される）（Murataら、Cancer Res. 51: 22~26、1991）；硫酸化多糖ペプチドグリカン複合体（SP-PG）（この化合物の機能は、ステロイド（例えば、エストロゲン）およびクエン酸タモキシフェンの存在によって、増強され得る）；スタウロスポリン；基質代謝の調節因子（例えば、プロリンアナログ、シスヒドロキシプロリン、d, L-3, 4-デヒドロプロリン、チアプロリン、 $\alpha$ -ジピリジル、アミノプロピオニトリルマレートを含む）；4-プロピル-5-(4-ピリジニル)-2(3H)-オキサゾロン；メトトレキサート；ミトザントロン；ヘパリン；インターフェロン；2マクログロブリン-血清；ChIMP-3（Pavloffら、J. Bio. Chem. 267: 17321~17326、1992）；キモスタチン（Tomkinsonら、Biochem J. 286: 475~480、1992）；シクロデキストリンテトラデカサルフェート；エボネマイシン；カンプトテシン；フマギリン（Ingberら、Nature 348: 555~557、1990）；チオリンゴ酸金ナトリウム（「GST」；MatsubaraおよびZiff、J. Clin. Invest. 79: 1440~1446、1987）；抗コラゲナーゼ-血清；2-抗プラスミン（Holmesら、J. Biol. Chem. 262(4): 1659~1664、1987）；ピサントレン（National Cancer Institute）；ロベンザリット二ナトリウム（N-(2)-カルボキシフェニル-4-クロロアントロニル酸（chloroanthronilic acid）二ナトリウム、すなわち「CCA」；Takeuchiら、Agents Actions 36: 312~316、1992）；サリドマイド；Angostatidステロイド；AGM-1470；カルボキシアミノイミダゾール（carboxyaminolimidazole）；およびメタロプロテインナーゼインヒビター（例えば、

30

40

50

BB94)。

【0786】

(結合活性)

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドは、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に結合する分子、またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)が結合する分子についてスクリーニングするために使用され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)とこの分子との結合は、結合したGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはその分子の活性を活性化(アゴニスト)、増大、阻害(アンタゴニスト)、または減少させ得る。そのような分子の例としては、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質(例えば、レセプター)、または低分子が挙げられる。

10

【0787】

好ましくは、この分子は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の天然のリガンド(例えば、リガンドのフラグメント)、または天然の基質、リガンド、構造的模倣物、もしくは機能的模倣物に密接に関連する(Coliganら、Current Protocols in Immunology 1(2):第5章(1991)を参照のこと)。同様に、この分子は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)が結合する天然のレセプター、または少なくとも、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)によって結合され得るレセプターのフラグメント(例えば、活性部位)に密接に関連し得る。いずれの場合においても、この分子は、公知の技術を用いて合理的に設計され得る。

20

【0788】

好ましくは、これらの分子についてのスクリーニングは、分泌タンパク質としてかまたは細胞膜上のいずれかでGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を発現する適切な細胞を産生する工程を包含する。好ましい細胞としては、哺乳動物由来の細胞、酵母由来の細胞、Drosophila由来の細胞、またはE.coli由来の細胞が挙げられる。次いで、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を発現する細胞(または、発現されたポリペプチドを含む細胞膜)を、好ましくは、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはこの分子のいずれかの結合、活性の刺激、または活性の阻害を観察するために、分子を潜在的に含む試験化合物と接触させる。

30

【0789】

このアッセイは、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)への候補化合物の結合を単純に試験し得、ここで結合は、標識によって、または標識された競合物との競合を含むアッセイにおいて検出される。さらに、このアッセイは、候補化合物がGタンパク質ケモカインレセプターへの結合によって生成されるシグナルを生じるか否かを試験し得る。

【0790】

あるいは、アッセイは、無細胞調製物、固体支持体に付着されたポリペプチド/分子、化学物質ライブラリー、または天然産物の混合物を用いて実施され得る。アッセイはまた、候補化合物を、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を含む溶液と混合する工程、Gタンパク質ケモカインレセプター/分子の活性または結合を測定する工程、およびGタンパク質ケモカインレセプター/分子の活性または結合を、標準と比較する工程を単純に包含し得る。

40

【0791】

好ましくは、ELISAアッセイが、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いて、サンプル(例えば、生物学的サンプル)におけるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のレベルまたは活性を測定し得る。抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)への直接的もしくは間接的のいずれかの結合、または基質についてのGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)との競合によって、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のレベルまたは活性を測定し得る。

【0792】

50

さらに、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)が結合するレセプターは、当業者に公知の多くの方法(例えば、リガンドパニングおよびFACSソーティング(Coliganら、Current Protocols in Immun., 1(2)、第5章(1991))によって同定され得る。例えば、発現クローニングが、ポリアデニル化RNAがこのポリペプチドに应答する細胞から調製される場合に用いられ、例えば、NIH3T3細胞(これは、FGFファミリータンパク質に対する複数のレセプターを含むことが公知である)、およびSC-3細胞、およびこのRNAから作製されたcDNAライブラリーは、プールに分けられ、そしてこのポリペプチドに应答性でないCOS細胞または他の細胞をトランスフェクトするために使用される。ガラススライド上で増殖されたトランスフェクトされた細胞が、それらを標識化した後に、本発明のポリペプチドに曝露される。このポリペプチドは、種々の手段(部位特異的プロテインキナーゼに対する認識部位のヨウ素化または包含を含む)によって標識され得る。

10

## 【0793】

固定化およびインキュベーション後、スライドは、オートラジオグラフィ分析に供される。陽性プールを同定し、そしてサブプールを、反復性のサブプール化および再スクリーニングプロセスを使用して調製および再びトランスフェクトして、最終的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生じる。

## 【0794】

レセプター同定のための代替のアプローチとして、標識ポリペプチドは、レセプター分子を発現する調製物を、細胞膜と光親和性連結し得るか、または抽出し得る。架橋された材料は、PAGE分析によって分離され、そしてX線フィルムに曝露される。ポリペプチドのレセプターを含む標識複合体が切り出され得、ペプチドフラグメントへと分離され得、そしてタンパク質微量配列決定に供され得る。微量配列決定から得られるアミノ酸配列を使用して、1組の縮重オリゴヌクレオチドプローブを設計してcDNAライブラリーをスクリーニングし、推定レセプターをコードする遺伝子を同定する。

20

## 【0795】

さらに、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エキソンシャッフリング、および/またはコドンシャッフリングの技術(集合的に「DNAシャッフリング」という)を利用して、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の活性を調節し得、それによってGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストおよびアンタゴニストを効果的に生成し得る。一般に、米国特許第5,605,793号、同第5,811,238号、同第5,830,721号、同第5,834,252号、および同第5,837,458号、ならびにPatton, P.A.ら、Curr. Opin. Biotechnol. 8:724~33(1997); Harayama, S. Trends Biotechnol. 16(2):76~82(1998); Hansson, L.O.ら、J. Mol. Biol. 287:265~76(1999); ならびにLorenzo, M.M.およびBlasco, R. Biotechniques 24(2):308~13(1998)(これらの特許および刊行物の各々は、本明細書において参考として援用される)を参照のこと。1つの実施態様において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドの変更は、DNAシャッフリングによって達成され得る。DNAシャッフリングは、相同組換えまたは部位特異的な組換えにより、2つ以上のDNAセグメントを、所望のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)分子へと構築することを含む。別の実施態様において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドおよび対応するポリペプチドは、組換えの前に、エラープローンPCR、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法によるランダム変異誘発に供することによって、変更され得る。別の実施態様において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどは、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、フラグメントなどと組換えられ得る。好ましい実施態様において、この異種分子は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ファミリーのメンバーで

30

40

50

ある。さらに好ましい実施態様において、この異種分子は、例えば、血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン様増殖因子 (IGF-I)、トランスホーミング増殖因子 (TGF- $\beta$ )、表皮増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、TGF- $\beta$ 、骨形成タンパク質 (BMP)-2、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、アクチビンAおよびアクチビンB、デカペンタプレジック (decapentaplegic) (dpp)、60A、OP-2、ドーサリン (dorsalin)、増殖分化因子 (GDF)、ノダル (nodal)、MIS、インヒビン- $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TGF- $\beta$ 5、および神経膠由来神経栄養因子 (GDNF) のような、増殖因子である。

【0796】

他の好ましいフラグメントは、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の生物学的に活性なフラグメントである。生物学的に活性なフラグメントは、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドの活性に類似の活性するが必ずしも同一ではない活性を示す、フラグメントである。このフラグメントの生物学的活性は、改善された所望の活性、または減少した所望されない活性を含み得る。

【0797】

さらに、本発明は、本発明のポリペプチドの作用を調節する化合物を同定するために化合物をスクリーニングする方法を提供する。このようなアッセイの例は、線維芽細胞が通常増殖する場合、哺乳動物線維芽細胞、本発明のポリペプチド、スクリーニングされる化合物および<sup>3</sup>[H]チミジンを、細胞培養条件下で合わせる工程を包含する。コントロールアッセイは、スクリーニングされる化合物の非存在下で実施され得、そしてこの化合物の存在下での線維芽細胞の増殖の量と比較して、各々の場合における<sup>3</sup>[H]チミジンの取り込みの決定によって、この化合物が増殖を刺激するか否かを決定し得る。線維芽細胞の増殖の量は、<sup>3</sup>[H]チミジンの取り込みを測定する液体シンチレーションクロマトグラフィーによって測定される。アゴニスト化合物およびアンタゴニスト化合物の両方が、この手順により同定され得る。

【0798】

別の方法において、本発明のポリペプチドに対するレセプターを発現する哺乳動物細胞または膜調製物は、この化合物の存在下において標識化した本発明のポリペプチドとともにインキュベートされる。次いで、この化合物がこの相互作用を増強またはブロックする能力が、測定され得る。あるいは、スクリーニングされる化合物の相互作用に従う既知のセカンドメッセンジャー系の応答およびGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) が測定され、そしてこの化合物がこのレセプターを結合し、そしてセカンドメッセンジャー応答を誘発する能力を測定して、この化合物が潜在的なアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する。このようなセカンドメッセンジャー系には、cAMPグアニル酸シクラーゼ、イオンチャネルまたはホスホイノシチド加水分解が挙げられるが、これらに限定されない。

【0799】

これらの上記のアッセイの全ては、診断マーカーまたは予後マーカーとして使用され得る。これらのアッセイを用いて発見される分子は、ポリペプチド/分子を活性化または阻害することによって、疾患を処置、予防、および/または診断するか、または患者における特定の結果 (例えば、血管増殖) をもたらすために使用され得る。さらに、アッセイは、適切に操作された細胞または組織からの本発明のポリペプチドの産生を阻害または増強し得る因子を発見し得る。従って、本発明は、以下の工程を含むGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) に結合する化合物を同定する方法を包含する：(a) 候補結合化合物をGタンパク質ケモカインレセプターとともにインキュベートする工程；および(b) 結合が生じたか否かを決定する工程。さらに、本発明は、以下の工程を含むアゴニスト/アンタゴニストを同定する方法を包含する：(a) 候補化合物をGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) とともにインキュベートする工程、(b) 生物学的活性をアッセイする工程、および(b) 生物学的活性をアッセイして、Gタンパク質ケモカインレセ

10

20

30

40

50

ブター (CCR5) の生物学的活性が改変されているか否かを決定する工程。

【0800】

また、図3および表1に開示される プリーツシート領域を使用することによって、実験的にGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) を結合する分子を同定し得る。従って、本発明の特定の実施形態は、図3/表1に開示された各々の プリーツシート領域のアミノ酸配列を含むか、あるいはこれらからなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のさらなる実施形態は、図3/表1に開示される プリーツシート領域の任意の組合せまたは全てを含むか、あるいはこれらからなる、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のさらに好ましい実施形態は、図3/表1に開示される各々の プリーツシート領域のGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) アミノ酸配列を含むか、あるいはこれらからなるポリペプチドに関する。本発明のさらなる実施形態は、図3/表1に開示される プリーツシート領域の任意の組合せまたは全てを含むか、あるいはこれらからなる、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドに関する。

10

【0801】

(標的化された送達)

別の実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチドについてのレセプターを発現する標的とされた細胞、または本発明のポリペプチドの細胞結合形態を発現する細胞に、組成物を送達する方法を提供する。

20

【0802】

本明細書中で議論されるように、本発明のポリペプチドまたは抗体は、疎水性相互作用、親水性相互作用、イオン相互作用および/または共有結合相互作用によって、異種ポリペプチド、異種核酸、毒素、またはプロドラッグと会合し得る。1つの実施形態において、本発明は、異種ポリペプチドまたは核酸と会合する本発明のポリペプチド(抗体を含む)を投与することによって、本発明の組成物を細胞に特異的に送達する方法を提供する。1つの例において、本発明は、治療的タンパク質を標的とされた細胞に送達するための方法を提供する。別の例において、本発明は、1本鎖核酸(例えば、アンチセンスまたはリボザイム)または二本鎖核酸(例えば、細胞のゲノムへと組み込まれ得るか、またはエピソームとして複製され得、そして転写され得るDNA)を標的とされた細胞に送達する方法を提供する。

30

【0803】

別の実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチド(例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明の抗体)を、毒素または細胞傷害性プロドラッグと共同して投与することによる、細胞の特異的破壊のため(例えば、腫瘍細胞の破壊)の方法を提供する。

【0804】

「毒素」により、内因性細胞傷害性エフェクター系を結合および活性化させる化合物、放射性同位体、ホロ毒素(holotoxin)、改変毒素、毒素の触媒サブユニット、または細胞死を引き起こす規定された条件下にある細胞に通常は存在しないか、または通常は細胞の表面に存在しない、任意の分子もしくは酵素を意味する。本発明の方法に従って使用され得る毒素としては、当該分野で公知の放射性同位体、例えば、固有もしくは誘導された内因性細胞傷害性エフェクター系を結合する抗体のような化合物(またはその補体固定(fixing)含有部分)、チミジンキナーゼ、エンドヌクレアーゼ、RNase、毒素、リシン、アプリン、Pseudomonas外毒素A、ジフテリア毒素、サポリン(saporin)、モモルジン(momordin)、ゲロニン(gelonin)、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サルシン(sarcin)およびコレラ毒素が挙げられるが、これらに限定されない。「細胞傷害性プロドラッグ」は、細胞に通常存在するが、酵素により細胞傷害性化合物へと変換される非毒性化合物を意味する。本発明の方法に従って使用され得る細胞傷害性プロドラッグは、安息香酸マスタードアルキル化剤のグルタミル誘導體、エトポシドまたはマイトマイシンCのリン酸誘導體、シトシンアラビノシド、ダウノルビシン、およびドキシソルビシンのフェノキシアセトアミド

40

50

誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0805】

(薬物スクリーニング)

本発明のポリペプチドの活性を改変する分子についてスクリーニングするための、本発明のポリペプチド、またはこれらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用が、さらに意図される。このような方法は、本発明のポリペプチドを、アンタゴニストまたはアゴニスト活性を有することが疑われる選択された化合物と接触する工程、および結合後にこれらのポリペプチドの活性をアッセイする工程を含む。

【0806】

本発明は、種々の薬物スクリーニング技術のいずれかにおいて、本発明のポリペプチド、またはそれらの結合フラグメントの使用によって治療用化合物をスクリーニングするために特に有用である。このような試験に利用されるポリペプチドまたはフラグメントは、固体支持体に固定化され得、細胞表面上に発現され得、溶液中で遊離であり得るか、または細胞内に局在化され得る。薬物スクリーニングの1つの方法は、ポリペプチドまたはフラグメントを発現する組換え核酸を用いて安定に形質転換される真核生物宿主細胞または原核生物宿主細胞を利用する。薬物は、競合結合アッセイにおいて、このような形質転換細胞に対してスクリーニングされる。例えば、試験されている薬物と本発明のポリペプチドとの間の複合体の処方物を測定し得る。

10

【0807】

従って、本発明は、本発明のポリペプチドによって媒介される活性に影響を及ぼす薬物または任意の他の因子のためのスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、当該分野で周知の方法によって、このような因子を本発明のポリペプチドもしくはそのフラグメントと接触する工程、およびこの因子とこのポリペプチドもしくはそのフラグメントとの間の複合体の存在についてアッセイする工程を包含する。このような競合結合アッセイにおいて、スクリーニングされる薬物は、代表的に、標識化される。インキュベーションに続いて、遊離の因子は、結合形態中に存在する因子と分離され、そして遊離または複合体化されていない標識の量は、特定の薬剤が本発明のポリペプチドに結合する能力の尺度である。

20

【0808】

薬物スクリーニングのための別の技術は、本発明のポリペプチドに対する適切な結合親和性を有する化合物のための高処理能力スクリーニングを提供し、そして欧州特許出願84/03564(1984年9月13日公開)(これは、本明細書中に参考として援用される)に非常に詳細に記載される。簡潔にいうと、大量の異なる小さなペプチド試験化合物は、固体基材(例えば、プラスチックピンまたはいくつかの他の表面)上で合成される。ペプチド試験化合物は、本発明のポリペプチドと反応され、そして洗浄される。次いで、結合されたポリペプチドは、当該分野で周知の方法によって検出される。精製されたポリペプチドは、前述の薬物スクリーニング技術での使用のためにプレート上に直接被覆される。さらに、非中和抗体を使用して、このペプチドを捕捉し得、そして固体支持体上にそれを固定化し得る。

30

【0809】

本発明はまた、競合薬物スクリーニングアッセイの使用を意図し、ここで、本発明のポリペプチドを結合し得る中和抗体は、ポリペプチドまたはそのフラグメントに対する結合について試験化合物と特異的に競合する。この様式において、抗体を使用して、本発明のポリペプチドと1つ以上の抗原性エピトープを共有する任意のペプチドの存在を検出する。

40

【0810】

従って、ポリペプチドを使用して、レセプター活性を調節する化合物を同定するし得る。レセプタータンパク質ならびに適切な改変体およびフラグメントの両方を、高スループットスクリーニングに使用して、このレセプターに結合する能力に関して候補化合物をアッセイし得る。これらの化合物は、機能レセプターに対してさらにスクリーニングされて

50

、レセプター活性に対するその化合物の影響を決定し得る。所望の程度にまでレセプターを活性化（アゴニスト）または不活性化（アンタゴニスト）する候補化合物が、同定され得る。

#### 【0811】

用語「アゴニスト」および「アンタゴニスト」は、応答を増強または減少する化合物を表す。アゴニストに1つの形態として、化合物は、内因性化合物と同じ部位に結合し、同じ型のシグナルを生成する（通常、内因性因子以上の大きさで）。別の形態のアゴニストは、第1のアゴニストと異なる部位に結合し、それ自体によってシグナルを生成しないが、内因性因子もまたその部位に結合する場合に、増強したシグナルが生成される。これは、アロステリック作用と呼ばれる。1つの型のアンタゴニストは、内因性因子によって使用される部位に結合し、内因性因子によって生成されるシグナルを減少するかまたはブロックする。別の形態のアンタゴニストは、アロステリック部位に第2の形態のアゴニストと同様に結合するが、内因性因子によって生成されるシグナルを減少する。第3の形態のアンタゴニストは、膜を溶解するかまたは膜と交差して、膜または細胞内側で内因性因子によって生成されるシグナルを遮断する。従って、アンタゴニストは、ネガティブなアゴニストまたは「インバースアゴニスト」を含み、インバースアゴニストの非存在下で測定されるシグナル伝達活性に対して、レセプターシグナル活性を減少するネガティブな内因性活性を有する。このようなアンタゴニストは、内因性活性を有さず、レセプターの基本的な活性に対して影響を与えないアゴニストと区別される。従って、例えば、インバースアゴニストは、レセプターの確定を変更し得、それによって、リガンドとの相互作用を減少するかまたは排除し得る。Milliganら、TIPS 16:10 (1995)を参照のこと。

10

20

#### 【0812】

レセプターポリペプチドを使用して、レセプタータンパク質とこのレセプタータンパク質と通常相互作用する標的分子との間の相互作用を刺激または阻害する能力に関して化合物をスクリーニングし得る。標的は、レセプタータンパク質が通常相互作用するシグナル経路のリガンドまたは成分であり得る（例えば、Gタンパク質、あるいはcAMPまたはホスファチジルイノシトール代謝回転および/またはアデニル酸シクラーゼ、またはホスホリパーゼC活性化に關与する他の相互作用因子）。このアッセイは、レセプタータンパク質またはフラグメントが標的分子と相互作用することを可能にする条件下でレセプタータンパク質を候補化合物と合わせる工程、そして、タンパク質と標的との間の複合体形成を検出するか、またはレセプタータンパク質と標的との相互作用の生物学的な結果を検出すること（例えば、シグナル伝達の任意の關連する影響、例えば、イオン流動、Gタンパク質リン酸化、サイクリックAMPまたはホスファチジルイノシトール代謝回転、およびアデニル酸シクラーゼ、またはホスホリパーゼC活性化）を含む。

30

#### 【0813】

レセプターポリペプチドは、細胞で過剰発現される場合、細胞ベースのアッセイにおいて有用である。従って、レセプターを過剰発現するこのような細胞は、過剰発現を調節または補償し得る化合物を同定することに有用である。レセプターを過剰発現する細胞は、通常の供給源から誘導され得るか、または慣用的な組換え方法によって作製され得る。

40

#### 【0814】

レセプターポリペプチドはまた、細胞上で構成的に活性化される場合、細胞ベースのアッセイにおいて化合物をスクリーニングするのに有用である。構成的に活性化されるレセプターを発現するこのような細胞は、レセプター活性化を調節する化合物をスクリーニングするのに有用である。このような細胞は、天然の供給源から誘導され得るか、または当該分野で周知である組換え手段によって作製され得る。例えば、Scheerら、J. Receptor Signal Transduction Res. 17:57-73 (1997)；米国特許第5,750,353号を参照のこと。

#### 【0815】

候補化合物としては、例えば、以下が挙げられる：(1)可溶性ペプチドのようなペプ

50

チド (I g テイルの融合ペプチドならびにランダムペプチドライブラリー (例えば、L a m ら、N a t u r e 3 5 4 : 8 2 - 8 4 ( 1 9 9 1 ) ; H o u g h t e n ら、N a t u r e 3 5 4 : 8 4 - 8 6 ( 1 9 9 1 ) を参照のこと) および D - および / または L - 配置のアミノ酸から作製されるコンビナトリアル化学由来の分子ライブラリーのメンバーを含む) ; ( 2 ) ホスホペプチド (例えば、ランダムであり部分的に変性された指向型ホスホペプチドライブラリーのメンバー (例えば、S o n g y a n g ら、C e l l 7 2 : 7 6 7 - 7 7 8 ( 1 9 9 3 ) を参照のこと) ) ; ( 3 ) 抗体 (例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体、イントラボディ抗体、および単鎖抗体、ならびに抗体の F a b、F ( a b )<sub>2</sub>、F a b 発現ライブラリーフラグメントおよびエピトープ結合フラグメント) ; ならびに ( 4 ) 有機低分子および無機低分子 (例えば、コンビナトリアルライブラリーおよび天然産物のライブラリーから得られる分子)。

#### 【 0 8 1 6 】

1 つの候補化合物は、リガンド結合を競合する可溶性全長レセプターまたはフラグメントである。他の候補化合物としては、レセプター機能に影響を与える変異を有し、従ってリガンドに対して競合する、変異レセプターまたは適切なフラグメントが挙げられる。従って、例えば、より高い親和性でリガンドに対して競合するフラグメント、またはリガンドに結合するが放出を可能にしないフラグメントが、本発明によって含まれる。

#### 【 0 8 1 7 】

本発明は、レセプター活性を調節 (刺激または阻害) する化合物を同定するための別の終点を提供する。このアッセイは、代表的に、レセプター活性を示すシグナル伝達経路中の事象のアッセイを含む。従って、レセプタータンパク質依存性シグナルカスケードにตอบสนองしてアップレギュレートまたはダウンレギュレートする遺伝子の発現が、アッセイされ得る。1 つの実施形態において、このような遺伝子の調節領域は、容易に検出可能なマーカー (例えば、ルシフェラーゼ) に作用可能に連結され得る。あるいは、レセプタータンパク質のリン酸化またはレセプタータンパク質標的がまた、測定され得る。

#### 【 0 8 1 8 】

タンパク質の異常なレベルまたは変異によって引起される障害が、終点の基礎として使用されることがまた、理解される。従って、発生における特定の逸脱またはレセプターに対して作用する化合物にตอบสนองした障害の経過は、終点として役立つ得る。

#### 【 0 8 1 9 】

レセプターによって媒介される任意の生物学的または生化学的機能は、終点アッセイとして使用され得る。これらとしては、本明細書中、本明細書中に引用される参考文献 (これらの終点アッセイ標的に関して参考として援用される) に記載される全ての生化学的または生化学的 / 生物学的事象および当業者に公知の他の機能が挙げられる。

#### 【 0 8 2 0 】

結合および / または活性化化合物はまた、キメラレセプタータンパク質によってスクリーニングされ得、ここで、アミノ末端細胞外ドメインまたはその一部、全膜貫通ドメインまたはサブ領域 (例えば、任意の 7 回膜貫通セグメントまたは任意の細胞内もしくは細胞外ループ) 、およびカルボキシ末端細胞外ドメインまたはその一部が、異種ドメインまたはサブ領域によって置換され得る。例えば、ネイティブなレセプターによって認識されるものと異なる G タンパク質と相互作用する G タンパク質結合領域が、使用され得る。従って、異なるセットのシグナル伝達成分が、活性化に関する終点アッセイとして利用可能である。あるいは、全膜貫通部分またはサブ領域 (例えば、膜貫通セグメントまたは細胞内もしくは細胞外ループ) は、アミノ末端細胞外ドメインおよび / または G タンパク質結合領域が誘導される宿主細胞とは異なる宿主細胞に特異的な、全膜貫通部分またはサブ領域と置換され得る。これは、レセプターが誘導される特定の宿主細胞以外で実施されるアッセイを可能にする。あるいは、アミノ末端細胞外ドメイン (および / または他のリガンド結合領域) は、異なるリガンドに結合するドメイン (および / または他の結合領域) によって置換され、故に、異種アミノ末端細胞外ドメイン (または領域) と相互作用するがな

10

20

30

40

50

おシグナル伝達を引き起こす試験化合物に関するアッセイを提供し得る。最後に、活性化は、ネイティブなシグナル伝達経路の一部である転写調節配列に作動可能に連結した容易に検出可能なコード領域を含むレポーター遺伝子によって検出され得る。

**【0821】**

レセプターポリペプチドはまた、レセプターと相互作用する化合物を発見するために設計された方法における競合結合アッセイにおいて有用である。従って、化合物は、化合物がレセプターポリペプチドに結合さもなくば相互作用することを可能にする条件下で、このポリペプチドに曝露される。可溶性レセプターポリペプチドはまた、混合物に添加される。試験化合物が可溶性レセプターポリペプチドと相互作用する場合、試験化合物は、形成される複合体の量を減少するかまたはレセプター標的から活性を減少する。この型のアッセイは、レセプターの特定領域と相互作用する化合物が探求される場合に、特に有用である。従って、標的レセプター領域と競合する可溶性ポリペプチドは、標的領域に対応するペプチド配列を含むように設計される。

10

**【0822】**

無細胞薬物スクリーニングアッセイを実施するために、レセプタータンパク質（またはフラグメント）またはその標的分子のいずれかを固定して、1つまたは両方のタンパク質の複合体化していない形態からの複合体の分離を容易にし、そしてこのアッセイの自動化を適応させることが、望ましい。

**【0823】**

Gタンパク質をマトリックス上に固定するための技術は、薬物スクリーニングアッセイにおいて使用され得る。1つの実施形態において、タンパク質がマトリックスに結合することを可能にするドメインを添加したタンパク質融合タンパク質がまた、提供され得る。例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ/Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St. Louis, MO）またはグルタチオン誘導体化されたマイクロタイタープレートに吸着され得、これは次いで、細胞溶解物（例えば、<sup>35</sup>S-標識）および候補化合物と合わされ、そしてこの混合物は、複合体形成を実施する（conductive）条件下（例えば、塩およびpHに関して生理学的な条件）で、インキュベートされる。インキュベーション後、このビーズは洗浄されて、任意の結合していない標識を除去し、そして固定化されたマトリックスおよび放射性標識が直接決定されるか、または複合体の後の上清が、分離される。あるいは、複合体は、マトリックスから分離され、SDS-PAGEによって分離され、そしてビーズ分画中に見出されるレセプター結合Gタンパク質のレベルが、標準的な電気泳動技術を用いてゲルから定量される。例えば、ポリペプチドまたはその標的分子のいずれかが、当該分野で周知の技術を用いてビオチンおよびストレプトアビジンの結合体を利用して固定され得る。あるいは、タンパク質と反応性であるがタンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体が、プレートのウェルに誘導体化され得、そしてタンパク質が、抗体結合によってウェルに捕獲される。レセプター結合Gタンパク質および候補化合物の調製物は、レセプタータンパク質提示ウェル中でインキュベートされ、そしてこのウェルに捕獲された複合体の量が、定量され得る。GST固定化複合体に関して上記されたものに加えて、このような複合体を検出する方法としては、レセプタータンパク質標的分子と反応性であるか、またはレセプタータンパク質と反応性であり標的分子と競合する抗体を用いる、複合体の免疫検出；ならびに標的分子と関連した酵素活性を検出することに依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

20

30

40

**【0824】**

これらの薬物スクリーニングアッセイに従って同定されたレセプタータンパク質活性の調節因子は、このレセプター経路によって媒介される障害を有する被験体を、このレセプタータンパク質を発現する細胞を処置することによって処置するために使用され得る。これらの処置方法は、本明細書中に記載されるように薬学的組成物中のタンパク質活性の調節因子を、このような処置が必要な被験体に投与する工程を含む。

**【0825】**

50

(アンチセンスおよびリボザイム(アンタゴニスト))

特定の実施形態において、本発明に従うアンタゴニストは、配列番号1に含まれる配列またはその相補鎖に対応する核酸および/または寄託されるクローン97183に含まれるヌクレオチド配列に対応する核酸である。1つの実施形態において、アンチセンス配列は、生物体により内部で生成され、別の実施形態において、アンチセンス配列は別々に投与される(例えば、O'Connor, J., Neurochem. 56:560(1991)を参照のこと)。Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL(1988)。アンチセンス技術を使用して、アンチセンスDNAもしくはRNAを通してか、または3重らせんの形成を通して遺伝子発現を制御し得る。アンチセンス技術は、例えば、Okano, J., Neurochem. 56:560(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL(1988)に考察される。3重らせん形成は、例えば、Leeら、Nucleic Acids Research 6:3073(1979); Cooneyら、Science, 241:456(1988); およびDervanら、Science, 251:1300(1991)において考察される。これらの方法は、相補的なDNAまたはRNAへのポリヌクレオチドの結合に基づく。

10

20

30

40

50

【0826】

例えば、非リンパ性白血病細胞株HL-60および他の細胞株の増殖を阻害するためのc-mycおよびc-mybアンチセンスRNA構築物の使用は、以前に記載された(Wicksstromら(1988); Anfossiら(1989))。これらの実験は、細胞をオリゴリボヌクレオチドとインキュベーションすることによってインビトロで行われた。インビボ用途のための類似の手順は、WO91/15580に記載される。簡単には、所定のアンチセンスRNAについてのオリゴヌクレオチドの対は、以下のように生成される: オープンリーディングフレームの最初の15塩基に相補的な配列を、5末端のEcoRI部位および3末端のHindIII部位に隣接させる。次に、オリゴヌクレオチドの対は、90℃で1分間加熱され、次いで2x連結緩衝液(20mM TRIS HCl pH7.5、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM ジチオスレイトール(DTT)および0.2mM ATP)中でアニーリングされ、次いで、レトロウイルスベクターPMV7のEcoRI/HindIII部位に連結される(WO91/15580)。

【0827】

例えば、本発明の成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの5'コード部分を使用して、約10~40塩基対長のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計し得る。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に関与する遺伝子の領域に相補的であるように設計され、それにより転写およびレセプターの産生を阻害する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドは、インビボでmRNAにハイブリダイズし、そしてmRNA分子のレセプターポリペプチドへの翻訳をブロックする。

【0828】

1つの実施形態において、本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)アンチセンス核酸は、外来の配列からの転写により細胞内で産生される。例えば、ベクターまたはその一部が転写され、本発明のアンチセンス核酸(RNA)を産生する。このようなベクターは、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)アンチセンス核酸をコードする配列を含む。このようなベクターは、それが転写されて所望のアンチセンスRNAを産生し得る限り、エピソームを保持し得るか、または染色体に組込まれ得る。このようなベクターは、当該分野において標準的な組換えDNA技術方法により構築され得る。ベクターは、脊椎動物細胞において複製および発現のために使用される、当該分野で公知のプラスミド、ウイルスなどであり得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)をコードする配列またはそのフラグメントの発現は、脊椎動物、好ましくはヒト細胞にお

いて作用する、当該分野で公知の任意のプロモーターにより得る。そのようなプロモーターは、誘導性または構成性であり得る。このようなプロモーターは、SV40初期プロモーター領域(BernoistおよびChambon、Nature、29:304-310(1981))、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター(Yamamotoら、Cell、22:787-797(1980))、ヘルペスチミジンプロモーター(Wagnerら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.78:1441-1445(1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinsterら、Nature、296:39-42(1982))などが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0829】

本発明のアンチセンス核酸は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)遺伝子のRNA転写物の少なくとも一部に相補的な配列を含む。しかし、完全に相補的であることは好ましいが、必要ではない。本明細書中で言及される「RNAの少なくとも一部に相補的な」配列は、RNAとハイブリダイズし得るに十分な相補性を有し、安定な二重鎖を形成する配列を意味し；従って、二本鎖Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)アンチセンス核酸の場合において、二重鎖DNAの一本鎖が試験され得るか、または三重鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)RNAとのより多くの塩基ミスマッチを含み得、これは、安定な二重鎖(または三重鎖の場合もあり得る)を含み得、そしてなお安定な二重鎖を形成し得る。当業者は、ハイブリダイズ複合体の融点を決定するために標準的な手順を使用することによりミスマッチの許容の程度を確認し得る。

#### 【0830】

メッセージの5'末端に相補的であるオリゴヌクレオチド(例えば、AUG開始コドンまででかつAUG開始コドンを含む5'非翻訳配列)は、翻訳の阻害の際に最も効率的に働くべきである。しかし、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列は、同様にmRNAの翻訳を阻害する際に有効であることが示された。一般的に、Wagner、R.、Nature 372:333-335(1994)を参照のこと。従って、図1A~Bに示されるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の5'-もしくは3'-の非翻訳、非コード領域に相補的なオリゴヌクレオチド、または寄託クローンのコード領域内に相補的なオリゴヌクレオチドのいずれかは、内因性Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)mRNAの翻訳を阻害するアンチセンスアプローチに使用され得る。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補物を含むべきである。mRNAコード領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、翻訳のあまり効率的でないインヒビターであるが、本発明に従って使用され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)mRNAの5'領域、3'領域もしくはコード領域、または寄託クローンのコード領域内にハイブリダイズするように設計されるか否かにかかわらず、アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチド長であるべきであり、そして好ましくは6~約50ヌクレオチド長にわたるオリゴヌクレオチドである。特定の局面において、このオリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも17ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチドまたは少なくとも50ヌクレオチドである。

#### 【0831】

本発明のポリヌクレオチドは、DNA、もしくはRNA、またはキメラ混合物、あるいはそれらの誘導体もしくは改変バージョン、一本鎖、または二本鎖であり得る。このオリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で改変されて、例えば、分子の安定性、ハイブリダーゼーションなどを改善し得る。このオリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加基(例えば、インビボにおいて宿主細胞レセプターを標的化するために)、または細胞膜を通した輸送を促進する因子(例えば、Letsingerら、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:6553-6556(1989))；Lemaitreら、Proc.Natl.Acad.Sci.84:648-65

10

20

30

40

50

2 (1987); PCT公開番号WO88/09810 (1988年12月15日公開)を参照のこと)、または血液脳関門(例えば、PCT公開番号WO89/10134 (1988年4月25日公開)を参照のこと)、ハイブリダイゼーション誘引切断剤(hybridization-triggered cleavage agent)(例えば、Krolら、BioTechniques、6:958-976 (1988)を参照のこと)、またはインターカレート剤(例えば、Zon, Pharm. Res. 5:539-549 (1988)を参照のこと)を含み得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子(例えば、ペプチド、ハイブリダーゼーション誘引架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘引切断剤など)に結合体化され得る。

【0832】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの改変された塩基部分を含み得、この塩基部分は、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される：5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 $\beta$ -D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 $\beta$ -D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ワイブトキシソシン(wybutoxosine)、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6-ジアミノプリン。

【0833】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される少なくとも1つの改変された糖部分を含み得る：アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソース。

【0834】

さらなる別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下を含むがそれらに限定されない群から選択される少なくとも1つの改変されたリン酸骨格を含む：ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミドチオエート、ホスホラミデート(phosphoramidate)、ホスホロジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホルムアセタール(formacetal)またはそれらのアナログ。

【0835】

さらに別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、a-アノマーオリゴヌクレオチドである。a-アノマーオリゴヌクレオチドは、相補的なRNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、通常のb-ユニットとは反対に、その鎖は互いに平行にする(Gautierら、Nucl. Acids Res.、15:6625-6641 (1987))。このオリゴヌクレオチドは、2'-O-メチルリボヌクレオチドであるか(Inoueら、Nucl. Acids Res.、15:6131-6148 (1987))、またはキメラRNA-DNAアナログである(Inoueら、FEBS Lett. 215:327-330 (1987))。

【0836】

本発明のポリヌクレオチドは当該分野で公知の標準的な方法(例えば、自動DNA合成機(このような装置はBiosearch, Applied Biosystemsなど

10

20

30

40

50

から市販されている)の使用により)合成され得る。例えば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Steinらの方法(Nucl. Acids Res., 16:3209(1988))により合成され得、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御された多孔ガラス(controlled pore glass)ポリマー支持体(Sarinら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85:7448-7451(1988))などの使用により調製され得る。

【0837】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)コード領域配列に相補的なアンチセンスヌクレオチドが使用され得るが、転写された非翻訳領域に相補的なアンチセンスヌクレオチドが最も好ましい。

10

【0838】

本発明による潜在的なアンタゴニストはまた、触媒RNA、すなわちリボザイムを含む(例えば、PCT国際公開WO90/11364、1990年10月4日公開; Sarverら、Science、247:1222-1225(1990))を参照のこと)。部位特異的認識配列でmRNAを切断するリボザイムを使用して、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)mRNAを破壊し得るが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的mRNAと相補的な塩基対を形成する隣接領域により決定される位置で、mRNAを切断する。たった1つの必要条件は、標的mRNAが以下の2つの塩基配列を有することである: 5'-UG-3'。ハンマーヘッド型リボザイムの構築および生成は当該分野で周知であり、そしてHaseloffおよびGerlach、Nature、334:585-591(1988))により十分に記載される。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のヌクレオチド配列内(図1A~Bまたは寄託されたクローンの配列)には、多数の潜在的なハンマーヘッド型リボザイム切断部位が存在する。好ましくは、このリボザイムは、切断認識部位がGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)mRNAの5'末端付近に位置するように; すなわち、効率を増大し、そして非機能的mRNA転写物の細胞内蓄積を最小化するように、操作される。

20

【0839】

アンチセンスアプローチの場合、本発明のリボザイムは、改変されたオリゴヌクレオチド(例えば、安定性、標的化などについて改良された)から構成され得、そしてインビボにおいてGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を発現する細胞に送達されるべきである。リボザイムをコードするDNA構築物は、DNAをコードするアンチセンスの導入のための上記と同じ様式において細胞中に導入され得る。送達の好ましい方法は、強力な構成性プロモーター(例えば、pol IIIまたはpol IIプロモーターのような)の制御下で、リボザイムを「コードする」DNA構築物を使用することを含み、その結果トランスフェクトした細胞が内因性Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)メッセージを破壊し、そして翻訳を阻害するに十分な量のリボザイムを生成する。リボザイムはアンチセンス分子と異なり触媒性であるので、より低い細胞内濃度が効率のために必要とされる。

30

【0840】

アンタゴニスト/アゴニスト化合物を利用して、腫瘍性の細胞および組織に対する本発明のポリペプチドの細胞増殖(growth)および増殖(proliferation)効果を阻害し得る。すなわち、腫瘍の新脈管形成を刺激し、それにより異常な細胞成長および増殖を(例えば、腫瘍形成または増殖において)遅延または防止する。

40

【0841】

アンタゴニスト/アゴニストをまた利用して、血管過多の疾患を阻害し得、そして水晶体囊外白内障(extracapsular cataract)手術後の上皮レンズ細胞の増殖を防止する。本発明のポリペプチドのミトジェン活性の防止はまた、例えば、バルーン血管形成術後の再狭窄のような場合に要求され得る。

【0842】

50

アンタゴニスト/アゴニストをまた利用して、創傷治癒の間の瘢痕組織の増殖防止し得る。

【0843】

アンタゴニスト/アゴニストをまた利用して、本明細書中に記載される疾患を処置し得る。

【0844】

従って、本発明は、疾患、障害および/または状態（本発明のポリヌクレオチドの過剰発現に関連する、本願の全体に渡って列挙される疾患、障害および/または状態が含まれるが、これらに限定されない）を処置または予防する方法であって、（a）本発明のポリヌクレオチドに対するアンチセンス分子、および/または（b）本発明のポリヌクレオチドに対するリボザイムを、患者に投与することによって処置または予防する方法を提供する。

10

【0845】

（アンタゴニスト/インヒビターとしての膜貫通フラグメントの使用）

特定の実施形態において、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を正確なレセプターの集合を阻害する分子に曝露することによって、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の生物学的活性を調節、特に阻害することに関する。詳細には、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター媒介のシグナル伝達またはリガンド結合を阻害するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の膜貫通ドメインの、単離されたフラグメントまたはペプチドに関する。特定の実施形態において、荷電した残基が、このフラグメントの1つの末端に添加され、膜におけるそのフラグメントの正確な配向を促進する。

20

【0846】

Gタンパク質共役レセプター（GPCR）膜貫通（TM）ドメインセグメントが、レセプター分子の集合の間に特定の様式で相互作用することが実証されている。これらの相互作用は、固定した構造を導かず、なぜなら、いくらかの柔軟性が、リガンド結合に続くコンフォメーション変化に必要とされるからであり、これは、この分子が、細胞表面から細胞内部分にシグナルを送ることを可能にする。膜貫通ドメインが、リガンド結合に関与し、従ってリガンドの透過を可能にする開口部を含むことがまた、いくつかのGPCRに関して実証された。膜貫通ドメインを無くした発現は、不活性化された短縮V2バソプレシン、 $\alpha$ -アドレナリン作用性およびムスカリン様M3レセプターをレスキューするという報告（Schonebergerら、EMBO J. 15:1283（1996）；Wongら、J. Biol. Chem. 265:6219（1990）；Monnotら、J. Biol. Chem. 271:1507（1996）；Gudermannら、Annu. Rev. Neurosci. 20:399（1997）；Osugaら、J. Biol. Chem. 272:25006（1997））は、P2アドレナリン作用性レセプターの6回膜貫通ドメイン由来のペプチドが、レセプター活性化および二量体化を阻害することを見出したことを示唆した（Hebertら、J. Biol. Chem. 271（27）:16384-92（1996））。従って、GPCR機能は、GPCRの膜内相互作用を標的化することによってレスキューされ得る。

30

40

【0847】

さらに、GPCR機能は、膜内相互作用を標的化することによって阻害され得る。例えば、CCR5の推定TMセグメントに対応するフラグメント（これは、HIVの細胞への侵入の間にコレセプターとして機能する）は、細胞への明白な毒性を生じることなくHIVの侵入を強力に阻害した。（WO 99/43711を参照のこと）。CXCR4（これは、T細胞屈性種のHIV-1の細胞侵入の間にコレセプターとして機能する）を特異的に標的化することによる有用な方法がまた、実証された。20~25アミノ酸残基を含むフラグメントは、0.2マクロモルほどの低さの濃度で、レセプターシグナル伝達およびインビトロのHIV-1感染を阻害した。（WO 99/43711を参照のこと）。

【0848】

50

膜貫通フラグメントの疎水性性質および/または両親媒性性質は、二重層へのその浸透を可能にする。さらに、膜の内側の方向は、荷電残基を末端に添加することによって制御され得、この末端は、インタクトなレセプターにおいて膜の細胞外側に曝露される。膜への挿入は、当業者に公知の方法論、およびWO 99/43711に記載されるような方法論を用いて、標識ペプチドアナログの蛍光顕微鏡によって試験される。

【0849】

特定の実施形態において、本発明は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の膜貫通ドメインを標的化することによって、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の生物学的特性および活性を、調節(好ましくは阻害)する膜貫通フラグメントを含む。さらなる実施形態において、本発明は、これらのアンタゴニストを用いることによってGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)機能を破壊する方法を特に含む。

10

【0850】

化学的なDNA技術または組換えDNA技術が使用されて、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)膜貫通フラグメントを得ることができ、このフラグメントは、好ましくは、可能な限りの小ささであるがGタンパク質ケモカインレセプターに結合またはこれらに会合する十分な高い親和性をなお維持する。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ペプチドの非限定的な例としては、セグメント1~7のうちの少なくとも1つの膜貫通セグメントに対応する10~50アミノ酸のフラグメントが挙げられる。

【0851】

別の実施形態において、本発明は、単離されたGタンパク質ケモカインレセプター媒介分子(Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の膜貫通セグメントの一部の構造アナログであるフラグメント、ペプチド、またはペプチド模倣物を含む)を含み、ここで、この分子は、細胞外末端および細胞内末端を有し、そしてこの分子は、生理学的条件下で、この細胞外末端に負に荷電した基を、そしてこの細胞内末端に中性の電荷を有し;この分子は、それが誘導された膜貫通ドメインと同じ方向で膜に自発的に挿入され;そして、この分子は、Gタンパク質ケモカインレセプターの生物学的性質または活性を調節する。

20

【0852】

特定の実施形態において、この分子は、親水性の、負に荷電した非ペプチドのヘッドの基および荷電していないテイルを含み、これは、細胞膜におけるこの分子の正確な方向を確実にする。別の実施形態において、負に荷電したヘッドの基は、1つ以上の酸性アミノ酸である。

30

【0853】

上記のフラグメントによって調節されるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)活性は、Gタンパク質ケモカインレセプター媒介細胞内Ca<sup>2+</sup>放出の阻害およびGタンパク質ケモカインレセプター媒介HIV感染の阻害を含む。上記ペプチドによって調節されるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)活性はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンドの結合を含む。上記ペプチドによって調節されるさらなるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)活性は、本明細書中の説明および実施例中のものを含む。

40

【0854】

別の実施形態において、本明細は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を発現する細胞を本発明の分子と接触させることによって、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の生物学的活性を調節する方法を含む。1つの方法において、この調節された生物学的活性は、Gタンパク質ケモカインレセプター媒介HIV感染の阻害である。別の方法において、この調節された生物学的活性は、Gタンパク質ケモカインレセプター媒介細胞内Ca<sup>2+</sup>放出の阻害である。調節される他の活性は、本明細書中のいずれかに記載される活性である。

【0855】

別の実施形態は、HIV-1感染を阻害する方法であり、この方法は、HIV-1に結

50

合する G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) を発現する細胞を、上記 G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) の膜貫通ドメインの一部の構造アナログであるポリペプチドフラグメント、ペプチド、またはペプチド模倣物を含む分子と接触させる工程を包含し、ここで、この細胞をこの分子と接触させることは、H I V - 1 感染を阻害する。ペプチドまたはペプチド模倣物は、G タンパク質ケモカインレセプターの膜貫通ドメインの一部の構造アナログであり得る。

【 0 8 5 6 】

1 つの実施形態において、本発明の分子は、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) の膜貫通セグメントを模倣し、そしておそらくネイティブな T M セグメントとの競合阻害によって、レセプターの自己集合をブロックする。これによって、この分子は、影響を受けた細胞においてシグナル伝達をブロックするかまたは阻害する。

10

【 0 8 5 7 】

本発明はまた、有用な性質 ( 例えば、増加した半減期、免疫原性の欠如、および血液脳関門を横切る能力 ) を保有するペプチドアナログおよびペプチド模倣物を含む。

【 0 8 5 8 】

本発明のペプチドアナログは、ホルモンアゴニスト / アンタゴニストまたは他のペプチドの化学的効果および / または生物学的効果を媒介する。これらは、薬学技術、治療技術および診断技術の開発に有用である。従って、本発明はまた哺乳動物に本発明の 1 つ以上のペプチドアナログの薬学的有効量を投与することによって、哺乳動物における予防応答または治療応答を生成する方法を提供する。好ましい実施形態において、本発明は、本発明の 1 つ以上のペプチドアナログの有効量を投与することによって G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) の活性を調節して、このような応答を生成するための方法を提供する。

20

【 0 8 5 9 】

別の実施形態において、1 つより多くの本発明のペプチドが、カクテルとして投与されて、G タンパク質ケモカインレセプターの生物学的活性を調節する。

【 0 8 6 0 】

用語「G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) 膜貫通ペプチド」は、膜貫通ドメインのフラグメント、膜貫通セグメント、膜貫通セグメントのフラグメント、およびその相同なペプチドを含み得る。好ましいフラグメントは、少なくとも 4 ~ 5 0 長、好ましくは少なくとも 4 ~ 3 0 長、および好ましくは少なくとも 1 0 ~ 3 0 アミノ酸長、またはこの中の任意の範囲のフラグメントを含む。さらに好ましいフラグメントは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または 5 0 アミノ酸長のフラグメントを含む。保存アミノ酸置換を有する任意の対応する配列がまた、含まれる。

30

【 0 8 6 1 】

本発明のサンプルの膜貫通フラグメントとしては、本明細書中に記載される任意のフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の好ましい膜貫通フラグメントは、生物学的に活性な G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) を含む細胞または膜構造 ( 例えば、リポソーム ) と接触された場合、インビトロ、インビボ、またはインサイチュで、上記の G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) の生物学的活性を媒介する。インビボ ( 例えば、血液の血漿または間質性の流体 ) またはインビトロ ( 例えば、培養培地 ) で細胞と接触する溶液中のフラグメント濃度は、1 ナノモルと 5 0 マイクロモルとの間、好ましくは、1 ナノモルと 1 マイクロモルとの間、そして最も好ましくは 5 マイクロモル未満である。

40

【 0 8 6 2 】

「負に荷電した」は、生理学的 p H において負に荷電した、アミノ酸、アミノ酸誘導体、アミノ酸模倣物および化学部分をいう。負に荷電したアミノ酸としては、例えば、A s

50

p および G l u が挙げられる。「酸性」残基は、生理学的 p H において負に荷電した残基である。

【 0 8 6 3 】

「正に荷電した」は、生理学的 p H において正に荷電した、アミノ酸、アミノ酸誘導体、アミノ酸模倣物および化学部分をいう。正に荷電したアミノ酸としては、例えば、L y s および A r g が挙げられる。「塩基性」残基は、生理学的 p H において正に荷電した残基である。

【 0 8 6 4 】

「中性」は、生理学的 p H において正にも負にも荷電していない、アミノ酸、アミノ酸誘導体、アミノ酸模倣物および化学部分をいう。

【 0 8 6 5 】

用語「生物学的特性または活性を調節する」は、試験膜貫通フラグメントの存在下において、測定可能な生物学的パラメータまたは事象が、このペプチドの非存在下のコントロールに対して、増加または減少したことを意味する。生物学的特性または活性の例としては、以下が挙げられる：G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）のコンフォメーション、G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）と他の分子との会合、シグナル伝達、細胞性タンパク質の細胞外分泌、タンパク質のコンフォメーション変化、酵素活性における変化、代謝活性における変化、リガンドに対する親和性の変化、ウイルス感染レベルにおける変化、血管拡張における変化、心臓速度の調節、気管支拡張の調節、内分泌の分泌調節、およびぜん動の調節。G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）の生物学的活性が、G タンパク質ケモカインレセプターによって実行される正確なインビトロの役割に制限されるものである必要はないことに注意する。この用語はまた、G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）特性（例えば、ウイルスタンパク質結合）（これは、G タンパク質ケモカインレセプターのインビボでの生物学的役割の一部ではない）もカバーする。この用語は、実験室における実験操作によってのみ開示される G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）の固有の特性（例えば、G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）リガンドと相互作用するための人工二重層（例えば、リポソーム）における G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）の能力）をさらにカバーする。

【 0 8 6 6 】

「シグナル伝達」とは、リガンドのレセプターへの結合が生理学的変化に翻訳されるプロセスである。一般に、リガンドのレセプターへの結合は、そのレセプターの物理的特性の変化（例えば、そのコンホメーションまたはその配向の変化、あるいはそれが他のリガンドを結合する能力の変化）を引き起こす。この物理的特性の変化は、直接的にかまたは間接的に、イオン流入の増加または減少、酵素活性の増加または減少、リン酸化の増加または減少、レセプターまたは任意の分子（例えば、イノシトール部分または G タンパク質サブユニット）の、1つの細胞区画から別の細胞区画への転座の増加または減少を生じ得る。

【 0 8 6 7 】

「G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）リガンド」とは、インビトロ、インサイチュ、またはインビボで G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）を結合する生物学的分子をいい、そしてホルモン、神経伝達物質、ウイルスまたはそのレセプター結合ドメイン、G タンパク質、オプシン、ロドプシン、ヌクレオシド、ヌクレオチド、凝固カスケード因子、臭気物質またはフェロモン、毒素、コロニー刺激因子、血小板活性化因子、神経活性ペプチド、神経体液、または生物学的に活性な任意の化合物（例えば、薬物または合成化合物もしくは天然に存在する化合物）が挙げられ得る。

【 0 8 6 8 】

節「H I V 感染を阻害する」とは、本発明のペプチドが、H I V の G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）への結合またはを阻害すること、または H I V ウイルスが G タンパク質ケモカインレセプター発現細胞に入って首尾よく繁殖することを媒介する、G タンパク質ケモカインレセプター（C C R 5）の生物学的活性を阻害することを意味する

10

20

30

40

50

。

## 【0869】

本発明のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド、またはそれをコードする核酸は、本明細書中に提供される教示およびガイダンスに基づいて、過度に実験することなく、当業者によって慣用的に得られ得る、置換ペプチドまたはポリヌクレオチドに実質的に対応する配列の、有限のセットを含む。タンパク質の化学および構造の詳細な記載に関しては、Schulzら、PRINCIPLES OF PROTEIN STRUCTURE, Springer-Verlag, New York, 1978、およびCreighton, T.E., PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983(これらは、本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。コドン優先性のような、ヌクレオチド配列置換の提示に関しては、Ausubelら、前出の、節A.1.1-A.1.24、およびSambrookら、前出の、付録CおよびDを参照のこと。

10

## 【0870】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドは、膜貫通ドメインの相同配列および/またはフラグメント(特に、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の膜貫通セグメント1~7の少なくとも1つまたはそのホモログ)を含む。

## 【0871】

しかし、本発明に関して、少なくとも15~20アミノ酸のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドは、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド脂質二重層にまたがり得るので、好ましい。

20

## 【0872】

生理学的条件下で、一端が荷電し、そして他端が中性であるように、本発明のポリペプチドを選択または改変することは、特に好ましい。このことにより、このペプチドが自発的に膜に挿入されるようになる。ペプチドを、それが由来する膜貫通Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ドメインと同じ配向で挿入することは、特に重要である。

## 【0873】

本発明のペプチドは、7つのTMセグメントのいずれかに由来し得る。これらのTMセグメントのアミノ酸位置は、非限定的な例として疎水性分析(表1を参照のこと)および/またはモデル鎖の当てはめと必要に応じて組み合わせて、分子モデル化を使用して決定され得る。このようなモデル化は、公知の方法(例えば、ECEPP、INSIGHT、DISCOVER、CHEM-DRAW、AMBER、FRODO、およびCHEM-X)によって達成され得る。このようなアルゴリズムは、関連するGPCR間で膜貫通ドメインおよびセグメントを比較し、可能な最低エネルギー構造を決定し、そして代替の膜貫通配列を規定する。

30

## 【0874】

アンタゴニストとして有用なGタンパク質結合ケモカインレセプター膜貫通ドメインのフラグメントは、配列番号2、または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドの以下の部分を含むか、あるいはこの部分からなる：

40

セグメント1：配列番号2または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドのアミノ酸31~58、32~58、33~58、34~58、35~58、36~58、37~58、38~58、31~57、32~57、33~57、34~57、35~57、36~57、37~57、31~56、32~56、33~56、34~56、35~56、36~56、31~55、32~55、33~55、34~55、35~55、31~54、32~54、33~54、34~54、31~53、32~53、33~53、31~52、32~52、31~51、またはこれらの任意の組み合わせ、好ましくは少なくとも15アミノ酸長；

セグメント2：配列番号2または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドのアミノ酸68~97、69~97、70~97、71~97、72~97、73~9

50

7、74～97、75～97、76～97、68～96、69～96、70～96、71～96、72～96、73～96、74～96、75～96、76～96、68～95、69～95、70～95、71～95、72～95、73～95、74～95、75～95、68～94、69～94、70～94、71～94、72～94、73～94、74～94、68～93、69～93、70～93、71～93、72～93、73～93、68～92、69～92、70～92、71～92、72～92、68～91、69～91、70～91、71～91、68～90、69～90、70～90、68～89、69～89、68～88またはこれらの任意の組み合わせ、好ましくは少なくとも15アミノ酸長；

セグメント3：配列番号2または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドのアミノ酸103～124、104～124、105～124、106～124、107～124、108～124、109～124、103～123、103～122、103～121、103～120、103～119、103～118またはこれらの任意の組み合わせ、好ましくは少なくとも15アミノ酸長；

セグメント4：配列番号2または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドのアミノ酸142～169、143～169、144～169、145～169、146～169、147～169、148～169、149～169、142～168、143～168、144～168、145～168、146～168、147～168、148～168、142～167、143～167、144～167、145～167、146～167、147～167、142～166、143～166、144～166、145～166、146～166、142～165、143～165、144～165、145～165、142～164、143～164、144～164、142～163、143～163、142～163またはこれらの任意の組み合わせ、好ましくは少なくとも15アミノ酸長；

セグメント5：配列番号2または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドのアミノ酸196～223、197～223、198～223、199～223、200～223、201～223、202～223、203～223、196～222、197～222、198～222、199～222、200～222、201～222、202～222、196～221、197～221、198～221、199～221、200～221、201～221、196～220、197～220、198～220、199～220、200～220、196～219、197～219、198～219、199～219、196～218、197～218、198～218、196～217、197～217、196～216またはこれらの任意の組み合わせ、好ましくは少なくとも15アミノ酸長；

セグメント6：配列番号2または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドのアミノ酸236～260、237～260、238～260、239～260、240～260、236～259、237～259、238～259、239～259、236～258、237～258、238～258、236～257、237～257、236～256またはこれらの任意の組み合わせ、好ましくは少なくとも15アミノ酸長；

セグメント7：配列番号2または寄託されたクローンによってコードされるポリペプチドのアミノ酸275～305、276～305、277～305、278～305、279～305、280～305、281～305、282～305、283～305、284～305、285～305、275～304、276～304、277～304、278～304、279～304、280～304、281～304、282～304、283～304、284～304、275～303、276～303、277～303、278～303、279～303、280～303、281～303、282～303、283～303、275～302、276～302、277～302、278～302、279～302、280～302、281～302、282～302、275～301、276～301、277～301、278～301、279～301、280～301、281～301、275～300、276～300、277～300、278～300、279

10

20

30

40

50

9 ~ 300、280 ~ 300、275 ~ 299、276 ~ 299、277 ~ 299、278 ~ 299、279 ~ 299、275 ~ 298、276 ~ 298、277 ~ 298、278 ~ 298、275 ~ 297、276 ~ 297、277 ~ 297、275 ~ 296、276 ~ 296、275 ~ 295またはこれらの任意の組み合わせ、好ましくは少なくとも15アミノ酸長；

WO99/43711に開示されるCCR5フラグメントは、この節の実施形態から特に排除される。

#### 【0875】

負に荷電したアミノ酸（例えば、AspまたはGlu）は、このフラグメントの細胞外末端で置換または付加され得る。負に荷電したアミノ酸の数は、代表的に、1、2、または3である。中性のアミノ酸は、このフラグメントの細胞内末端で置換または付加され得る。実施例57もまた参照のこと。

#### 【0876】

（他の活性）

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、血管内皮細胞増殖を刺激する能力の結果として、種々の疾患状態（例えば、血栓症、動脈硬化、および他の心臓血管の状態）に起因する虚血組織の血管再生を刺激するための処置において利用され得る。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた利用して、上記で議論されるように新脈管形成および肢の再生を刺激し得る。

#### 【0877】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストを、傷害、火傷、手術後組織修復、および潰瘍に起因する創傷の処置、予防および/または診断にもまた利用し得る。なぜなら、それらは異なる起源の種々の細胞（例えば、線維芽細胞および骨格筋細胞）に対してミトジェン性であり、それゆえ損傷を受けた組織または疾患組織の修復または置換を促進するからである。

#### 【0878】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、ニューロンの成長を刺激し、そして特定のニューロンの疾患、障害および/もしくは状態または神経変性状態（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、およびエイズ関連複合体（complex））において生じるニューロンの損傷を処置および予防するために利用され得る。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、軟骨細胞増殖を刺激する能力を有し得、それゆえ、これらは骨および歯周の再生を増強し、そして組織移植片または骨の移植片における補助のために利用され得る。

#### 【0879】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた利用して、ケラチノサイト増殖を刺激することにより、日焼けに起因する皮膚の加齢を予防し得る。

#### 【0880】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストをまた、抜け毛を予防するために利用し得る。なぜなら、FGFファミリーのメンバーは、髪形成細胞を活性化し、そしてメラノサイト増殖を促進するからである。同じ系列にそって、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストを利用して、他のサイトカインと組み合わせて使用した場合、造血細胞および骨髄細胞の増殖および分化を刺激し得る。

#### 【0881】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、移植前の器官を維持するか、または初代組織の細胞培養を支持するために使用され得る。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、初期胚における分化のための中胚葉起源の組織を誘導するために利用され得る。

10

20

30

40

50

## 【0882】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、上記で議論されるように造血系統に加えて、胚幹細胞の分化または増殖を増加または減少し得る。

## 【0883】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、哺乳動物の特徴（例えば、身長、体重、毛の色、眼の色、皮膚、脂肪組織の割合、色素沈着、大きさ、および形（例えば、美容外科））を調節するために使用され得る。同様に、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、異化作用、同化作用、プロセッシング、利用、およびエネルギーの貯蔵に影響を及ぼす哺乳動物の代謝を調節するために使用され得る。

10

## 【0884】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストは、バイオリズム、概日（*circadian*）リズム、うつ病（抑うつ性の疾患、障害および/または状態を含む）、暴力の傾向、痛み（例えば、慢性疼痛および急性疼痛）への耐性、生殖能力（好ましくは、アクチビンまたはインヒビン様活性によって）、ホルモンレベルもしくは内分泌レベル、食欲、性欲、記憶、ストレス、または他の認知の質に影響を及ぼすことによって、哺乳動物の精神状態または身体状態を変更するために使用され得る。

## 【0885】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストはまた、例えば、貯蔵能力、脂肪含有量、脂質、タンパク質、炭水化物、ビタミン、ミネラル、補因子、または他の栄養成分を増加または減少させるような食品添加物または保存剤として使用され得る。

20

## 【0886】

上記に列挙された適用は、広範な種々の宿主において用途を有する。そのような宿主としては、ヒト、ネズミ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、マイクロピッグ（*micro-pig*）、ニワトリ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、イヌ、ネコ、非ヒト霊長類、およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、宿主は、マウス、ウサギ、ヤギ、モルモット、ニワトリ、ラット、ハムスター、ブタ、ヒツジ、イヌまたはネコである。好ましい実施形態において、宿主は、哺乳動物である。最も好ましい実施形態において、宿主は、ヒトである。

30

## 【0887】

概して、本発明を記載してきたが、本発明は、例示の目的のために提供され、そして限定を意図しない、以下の実施例を参照することによってより容易に理解される。

## 【実施例】

## 【0888】

（実施例1）

（HDG NR 10の細菌発現および精製）

HDG NR 10をコードするDNA配列（ATCC受託番号第97183号）を、プロセスされたHDG NR 10核酸配列（シグナルペプチド配列が除かれたもの）の5'および3'末端配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーおよびHDG NR 10に対して3'のベクター配列を用いて最初に増幅する。HDG NR 10に対応するさらなるヌクレオチドを、5'および3'配列にそれぞれ添加した。5'オリゴヌクレオチドプライマーは、配列5'CGGAATTCTCCATGGATTATCAAGTGTCA3'（配列番号3）を有し、EcoRI制限酵素部位、それに続いてプロセスされたタンパク質コドンの推定上の末端アミノ酸から始まるHDG NR 10コード配列の18ヌクレオチドを含む。

40

## 【0889】

3'配列5'CGGAAGCTTCGTCAACAAGCCACAGATAT3'（配列番号4）は、HindIII部位に相補的な配列、それに続いてHDG NR 10コード

50

配列の18ヌクレオチドを含む。これらの制限酵素部位は、細菌発現ベクター pQE-9 (Qiagen, Inc. 9259, Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) 上の制限酵素部位に対応する。pQE-9は、抗生物質耐性(Amp<sup>r</sup>)、細菌の複製起点(ori)、IPTG調節可能プロモーターオペレーター(P/O)、リボソーム結合部位(RBS)、6-Hisタグ、および制限酵素部位をコードする。次いで、pQE-9をEcoRIおよびHindIIIで消化した。増幅された配列をpQE-9に連結し、そしてヒスチジンタグおよびRBSをコードする配列とインフレームで挿入した。次いで、連結混合物を用いて、E. coli M15株M15/rep4 (Qiagen, Inc.)をSambrook, J.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989)に記載の手順により形質転換した。M15/rep4は、lacIリプレッサーを発現し、そしてカナマイシン耐性(Kan<sup>r</sup>)を付与するプラスミドpREP4のマルチコピーを含有する。形質転換体をLBプレート上で増殖する能力により同定し、そしてアンピシリン/カナマイシン耐性コロニーを選択した。プラスミドDNAを単離して、制限酵素分析により確認した。

10

20

30

40

50

#### 【0890】

所望の構築物を含有するクローンを、Amp (100 µg/ml) および Kan (25 µg/ml) の両方を補充したLB培地における液体培養で一晩(O/N)増殖させた。O/N培養物を用いて1:100~1:250の比で大きな培養物に接種する。細胞を、600の光学密度(O.D.<sup>600</sup>)が0.4と0.6の間になるまで増殖させる。次いで、IPTG(「イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド」)を加えて1mMの最終濃度にした。IPTGはlacIリプレッサーを不活性化し、P/Oリーディングを解放することによって遺伝子発現の増加を誘導する。細胞をさらに3~4時間増殖させた。次いで、細胞を遠心分離により収集した。この細胞ペレットをカオトロピック薬剤6MグアニジンHCl中で可溶化した。明澄化の後、6-Hisタグを含有するタンパク質による緊密な結合を可能にする条件下でのニッケル-キレートカラムにおけるクロマトグラフィーによって、この溶液から可溶化HDG NR10を精製した(Hochuli, Eら、J. Chromatography 411:177-184(1984))。HDG NR10(90%純粋)を6MグアニジンHCl pH5.0でカラムから溶出し、そして再生のために3MグアニジンHCl、100mMリン酸ナトリウム、10mMグルタチオン(還元型)、および2Mグルタチオン(酸化型)に調整した。この溶液中での12時間のインキュベーションの後、タンパク質を10mMリン酸ナトリウムに対して透析した。

#### 【0891】

(実施例2)

(COS細胞における組換えHDG NR10の発現)

プラスミドHDG NR10 HAの発現は、ベクターpcDNA1/Amp (Invitrogen)に由来し、このベクターpcDNA1/ampは以下を含む:(1)SV40複製起点、(2)アンピシリン耐性遺伝子、(3)E. coli複製起点、(4)CMVプロモーター、それに続くポリリンカー領域、SV40イントロンおよびポリアダニル化部位。HDG NR10前駆体全体およびその3'末端にインフレームで融合されたHAタグをコードするDNAフラグメントを、このベクターのポリリンカー領域内にクローン化した。従って、組換えタンパク質の発現は、CMVプロモーター下で指向される。HAタグは、(I. Wilsonら、Cell 37:767(1984))に以前に記載されたインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する。標的タンパク質へのHAタグの融合は、HAエピトープを認識する抗体を用いた、組換えタンパク質の容易な検出を可能にする。

#### 【0892】

プラスミド構築ストラテジーは、以下に記載の通りである:

HDG NR10をコードするDNA配列(ATCC番号97183)を、以下の2つの

プライマーを使用するPCRにより構築した：5'プライマー(5'GTCCAAGCTTGCCACCATGGATTATCAAGTGTCA3')(配列番号5)は、HindIII部位を含み、続いて、開始コドンから始まるHDG NR10のコード配列の18ヌクレオチドを含む；3'配列(5'CTAGCTCGAGTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGCACAAAGCCACAGATATTTTC3')(配列番号6)は、XhoI部位、翻訳終止コドン、HAタグ、およびHDG NR10コード配列の最後の18ヌクレオチド(終止コドンは含んでいない)に対する相補配列を含む。従って、PCR産物は、HindIII部位HDG NR10コード配列、これに続くインフレームで融合されたHAタグ、HAタグに続く翻訳終止コドン、ならびにXhoI部位を含む。PCR増幅DNAフラグメントおよびベクターpcDNA1/Ampを、HindIIIおよびXhoI制限酵素で消化し、そして連結した。連結混合物を、E. coli株SURE(Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037から入手可能)内に形質転換し、形質転換培養物を、アンピシリン培地プレートへプレATINGし、そして耐性コロニーを選択した。プラスミドDNAを形質転換体から単離し、そして正しいフラグメントの存在について制限分析によって試験した。組換えHDG NR10発現のために、COS細胞を、DEAE-DEXTRAN法(J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press (1989))により発現ベクターをトランスフェクトした。HDG NR10 HAタンパク質の発現を、放射標識化および免疫沈降法(E. HarlowおよびD. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988))によって検出した。細胞を、トランスフェクションの2日後に35S-システインで8時間標識した。次いで、培養培地を収集し、そして細胞を界面活性剤(RIPA緩衝液(150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% DOC, 50mM Tris, pH 7.5)(Wilson, I.ら、同書 37:767(1984))で溶解した。細胞溶解物および培養培地の両方を、HA特異的モノクローナル抗体を用いて沈降した。沈降されたタンパク質を、15% SDS-PAGEゲル上で分析した。

#### 【0893】

(実施例3)

(Baculovirus発現系を使用するHDG NR10のクローニングおよび発現)

全長HDG NR10タンパク質をコードするDNA配列(ATCC番号97183)を、その遺伝子の5'および3'配列に対応するPCRオリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅した。

#### 【0894】

5'プライマーは、配列5'CGGGATCCCTCCATGGATTATCAAGTGTCA3'(配列番号7)を有し、そしてBamHI制限酵素部位、続いて真核生物細胞における翻訳の開始のために効率的なシグナルに類似の4ヌクレオチド(Kozak, M., J. Mol. Biol. 196:947-950(1987))、および直前に、HDG NR10遺伝子の最初の18ヌクレオチド配列を含む(翻訳の開始コドンは「ATG」である)。

#### 【0895】

3'プライマーは、配列5'CGGGATCCCGCTCACAAAGCCACAGATAT3'(配列番号8)を有し、そして制限エンドヌクレアーゼBamHIに対する切断部位およびHDG NR10遺伝子の3'未翻訳配列に相補的な18ヌクレオチドを含む。増幅された配列を、市販のキット(「GeneClean」BIO 101 Inc., La Jolla, CA)を用いて、1%アガロースゲルから単離した。次いで、この

フラグメントを、エンドヌクレアーゼ BamHI で消化し、次いで、上記のように精製した。このフラグメントを、F2 と称した。

【0896】

pRG1ベクター（pVL941ベクターの改変、以下で議論する）を、バキュロウイルス発現系（総説については；Summers, M. D. および Smith, G. E., 1987, 「A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures」Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555を参照のこと）を使用するHDGNR10タンパク質の発現のために使用する。この発現ベクターは、Autographa californica核多角体病ウイルス（AcMNPV）の強力なポリヘドリンプロモーターを含み、続いて制限エンドヌクレアーゼ BamHI についての認識部位を含む。シミアンウイルス（SV）40のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために使用する。組換えウイルスの容易な選択のために、E. coli由来のガラクトシダーゼ遺伝子が、ポリヘドリンプロモーターと同じ方向で挿入され、ポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルがこれに続く。ポリヘドリン配列には、同時トランスフェクトされた野生型ウイルスDNAの細胞媒介性相同組換えのためにウイルス配列が両側で隣接される。多くの他のバキュロウイルスベクターが、pRG1に代わって使用され得る（例えば、pAc373、pVL941およびpAcIM1）（Luckow, V. A. および Summers, M. D., Virology 170: 31-39）。

10

20

【0897】

プラスミドを、制限酵素 BamHI で消化し、次いでウシ腸ホスファターゼを使用して、当該分野で公知の手順により脱リン酸化した。そのDNAを次いで、上記のように1%アガロースゲルから単離した。このベクターDNAを、V2 と称する。

【0898】

フラグメントF2および脱リン酸化プラスミドV2を、T4 DNAリガーゼで連結する。次いで、E. coli HB101細胞を形質転換し、そしてHDGNR10遺伝子を有するプラスミド（pBac HDGNR10）を含む細菌を、酵素 BamHI を使用して同定した。クローン化フラグメントの配列を、DNA配列決定によって確認した。

【0899】

5 μgのプラスミドpBac HDGNR10を、リポフェクチン法（Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417 (1987)）を使用して、1.0 μgの市販の線状化バキュロウイルス（「BaculoGold<sup>TM</sup> baculovirus DNA」, Pharmingen, San Diego, CA.）とともに同時トランスフェクトした。

30

【0900】

1 μgのBaculoGold<sup>TM</sup>ウイルスDNAおよび5 μgのプラスミドpBac HDGNR10を、50 μgの無血清グレース培地（Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD）を含むマイクロタイタープレートの滅菌ウェル中で混合した。その後、10 μlのリポフェクチンおよび90 μlのグレース培地を添加し、混合し、そして室温にて15分間インキュベートした。次いで、このトランスフェクション混合物を、無血清グレース培地1 mlを有する35 mm組織培養プレート内に播種されたSf9昆虫細胞（ATCC CRL 1711）に滴下した。プレートを前後に傾けて、その新しく添加した溶液を混合した。次いで、プレートを、27 °Cで5時間インキュベートした。5時間後、トランスフェクション溶液をプレートから除去し、そして10%ウシ胎児血清を補充した1 mlのグレース昆虫培地を添加した。プレートをインキュベーター内に置き戻し、そして培養を、27 °Cで4日間継続した。

40

【0901】

4日後、上清を回収し、そしてSummersおよびSmith、前出に記載されるのと同様にブランクアッセイを行った。改変により、「Blue Gal」（Life T

50

echnologies Inc., Gaithersburg)を含むアガロースゲルを用いて、青色染色されたブランクの容易な単離を可能にした。(「ブランクアッセイ」の詳細な説明はまた、Life Technologies Inc., Gaithersburg、で配布される昆虫細胞培養およびバキュロウイルス学のための使用者ガイド(9~10頁)においても見出され得る)。

#### 【0902】

段階希釈の4日後、ウイルスを細胞に添加し、青色染色されたブランクをEppendorfピペットのチップで拾った。次いで、組換えウイルスを含む寒天を、200 $\mu$ lのグレース培地を含むEppendorfチューブに再懸濁した。寒天を手短な遠心分離により除去し、そして組換えバキュロウイルスを含む上清を使用して、35mmディッシュに播種されたSf9細胞を感染させる。4日後、これらの培養ディッシュの上清を収集し、次いでそれらを4で保存する。

10

#### 【0903】

Sf9細胞を、10%熱非働化FBSを補充したグレース培地中で増殖させた。細胞に、2の感染多重度(「MOI」)で組換えバキュロウイルスV-HDGNR10を感染させた。6時間後、培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを除いたSF900II培地(Life Technologies Inc., Gaithersburg)で置換した。42時間後、5 $\mu$ Ciの<sup>35</sup>S-メチオニンおよび5 $\mu$ Ciの<sup>35</sup>S-システイン(Amersham)を添加した。細胞をさらに16時間インキュベートし、次いで細胞を遠心分離により収集し、そして標識タンパク質を、SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィーにより可視化した。

20

#### 【0904】

(実施例4)

(遺伝子治療を介する発現)

線維芽細胞を、被験体から皮膚生検によって得る。得られた組織を組織培養培地中に置き、そして小片に分ける。組織の小塊を、組織培養フラスコの湿った表面上に置き、各フラスコ中におよそ10片を置く。フラスコの上下を逆さにし、密閉し、そして室温に一晩放置する。室温で24時間後、フラスコを反転させ、そして組織塊をフラスコの底に付着したままにし、そして新鮮な培地(例えば、10%FBS、ペニシリン、およびストレプトマイシンを有するHamのF12培地)を添加する。次いで、これを37度でおよそ1週間インキュベートする。この時点で新鮮な培地を添加し、その後数日ごとに取り替える。さらに2週間の培養後、線維芽細胞の単層が出現する。単層をトリプシン処理し、そしてより大きなフラスコにスケールアップ(scale)する。

30

#### 【0905】

モロニー Maus肉腫ウイルスの長い末端反復に隣接するpMV-7(Kirschmeier, P.T.ら、DNA 7:219-225(1988))をEcoRIおよびHindIIIを用いて消化し、続いて仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。直鎖状ベクターをアガロースゲル上で分別し、そしてガラスビーズを用いて精製する。

#### 【0906】

本発明のポリペプチドをコードするcDNAを、それぞれ5'末端配列および3'末端配列に対応するPCRプライマーを用いて増幅する。5'プライマーはEcoRI部位を含み、そして3'プライマーはHindIII部位を含む。等量のモロニー Maus肉腫ウイルス直鎖状骨格、ならびにEcoRIおよびHindIIIフラグメントを、T4 DNAリガーゼの存在下で一緒に加える。得られた混合物を、2つのフラグメントの連結に適切な条件下で維持する。連結混合物を使用して、細菌HB101を形質転換し、次いで、これを、適切に挿入された目的の遺伝子をベクターが有することを確認する目的のために、カナマイシン含有寒天上にプレATINGする。

40

#### 【0907】

アンホトロピックpA317またはGP+am12パッケージング細胞を、10%仔ウシ血清(CS)、ペニシリン、およびストレプトマイシンを有するDulbecco改変

50

Eagle培地(DMEM)中の組織培養物中で、コンフルエントな密度になるまで増殖させる。次いで、遺伝子を含むMSVベクターを培地に添加し、そしてパッケージ細胞をベクターで形質導入する。この時点でパッケージ細胞は、遺伝子を含有する感染性ウイルス粒子を産生する(この時点でパッケージ細胞は、プロデューサー細胞と呼ばれる)。

【0908】

新鮮な培地を、形質導入したプロデューサー細胞に添加し、その後、コンフルエントなプロデューサー細胞の10cmプレートから培地を回収する。感染性ウイルス粒子を含む使用済みの培地を、ミリポア(millipore)フィルターを通して濾過して、剥離したプロデューサー細胞を除去し、次いでこの培地を用いて線維芽細胞を感染させる。培地を、線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから除去し、そして直ちにプロデューサー細胞からの培地に置き換える。この培地を除去し、そして新鮮な培地と置き換える。ウイルスの力価が高い場合、事実上全ての線維芽細胞が感染され、そして選択は必要ではない。力価が非常に低い場合、選択マーカー(例えば、neo、またはhis)を有するレトロウイルスベクターを使用することが必要である。

10

【0909】

次いで、操作された線維芽細胞を、単独で、またはcytodex 3マイクロキャリアーズ上でコンフルエントになるまで増殖させた後のいずれかで、宿主に注入する。この時点で、線維芽細胞は、タンパク質産物を産生する。

20

【0910】

(実施例5)

(G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)DNAクローンの寄託されたサンプルからの単離)

G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)についてのDNAを、pQE-9(Qiagen, Inc.)のマルチクローニング部位に挿入する。pQE-9はアンピシリン耐性遺伝子を含み、そしてE.coli株DH10B(Life Technologiesから入手可能である)に形質転換され得る。(例えば、Gruber, C.E.ら、Focus 15:59(1993)を参照のこと)。

【0911】

2つのアプローチを使用して、寄託されたサンプルから、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を単離し得る。第1に、寄託されたクローンを、当業者に公知の技術(例えば、ベクター供給者によって提供される技術または関連の刊行物もしくは特許において提供される技術)を用いて、適切な宿主(例えば、XL-1 Blue(Stratagene))に形質転換する。形質転換体を1.5%寒天プレート(適切な選択薬剤、例えば、アンピシリンを含む)に、1プレートあたり約150の形質転換体(コロニー)の密度でプレーティングする。次いで、単一のコロニーを使用して、当業者に周知の核酸単離技術(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press)を用いて、DNAを生成する。

30

【0912】

あるいは、配列番号1または配列番号21の両端(すなわち、クローンの5'NTおよび3'NTによって囲まれる配列番号1または配列番号21の領域内)に由来する、17~20ヌクレオチドの2つのプライマーを合成し、そしてこれらを使用して、寄託されたDNAプラスミドをテンプレートとして使用して、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)DNAを増幅する。ポリメラーゼ連鎖反応を、慣用の条件下で、例えば、0.5µgの上記DNAテンプレートとの反応混合物の25µl中で実施する。簡便な反応混合物は、1.5~5mM MgCl<sub>2</sub>、0.01%(w/v)ゼラチン、それぞれ20µMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、25pmolの各プライマーおよび0.25ユニットのTaqポリメラーゼである。35サイクルのPCR(94 での変性を1分間; 55 でのアニールを1分間; 72 での伸長を1分間)を、Perkin-E

40

50

lmer Cetus 自動化サーマルサイクラーを用いて実施する。増幅産物をアガロースゲル電気泳動により分析し、そして予想される分子量の DNA バンドを切り出し、そして精製する。PCR 産物を DNA 産物をサブクローニングおよび配列決定することによって、選択された配列であることを確認する。

【0913】

寄託されたクローンに存在しないかもしれない G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 遺伝子の 5' 非コード部分または 3' 非コード部分の同定のために、いくつかの方法が利用可能である。これらの方法は、以下を含むがこれらに限定されない：フィルタープローブ探索、特異的プローブを使用するクローン富化、および当該分野で周知である 5' および 3' 「RACE」プロトコルと類似するかまたは同一のプロトコル。例えば、5' RACE に類似する方法は、所望の全長転写物の欠けている 5' 末端を生成するために利用可能である (Fromont - Racine ら、Nucleic Acids Res. 21 (7) : 1683 - 1684 (1993))。

10

【0914】

簡潔には、特定の RNA オリゴヌクレオチドを、全長遺伝子 RNA 転写物をおそらく含む RNA の集団の 5' 末端に連結する。連結された RNA オリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 遺伝子の公知の配列に特異的なプライマーを含むプライマーセットを使用して、G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 全長遺伝子の 5' 部分を PCR 増幅する。次いで、この増幅した産物を配列決定し得、そしてこれを使用して全長遺伝子を生成し得る。

20

【0915】

この上記の方法は、所望の供給源から単離された総 RNA を用いて開始するが、ポリ A + RNA を使用し得る。次いで、RNA 調製物を、必要ならばホスファターゼで処理して、後の RNA リガーゼ工程を妨害し得る分解または損傷 RNA の 5' リン酸基を排除し得る。次いで、ホスファターゼを不活化するべきであり、そして RNA をメッセンジャー RNA の 5' 末端に存在するキャップ構造を除去するために、タバコ酸性ピロホスファターゼを用いて処理するべきである。この反応は、次いで T4 RNA リガーゼを用いて RNA オリゴヌクレオチドに連結され得る、キャップ切断 RNA の 5' 末端に 5' リン酸基を残す。

【0916】

この改変型 RNA 調製物を、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチドを用いる、第一鎖 cDNA 合成のためのテンプレートとして使用する。第一鎖合成反応物を、連結された RNA オリゴヌクレオチドに特異的なプライマーおよび目的の遺伝子の公知の配列に特異的なプライマーを用いる、所望の 5' 末端の PCR 増幅のためのテンプレートとして使用する。次いで、得られた生成物を配列決定し、そして分析して 5' 末端配列が G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 遺伝子に属することを確認する。

30

【0917】

(実施例 6)

(G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ゲノムクローンの単離)

ヒトゲノム P1 ライブラリー (Genomic Systems, Inc.) を、実施例 5 に記載される方法に従って、配列番号 1 または配列番号 21 に対応する DNA 配列について選択されたプライマーを用いる PCR によってスクリーニングする (Sambrook もまた参照のこと)。

40

【0918】

(実施例 7)

(G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドの組織分布)

G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の mRNA 発現の組織分布を、とりわけ、Sambrook らによって記載されるノーザンプロット分析についてのプロトコルを用いて決定する。例えば、実施例 5 に記載される方法によって生成される G - タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) プローブを、rediprime<sup>T M</sup> DNA

50

labeling system (Amersham Life Science) を用いて、製造者の指示に従って、P<sup>32</sup> で標識する。標識後、プローブを、CHROMA SPIN-100<sup>TM</sup> カラム (Clontech Laboratories, Inc.) を使用して、製造者のプロトコル番号 PT1200-1 に従って精製する。次いで、精製した標識プローブを使用して、種々のヒト組織を mRNA 発現について試験する。

【0919】

種々のヒト組織 (H) またはヒト免疫系組織 (IM) を含む多重組織ノーザン (MTN) プロット (Clontech) を、ExpressHyb<sup>TM</sup> ハイブリダイゼーション溶液 (Clontech) を用いて、製造者のプロトコル番号 PT1190-1 に従って、標識プローブで試験する。ハイブリダイゼーションおよび洗浄後、プロットをマウントして、そして -70 で一晩フィルムに露出し、そしてフィルムを標準的な手順に従って現像する。

10

【0920】

(実施例 8)

(G-タンパク質ケモカインレセプターの染色体マッピング)

オリゴヌクレオチドプライマーのセットを、配列番号 1 または配列番号 21 の 5' 末端の配列に従って設計する。このプライマーは、好ましくは約 100 ヌクレオチドにわたる。次いで、このプライマーセットを、以下のセットの条件下でポリメラーゼ連鎖反応に使用する: 95 で 30 秒; 56 で 1 分; 70 で 1 分。このサイクルを 32 回反復し、次いで 1 回、70 で 5 分間のサイクルを行う。個々の染色体または染色体フラグメントを含む体細胞ハイブリッドパネル (Bios, Inc) に加えて、ヒト、マウス、およびハムスターの DNA を鋳型として使用する。反応物を、8% ポリアクリルアミドゲルまたは 3.5% アガロースゲルのいずれかで分析する。染色体マッピングを、特定の体細胞ハイブリッドにおける約 100 bp の PCR フラグメントの存在によって決定する。

20

【0921】

(実施例 9)

(G-タンパク質ケモカインレセプターの細菌性発現)

本発明の G-タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドをコードする G-タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドを、実施例 5 に概説するように、DNA 配列の 5' および 3' 末端に対応する PCR オリゴヌクレオチドプライマーを使用して増幅して挿入フラグメントを合成する。cDNA 挿入物を増幅するために使用されるプライマーは、発現ベクターに増幅産物をクローニングするために、プライマーの 5' 末端に BamHI および XbaI のような制限部位を好ましくは含むべきである。例えば、BamHI および XbaI は、細菌性発現ベクター pQE-9 (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA) の制限酵素部位に対応する。このプラスミドベクターは、抗生物質耐性 (Amp<sup>r</sup>)、細菌の複製起点 (ori)、IPTG で調節可能なプロモーター/オペレーター (P/O)、リボソーム結合部位 (RBS)、6-ヒスチジンタグ (6-His)、および制限酵素クローニング部位をコードする。

30

【0922】

pQE-9 ベクターを BamHI および XbaI で消化し、そして、増幅されたフラグメントを細菌性 RBS において開始されるリーディングフレームを維持しながら pQE-9 ベクターに連結する。次いで、連結混合物を、lacI リプレッサーを発現し、またカナマイシン耐性 (Kan<sup>r</sup>) を与えるプラスミド pREP4 の多重コピーを含む、E. coli 株 M15/rep4 (Qiagen, Inc.) を形質転換するために使用する。形質転換体を、LB プレート上で生育するそれらの能力によって同定し、そしてアンピシリン/カナマイシン耐性コロニーを選択する。プラスミド DNA を単離し、そして制限分析によって確認する。

40

【0923】

所望の構築物を含むクローンを、Amp (100 μg/ml) および Kan (25 μg/ml) の両方を補充した LB 培地における液体培養で一晩 (O/N) 増殖させる。O/N

50

N培養物を、1:100~1:250の比で大量培養物に接種するために使用する。細胞を、0.4と0.6との間の光学密度600(O.D.<sup>600</sup>)まで増殖させる。次いで、IPTG(イソプロピル-B-D-チオガラクトピラノシド)を最終濃度1mMになるように加える。IPTGは、lacIリプレッサーの不活化により誘導され、P/Oの障害物を除去し、遺伝子発現の増加を導く。

#### 【0924】

細胞を、さらに3~4時間増殖させる。次いで、細胞を遠心分離(6000×gで20分間)によって収集する。細胞ペレットを、カオトロピック剤である6MグアニジンHCl中に、4で3~4時間攪拌することによって可溶化させる。細胞細片を遠心分離によって取り除き、そしてポリペプチドを含む上清を、ニッケル-ニトリロ三酢酸(「Ni-NTA」)アフィニティー樹脂カラム(QIAGEN, Inc. 前出より入手可能)にロードする。6×Hisタグを有するタンパク質は、Ni-NTA樹脂に高い親和性で結合し、そして単純な1工程手順で精製され得る(詳細には、The QIAXpress ionist(1995)QIAGEN, Inc., 前出を参照のこと)。

10

#### 【0925】

手短かに言えば、上清を、6Mグアニジン-HCl、pH8のカラムにロードし、そのカラムを、最初に10容量の6Mグアニジン-HCl、pH8で洗浄し、次いで10容量の6Mグアニジン-HCl、pH6で洗浄し、最後にポリペプチドを、6Mグアニジン-HCl、pH5で溶出する。

#### 【0926】

次いで、精製したG-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質を、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)または50mM酢酸ナトリウム、pH6の緩衝液および200mM NaClに対して透析することにより再生させる。あるいは、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質はNi-NTAカラムに固定化している間に、首尾よく再折畳みされ得る。推奨条件は以下の通りである: プロテアーゼインヒビターを含む、500mM NaCl、20%グリセロール、20mM Tris/HCl pH7.4中の6M~1M尿素の直線勾配を使用する再生。再生は1.5時間以上の時間をかけて行うべきである。再生後、タンパク質を250mMイミダゾールの添加によって溶出させる。イミダゾールを、PBSまたは50mM酢酸ナトリウム pH6の緩衝液および200mM NaClに対する最終の透析工程によって除去する。精製したG-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質を、4で保存するか、または-80で冷凍する。

20

30

#### 【0927】

上記の発現ベクターに加えて、本発明はさらに、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたファージオペレーターおよびプロモーターエレメントを含み、pHE4aと呼ばれる発現ベクターを含む(ATCC受託番号209645、1998年2月25日に寄託)。このベクターは以下を含む: 1) 選択マーカーとしてのネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子、2) E.coli複製起点、3) T5ファージプロモーター配列、4) 2つのlacオペレーター配列、5) シヤイン-ダルガーノ配列、および6) ラクトースオペロンリプレッサー遺伝子(lacIq)。複製起点(oriC)は、pUC19(LTI, Gaithersburg, MD)に由来する。プロモーター配列およびオペレーター配列を合成的に作製する。

40

#### 【0928】

NdeIおよびXbaI、BamHI、XhoI、またはAsp718によってベクターを制限処理し、制限生成物をゲルで泳動し、そしてより大きな方のフラグメント(スタッファー(stuffer)フラグメントは約310塩基対であるべきである)を単離することによって、DNAをpHEaに挿入し得る。DNA挿入物を、NdeI(5'プライマー)およびXbaI、BamHI、XhoI、またはAsp718(3'プライマー)に対する制限部位を有するPCRプライマーを使用して、実施例5に記載のPCRプロトコルに従って生成する。PCR挿入物を、ゲル精製し、そして適合する酵素で制限処理

50

する。挿入物およびベクターを標準的なプロトコルに従って連結する。

【0929】

操作されたベクターは、上記のプロトコルにおいて、細菌系でタンパク質を発現させるために容易に置換され得る。

【0930】

(実施例10)

(封入体からのG-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの精製)

以下の別の方法は、ポリペプチドが封入体の形態で存在する場合に、E. coli中で発現されたG-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドを精製するために使用され得る。他に指定されない場合には、以下のすべての工程は4~10で行われる。

10

【0931】

E. coli発酵の生産期の完了後、細胞培養物を4~10に冷却し、そして15,000rpmの連続遠心分離(Heraeus Sepatech)によって細胞を採集する。細胞ペーストの単位重量あたりのタンパク質の予想される収量および必要とされる精製タンパク質の量に基づいて、細胞ペーストの適切な量(重量による)を、100mM Tris、50mM EDTA、pH7.4を含む緩衝溶液に懸濁させる。細胞を、高剪断ミキサーを使用して均質な懸濁液に分散させる。

【0932】

次いで、細胞をマイクロフルイダイザー(microfluidizer)(Microfluidics, Corp.またはAPV Gaulin, Inc.)に2回、4000~6000psiで溶液を通すことによって溶解させる。次いでホモジネートを、最終濃度0.5M NaClになるようにNaCl溶液と混合し、続いて7000xgで15分間遠心分離を行う。得られたペレットを、0.5M NaCl、100mM Tris、50mM EDTA、pH7.4を使用して再度洗浄する。

20

【0933】

得られた洗浄した封入体を、1.5M 塩酸グアニジン(GuHCl)で2~4時間可溶化する。7000xgで15分間の遠心分離の後、ペレットを廃棄し、そしてポリペプチドを含む上清を4で一晩インキュベートしてさらなるGuHCl抽出を可能にする。

30

【0934】

不溶性粒子を除去するための高速遠心分離(30,000xg)に続き、GuHCl可溶化タンパク質を、GuHCl抽出物と、50mM ナトリウム、pH4.5、150mM NaCl、2mM EDTAを含む20容量の緩衝液とを、激しい攪拌で迅速に混合することによって、再折畳みさせる。再折畳みした希釈タンパク質溶液を、さらなる精製工程の前の12時間、混合しないで4で保つ。

【0935】

再折畳みされたポリペプチド溶液を清澄にするために、40mM酢酸ナトリウム、pH6.0で平衡化した、適切な表面積を有する0.16µmメンブレンフィルターを備えるあらかじめ準備した接線濾過ユニット(例えば、Filtron)を使用する。濾過したサンプルを、カチオン交換樹脂(例えば、Poros HS-50, Perseptive Biosystems)上にロードする。このカラムを40mM酢酸ナトリウム、pH6.0で洗浄し、そして同じ緩衝液中の250mM、500mM、1000mM、および1500mM NaClで、段階的な様式で溶出する。溶出液の280nmにおける吸光度を連続的にモニターする。画分を収集し、そしてSDS-PAGEによってさらに分析する。

40

【0936】

次いで、G-タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドを含む画分をプールし、そして4容量の水と混合する。次いで希釈されたサンプルを、あらかじめ準備した強アニオン(Poros HQ-50, Perseptive Biosystem

50

s) 交換樹脂および弱アニオン (Poros CM-20, Perseptive Biosystems) 交換樹脂の直列カラムのセットにロードする。カラムを 40 mM 酢酸ナトリウム、pH 6.0 で平衡化する。両方のカラムを、40 mM 酢酸ナトリウム、pH 6.0、200 mM NaCl で洗浄する。次いで CM-20 カラムを 10 カラム容量の直線勾配 (0.2 M NaCl、50 mM 酢酸ナトリウム、pH 6.0 から 1.0 M NaCl、50 mM 酢酸ナトリウム、pH 6.5 の範囲) を用いて溶出させる。画分を、溶出液の定常 A<sub>280</sub> モニタリング下で収集する。次いで、(例えば、16% SDS-PAGE によって判明した) ポリペプチドを含む画分をプールの。

【0937】

得られた G-タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドは、上記の再折畳みおよび精製工程の後で 95% より高い純度を示すはずである。5 μg の精製タンパク質がロードされる場合、いかなる主たる混在バンドも、クマシーブルー染色した 16% SDS-PAGE ゲルから観察されないはずである。精製 G-タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) タンパク質はまた、エンドトキシン/LPS 混在について試験され得、そして代表的には、LPS 含量は LAL アッセイに従って、0.1 ng/ml 未満である。

10

【0938】

(実施例 11: バキュロウイルス発現系における G-タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドのクローニングおよび発現)

この実施例において、プラスミドシャトルベクター pA2 を使用して、G-タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドをバキュロウイルスに挿入し、G-タンパク質ケモカインレセプターを発現する。この発現ベクターは、Autographa californica 核多核体ウイルス (AcMNPV) の強力なポリヘドリンプロモーター、続いて BamHI、XbaI、および Asp718 のような簡便な制限部位を含む。シミアンウイルス 40 (「SV40」) のポリアデニル化部位を、効率的なポリアデニル化のために使用する。組換えウイルスの容易な選択のために、このプラスミドは、同方向の弱い Drosophila プロモーターの制御下で、E. coli 由来の -ガラクトシダーゼ遺伝子、続いてポリヘドリン遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む。挿入された遺伝子は、クローニングした G-タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチドを発現する生存可能なウイルスを生成する、野生型ウイルス DNA との細胞媒介性の相同組換えのためのウイルス配列と両方の側で隣接する。

20

30

【0939】

他の多くのバキュロウイルスベクター (例えば、pAc373、pVL941、および pAcIM1) は、当業者が容易に理解するように、構築物が転写、翻訳、分泌などのために適切に配置されたシグナル (必要とされる場合、シグナルペプチドおよびインフレームな AUG を含む) を提供する限りにおいて、上記のベクターの代わりに使用され得る。このようなベクターは、例えば、Luckow ら、Virology 170:31-39 (1989) に記載される。

【0940】

具体的には、AUG 開始コドン、および天然に結合した任意のリーダー配列を含む、寄託されたクローニングに含まれる G-タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) cDNA 配列を、実施例 5 に記載される PCR プロトコルを使用して増幅させる。天然に存在するシグナル配列を使用して分泌タンパク質を産生する場合、pA2 ベクターは第 2 のシグナルペプチドを必要としない。あるいは、Summers ら、「A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures」、Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. : 1555 (1987) に記載される標準的な方法を用いて、このベクターを、バキュロウイルスリーダー配列を含むように改変し得る (pA2GP)。

40

【0941】

50

増幅されたフラグメントを、市販のキット（「GeneClean」, BIO 101 Inc., La Jolla, Ca）を使用して、1%アガロースゲルから単離する。次いでフラグメントを適切な制限酵素で消化し、そして再び1%アガロースゲルで精製する。

#### 【0942】

プラスミドを対応する制限酵素で消化し、そして必要に応じて、当該分野で公知の慣用の手順を用いて、仔ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸化し得る。次いでDNAを、市販のキット（「GeneClean」BIO 101 Inc., La Jolla, Ca）を使用して、1%アガロースゲルから単離する。

#### 【0943】

フラグメントおよび脱リン酸化したプラスミドを、T4 DNAリガーゼを用いて互いに連結する。E. coli HB101またはXL-1 Blue (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Ca) 細胞のような他の適切なE. coli 宿主を、連結混合液で形質転換し、そして培養プレート上に拡げる。プラスミドを含む細菌を、個々のコロニー由来のDNAを消化し、そして消化産物をゲル電気泳動によって分析することにより同定する。クローニングしたフラグメントの配列をDNA配列決定によって確認する。

#### 【0944】

このポリヌクレオチドを含む5 µgのプラスミドを、Felgnerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417 (1987) によって記載されたリポフェクション法を使用して、1.0 µgの市販の線状化バキュロウイルスDNA（「BaculoGold<sup>TM</sup> baculovirus DNA」, Pharmingen, San Diego, CA）とともに同時トランスフェクトする。1 µgのBaculoGold<sup>TM</sup> ウイルスDNAおよび5 µgのプラスミドを、50 µlの無血清グレース培地（Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD）を含む、マイクロタイタープレートの滅菌したウェル中で混合する。その後、10 µlのリポフェクションおよび90 µlグレース培地を加え、混合し、そして室温で15分間インキュベートする。次いで、トランスフェクション混合液を、無血清グレース培地1 mlを加えた35 mm組織培養プレートに播種したSf9昆虫細胞（ATCC CRL 1711）に滴下して加える。次いでプレートを27 °Cで5時間インキュベートする。次いで、トランスフェクション溶液をプレートから除去し、そして10%ウシ胎仔血清を補充した1 mlのグレース昆虫培地を添加する。次いで培養を27 °Cで4日間継続する。

#### 【0945】

4日後上清を収集し、SummersおよびSmith、前出によって記載されたようにブランクアッセイを行う。「Blue Gal」（Life Technologies Inc., Gaithersburg）を含むアガロースゲルを、galが発現しているクローン（青色に着色したブランクを生ずる）の容易な同定および単離を可能にするために使用する。（この型の「ブランクアッセイ」の詳細な説明はまた、Life Technologies Inc., Gaithersburgによって配布される、昆虫細胞培養およびバキュロウイルス学のための使用者ガイドの中の9-10頁に見出され得る）。適切なインキュベーションの後、青色に着色したブランクをマイクロピペッター（例えば、Eppendorf）のチップで拾う。次いで、組換えウイルスを含む寒天を、200 µlのグレース培地を含む微小遠心分離チューブ中で再懸濁させ、そして組換えバキュロウイルスを含む懸濁液を、35 mmディッシュに播種したSf9細胞に感染させるために使用する。4日後、これらの培養ディッシュの上清を採集し、次いで4 °Cに貯蔵する。

#### 【0946】

ポリペプチドの発現を確認するために、10%熱非働化FBSを補充したグレース培地中でSf9細胞を増殖させる。細胞を、約2の感染多重度（「MOI」）でポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チドを含む組換えバキュロウイルスで感染させる。放射性標識したタンパク質を所望する場合には、6時間後に培地を除去し、そしてメチオニンおよびシステインを含まないSF900 II培地(Life Technologies Inc., Rockville, MDから入手可能)に置き換える。42時間後、5  $\mu$ Ciの<sup>35</sup>S-メチオニンおよび5  $\mu$ Ciの<sup>35</sup>S-システイン(Amershamから入手可能)を添加する。細胞をさらに16時間インキュベートし、次いで遠心分離によって採集する。上清中のタンパク質および細胞内タンパク質を、SDS-PAGE、次いで(放射性標識した場合)オートラジオグラフィーによって分析する。

【0947】

精製タンパク質のアミノ末端のアミノ酸配列の微量配列決定法を使用して、産生されたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアミノ末端配列を決定し得る。

10

【0948】

(実施例12:哺乳動物細胞におけるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の発現)

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドを、哺乳動物細胞中で発現し得る。代表的な哺乳動物発現ベクターは、mRNAの転写の開始を媒介するプロモーターエレメント、タンパク質コード配列、ならびに転写の終結および転写物のポリアダニル化に必要なシグナルを含む。さらなるエレメントは、エンハンサー、コザック配列、および、RNAスプライシングのドナー部位およびアクセプター部位に隣接する介在配列を含む。非常に効率的な転写は、SV40由来の初期および後期プロモーター、レトロウイルス(例えばRSV、HTLV I、HIV I)由来の長末端反復(LTR)、およびサイトメガロウイルス(CMV)の初期プロモーターを用いて達成される。しかし、細胞エレメント(例えば、ヒトアクチンプロモーター)もまた、使用され得る。

20

【0949】

本発明を実施する際の使用に適切な発現ベクターは、例えば、pSVLおよびpMSG(Pharmacia, Uppsala, Sweden)、pRSVcat(ATCC 37152)、pSV2DHF(R)(ATCC 37146)、pBC12MI(ATCC 67109)、pCMV Sport 2.0、ならびにpCMV Sport 3.0のようなベクターを含む。使用され得る哺乳動物宿主細胞としては、ヒトHeLa細胞、293細胞、H9細胞およびJurkat細胞、マウスNIH3T3細胞およびC127細胞、Cos 1細胞、Cos 7細胞およびCV1細胞、ウズラQC1-3細胞、マウスL細胞、ならびにチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞が挙げられる。

30

【0950】

あるいは、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドは、染色体に組み込まれたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドを含む、安定な細胞株中で発現され得る。DHF(R)、gpt、ネオマイシン、ハイグロマイシンのような選択マーカーを用いる同時トランスフェクションは、トランスフェクトされた細胞の同定および単離を可能にする。

【0951】

トランスフェクトされたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)遺伝子はまた、大量のコードされたタンパク質を発現するために増幅され得る。DHF(R)(ジヒドロ葉酸還元酵素)マーカーは、目的の遺伝子の数百または数千さえものコピーを有する細胞株の開発に有用である。(例えば、Alt, F.W.ら、J. Biol. Chem. 253: 1357-1370(1978); Hamlin, J.L.およびMa, C.ら、Biochem. et Biophys. Acta, 1097: 107-143(1990); Page, M.J.およびSydenham, M.A.ら、Biotechnology 9: 64-68(1991)を参照のこと)。別の有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ(GS)である(Murphyら、Biochem J. 227: 277-279(1991); Bebbingtonら、Bio/Technology 10: 169-175(1992))。これらのマーカーを使用して、哺乳動物細胞を選択培

40

50

地中で増殖させ、そしてもっとも高い耐性を有する細胞を選択する。これらの細胞株は、染色体に組み込まれた、増幅された遺伝子を含む。チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) および NSO 細胞は、タンパク質の産生のためにしばしば使用される。

#### 【0952】

プラスミド pSV2-DHFR (ATCC 受託番号 37146) の誘導体である、発現ベクター pC4 (ATCC 受託番号 209646) および pC6 (ATCC 受託番号 209647) は、ラウス肉腫ウイルス (Cullenら、Molecular and Cellular Biology, 438-447 (1985年3月)) の強力なプロモーター (LTR)、および CMV エンハンサー (Boshartら、Cell 41:521-530 (1985)) のフラグメントを含む。例えば、BamHI、XbaI、および Asp718 の制限酵素切断部位を有するマルチプルクローニングサイトは、Gタンパク質ケモカインレセプターのクローニングを容易にする。ベクターはまた、ラットプレプロインスリン遺伝子の 3'イントロン、ポリアデニル化および終結シグナル、ならびに、SV40 初期プロモーターの制御下にあるマウス DHFR 遺伝子を含む。

10

#### 【0953】

具体的には、プラスミド pC6 または pC4 を、複数のクローニング部位に切断する制限酵素によって消化し、次いで当該分野で公知の手順によって、仔ウシ腸ホスファターゼ (phosphate) を使用して脱リン酸化する。次いで、このベクターを 1% アガロースゲルから単離する。

20

#### 【0954】

このベクターは、細胞からタンパク質を分泌させるために、異種シグナル配列を含むように改変され得る (例えば、WO96/34891 を参照のこと)。

#### 【0955】

次いで、増幅フラグメントを、消化されたベクターの末端に相補的な末端を生成する制限酵素で消化し、そして市販のキット (「GeneClean」、BIO 101 Inc.、La Jolla, Ca.) を使用して、1% アガロースゲルで単離する。次いで、単離されたフラグメントおよび脱リン酸化したベクターを、T4 DNA リガーゼで連結する。次いで、E. coli HB101 細胞または XL-1 Blue 細胞を形質転換し、そしてプラスミド pC6 または pC4 に挿入されたフラグメントを含む細菌を、例えば、制限酵素分析を用いて同定する。

30

#### 【0956】

活性な DHFR 遺伝子を欠損するチャイニーズハムスター卵巣細胞を、トランスフェクションに使用する。5  $\mu$ g の発現プラスミド pC6 または pC4 を、リポフェクチン (Felgnerら、前出) を用いて、0.5  $\mu$ g のプラスミド pSVneo と同時トランスフェクトする。プラスミド pSV2-neo は、優性な選択マーカーであるところの、G418 を含む抗生物質の群に対する耐性を付与する酵素をコードする Tn5 由来の neo 遺伝子を含む。この細胞を、1 mg/ml の G418 を補充した マイナス MEM に播種する。2 日後、この細胞をトリプシン処理し、そして 10、25、または 50 ng/ml のメトトレキサートおよび 1 mg/ml の G418 を補充した マイナス MEM 中のハイブリドマクローニングプレート (Greiner, Germany) 中に播種する。約 10~14 日後、単一のクローンをトリプシン処理し、次いで異なる濃度のメトトレキサート (50 nM、100 nM、200 nM、400 nM、800 nM) を使用して、6 ウェルのペトリ皿または 10 ml のフラスコに播種する。次いで、最高濃度のメトトレキサートで増殖するクローンを、さらに高い濃度のメトトレキサート (1  $\mu$ M、2  $\mu$ M、5  $\mu$ M、10 mM、20 mM) を含む新たな 6 ウェルプレートに移す。同じ手順を、100~200  $\mu$ M の濃度で増殖するクローンが得られるまで繰り返す。Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の発現を、例えば、SDS-PAGE およびウエスタンブロットによって、または逆相 HPLC 分析によって分析する。

40

#### 【0957】

(実施例 13 : N 末端および / または C 末端欠失変異体の構築)

50

以下の一般的なアプローチを使用して、N末端またはC末端欠失Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）欠失変異体をクローニングし得る。一般には、約15～25ヌクレオチドの2つのオリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号1または寄託されたクローン（配列番号21）のポリヌクレオチドの所望の5'位および3'位に由来する。プライマーの5'位および3'位は、所望のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドフラグメントに基づいて決定される。必要な場合は、開始コドンおよび終止コドンを5'プライマーおよび3'プライマーにそれぞれ付加し、このポリヌクレオチドフラグメントによってコードされるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドフラグメントを発現する。好ましいGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドフラグメントは、明細書の「ポリヌクレオチドおよびポリペプチドフラグメント」の節において上記にて開示されるN末端およびC末端欠失変異体をコードするフラグメントである。

#### 【0958】

所望のベクターにおけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドフラグメントのクローニングを促進するための制限部位を含むさらなるヌクレオチドもまた、5'および3'プライマー配列に付加され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドフラグメントは、本明細書中で議論されるかまたは当該分野において公知の適切なPCRオリゴヌクレオチドプライマーおよび条件を用いて、ゲノムDNAから、または寄託されたcDNAクローンから増幅される。本発明のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドフラグメントによってコードされるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドフラグメントは、全長ポリペプチドと同じ一般的な様式で発現および精製され得るが、慣用的な改変が、特定のフラグメントと全長ポリペプチドとの間の化学的特性および物理的特性における差異に起因して必要であり得る。

#### 【0959】

本発明の限定ではなく例示の手段として、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドフラグメントY-37～Q-280をコードするポリヌクレオチドは、以下のように増幅およびクローニングされる：Y-37で開始するポリペプチドフラグメントのN末端部分をコードするポリヌクレオチド配列をインフレームに、制限酵素部位、続いて開始コドンを含む5'プライマーを生成する。Q-280で終結するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドフラグメントのC末端部分をコードするポリヌクレオチド配列をインフレームに、制限酵素部位、続いて終止コドンを含む相補的3'プライマーを生成する。

#### 【0960】

増幅したポリヌクレオチドフラグメントおよび発現ベクターを、プライマー中の部位を認識する制限酵素で消化する。次いで、消化したポリヌクレオチドとともに連結する。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチドフラグメントを、制限発現ベクターに、好ましくはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドフラグメントコード領域をプロモーターから下流に配置する様式で挿入する。連結混合物を、標準的な手順を用いて、本明細書中の実施例に記載されるように、コンピテントE.coli細胞に形質転換する。プラスミドDNAを耐性コロニーから単離し、そしてクローニングされたDNAのアイデンティティを制限分析、PCRおよびDNA配列決定によって確認する。

#### 【0961】

（実施例14：Gタンパク質ケモカインレセプターのタンパク質融合物）

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドは、好ましくは、他のタンパク質に融合される。これらの融合タンパク質は、種々の適用について使用され得る。例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドの、Hisタグ、HAタグ、プロテインA、IgGドメイン、およびマルトース結合タンパク質への融合は、精製を容易にする（実施例9を参照のこと；EPA 394, 827；Traune

10

20

30

40

50

ckerら、Nature 331:84-86(1988)もまた参照のこと)。同様に、IgG-1、IgG-3、およびアルブミンへの融合は、インビボでの半減期を増大させる。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに融合した核局在化シグナルは、タンパク質を特定の細胞内局在に標的化し得る。一方、共有結合ヘテロダイマーまたはホモダイマーは、融合タンパク質の活性を増大または減少させ得る。融合タンパク質はまた、1つより多い機能を有するキメラ分子を作製し得る。最後に、融合タンパク質は、非融合タンパク質と比較して、融合タンパク質の可溶性および/または安定性を増大させ得る。上記の融合タンパク質の全ての型は、ポリペプチドのIgG分子への融合を概説する以下のプロトコル、または実施例9に記載されるプロトコルを改変することによって作製され得る。

#### 【0962】

簡単には、IgG分子のヒトFc部分は、以下に記載の配列の5'および3'末端にわたるプライマーを使用してPCR増幅され得る。これらのプライマーはまた、発現ベクター(好ましくは、哺乳動物発現ベクター)へのクローニングを容易にする都合の良い制限酵素部位を有するべきである。

#### 【0963】

例えば、pC4(受託番号第209646号)が使用される場合、ヒトFc部分は、BamHIクローニング部位に連結され得る。3'BamHI部位が破壊されるべきであることに注意のこと。次に、ヒトFc部分を含有するベクターが、BamHIによって再び制限され、ベクターを線状化し、そして実施例5に記載するPCRプロトコルによって単離されたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドが、このBamHI部位に連結される。このポリヌクレオチドは、終止コドンなしにクローン化され、そうでなければ、融合タンパク質は産生されないことに注意すること。

#### 【0964】

天然に存在するシグナル配列が分泌タンパク質を産生するために使用される場合、pC4は、第二のシグナルペプチドを必要としない。あるいは、天然に存在するシグナル配列が使用されない場合、このベクターは、異種シグナル配列を含むように改変され得る(例えば、WO96/34891を参照のこと)。

#### 【0965】

ヒトIgG Fc領域:

```

GGGATCCGGAGGCCCAAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATG
CCCACCGTGCCCAAGCACCTGAATTCTGAGGGGTGCACCGTCA
GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGA
TCTCCCGGACTCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
AAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAAGTTCAAACCTGGTACGTG
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGG
AGGAGCAGTACAACAAGCACGTAACCGTGTGGTCAAGCGTCC
CACCGTCCCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAACCCCAATCG
AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGGAACC
ACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCGGGATGAGCTGACC
AAGAACCAGGTCAAGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCT
ATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGGTGGAC
TCCGACGGCTCTTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCCTTCTCATGCTC
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAACGCAGGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATAATGAGTGCAGCGCCGC
GACTCTAGAGGAT(配列番号10)。

```

#### 【0966】

10

20

30

40

50

(実施例15：抗体の産生)

ハイブリドーマ技術

本発明の抗体は、種々の方法によって調製され得る。(Current Protocols, 第2章を参照のこと)。このような方法の1つの例として、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を発現する細胞は、ポリクローナル抗体を含む血清の産生を誘導するために動物に投与される。好ましい方法において、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質の調製物が調製され、そして精製されて、天然の夾雑物を実質的に含まないようにされる。次いで、より大きな比活性のポリクローナル抗血清を生成するために、このような調製物は、動物に導入される。

【0967】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質に特異的なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術を使用して調製され得る(Koehlerら、Nature 256:495(1975); Koehlerら、Eur. J. Immunol. 6:511(1976); Koehlerら、Eur. J. Immunol. 6:292(1976); Hammerlingら: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 563-681頁(1981))。一般に、動物(好ましくは、マウス)をGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドで免疫されるか、またはより好ましくは、分泌Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチド発現細胞で免疫される。このようなポリペプチド発現細胞は、任意の適切な組織培養培地において培養される; 10%ウシ胎仔血清(約56で非働化した)を補充し、そして約10g/lの非必須アミノ酸、約1,000U/mlのペニシリン、および約100μg/mlのストレプトマイシンを補充したEarle改変イーグル培地において細胞を培養することが好ましい。

【0968】

このようなマウスの脾細胞は抽出され、そして適切なミエローマ細胞株と融合される。任意の適切なミエローマ細胞株は、本発明に従って用いられ得る; しかし、ATCCから入手可能な親ミエローマ細胞株(SP20)を用いることが好ましい。融合後、得られるハイブリドーマ細胞を、HAT培地において選択的に維持し、次いでWandsら(Gastroenterology 80:225-232(1981))に記載されるように限界希釈によってクローニングする。このような選択によって得られるハイブリドーマ細胞は、次いでGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに結合し得る抗体を分泌するクローンを同定するためにアッセイされる。

【0969】

あるいは、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドに結合し得るさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を使用して2段階工程の手順において生成し得る。このような方法は、抗体それ自体が抗原であり、それゆえ第二の抗体に結合する抗体を得ることが可能であるという事実を利用する。この方法に従って、タンパク質特異的抗体を使用して、動物(好ましくは、マウス)を免疫する。次いで、このような動物の脾細胞を使用して、ハイブリドーマ細胞を産生する。そして、このハイブリドーマ細胞は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質特異的抗体に結合する能力がGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)によってブロックされ得る抗体を産生するクローンを同定するためにスクリーニングされる。このような抗体は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質特異的抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、そして動物を免疫してさらなるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質特異的抗体の形成を誘導するために使用され得る。

【0970】

ヒトにおける抗体のインビボ使用のために、抗体は「ヒト化」される。このような抗体は、上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に由来する遺伝的構築物を使用することによって産生され得る。キメラ抗体およびヒト化抗体を産生するための方法は当該分野で公知であり、本明細書中に議論される(総説については、Morrisson

10

20

30

40

50

, Science 229:1202 (1985); Oira, BioTechnique 4:214 (1986); Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Taniguchiら、EP 171496; Morrisonら、EP 173494; Neubergerら、WO 8601533; Robinsonら、WO 8702671; Boulianneら、Nature 312:643 (1984); Neubergerら、Nature 314:268 (1985)を参照のこと。

【0971】

(scFvのライブラリーからのGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に対する抗体フラグメントの単離)

ヒトPBLから単離した天然に存在するV遺伝子を、ドナーが曝露されていてもよいし、曝露されていなくてもよいGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に対する反応性を含む抗体フラグメントのライブラリーに構築する(例えば、米国特許第5,885,793号(その全体が参考として本明細書に援用される)を参照のこと)。

【0972】

(ライブラリーのレスキュー)

PCT公報WO92/01047に記載のように、ヒトPBLのRNAからscFvのライブラリーを構築する。抗体フラグメントを提示するファージをレスキューするため、ファージミドを保有する約 $10^9$ 個のE.coliを用いて、50mlの $2 \times TY$ (1%グルコースおよび $100 \mu g/ml$ のアンプシリンを含有する)( $2 \times TY - AMP - GLU$ )を接種し、そして振盪しながら0.8のO.D.まで増殖させる。この培養物の5mlを用いて50mlの $2 \times TY - AMP - GLU$ を接種(innoculate)し、 $2 \times 10^8$  TUの遺伝子3ヘルパー(M13 遺伝子III、PCT公報WO92/01047を参照のこと)を添加し、そして培養物を振盪なしで37で45分間インキュベートし、次いで振盪しながら37で45分間インキュベートする。この培養物を10分間4000r.p.m.で遠心分離し、そしてペレットを2リットルの $2 \times TY$ ( $100 \mu g/ml$ アンプシリンおよび $50 \mu g/ml$ カナマイシンを含有する)中に再懸濁し、そして一晚増殖させる。ファージをPCT公報WO92/01047に記載のように調製する。

【0973】

M13 遺伝子IIIを以下のように調製する：M13 遺伝子IIIヘルパーファージは、遺伝子IIIタンパク質をコードしない。それゆえ、抗体フラグメントを提示するファージ(ファージミド)は、抗原に対するより大きい結合アビディティを有する。ファージ形態形成の間、野生型遺伝子IIIタンパク質を供給するpUC19誘導体を保有する細胞においてヘルパーファージを増殖させることにより、感染性M13 遺伝子III粒子を作製する。培養物を振盪なしで37で1時間インキュベートし、次いで振盪しながら37でさらに1時間インキュベートする。細胞を遠心沈殿(IEC-Centra 8, 400r.p.m./分で10分間)し、 $100 \mu g/ml$ のアンプシリンおよび $25 \mu g/ml$ のカナマイシンを含有する $2 \times TY$ ブロス( $2 \times TY - AMP - KAN$ )300ml中で再懸濁し、そして37で振盪しながら一晚増殖させた。ファージ粒子を、2回のPEG沈殿(Sambrookら、1990)により培養培地から精製および濃縮し、2ml PBSに再懸濁し、そして $0.45 \mu m$ のフィルター(Minisart NML; Sartorius)を通過させ、約 $10^{13}$ 形質導入単位/ml(アンプシリン耐性クローン)の最終濃度を得る。

【0974】

(ライブラリーパニング)

Immunotubes(Nunc)を、本発明のポリペプチドの $100 \mu g/ml$ または $10 \mu g/ml$ のいずれかの4mlを用いてPBS中で一晚被膜する。チューブを2%Marvel-PBSを用いて37で2時間ブロックし、次いでPBS中で3回洗浄する。約 $10^{13}$  TUのファージをチューブに適用し、そして、回転盤で上下に傾けながら室温で30分間インキュベートし、次いでさらに1.5時間静置しておく。チューブを

10

20

30

40

50

PBS 0.1% Tween-20で10回、そしてPBSで10回洗浄する。1mlの100mMトリエチルアミンを添加し、そして回転盤上で15分間上下に回転させることによりファージを溶出し、その後この溶液を0.5mlの1.0M Tris-HCl, pH7.4で直ちに中和する。次いで、溶出したファージを細菌とともに37℃で30分間インキュベートすることにより、ファージを用いて、10mlの対数増殖中期のE. coli TG1に感染させる。次いで、E. coliを1%グルコースおよび100μg/mlアンピシリンを含有するTYEプレート上にプレートする。次いで、得られる細菌ライブラリーを、上記のように遺伝子3ヘルパーファージでレスキューし、次の回の選択のためのファージを調製する。次いで、このプロセスを、アフィニティー精製の全4回について反復し、3回目および4回目にはチューブ洗浄をPBS、0.1% Tween-20で20回、そしてPBSで20回に増加する。

10

## 【0975】

(結合剤の特徴付け)

第3回目および4回目の選択から溶出したファージを用いて、E. coli HB 2151を感染させ、そして可溶性scFvをアッセイのために単一コロニーから生成する(Marksら、1991)。50mM炭酸水素塩、pH9.6中の本発明のポリペプチドの10ピコグラム/mlのいずれかで被膜したマイクロタイタープレートを用いてELISAを実行する。ELISA中の陽性クローンをPCRフィンガープリンティング(例えば、WO92/01047を参照のこと)、次に配列決定することによりさらに特徴付ける。これらのELISA陽性クローンはまた、当該分野において公知の技術(例えば、エピトープマッピング、結合親和性、レセプターシグナル形質導入、抗体/抗原結合をブロックするかまたは競合的に阻害する能力、および競合的アゴニスト活性または競合的アンタゴニスト活性など)によりさらに特徴付けられ得る。

20

## 【0976】

(実施例16:高処理能力スクリーニングアッセイのためのGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンドの産生)

以下のプロトコルは、試験される可溶性Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドまたはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンドを含む上清を産生する。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のリガンドには、MIP-1、MIP-1、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、Eotaxin、RANTES、およびHIVが挙げられる。次いで、この上清は、実施例18~25に記載されるスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。

30

## 【0977】

第一に、ポリ-D-リジン(644 587 Boehringer-Mannheim)ストック溶液(PBS中に1mg/ml)を、PBS(カルシウムもマグネシウムも含まない17-516F Biowhitaker)中で1:20に希釈して、作業溶液50μg/mlにする。200μlのこの溶液を、各ウェル(24ウェルプレート)に添加し、そして室温で20分間インキュベートする。溶液を各ウェルにわたって分配させることを確実にする(注記:12チャンネルピペッターを、1つおきのチャンネルにチップをつけて使用し得る)。ポリ-D-リジン溶液を吸引除去し、そして1ml PBS(リン酸緩衝化生理食塩水)でリンスする。PBSは、細胞をプレートする直前までウェル中に残すべきであり、そしてプレートは2週間前までに予めポリリジンでコーティングし得る。

40

## 【0978】

293T細胞(P+20を過ぎて細胞を保有しない)を、 $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルで、0.5mlのDMEM(Dulbecco改変Eagle培地)(4.5G/LのグルコースおよびL-グルタミン(12-604F Biowhitaker)を含む)/10%熱非働化FBS(14-503F Biowhitaker)/1xPenstrep(17-602E Biowhitaker)中にプレートする。細胞を一晩増殖

50

させる。

【0979】

翌日、滅菌溶液容器 (basin) 中で、300  $\mu$ l Lipofectamine (18324-012 Gibco/BRL) および 5ml Optimem I (31985070 Gibco/BRL) / 96 ウェルプレート を、一緒に混合する。少容量のマルチチャンネルピペッターを用いて、実施例 8 ~ 10 に記載する方法によって産生されたポリヌクレオチド挿入物を含む約 2  $\mu$ g の発現ベクターを、適切に標識された 96 ウェルの丸底プレート中にアリコートする。マルチチャンネルピペッターを用いて、50  $\mu$ l の Lipofectamine / Optimem I 混合物を各ウェルに添加する。ピペットで緩やかに吸い上げたり下げたりして混合する。室温で 15 ~ 45 分間インキュベートする。約 20 分後、マルチチャンネルピペッターを使用して 150  $\mu$ l の Optimem I を各ウェルに添加する。コントロールとして、挿入物を欠失するベクター DNA の 1 つのプレートは、トランスフェクションの各セットでトランスフェクトされるべきである。

10

【0980】

好ましくは、トランスフェクションは、以下の作業をタッグチームを組んで (tag-teaming) 行うべきである。タッグチームを組むことによって、時間に関する労力は半減され、そして細胞には PBS 上であまり多くの時間を過ごさせない。まず、A さんは、培地を細胞の 4 つの 24 ウェルプレートから吸引除去し、次いで B さんが 0.5 ~ 1 ml の PBS で各ウェルをリンスする。次いで、A さんは、PBS リンスを吸引除去し、そして B さんは、1 つおきのチャンネルにチップのついた 12 チャンネルピペッターを使用して、200  $\mu$ l の DNA / Lipofectamine / Optimem I 複合体を、まず奇数のウェルに、次いで偶数のウェルにと、24 ウェルプレート上の各列に添加する。37 で 6 時間インキュベートする。

20

【0981】

細胞をインキュベートする間に、1x ペンストレップ (penstrep) を有する DMEM 中の 1% BSA が、または HGS CHO-5 培地 (116.6 mg/L の  $\text{CaCl}_2$  (無水物); 0.00130 mg/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.050 mg/L の  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ; 0.417 mg/L の  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 311.80 mg/L の  $\text{KCl}$ ; 28.64 mg/L の  $\text{MgCl}_2$ ; 48.84 mg/L の  $\text{MgSO}_4$ ; 6995.50 mg/L の  $\text{NaCl}$ ; 2400.0 mg/L の  $\text{NaHCO}_3$ ; 62.50 mg/L の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 71.02 mg/L の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0.4320 mg/L の  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.002 mg/L のアラキドン酸; 1.022 mg/L のコレステロール; 0.070 mg/L の DL-酢酸トコフェロール; 0.0520 mg/L のリノール酸; 0.010 mg/L のリノレン酸; 0.010 mg/L のミリスチン酸; 0.010 mg/L のオレイン酸; 0.010 mg/L のパルミトレイン酸 (palmitric acid); 0.010 mg/L のパルミチン酸; 100 mg/L の Pluronic F-68; 0.010 mg/L のステアリン酸; 2.20 mg/L の Tween 80; 4551 mg/L の D-グルコース; 130.85 mg/ml の L-アラニン; 147.50 mg/ml の L-アルギニン-HCl; 7.50 mg/ml の L-アスパラギン-H<sub>2</sub>O; 6.65 mg/ml の L-アスパラギン酸; 29.56 mg/ml の L-シスチン-2HCl-H<sub>2</sub>O; 31.29 mg/ml の L-シスチン-2HCl; 7.35 mg/ml の L-グルタミン酸; 365.0 mg/ml の L-グルタミン; 18.75 mg/ml のグリシン; 52.48 mg/ml の L-ヒスチジン-HCl-H<sub>2</sub>O; 106.97 mg/ml の L-イソロイシン; 111.45 mg/ml の L-ロイシン; 163.75 mg/ml の L-リジン HCl; 32.34 mg/ml の L-メチオニン; 68.48 mg/ml の L-フェニルアラニン; 40.0 mg/ml の L-プロリン; 26.25 mg/ml の L-セリン; 101.05 mg/ml の L-スレオニン; 19.22 mg/ml の L-トリプトファン; 91.79 mg/ml の L-チロシン (Tyrosine) - 2Na - 2H<sub>2</sub>O; および 99.65 mg/ml の L-バ

30

40

50

リン；0.0035 mg/Lのビオチン；3.24 mg/LのD-Caパントテネート；11.78 mg/Lの塩化コリン；4.65 mg/Lの葉酸；15.60 mg/Lのi-イノシトール；3.02 mg/Lのナイアシンアミド；3.00 mg/LのピリドキサルHCl；0.031 mg/LのピリドキシンHCl；0.319 mg/Lのリボフラビン；3.17 mg/LのチアミンHCl；0.365 mg/Lのチミジン；0.680 mg/LのビタミンB<sub>12</sub>；25 mMのHEPES緩衝剤；2.39 mg/LのNaヒポキサンチン；0.105 mg/Lのリボ酸；0.081 mg/Lのブトレシナトリウム-2HCl；55.0 mg/Lのピルビン酸ナトリウム；0.0067 mg/Lの亜セレン酸ナトリウム；20 μMのエタノールアミン；0.122 mg/Lのクエン酸鉄；リノール酸と複合体化した41.70 mg/Lのメチル-B-シクロデキストリン；オレイン酸と複合体化した33.33 mg/Lのメチル-B-シクロデキストリン；レチナルアセテートと複合体化した10 mg/Lのメチル-B-シクロデキストリン)のいずれかの適切な培地を調製する。2 mMグルタミンおよび1 x ペンストレップ (pen strep) を用いて、浸透圧モル濃度を327 mOsmに調整する(10% BSAストック溶液のために、1 L DMEM中にBSA(81-068-3 Bayer) 100 gを溶解した)。培地を濾過し、そして50 μlを内毒素アッセイのために15 mlポリスチレンコニカル中に収集する。

10

#### 【0982】

トランスフェクション反応を、好ましくはタッグチームを組んでインキュベーション時間の終わりに終結させる。Aさんは、トランスフェクション培地を吸引除去し、その間Bさんは、1.5 mlの適切な培地を各ウェルに添加する。使用された培地に依存して45時間または72時間、37 でインキュベートする：1% BSAは45時間、またはCHO-5は72時間。

20

#### 【0983】

4日目に、300 μlのマルチチャンネルピペッターを使用して、600 μlを1 mlの深底ウェルプレート1枚にアリコートし、そして残りの上清を2 mlの深底ウェルにアリコートする。次いで、各ウェルからの上清を実施例18~25に記載するアッセイにおいて使用し得る。

#### 【0984】

活性が、上清を使用して以下に記載する任意のアッセイにおいて得られる場合、この活性は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドから直接に(例えば、分泌タンパク質、可溶性タンパク質、もしくは膜関連タンパク質として)またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンドから直接にか、あるいは他のタンパク質のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンド誘導発現によって(このタンパク質は、次いで上清中に分泌される)のいずれかに由来することが特に理解される。従って、本発明はさらに、特定のアッセイにおける活性によって特徴づけられる上清中のタンパク質を同定する方法を提供する。

30

#### 【0985】

(実施例17：GASレポーター構築物の構築)

細胞の分化および増殖に関する1つのシグナル伝達経路は、Jak-STAT経路と呼ばれる。Jak-STAT経路において活性化されたタンパク質は、多くの遺伝子のプロモーターに位置する、活性化部位「GAS」エレメントまたはインターフェロン感受性応答エレメント(「ISRE」)に結合する。これらのエレメントに対するタンパク質の結合は、関連する遺伝子の発現を変化させる。

40

#### 【0986】

GASエレメントおよびISREエレメントは、Signal Transducer and Activators of Transcription、すなわち「STAT」と呼ばれるクラスの転写因子によって認識される。STATファミリーには6つのメンバーが存在する。Stat1およびStat3は、Stat2と同様に(IFNに対する応答が広範であるように)、多くの細胞型において存在する。Stat4は、よ

50

り限定されており、そして多くの細胞型には存在しないが、IL-12での処理後のTヘルパークラスI細胞に見出されている。Stat5は、元々は乳房成長因子と呼ばれたが、骨髄性細胞を含む他の細胞においてより高い濃度で見出されている。それは、多くのサイトカインによって組織培養細胞において活性化され得る。

【0987】

STATは活性化されて、Janus Kinase(「Jak」)ファミリーとして知られる1セットのキナーゼによるチロシンリン酸化に際して細胞質から核へトランスロケートする。Jakは、可溶性のチロシンキナーゼの別個のファミリーの代表であり、そしてTyk2、Jak1、Jak2、およびJak3を含む。これらのキナーゼは、有意な配列類似性を示し、そして一般には休止細胞において触媒的に不活性である。

10

【0988】

Jakは、以下の表3によって要約されるように広範なレセプターによって活性化される。(SchidlerおよびDarnell, Ann. Rev. Biochem. 64: 621-51 (1995)による総説から改変)。Jakを活性化し得るサイトカインレセプターファミリーは、2つの群に分けられる:(a)クラス1は、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-12、IL-15、Epo、PRL、GH、G-CSF、GM-CSF、LIF、CNTF、およびトロンボポエチンに対するレセプターを含み;そして(b)クラス2は、IFN-a、IFN-g、およびIL-10を含む。クラス1レセプターは、保存されたシステインモチーフ(4つの保存されたシステインおよび1つのトリプトファンセット)、およびWSXWSモチーフ(Trp-Ser-Xxx-Trp-Ser(配列番号11)をコードする膜近接(proxial)領域)を共有する。

20

【0989】

従って、リガンドのレセプターへの結合の際に、Jakは活性化され、これは次いでSTATを活性化し、これは、次いでトランスロケートし、そしてGASエレメントに結合する。この全プロセスは、Jak-STATシグナル伝達経路に包含される。

【0990】

それゆえ、GASまたはISREエレメントの結合によって反映されるJak-STAT経路の活性化は、細胞の増殖および分化に關与するタンパク質を示すために使用され得る。例えば、増殖因子およびサイトカインは、Jak-STAT経路を活性化することが知られている。(以下の表3を参照のこと)。従って、レポーター分子に連結したGASエレメントを使用することにより、Jak-STAT経路のアクチベーターが同定され得る。

30

【0991】

【表 3】

表 3

リガンド	JAKs			STATs		GAS(リバンド) または ISRE
	tyk2	Jak1	Jak2	Jak3		
<u>IFNファミリー</u>						
IFN-a/B	+	+	-	-	1,2,3	ISRE
IFN-g		+	+	-	1	GAS (IRF1>Lys6>IFP)
IL-10	+	?	?	-	1,3	
<u>gp130ファミリー</u>						
IL-6(多面性)	+	+	+	?	1,3	GAS (IRF1>Lys6>IFP)
IL-11(多面性)	?	+	?	?	1,3	
OnM(多面性)	?	+	+	?	1,3	
LIF(多面性)	?	+	+	?	1,3	
CNTF(多面性)	-/+	+	+	?	1,3	
G-CSF(多面性)	?	+	?	?	1,3	
IL-12(多面性)	+	-	+	+	1,3	
<u>g-Cファミリー</u>						
IL-2(リンパ球)	-	+	-	+	1,3,5	GAS
IL-4(リンパ/骨髄性の)	-	+	-	+	6	GAS (IRF1 = IFP >> Ly6)(IgH)
IL-7(リンパ球)	-	+	-	+	5	GAS
IL-9(リンパ球)	-	+	-	+	5	GAS
IL-13(リンパ球)	-	+	?	?	6	GAS
IL-15	?	+	?	+	5	GAS
<u>gp140ファミリー</u>						
IL-3(骨髄性の)	-	-	+	-	5	GAS (IRF1>IFP>>Ly6)
IL-5(骨髄性の)	-	-	+	-	5	GAS
GM-CSF(骨髄性の)	-	-	+	-	5	GAS
<u>成長ホルモンファミリー</u>						
GH	?	-	+	-	5	
PRL	?	+/-	+	-	1,3,5	
EPO	?	-	+	-	5	GAS(B-CAS>IRF1=IFP>>Ly6)
<u>レセプターチロシンキナーゼ</u>						
EGF	?	+	+	-	1,3	GAS (IRF1)
PDGF	?	+	+	-	1,3	
CSF-1	?	+	+	-	1,3	GAS (IRF1 ではない)

10

20

30

40

実施例 18 ~ 19 に記載される生物学的アッセイにおいて使用される、プロモーターエレメントを含む合成 GAS を構築するために、PCR に基づいたストラテジーを用いて GAS-SV40 プロモーター配列を生成する。5'プライマーは、IRF1 プロモーターにおいて見出され、そして一定の範囲のサイトカインでの誘導の際に STAT に結合することが以前に実証された GAS 結合部位の 4 つの直列のコピーを含むが (Rothmanら、Immunity 1: 457-468 (1994))、他の GAS エlement または ISRE エlement を代わりに使用し得る。5'プライマーはまた、SV40 初期プロモーター配列に対して相補的な 18bp の配列も含み、そして XhoI 部位に隣接する。5'プライマーの配列は以下である：

【0992】

## 【化2】

5':GCGCCTCGAGATTTCCCGAAATCTAGATTTCCCGAAATGATTTCCCG  
GAAATGATTTCCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAG:3' (配列番号 12)

下流プライマーはSV40プロモーターに対して相補的であり、そしてHind III部位に隣接する：5' : G C G G C A A G C T T T T T G C A A A G C C T A G G C :  
3' (配列番号13)。

## 【0993】

PCR増幅を、Clontechから入手したB-gal:プロモータープラスミド中に存在するSV40プロモーターのテンプレートを用いて実施する。得られたPCRフラグメントをXhoI/Hind IIIを用いて消化し、そしてBLSK2-(Stratagene)にサブクロニングする。正方向および逆方向のプライマーを用いる配列決定により、挿入物が以下の配列を含むことを確認する：

## 【0994】

## 【化3】

5':CTCGAGATTTCCCGAAATCTAGATTTCCCGAAATGATTTCCCGAAA  
TGATTTCCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCG  
CCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCT  
CCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAGGCCGCC  
TCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTA  
GGCTTTTGCAAAAAGCTT:3' (配列番号 14)

このGASプロモーターエレメントがSV40プロモーターに結合されると、次に、GAS:SEAPレポーター構築物を操作する。ここで、レポーター分子は、分泌アルカリホスファターゼ、すなわち「SEAP」である。しかし、明らかに、この実施例または他の実施例のいずれにおいても、任意のレポーター分子が、SEAPの代わりとなり得る。SEAPの代わりに使用され得る周知のレポーター分子としては、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、  
-ガラクトシダーゼ、グリーン蛍光タンパク質(GFP)、または抗体により検出可能な任意のタンパク質が挙げられる。

## 【0995】

上記の配列により確認された合成GAS-SV40プロモーターエレメントを、GAS-SEAPベクターを作製するために、Hind IIIおよびXhoIを用いて、増幅したGAS:SV40プロモーターエレメントでSV40プロモーターを有効に置換し、Clontechから入手したpSEAP-プロモーターベクターにサブクロニングする。しかし、このベクターはネオマイシン耐性遺伝子を含まず、それゆえ、哺乳動物の発現系には好ましくない。

## 【0996】

従って、GAS-SEAPレポーターを発現する哺乳動物の安定な細胞株を作製するために、GAS-SEAPカセットを、SalIおよびNotIを用いてGAS-SEAPベクターから取り出し、そしてGAS-SEAP/Neoベクターを作製するために、マルチクロニング部位におけるこれらの制限部位を用いて、ネオマイシン耐性遺伝子を含むバックボーンベクター(例えば、pGFP-1(Clontech))に挿入する。一旦、このベクターを哺乳動物細胞にトランスフェクトすれば、次いでこのベクターは、実施例18~19に記載されるようにGAS結合についてのレポーター分子として使用され

10

20

30

40

50

得る。

【0997】

他の構築物を、上記の説明を使用し、そしてGASを異なるプロモーター配列で置換して、作製し得る。例えば、NFκBおよびEGFPプロモーター配列を含むレポーター分子の構築を、実施例20および21に記載する。しかし、多くの他のプロモーターを、これらの実施例に記載のプロトコルを使用して置換し得る。例えば、SRE、IL-2、NFAT、またはオステオカルシンのプロモーターを単独で、または組み合わせて（例えば、GAS/NFκB/EGFP、GAS/NFκB、IL-2/NFAT、またはNFκB/GAS）置換し得る。同様に、他の細胞株（例えば、HELA（上皮細胞）、HUVEC（内皮細胞）、Reh（B細胞）、Saos-2（骨芽細胞）、HUVAC（大動脈細胞）、または心筋細胞）を、レポーター構築物の活性を試験するために使用し得る。

10

【0998】

（実施例18：T細胞の活性についての高処理能力スクリーニングアッセイ）

以下のプロトコルを使用して、因子を同定すること、および本発明のポリペプチドまたはそのリガンドを含有する上清がT細胞を増殖および/または分化するか否かを決定することによって、T細胞活性を評価する。T細胞の活性を実施例17で作製したGAS/SEAP/Neo構築物を用いて評価する。従って、SEAP活性を増加させる因子は、Jaks-STATSシグナル伝達経路を活性化する能力を示す。このアッセイに使用したT細胞は、Jurkat T細胞（ATCC受託番号TIB-152）であるが、Molt-3細胞（ATCC受託番号CRL-1552）およびMolt-4細胞（ATCC受託番号CRL-1582）細胞もまた使用し得る。

20

【0999】

Jurkat T細胞は、リンパ芽球性CD4<sup>+</sup> Th1ヘルパー細胞である。安定な細胞株を作製するために、およそ200万のJurkat細胞をDMRIE-C（Life Technologies）を用いて、GAS-SEAP/neoベクターでトランスフェクトする（以下に記載のトランスフェクション手順）。トランスフェクトした細胞を、およそ20,000細胞/ウェルの密度で播種し、そして1mg/mlのジェネティシン（gentamicin）に対して耐性であるトランスフェクト体を選択する。耐性コロニーを増殖させ、次いで、漸増する濃度のインターフェロン に対するそれらの応答について試験する。選択したクローンの用量応答を示す。

30

【1000】

詳細には、以下のプロトコルにより、200ulの細胞を含む75のウェルについて十分な細胞を得る。従って、複数の96ウェルプレートについて十分な細胞を産生するために、これをスケールアップするか、または複数で実施するかのいずれかを行う。Jurkat細胞をRPMI+10%血清および1%のPen-Strep中で維持する。T25フラスコ中で2.5mlのOPTI-MEM（Life Technologies）と10ugのプラスミドDNAとを組み合わせる。50ulのDMRIE-Cを含む2.5mlのOPTI-MEMを添加し、そして、室温で15~45分間インキュベートする。

【1001】

インキュベート時間の間、細胞濃度をカウントし、必要な細胞数（トランスフェクションあたり $10^7$ 個）をスピンドウンし、そして最終濃度が $10^7$ 細胞/mlとなるようにOPTI-MEM中で再懸濁する。次いで、OPTI-MEM中の $1 \times 10^7$ 個の細胞の1mlをT25フラスコに加え、そして37℃で6時間インキュベートする。インキュベーションの後、10mlのRPMI+15%の血清を添加する。

40

【1002】

Jurkat: GAS-SEAP安定レポーター株をRPMI+10%血清、1mg/mlジェネティシン、および1%のPen-Strep中で維持する。これらの細胞は、実施例16に記載のプロトコルにより産生されるようにGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドまたはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）誘

50

導ポリペプチドを含む上清で処理される。

【1003】

上清での処理日に細胞を洗浄すべきであり、そして1mlあたり500,000個の細胞の密度となるように新鮮なRPMI+10%血清中に再懸濁するべきである。必要な細胞の正確な数は、スクリーニングされる上清の数に依存する。1枚の96ウェルプレートについて、およそ1000万個の細胞(10枚のプレートについて1億個の細胞)を必要とする。

【1004】

12チャンネルのピペットを用いて96ウェルのディッシュに細胞を分与するために、三角のリザーバーポートに細胞を移す。200ulの細胞を、12チャンネルのピペットを用いて、それぞれのウェルに移す(従って、ウェル当たり100,000個の細胞を添加する)。

10

【1005】

全てのプレートに播種した後、50ulの上清を、12チャンネルピペットを用いて、上清を含む96ウェルプレートから各ウェルに直接的に移す。さらに、外来性のインターフェロンの用量(0.1、1.0、10ng)を、ウェルH9、ウェルH10、およびウェルH11に添加し、アッセイについてのさらなる陽性コントロールとして使用する。

【1006】

上清で処理したJurkat細胞を含む96ウェルディッシュをインキュベーターに48時間置く(注記:この時間は48~72時間の間で変更可能である)。次いで、各ウェルから35ulのサンプルを12チャンネルのピペットを用いて、不透明な96ウェルプレートに移す。不透明なプレートを(セロファンのカバーを用いて)覆うべきであり、そして実施例18に記載のSEAPアッセイを実施するまで、-20で保存するべきである。残存する処理した細胞を含むプレートを4に置き、そして、所望するならば、特定のウェル上でのアッセイを繰り返すための物質の供給源として供する。

20

【1007】

陽性コントロールとして、100ユニット/mlのインターフェロンを使用し得、これは、Jurkat T細胞を活性化することが公知である。代表的には、30倍を超える誘導が、陽性コントロールのウェルにおいて観察される。

【1008】

上述のプロトコルは、一過性および安定性の両方のトランスフェクト細胞の作製に用いられ得、このことは当業者に明らかである。

30

【1009】

(実施例19:骨髄性の活性を同定する高処理能力スクリーニングアッセイ)

以下のプロトコルを使用して、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンドが骨髄性細胞を増殖および/または分化させるか否かを決定することによりGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の骨髄性の活性を評価する。骨髄性細胞の活性を実施例17において産生されたGAS/SEAP/Neo構築物を用いて評価する。従って、SEAP活性を増加させる因子は、Jaks-STATSシグナル伝達経路を活性化させる能力を示す。このアッセイに使用した骨髄性細胞は、U937(前単球(pre-monocyte)細胞株)であるが、TF-1、HL60、またはKG1をも使用し得る。

40

【1010】

U937細胞を、実施例17において産生されたGAS/SEAP/Neo構築物で、一過性にトランスフェクトするために、DEAE-Dextran法(Kharbandaら、1994, Cell Growth & Differentiation, 5: 259-265)を用いる。最初に、 $2 \times 10^7$ 個のU937細胞を回収し、そしてPBSで洗浄する。U937細胞を、通常、100単位/mlのペニシリンおよび100mg/mlのストレプトマイシンを補充した10%熱非働化ウシ胎仔血清(FBS)を含むRPMI 1640培地中で増殖させる。

50

## 【1011】

次に、0.5 mg/ml DEAE-Dextran、8 µgのGAS-SEAP2プラスミドDNA、140 mM NaCl、5 mM KCl、375 µM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、1 mM MgCl<sub>2</sub>、および675 µM CaCl<sub>2</sub>を含む1 mlの20 mM Tris-HCl (pH 7.4) 緩衝液に細胞を懸濁する。37 で45分間インキュベートする。

## 【1012】

10% FBSを含むRPMI 1640培地で細胞を洗浄し、次いで、10 mlの完全培地に再懸濁し、そして37 で36時間インキュベートする。

## 【1013】

GAS-SEAP/U937安定細胞を、400 µg/mlのG418中で細胞を増殖させることにより得る。G418を含まない培地を使用して、慣用的に増殖させるが、1~2ヶ月毎に細胞を二継代の間、400 µg/ml G418中で再増殖させるべきである。

## 【1014】

これらの細胞を1 × 10<sup>8</sup>個の細胞（これは10枚の96ウェルプレートアッセイのために十分である）を回収することにより試験し、そしてPBSで洗浄する。上記の200 mlの増殖培地中に、5 × 10<sup>5</sup>細胞/mlの最終密度で細胞を懸濁する。96ウェルプレートにおいてウェルあたり200 µlの細胞（すなわち、1 × 10<sup>5</sup>細胞/ウェル）をプレートする。

## 【1015】

実施例16に記載されるプロトコルにより調製された上清の50 µlを添加する。37 で48~72時間インキュベートする。陽性コントロールとして、100単位/mlのインターフェロンを使用し得、これはU937細胞を活性化させることが公知である。代表的には、30倍を超える誘導が、陽性コントロールウェルにおいて観察される。実施例22に記載のプロトコルに従って上清をSEAPアッセイする。

## 【1016】

（実施例20：ニューロン活性を同定する高処理能力スクリーニングアッセイ）

細胞が分化および増殖を経る場合、一群の遺伝子が多くの異なるシグナル伝達経路を介して活性化される。これらの遺伝子の1つであるEGR1（初期増殖応答遺伝子1）は、活性化時に種々の組織および細胞型において誘導される。EGR1のプロモーターはこのような誘導を担う。レポーター分子に結合したEGR1プロモーターを使用して、細胞の活性化を（CCR5）によって評価し得る。

## 【1017】

詳細には、以下のプロトコルをPC12細胞株におけるニューロン活性を評価するために使用する。PC12細胞（ラット褐色細胞腫（phenochromocytoma cell））は、多くのマイトジェン（例えば、TPA（テトラデカノイルホルボルアセテート）、NGF（神経成長因子）、およびEGF（上皮増殖因子））での活性化により増殖および/または分化することが公知である。この処理の間にEGR1遺伝子発現を活性化する。従って、SEAPレポーターに結合したEGRプロモーターを含む構築物でPC12細胞を安定にトランスフェクトすることにより、（CCR5）によってPC12細胞の活性化を評価し得る。

## 【1018】

EGR/SEAPレポーター構築物を以下のプロトコルにより組み立て得る。EGR-1プロモーター配列（-633~+1）（Sakamoto Kら、Oncogene 6: 867-871（1991））を以下のプライマーを用いて、ヒトゲノムDNAからPCR増幅し得る：

5' GCGCTCGAGGGATGACAGCGATAGAACCCCGG-3'（配列番号15）

5' GCGAAGCTTTCGCGACTCCCGGATCCGCTTC-3'（配列

10

20

30

40

50

番号16)。

【1019】

次いで、実施例17において作製したGAS:SEAP/Neoベクターを使用して、EGR1増幅産物をこのベクターに挿入し得る。制限酵素XhoI/HindIIIを使用してGAS:SEAP/Neoベクターを線状化し、GAS/SV40スタッファー(stuffer)を取り除く。これらと同じ酵素を用いて、EGR1増幅産物を制限処理する。ベクターとEGR1プロモーターとを連結する。

【1020】

細胞培養のための96ウェルプレートを調製するために、コーティング溶液(コラーゲンI型(Upstate Biotech Inc. カタログ番号08-115)の30%エタノール(滅菌濾過)での1:30希釈)を1つの10cmプレートあたり2ml、または96ウェルプレートのウェルあたり50 $\mu$ l添加し、そして2時間風乾させる。

10

【1021】

PC12細胞を、予めコートした10cm組織培養ディッシュ上で、ペニシリン(100単位/ml)およびストレプトマイシン(100 $\mu$ g/ml)を補充した、10%ウマ血清(JRH BIOSCIENCES、カタログ番号12449-78P)、5%熱非働化ウシ胎仔血清(FBS)を含むRPMI-1640培地(Bio Whittaker)中で慣用的に増殖させる。1つから4つへの分割を3~4日毎に行う。細胞を掻き取るによりプレートから取り出し、そして15回より多く上下にピペティングして再懸濁する。

20

【1022】

EGR/SEAP/Neo構築物を、実施例16に記載のLipofectamineプロトコルを使用して、PC12にトランスフェクトする。EGR-SEAP/PC12安定細胞を、300 $\mu$ g/mlのG418中で細胞を増殖させることにより得る。G418を含まない培地を慣用的増殖のために使用するが、1~2ヶ月毎に、細胞を2継代の間、300 $\mu$ g/mlのG418中で再増殖させるべきである。

【1023】

ニューロン活性をアッセイするために、およそ70~80%コンフルエントである細胞を有する10cmプレートを、古い培地を除去することによりスクリーニングする。細胞をPBS(リン酸緩衝化生理食塩水)を用いて1回洗浄する。次いで、細胞を低血清培地(抗生物質とともに1%ウマ血清および0.5% FBSを含むRPMI-1640)中で一晚、飢餓させる。

30

【1024】

翌朝、培地を除去し、そしてPBSで細胞を洗浄する。プレートから細胞を掻き取り、細胞を2mlの低血清培地中でよく懸濁する。細胞数をカウントし、そしてより低血清の培地を添加し、 $5 \times 10^5$ 細胞/mlの最終細胞密度に到達させる。

【1025】

200 $\mu$ lの細胞懸濁液を96ウェルプレートの各ウェルに添加する( $1 \times 10^5$ 細胞/ウェルに等しい)。実施例12により産生された50 $\mu$ lの上清を、37 $^{\circ}$ Cで48~72時間加える。陽性コントロールとして、EGRを介してPC12細胞を活性化することが公知の成長因子(例えば、50ng/ $\mu$ lの神経成長因子(NGF))を使用し得る。代表的には、50倍を超えるSEAP誘導が陽性コントロールウェルにおいて見られる。SEAPは実施例22に従って、上清をアッセイする。

40

【1026】

(実施例21: T細胞の活性についての高処理能力スクリーニングアッセイ)

NF- $\kappa$ B(核因子 $\kappa$ B)は、広範な種々の薬剤(炎症性サイトカインであるIL-1およびTNF、CD30およびCD40、リンホトキシン- $\alpha$ およびリンホトキシン- $\beta$ を含む)により、LPSまたはトロンピンへの曝露により、ならびに特定のウイルス遺伝子産物の発現により活性化される転写因子である。転写因子として、NF- $\kappa$ Bは免疫細胞の活性化に關与する遺伝子の発現、アポトーシスの制御(NF- $\kappa$ Bは、アポトーシス

50

から細胞を保護するようである)、B細胞およびT細胞の発生、抗ウイルス応答および抗菌応答、ならびに複数のストレス応答を調節する。

【1027】

刺激されない条件において、NF- $\kappa$ Bは、I- $\kappa$ B(インヒビター B)を有する細胞質に保持される。しかし、刺激の際に、I- $\kappa$ Bはリン酸化され、そして分解(degraded)され、NF- $\kappa$ Bの核へのシャトル(shuttle)を引き起こし、これにより標的遺伝子の転写を活性化する。NF- $\kappa$ Bにより活性化される標的遺伝子としては、IL-2、IL-6、GM-CSF、ICAM-1およびクラス1MHCが挙げられる。

【1028】

その中心的な役割および一定の範囲の刺激に応答する能力に起因して、NF- $\kappa$ Bプロモーターエレメントを利用するレポーター構築物を、実施例16において産生された上清をスクリーニングするために使用する。NF- $\kappa$ Bのアクチベーターまたはインヒビターは、疾患の処置に有用である。例えば、NF- $\kappa$ Bのインヒビターを、急性または慢性的なNF- $\kappa$ Bの活性化に関連するこれらの疾患(例えば、慢性関節リウマチ)を処置するために使用し得る。

【1029】

NF- $\kappa$ Bプロモーターエレメントを含むベクターを構築するために、PCRに基づいたストラテジーを用いる。上流のプライマーは、NF- $\kappa$ B結合部位(GGGGACTTTCCTCC)(配列番号17)の4つの直列のコピー、SV40初期プロモーター配列の5'末端に対して相補的な18bpの配列を含み、そしてXhoI部位に隣接する：

5' : GCGGCCCTCGAGGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGACTTTCCGGG  
GACTTTCCGGGACTTTCCATCCTGCCATCTCAATTAG : 3'  
(配列番号18)。

【1030】

下流プライマーは、SV40プロモーターの3'末端に対して相補的であり、そしてHindIII部位に隣接する：

5' : GCGGCAAGCTTTTGGCAAAGCCTAGGC : 3' (配列番号19)。

【1031】

PCR増幅を、Clontechから入手したp-gal:プロモータープラスミドに存在するSV40プロモーターのテンプレートを使用して行う。得られたPCRフラグメントをXhoIおよびHindIIIで消化し、そしてBLSK2-(Stratagene)にサブクローニングする。T7およびT3プライマーを用いる配列決定により、挿入物が以下の配列を含むことを確認する：

【1032】

【化4】

5':CTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGACTTTCC  
ATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCC  
ATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGA  
CTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTA  
TTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAA  
GCTT:3' (配列番号20)

次に、XhoIおよびHindIIIを使用して、pSEAP2-プロモータープラスミド(Clontech)に存在するSV40最小プロモーターエレメントをこのNF- $\kappa$ B/SV40フラグメントで置換する。しかし、このベクターはネオマイシン耐性遺伝

10

20

30

40

50

子を含まず、そしてそれゆえ哺乳動物の発現系には好ましくない。

【1033】

安定な哺乳動物細胞株を作製するために、NF - B / SV40 / SEAPカセットを制限酵素SalIおよびNotIを使用して上記のNF - B / SEAPベクターから取り出し、そしてネオマイシン耐性を含むベクターに挿入する。詳細には、SalIおよびNotIでpGFP - 1を制限処理した後に、NF - B / SV40 / SEAPカセットをpGFP - 1 (Clontech)に挿入し、GFP遺伝子を置換した。

【1034】

一旦、NF - B / SV40 / SEAP / Neoベクターを作製した後は、実施例18に記載のプロトコルに従って、安定なJurkat T細胞を作製し、そして維持する。同様に、これらの安定なJurkat T細胞を含む上清をアッセイするための方法がまた、実施例18に記載される。陽性コントロールとして、外因性のTNF (0.1、1、10ng)をウェルH9、H10、およびH11に添加し、代表的には、5~10倍の活性化が観察される。

10

【1035】

(実施例22: SEAP活性についてのアッセイ)

実施例18~21に記載されるアッセイのためのレポーター分子として、SEAP活性を、以下の一般的な手順に従ってTropix Phospho-light Kit (カタログ番号BP - 400)を用いてアッセイする。Tropix Phospho-light Kitは、以下で使用される希釈緩衝液、アッセイ緩衝液、および反応緩衝液を供給する。

20

【1036】

ディスペンサーに2.5x希釈緩衝液を満たし、そして15µlの2.5x希釈緩衝液を35µlの上清を含むオプティプレート(Optiplate)に分与する。プラスチックシャーでプレートをシールし、そして65°Cで30分間インキュベートする。一様でない加温を避けるためにオプティプレートを離しておく。

【1037】

サンプルを室温まで15分間冷却する。ディスペンサーを空にし、そしてアッセイ緩衝液を満たす。50µlのアッセイ緩衝液を添加し、そして室温で5分間インキュベートする。ディスペンサーを空にし、そして反応緩衝液を満たす(以下の表を参照のこと)。50µlの反応緩衝液を添加し、そして室温で20分間インキュベートする。化学発光シグナルの強度は時間依存的であり、そしてルミノメーターで5つのプレートを読み取るために約10分間を費やすので、1回に5つのプレートを処理し、10分後に2つ目のセットを開始するべきである。

30

【1038】

ルミノメーターにおける相対的な光の単位(light unit)を読み取る。プランクとしてH12をセットし、そして結果を印字する。化学発光の増加は、レポーター活性を示す。

【1039】

【表 4】

## 反応緩衝液の処方:

プレート番号	反応緩衝液の希釈物 (ml)	CSPD (ml)
10	60	3
11	65	3.25
12	70	3.5
13	75	3.75
14	80	4
15	85	4.25
16	90	4.5
17	95	4.75
18	100	5
19	105	5.25
20	110	5.5
21	115	5.75
22	120	6
23	125	6.25
24	130	6.5
25	135	6.75
26	140	7
27	145	7.25
28	150	7.5
29	155	7.75
30	160	8
31	165	8.25
32	170	8.5
33	175	8.75
34	180	9
35	185	9.25
36	190	9.5
37	195	9.75
38	200	10
39	205	10.25
40	210	10.5
41	215	10.75
42	220	11
43	225	11.25
44	230	11.5
45	235	11.75
46	240	12
47	245	12.25
48	250	12.5
49	255	12.75
50	260	13

10

20

30

40

(実施例 23 : 低分子の濃度および膜透過性における変化を同定する高処理能力スクリーニングアッセイ)

レセプターへのリガンドの結合は、カルシウム、カリウム、ナトリウムのような低分子および pH の細胞内レベルを変化させ、さらに膜電位を変化させることが公知である。これらの変化を特定細胞のレセプターに結合する上清の同定を行うアッセイで測定し得る。以下のプロトコルは、カルシウムについてのアッセイを記載するが、このプロトコルは、カリウム、ナトリウム、pH、膜電位、または蛍光プローブにより検出可能な任意の他の低分子における変化を検出するように容易に改変し得る。

【1040】

50

以下のアッセイは、蛍光測定画像化プレートリーダー（「FLIPR」）を使用して低分子と結合する蛍光分子（Molecular Probes）における変化を測定する。明らかに、低分子を検出する任意の蛍光分子を本明細書で用いるカルシウム蛍光分子、fluo-4（Molecular Probes, Inc.; カタログ番号F-14202）の代わりに使用し得る。

**【1041】**

接着細胞については、細胞を10,000~20,000細胞/ウェルで、底が透明なCo-star黒色96ウェルプレートに播種する。プレートをCO<sub>2</sub>インキュベーター内で20時間インキュベートする。接着細胞をBiotek洗浄器内で200μlのHBSS（ハンクスの平衡塩類溶液）で二回洗浄し、最後の洗浄後、緩衝液100μlを残す。

10

**【1042】**

1mg/ml fluo-4のストック溶液を10%プルロン酸（pluronic acid）DMSOで作製する。細胞にfluo-4を負荷するため、12μg/ml fluo-4（50μl）を各ウェルに添加する。このプレートをCO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で60分間インキュベートする。プレートをBiotek洗浄器で、HBSSにより4回洗浄し、緩衝液100μlを残す。

**【1043】**

非接着細胞については、細胞を培養培地からスピンドウンする。細胞を、50mlのコニカルチューブ内でHBSSを用いて2~5×10<sup>6</sup>細胞/mlに再懸濁する。細胞懸濁液1mlあたり、1mg/ml fluo-4の10%プルロン酸DMSO溶液4μlを加える。次に、チューブを37℃の水浴中に30~60分間置く。細胞をHBSSで二回洗浄し、1×10<sup>6</sup>細胞/mlに再懸濁し、そしてマイクロプレートに100μl/ウェルずつ分配する。プレートを1000rpmで5分間遠心分離する。次に、プレートをDenley Cell Wash中で200μlで一回洗浄した後、吸引工程により最終容量を100μlにする。

20

**【1044】**

非細胞ベースのアッセイについては、各ウェルは、fluo-4のような蛍光分子を含有する。上清をウェルに添加し、そして蛍光変化を検出する。

**【1045】**

細胞内カルシウムの蛍光を測定するため、FLIPRを以下のパラメーターについて設定する：（1）システムゲインは、300~800mWであり；（2）曝露時間は、0.4秒間であり；（3）カメラF/ストップは、F/2であり；（4）励起は488nmであり；（5）発光は530nmであり；そして（6）サンプル添加は50μlである。530nmにおける発光の増加は、分子（例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）もしくはそのリガンド）、または細胞内Ca<sup>++</sup>濃度の増加を生じるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）によって引き起こされる、細胞外シグナル伝達事象を示す。

30

**【1046】**

（実施例24：チロシンキナーゼ活性を同定する高処理能力スクリーニングアッセイ）  
プロテインチロシンキナーゼ（PTK）は、多様な群の膜貫通キナーゼおよび細胞質キナーゼを表す。レセプタープロテインチロシンキナーゼ（RPTK）群内に、PDGF、FGF、EGF、NGF、HGFおよびインスリンレセプターサブファミリーを含む、一定の範囲の有糸分裂促進性（mitogenic）および代謝性成長因子のレセプターがある。さらに、対応するリガンドが未知である大きなRPTKファミリーがある。RPTKのリガンドは、主として分泌される低分子量タンパク質を含むが、膜結合型および細胞外マトリックスタンパク質も含む。

40

**【1047】**

リガンドによるRPTKの活性化は、リガンド媒介レセプターダイマー化を含み、これはレセプターサブユニットのトランスリン酸化および細胞質チロシンキナーゼの活性化を

50

生じる。細胞質チロシンキナーゼとしては、srcファミリー（例えば、src、yes、lck、lyn、fyn）のレセプター関連チロシンキナーゼ、ならびにJakファミリーのような非レセプター結合型および細胞質ゾルプロテインチロシンキナーゼが挙げられる。これらのメンバーは、サイトカインスーパーファミリー（例えば、インターロイキン、インターフェロン、GM-CSFおよびレプチン）のレセプターによって誘発されるシグナル伝達を媒介する。

#### 【1048】

チロシンキナーゼ活性を刺激し得る公知の因子は広範であるため、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）もしくはそのリガンドまたはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）によって誘導される分子が、チロシンキナーゼシグナル伝達経路を活性化し得るか否かを同定することは、興味深い。従って、以下のプロトコルを設計して、チロシンキナーゼシグナル伝達経路を活性化し得る、このような低分子を同定する。

#### 【1049】

標的細胞（例えば、初代ケラチノサイト）を約25,000細胞/ウェルの密度で、Nalge Nunc (Naperville, IL) から購入した96ウェルLoprodyn Silent Screen Plateに播種する。プレートを100%エタノールで30分間、二回リンスして滅菌し、水でリンスした後、一晚乾燥させる。幾つかのプレートを、100mlの細胞培養グレードI型コラーゲン(50mg/ml)、ゼラチン(2%)またはポリリジン(50mg/ml)（これらは全て、Sigma Chemicals (St. Louis, MO) から購入し得る）で、またはBecton Dickinson (Bedford, MA) から購入した10%Matrigel、あるいは仔ウシ血清で2時間コートし、PBSでリンスした後、4℃で保存する。増殖培地に5,000細胞/ウェルを播種し、製造業者のAlamar Biosciences, Inc. (Sacramento, CA) が記載するように、alamarBlueを使用して48時間後に細胞数を間接定量することにより、これらのプレート上の細胞増殖をアッセイする。Becton Dickinson (Bedford, MA) のFalconプレートカバー#3071を使用し、Loprodyn Silent Screen Plateを覆う。Falcon Microtest III細胞培養プレートもまた、いくつかの増殖実験において使用し得る。

#### 【1050】

抽出物を調製するため、A431細胞をLoprodynプレートのナイロン膜上に播種し(20,000/200ml/ウェル)、そして完全培地中で一晚培養する。細胞を無血清基本培地中で24時間インキュベートして静止させる。EGF(60ng/ml)または実施例16で生成した上清50μlで5~20分間処理した後、培地を除去し、100mlの抽出緩衝液(20mM HEPES pH7.5, 0.15M NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>およびBoehringer Mannheim (Indianapolis, IN) から入手したプロテアーゼインヒビターの混合物(#1836170))を各ウェルに添加し、そしてプレートを回転振盪器上、4℃で5分間振盪する。次に、プレートを真空トランスファーマニホールド(vacuum transfer manifold)に設置し、そしてハウスパキュムを使用して抽出物を各ウェルの底の0.45mm膜で濾過する。抽出物をパキュムマニホールドの底の96ウェル捕獲/アッセイプレートに集め、そして直ちに氷上に置く。遠心分離により明澄化した抽出物を得るため、界面活性剤で5分間可溶化した後、各ウェルの含有物を取り出し、4℃、16,000×gで15分間遠心分離する。

#### 【1051】

濾過抽出物をチロシンキナーゼ活性のレベルについて試験する。チロシンキナーゼ活性を検出する多数の方法が公知であるが、本明細書においては方法の一つを記載する。

#### 【1052】

一般的に、特定の基質(ビオチン化ペプチド)上のチロシン残基をリン酸化する能力を

10

20

30

40

50

決定することにより、上清のチロシンキナーゼ活性を評価する。この目的に使用し得るビオチン化ペプチドとしては、PSK1（細胞分裂キナーゼcdc2-p34のアミノ酸6～20に相当）およびPSK2（ガストリンのアミノ酸1～17に相当）が挙げられる。両ペプチドは、一連のチロシンキナーゼの基質であり、Boehringer Mannheimから入手可能である。

#### 【1053】

以下の成分を順に添加することにより、チロシンキナーゼ反応を設定する。まず、5 μM ビオチン化ペプチド10 μlを添加した後、順に、ATP/Mg<sup>2+</sup>（5 mM ATP / 50 mM MgCl<sub>2</sub>）10 μl、5×アッセイ緩衝液（40 mM 塩酸イミダゾール、pH 7.3、40 mM -グリセロリン酸塩、1 mM EGTA、100 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM MnCl<sub>2</sub>、0.5 mg/ml BSA）10 μl、バナジン酸ナトリウム（1 mM）5 μl、最後に水5 μlを加える。成分を穏やかに混合し、反応混合物を30℃で2分間プレインキュベートする。コントロール酵素または濾過上清10 μlを加えて反応を開始させる。

#### 【1054】

次に、120 mM EDTA 10 μlを添加することによりチロシンキナーゼアッセイ反応を停止し、反応物を氷上に置く。

#### 【1055】

反応混合物の50 μlのアリコートマイクロタイタープレート（MTP）モジュールに移し、37℃で20分間インキュベートすることにより、チロシンキナーゼ活性を測定する。これにより、ストレプトアビジン（streptavidin）コーティング96ウェルプレートをビオチン化ペプチドと会合させ得る。MTPモジュールを300 μl / ウェルのPBSで4回洗浄する。次に、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化した抗ホスホチロシン（phosphotyrosine）抗体（抗P-Tyr-POD（0.5 μg/ml））75 μlを、各ウェルに添加した後、37℃で1時間インキュベートする。ウェルを上記のように洗浄する。

#### 【1056】

次に、ペルオキシダーゼ基質溶液（Boehringer Mannheim）100 μlを加え、室温で少なくとも5分間（最長30分間）インキュベートする。ELISAリーダーを使用して、405 nmにおけるサンプルの吸光度を測定する。結合したペルオキシダーゼ活性のレベルをELISAリーダーを使用して定量し、これは、チロシンキナーゼ活性のレベルを反映する。

#### 【1057】

（実施例25：リン酸化活性を同定する高処理能力スクリーニングアッセイ）

実施例24に記載のプロテインチロシンキナーゼ活性アッセイの可能性のある代替物および/または補完物（complement）として、主要な細胞内シグナル伝達中間体の活性化（リン酸化）を検出するアッセイもまた使用し得る。例えば、下記のように、一つの特定のアッセイは、Erk-1およびErk-2キナーゼのチロシンリン酸化を検出し得る。しかし、Raf、JNK、p38 MAP、Mapキナーゼキナーゼ（MEK）、MEKキナーゼ、Src、筋肉特異的キナーゼ（MuSK）、IRAK、TecおよびJanusのような他の分子、ならびに他の任意のホスホセリン、ホスホチロシンまたはホスホスレオニン分子のリン酸化を、以下のアッセイにおいてこれらの分子でErk-1またはErk-2を置き換えることにより検出し得る。

#### 【1058】

詳細には、96ウェルELISAプレートのウェルをプロテインG（1 μg/ml）0.1 mlにより室温（RT）で2時間コーティングしてアッセイプレートを作製する。次に、プレートをPBSでリンスし、3% BSA / PBSにより室温で1時間ブロックする。次に、プロテインGプレートをErk-1およびErk-2に対する二つの市販のモノクローナル抗体（100 ng / ウェル）（Santa Cruz Biotechnology）で処理（RTで1時間）する。（他の分子を検出するために、上記の任意の分子

10

20

30

40

50

を検出するモノクローナル抗体を交換することにより、この工程を容易に改変し得る)。PBSで3~5回リンスした後、使用時まで、プレートを4℃で貯蔵する。

【1059】

A431細胞を20,000/ウェルで96ウェルLoprodynefilterプレートに播種し、増殖培地中で一晚培養する。次に、細胞を基本培地(DMEM)中で48時間飢餓させた後、EGF(6ng/ウェル)または実施例16で得た上清50μlで5~20分間処理する。次に、細胞を可溶化し、抽出物を濾過して直接アッセイプレート中に入れる。

【1060】

抽出物を用いて室温で1時間インキュベートした後、ウェルを再度リンスする。陽性コントロールとして、市販のMAPキナーゼ調製物(10ng/ウェル)をA431抽出物の代わりに使用する。次に、プレートを、Erk-1およびErk-2キナーゼのリン酸化エピトープを特異的に認識する市販のポリクローナル(ウサギ)抗体(1μg/ml)で処理する(室温で1時間)。この抗体を標準的な手順によりビオチン化する。次に、結合ポリクローナル抗体をユーロピウムストレプトアビジンおよびユーロピウム蛍光増強剤と、Wallac DELFIA装置内で連続的にインキュベートする(時間分解性蛍光)ことによって定量する。バックグラウンドを超える蛍光シグナルの増加は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)もしくはそのリガンドまたはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)によるリン酸化を示す。

10

【1061】

(実施例26:(CCR5)遺伝子における変化の決定方法)

目的の表現型(例えば、疾患)を提示する家族全員または個々の患者から単離されたRNAを単離する。次に、cDNAをこれらのRNAサンプルから当該分野で公知のプロトコルを使用して生成する(Sambrookを参照のこと)。次に、このcDNAを、配列番号1における目的の領域を取り囲むプライマーを用いるPCRのテンプレートとして使用する。示唆されるPCR条件は、Sidranskyら、Science 252:706(1991)に記載の緩衝溶液を使用し、95℃で30秒間;52~58℃で60~120秒間;および70℃で60~120秒間の35サイクルからなる。

20

【1062】

次に、PCR産物を、SequitTherm Polymerase(Epicentre Technologies)を用い、5'末端にT4ポリヌクレオチドキナーゼで標識したプライマーを使用して配列決定する。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の選択したエキソンのイントロン-エキソン境界もまた決定し、ゲノムPCR産物を分析してその結果を確認する。次に、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に疑わしい変異を有するPCR産物のクローン化および配列決定を行い、直接配列決定の結果を確認する。

30

【1063】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のPCR産物を、HoltonおよびGraham, Nucleic Acids Research, 19:1156(1991)に記載のようにTテールベクターにクローン化し、T7ポリメラーゼ(United States Biochemical)で配列決定する。罹患個体を、非罹患個体には存在しないGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)における変異により同定する。

40

【1064】

ゲノム再配置もまた、Gタンパク質ケモカインレセプターに対応する遺伝子における改変を決定する方法として観察する。実施例6に従って単離したゲノムクローンを、ジゴキシゲニンデオキシ-ウリジン5'-三リン酸(Boehringer Mannheim)を用いてニックトランスレーションし、そしてJohnsonら、Methods Cell Biol. 35:73-99(1991)に記載のようにFISHを行う。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ゲノム遺伝子座への特異的ハイブリダイゼ

50

ーションのために、大過剰のヒト *cot-1* DNA を用いて標識プローブとのハイブリダイゼーションを行う。

【1065】

染色体を、4, 6-ジアミノ-2-フェニドールおよびヨウ化プロピジウムで対比染色し、CおよびRバンドの組み合わせを生成する。正確なマッピングのための整列イメージを、三重バンドフィルターセット (Chroma Technology, Brattleboro, VT) と冷却電荷結合素子カメラ (Photometrics, Tucson, AZ) および可変励起波長フィルター (Johnson & Genet. Anal. Tech. Appl., 8:75 (1991)) とを組み合わせ用いて得る。I See Graphical Program System (Inovision Corporation, Durham, NC) を使用して、イメージ収集、分析および染色体部分長測定を行う。(プローブがハイブリダイズした) Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ゲノム領域の染色体変化を、挿入、欠失および転座として同定する。これらのGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の変化を関連疾患の診断マーカーとして使用する。

10

【1066】

(実施例27: 生物学的サンプル中の (CCR5) 異常レベルを検出する方法)

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチドは生物学的サンプル中で検出され得、そしてGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の上昇または低下が検出されるなら、このポリペプチドは、特定表現型のマーカーである。検出方法は数多くあり、そしてそれ故、当業者は以下のアッセイをそれらの特定の必要性に適合するように改変し得ることが理解される。

20

【1067】

例えば、抗体サンドイッチELISAを使用し、サンプル中、好ましくは、生物学的サンプル中のGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) を検出する。マイクロタイタープレートのウェルを、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) に特異的抗体を最終濃度  $0.2 \sim 10 \mu\text{g/ml}$  で用いてコーティングする。この抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであって、実施例15に記載の方法により産生される。ウェルに対するGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の非特異的結合が減少するように、このウェルをブロックする。

30

【1068】

次に、コーティングしたウェルを、Gタンパク質ケモカインレセプター含有サンプルを用いて室温で2時間を超えてインキュベートする。好ましくは、サンプルの系列希釈を使用して結果を確認すべきである。次に、プレートを脱イオン水または蒸留水で三回洗浄し、非結合Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) を除去する。

【1069】

次に、特異的抗体-アルカリホスファターゼ結合体  $50 \mu\text{l}$  を  $25 \sim 400 \text{ ng}$  の濃度で加え、室温で2時間インキュベートする。プレートを再び脱イオン水または蒸留水で三回洗浄し、未結合の結合体を除去する。

【1070】

4-メチルウンベリフェリルリン酸 (MUP) または p-ニトロフェニルリン酸 (NPP) 基質溶液  $75 \mu\text{l}$  を各ウェルに添加し、そして室温で1時間インキュベートする。反応物をマイクロタイタープレートリーダーにより測定する。コントロールサンプルの系列希釈を使用して標準曲線を作成し、そしてX軸 (対数スケール) にGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリペプチド濃度を、そしてY軸 (線形スケール) に蛍光または吸光度をプロットする。標準曲線を用いてサンプル中のポリペプチド濃度を補間する。

40

【1071】

(実施例28: 処方)

本発明はまた、被験体に有効量の治療剤を投与することにより疾患または障害 (例えば、本明細書中に開示される疾患または障害の任意の1つ以上のような) を処置および/ま

50

たは予防する方法を提供する。治療剤により、薬学的に受容可能なキャリア型（例えば、滅菌キャリア）と組み合わせた、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド（フラグメントおよび改変体を含む）、そのアゴニストまたはアンタゴニスト、および/またはそれらに対する抗体を意味する。

【1072】

治療剤を、個々の患者の臨床状態（特に、治療剤単独処置の副作用）、送達部位、投与方法、投与計画および当業者に公知の他の因子を考慮に入れ、医療実施基準（good medical practice）を遵守する方式で処方および投薬する。従って、本明細書において目的とする「有効量」は、このような考慮を行って決定される。

【1073】

一般的提案として、用量当り、非経口的に投与される治療剤の合計薬学的有効量は、患者体重での、約  $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日} \sim 10 \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$  の範囲にあるが、上記のようにこれは治療的裁量に委ねられる。さらに好ましくは、このホルモンについて、この用量は、少なくとも  $0.01 \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、最も好ましくはヒトに対して約  $0.01 \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$  と約  $1 \text{mg}/\text{kg}/\text{日}$  との間である。連続投与する場合、代表的には、治療剤を約  $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間} \sim 50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{時間}$  の投薬速度で1日に1～4回の注射かまたは連続皮下注入（例えばミニポンプを用いる）のいずれかにより投与する。静脈内用バッグ溶液もまた使用し得る。変化を観察するために必要な処置期間および応答が生じる処置後の間隔は、所望の効果に応じて変化するのである。

【1074】

治療剤を、経口的、直腸内、非経口的、槽内（intracisternally）、腔内、腹腔内、局所的（散剤、軟膏、ゲル、点滴剤、または経皮パッチによるなど）、口内あるいは経口または鼻腔スプレーとして投与し得る。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の製剤補助剤をいう。本明細書で用いる場合、用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

【1075】

本発明の治療剤はまた、徐放性システムにより適切に投与される。徐放性治療剤の適切な例は、経口的、直腸内、非経口的、槽内、腔内、腹腔内、局所的（散剤、軟膏、ゲル、点滴剤、または経皮パッチによるなど）、口内あるいは経口または鼻腔スプレーとして投与する。「薬学的に受容可能なキャリア」とは、非毒性の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、被包材または任意の型の製剤補助剤をいう。本明細書で用いる場合、用語「非経口的」とは、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下および関節内の注射および注入を含む投与の様式をいう。

【1076】

本発明の治療剤はまた、徐放性システムにより適切に投与される。徐放性治療剤の適切な例は、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの成形品の形態の半透過性ポリマーマトリックスのような適切なポリマー材料、適切な疎水性材料（例えば、受容可能な油中の乳濁液として）またはイオン交換樹脂、および貧可溶性誘導体（例えば、貧可溶性塩のような）を含む。

【1077】

徐放性マトリックスとしては、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP 58,481）、L-グルタミン酸および -エチル-L-グルタメートのコポリマー（Sidmanら、Biopolymers 22:547-556（1983））、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（Langerら、J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277（1981））、およびLanger, Chem. Tech. 12:98-105（1982））、エチレンビニルアセテート（Langerら、同書）またはポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸（EP 133,988）が挙げられる。

【1078】

10

20

30

40

50

徐放性治療剤はまた、リポソームに封入された本発明の治療剤を含む（一般には、Langer, Science 249:1527-1533(1990); Treatise, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-BeresteinおよびFidler(編), Liss, New York, 317-327頁および353-365頁(1989)を参照のこと)。治療剤を含有するリポソームは、それ自体が公知である方法により調製される: DE3, 218, 121; Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:3688-3692(1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77:4030-4034(1980); EP52, 322; EP36, 676; EP88, 046; EP143, 949; EP142, 641; 日本国特許出願第83-118008号; 米国特許第4, 485, 045号および同第4, 544, 545号; ならびにEP第102, 324号。通常、リポソームは、小さな(約200~800)ユニラメラ型であり、そこでは、脂質含有量は、約30モル%コレステロールよりも多く、選択された割合が、最適な治療剤のために調整される。

10

20

30

40

50

#### 【1079】

なおさらなる実施形態において、本発明の治療剤は、ポンプによって送達される(Langer, 前出; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201(1987); Buchwaldら, Surgery 88:507(1980); Saudekら, N. Engl. J. Med. 321:574(1989)を参照のこと)。

#### 【1080】

他の制御放出系は、Langer(Science 249:1527-1533(1990))による総説において議論される。

#### 【1081】

非経口投与のために、1つの実施形態において、一般に、治療剤は、それを所望の程度の純度で、薬学的に受容可能なキャリア、すなわち用いる投薬量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、かつ処方物の他の成分と適合するものと、単位投薬量の注射可能な形態(溶液、懸濁液または乳濁液)で混合することにより処方される。例えば、この処方物は、好ましくは、酸化剤、および治療剤に対して有害であることが知られている他の化合物を含まない。

#### 【1082】

一般に、治療剤を液体キャリアまたは微細分割固体キャリアあるいはその両方と均一および緊密に接触させて処方物を調製する。次に、必要であれば、生成物を所望の処方物に成形する。好ましくは、キャリアは、非経口的キャリア、より好ましくはレシピエントの血液と等張である溶液である。このようなキャリアビヒクルの例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液およびデキストロス溶液が挙げられる。揮発性油およびオレイン酸エチルのような非水性ビヒクルもまた、リポソームと同様に本明細書において有用である。

#### 【1083】

キャリアは、等張性および化学安定性を高める物質のような微量の添加剤を適切に含有する。このような物質は、用いる投薬量および濃度でレシピエントに対して毒性がなく、このような物質としては、リン酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩、酢酸および他の有機酸またはその塩類のような緩衝剤; アスコルビン酸のような抗酸化剤; 低分子量(約10残基より少ない)ポリペプチド(例えば、ポリアルギニンまたはトリペプチド); 血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンのようなタンパク質; ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー; グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸またはアルギニンのようなアミノ酸; セルロースまたはその誘導体、ブドウ糖、マンノースまたはデキストリンを含む、単糖類、二糖類、および他の炭水化物; EDTAのようなキレート剤; マンニトールまたはソルビトールのような糖アルコール; ナトリウムのような対イオン; および/また

はポリソルベート、ポロキサマーもしくはPEGのような非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【1084】

治療剤は、代表的には約0.1mg/ml~100mg/ml、好ましくは1~10mg/mlの濃度で、約3~8のpHで、このようなビヒクル中に処方される。前記の特定の賦形剤、キャリアまたは安定化剤を使用することにより、ポリペプチド塩が形成されることが理解される。

【1085】

治療的投与に用いられる任意の医薬品は無菌状態であり得る。滅菌濾過膜（例えば0.2ミクロンメンブレン）で濾過することにより無菌状態は容易に達成される。一般に、治療剤は、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下用注射針で穿刺可能なストッパー付の静脈内用溶液バッグまたはバイアルに配置される。

10

【1086】

治療剤は、通常、単位用量または複数用量容器、例えば、密封アンプルまたはバイアルに、水溶液または再構成するための凍結乾燥処方物として貯蔵される。凍結乾燥処方物の例として、10mlのバイアルに、滅菌濾過した1%（w/v）治療剤水溶液5mlを充填し、そして得られる混合物を凍結乾燥する。凍結乾燥した治療剤を注射用静菌水を用いて再構成して注入溶液を調製する。

【1087】

本発明はまた、本発明の治療剤の1つ以上の成分を満たした一つ以上の容器を備える薬学的パックまたはキットを提供する。医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関が定めた形式の通知が、このような容器に付属し得、この通知は、ヒトへの投与に対する製造、使用または販売に関する政府機関による承認を表す。さらに、治療剤を他の治療用化合物と組み合わせて使用し得る。

20

【1088】

本発明の治療剤は、単独で、またはアジュバントと組み合わせて投与され得る。本発明の治療剤とともに投与され得るアジュバントとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：ミョウバン、ミョウバン+デオキシコール酸（ImmunoAg）、MTP-PE（Biocine Corp.）、QS21（Genentech, Inc.）、BCG、およびMPL。特定の実施形態において、本発明の治療剤は、ミョウバンと組み合わせて投与される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、QS-21と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得るさらなるアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：モノホスホリル脂質免疫調節剤、Adjvax 100a、QS-21、QS-18、CRL1005、アルミニウム塩、MF-59、およびVirosomalアジュバント技術。本発明の治療剤とともに投与され得るワクチンとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：MMR（麻疹、流行性耳下腺炎、風疹）、ポリオ（polio）、水痘、破傷風/ジフテリア、A型肝炎、B型肝炎、B型インフルエンザ、百日咳（whooping cough）、肺炎、インフルエンザ、ライム病、ロタウイルス、コレラ、黄熱病、日本脳炎、ポリオ（poliomyelitis）、狂犬病、腸チフス、および百日咳（pertussis）に対する防御に指向するワクチン。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じてのように）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

30

40

【1089】

本発明の治療剤は、単独で、または他の治療的薬剤と組み合わせて投与され得る。本発明の治療剤とともに投与され得る治療的薬剤としては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：化学療法剤、抗生物質、ステロイド性および非ステロイド性の抗炎症剤、従

50

来の免疫療法剤、および/または以下に記載される治療的処置。組み合わせは、例えば、混合物として同時に、別々であるが同時にもしくは並行して；または逐次的にかのいずれかで投与され得る。これは、組み合わせられた薬剤が、治療混合物としてともに投与される提示を含み、そして組み合わせた薬剤が、別々であるが同時に（例えば、同じ個体へ別々の静脈ラインを通じてのように）投与される手順もまた含む。「組み合わせ」投与は、第1に、続いて第2に与えられる化合物または薬剤のうちの1つを別々に投与することをさらに含む。

#### 【1090】

1つの実施形態において、本発明の組成物は、TNFファミリーの他のメンバーと組み合わせ投与される。本発明の組成物とともに投与され得るTNF分子、TNF関連分子、またはTNF様分子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：可溶性形態の、TNF- $\alpha$ 、リンホトキシン- $\alpha$ 、(LT- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ としても公知)、LT- $\beta$ （複合ヘテロ三量体LT- $\alpha$ - $\beta$ の状態で見出される）、OPGL、FasL、CD27L、CD30L、CD40L、4-1BBL、DcR3、OX40L、TNF- $\beta$ （国際公開番号WO96/14328）、AIM-I（国際公開番号WO97/33899）、エンドカイン(endokine)- $\beta$ （国際公開番号WO98/07880）、TR6（国際公開番号WO98/30694）、OPG、およびニュートロカイン(neutrokin)- $\alpha$ （国際公開番号WO98/18921）、OX40、および神経成長因子(NGF)、ならびに可溶性形態の、Fas、CD30、CD27、CD40および4-1BB、TR2（国際公開番号WO96/34095）、DR3（国際公開番号WO97/33904）、DR4（国際公開番号WO98/32856）、TR5（国際公開番号WO98/30693）、TR6（国際公開番号WO98/30694）、TR7（国際公開番号WO98/41629）、TRANK、TR9（国際公開番号WO98/56892）、TR10（国際公開番号WO98/54202）、312C2（国際公開番号WO98/06842）、およびTR12、ならびに可溶性形態の、CD154、CD70、およびCD153。

#### 【1091】

特定の実施形態において、本発明の治療剤は、抗レトロウイルス薬剤、ヌクレオシド/ヌクレオチド逆転写酵素インヒビター(NRTI)、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター(NNRTI)、および/またはプロテアーゼインヒビター(PI)と組み合わせ投与される。本発明の治療剤と組み合わせ投与され得るNRTIとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：RETROVIR<sup>TM</sup>(ジドブジン/AZT)、VIDEX<sup>TM</sup>(ジダノシン/ddI)、HIVID<sup>TM</sup>(ザルシタピン/ddC)、ZERIT<sup>TM</sup>(スタブジン/d4T)、EPIVIR<sup>TM</sup>(ラミブジン/3TC)、およびCOMBIVIR<sup>TM</sup>(ジドブジン/ラミブジン)。本発明の治療剤と組み合わせ投与され得るNNRTIとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：VIRAMUNE<sup>TM</sup>(ネビラピン)、RESCRIPTOR<sup>TM</sup>(デラビルジン)、およびSUSTIVA<sup>TM</sup>(エファビレンズ)。本発明の治療剤と組み合わせ投与され得るプロテアーゼインヒビターとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：CRIXIVAN<sup>TM</sup>(インディナビル(indinavir))、NORVIR<sup>TM</sup>(リトナビル(ritonavir))、INVIRASE<sup>TM</sup>(サキナビル(saquinavir))、およびVIRACEPT<sup>TM</sup>(ネルフィナビル(nelfinavir))。特定の実施形態において、抗レトロウイルス薬剤、ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、非ヌクレオシド逆転写酵素インヒビター、および/またはプロテアーゼインヒビターは、AIDSを処置するため、および/またはHIV感染を予防もしくは処置するために、本発明の治療剤との任意の組み合わせで使用され得る。

#### 【1092】

さらなるNRTIとしては、以下が挙げられる：LODENOSINE<sup>TM</sup>(F-ddA；酸安定性アデノシンNRTI；Triangle/Abbott)；COVIRACIL<sup>TM</sup>(エムトリシタピン(emtricitabine)/FTC；ラミブジン(la

10

20

30

40

50

mivudine) (3TC) と構造的に関連するが、インビトロにおいて3~10倍強い活性を有する; Triangle/Abbott); dOTC (BCH-10652, 同様に、ラミブジンと構造的に関連するが、ラミブジン耐性分離菌のかなりの部分に対する活性を有する; Biochem Pharma); Adefovir (FDAによって、抗HIV治療についての認可を拒絶された; Gilead Sciences); PREVEON (登録商標) (Adefovir Dipivoxil, アデノフォビル (adefovir) の活性なプロドラッグ; その活性形態はPMEA-ppである); TENOFVIR<sup>TM</sup> (ビス-POC PMPA, PMPAプロドラッグ; Gilead); DAPD/DXG (DAPDの活性な代謝産物; Triangle/Abbott); D-D4FC (3TCと関連, AZT/3TC-耐性ウイルスに対する活性を有する); GW420867X (Glaxo Wellcome); ZIAGEN<sup>TM</sup> (アバカビル (abacavir) /159U89; Glaxo Wellcome Inc.); CS-87 (3'-アジド-2', 3'-ジデオキシウリジン; WO 99/66936); ならびに、-L-FD4Cおよび-L-FddCのS-アシル-2-チオエチル (SATE) -保有プロドラッグ形態 (WO 98/17281)。

10

## 【1093】

さらなるNNRTIとしては、以下が挙げられる: COACTINON<sup>TM</sup> (Emivirine/MKC-442, HEPTクラスの強力なNNRTI; Triangle/Abbott); CAPRAVIRINE<sup>TM</sup> (AG-1549/S-1153, K103N変異を含むウイルスに対して活性を有する、次世代のNNRTI; Agouron); PNU-142721 (その前駆体デラビルジン (delavirdine) よりも20~50倍高い活性を有し、そしてK103N変異体に対して活性である; Pharmacia & Upjohn); DPC-961およびDPC-963 (エファビレンツ (efavirenz) の第二世代誘導体, K103N変異を有するウイルスに対して活性であるように設計された; DuPont); GW-420867X (HBY097よりも25倍高い活性を有し、そしてK103N変異体に対して活性である; Glaxo Wellcome); CALANOLIDE A (ラテックス樹木由来の天然に存在する因子; Y181CおよびK103N変異のいずれかまたは両方を含むウイルスに対して活性); ならびに、Propolis (WO 99/49830)。

20

## 【1094】

さらなるプロテアーゼインヒビターとしては以下が挙げられる: LOPINAVIR<sup>TM</sup> (ABT378/r; Abbott Laboratories); BMS-232632 (アザペプチド; Bristol-Myers Squibb); TIPRANAVIR<sup>TM</sup> (PNU-140690, 非ペプチド性 (non-peptic) ジヒドロピロン; Pharmacia & Upjohn); PD-178390 (非ペプチド性ジヒドロピロン; Parke-Davis); BMS 232632 (アザペプチド; Bristol-Myers Squibb); L-756, 423 (インディナビル (indinavir) のアナログ; Merck); DMP-450 (サイクリック尿素化合物; Avid & DuPont); AG-1776 (プロテアーゼインヒビター耐性ウイルスに対してインビトロで活性を有するペプチド模倣物; Agouron); VX-175/GW-433908 (アンブレナビル (amprenavir) のホスフェートプロドラッグ; Vertex & Glaxo Wellcome); CGP61755 (Ciba); およびAGENERASE<sup>TM</sup> (アンブレナビル (amprenavir); Glaxo Wellcome Inc.)。

30

40

## 【1095】

さらなる抗レトロウイルス薬剤としては、融合インヒビター/gp41結合剤が挙げられる。融合インヒビター/gp41結合剤としては、T-20 (その休止状態においてgp41に結合し、そしてフソジェニック (fusogenic) 状態への形質転換を妨げるHIV gp41膜貫通タンパク質の外部ドメインの残基643~678由来のペプチド; Trimeris) およびT-1249 (第二世代の融合インヒビター; Trime

50

r i s ) が挙げられる。

【1096】

さらなる抗レトロウイルス薬剤としては、融合インヒビター/ケモカインレセプターアンタゴニストが挙げられる。融合インヒビター/ケモカインレセプターアンタゴニストとしては、以下が挙げられる：CXCR4アンタゴニスト（例えば、AMD 3100（バイサイラム（bicyclam））、SDF-1およびそのアナログ、ならびにALX40-4C（カチオン性ペプチド）、T22（18アミノ酸のペプチド；Trimeris）ならびにT22アナログであるT134およびT140）；CCR5アンタゴニスト（例えば、RANTES（9-68）、AOP-RANTES、NNY-RANTES、およびTAK-779）；ならびにCCR5/CXCR4アンタゴニスト（例えば、NSC 651016（ジスタマイシンアナログ）。CCR2B、CCR3、およびCCR6アンタゴニストもまた含まれる。ケモカインレセプターアゴニスト（例えば、RANTES、SDF-1、MIP-1、MIP-1 など）もまた融合を阻害し得る。

10

【1097】

さらなる抗レトロウイルス薬剤は、インテグラーゼインヒビターを含む。インテグラーゼインヒビターとしては、以下が挙げられる：ジカフェオイルキナ（DFQA）酸（dicaffeoylquinic（DFQA）acids）；L-チコリ酸（L-chicoric acid）（ジカフェオイル酒石（DCTA）酸）；キナリザリン（quinizarin；QLC）および関連のアントラキノン；ZINTEVIR<sup>TM</sup>（AR177、真のインテグラーゼインヒビターではなく、細胞表面で恐らく作用するオリゴヌクレオチド；Arondex）；ならびにWO 98/50347に開示されるようなナフトール。

20

【1098】

さらなる抗レトロウイルス薬剤としては、以下が挙げられる：ヒドロキシ尿素様化合物（例えば、BCX-34（プリンヌクレオシドホスホリラーゼインヒビター；Biocryst））；リボヌクレオチドレダクターゼインヒビター（例えば、DIDOX<sup>TM</sup>（Molecules for Health））；イノシンモノホスフェートデヒドロゲナーゼ（IMPDH）インヒビター（例えば、VX-497（Vertex））；ならびにマイコフォリック酸（mycopholic acid）（例えば、Cellcept（マイコフェノラートモフェチル（mycophenolate mofetil）；Roche）。

30

【1099】

さらなる抗レトロウイルス薬剤としては、以下が挙げられる：ウイルスインテグラーゼのインヒビター、ウイルスゲノム核転座のインヒビター（例えば、アリーレンビス（メチルケトン）化合物）；HIV侵入のインヒビター（例えば、AOP-RANTES、NNY-RANTES、RANTES-IgG融合タンパク質、RANTESおよびグリコサミノグリカン（GAG）の可溶性複合体、およびAMD-3100）；ヌクレオカプシドジンクフィンガーインヒビター（例えば、ジチアン（dithiane）化合物）；HIV TatおよびRevの標的；ならびに薬剤エンハンサー（pharmacoenhancer）（例えば、ABT-378）。

40

【1100】

他の抗レトロウイルス治療剤および補助治療剤としては、以下が挙げられる：サイトカインおよびリンホカイン（例えば、MIP-1、MIP-1、SDF-1、IL-2、PROLEUKIN<sup>TM</sup>（アルデスロイキン（aldesleukin）/L2-7001；Chiron）、IL-4、IL-10、IL-12、およびIL-13）；インターフェロン（例えば、IFN-2a）；TNF、NF B、GM-CSF、M-CSF、およびIL-10のアンタゴニスト；免疫活性を調節する薬剤（例えば、シクロスポリンおよびプレドニゾン）；ワクチン、例えば、Remune<sup>TM</sup>（HIV免疫原）、APL 400-003（Apolon）、組換えgp120およびフラグメント、二価（B/E）組換えエンベロープ糖タンパク質、rgp120CM235、MN rgp

50

120, SF-2 rgp120, gp120/可溶性CD4複合体, Delta JR-FLタンパク質, 不連続gp120 C3/C4ドメイン由来の分枝合成ペプチド, 融合能を有する免疫原, ならびにGag, Pol, Nef, およびTatワクチン; 遺伝子に基づく治療、例えば、遺伝的抑制エレメント(GSE; WO 98/54366), およびイントラカイン(intrakine) (遺伝子改変されたCCケモカイン(ERへと標的化されて、新たに合成されたCCR5の表面発現をブロックする(Yangら, PNAS 94:11567-72(1997); Chenら, Nat. Med. 3:1110-16(1997)); 抗体、例えば、抗CXCR4抗体12G5のような抗CXCR4抗体, 抗CCR5抗体2D7, 5C7, PA8, PA9, PA10, PA11, PA12, およびPA14のような抗CCR5抗体, 抗CD4抗体Q4120およびRPA-T4のような抗CD4抗体、抗CCR3抗体7B11のような抗CCR3抗体、抗gp120抗体17b, 48d, 447-52D, 257-D, 268-Dおよび50.1のような抗gp120抗体, 抗Tat抗体, 抗TNF-抗体, およびモノクローナル抗体33A); アリール炭化水素(AH)レセプターアゴニストおよびアンタゴニスト、例えば、TCDD, 3, 3', 4, 4', 5-ペンタクロロビフェニル, 3, 3', 4, 4'-テトラクロロビフェニル, および-ナフトフラボン(WO 98/30213); ならびに、抗酸化剤、例えば、-L-グルタミル-L-システインエチルエステル(-GCE; WO 99/56764)。

#### 【1101】

上記の薬剤と一緒に、または上記の薬剤を用いずに、本発明の治療剤を用いて使用され得るさらなる薬剤としては、抗リンパ球増殖剤(例えば、オールトランスレチノイン酸(all-trans-RA)、IFN-、EPOCHおよびCidofovir); サリドマイドのような脈管形成のインヒビター; ヒドロキシ尿素のような細胞増殖抑制性化学療法剤; リファブチン、イソニアジド、およびリファンピンのような抗感染剤; ならびにLU 02-584(CPI-1189; Centuar Pharmaceuticals Inc.)のような抗痴呆剤が挙げられる。

#### 【1102】

これらの種々の薬剤の投薬量は当該分野で公知であり、そして例えば、The Physician's Desk Referenceおよび科学文献において見出され得る。

#### 【1103】

ウイルスは、誤りがちな(error prone)逆トランスクリプターゼ(RT)に起因して非常に迅速に変異し、従って複数の治療剤に対する耐性を発生する。併用治療を使用して、ウイルス経路における複数の点(RT、プロテアーゼ、ウイルス侵入およびウイルスの中和)を標的化することによって、高い変異率が効率的に無効にされるはずである。従って、本発明の治療剤は、抗レトロウイルス剤の組合せ(2つの薬物、3つの薬物、4つの薬物、5つの薬物、6つの薬物、7つの薬物、8つの薬物、9つの薬物およびそれより多くの組合せを含む)で使用され得る。抗レトロウイルス剤のこのような組合せは、文献において、活性抗レトロウイルス治療(ART)、高活性抗レトロウイルス治療(HAART)、連続的HAART、断続的HAART、「メガ」HAART(4、5、6、7、または8より多く、そして好ましくは9より多くの薬剤)、集中的高用量多種薬剤治療、初期治療強化(ETI)、最大補助的治療(MAT)、自己投与治療(SAT)、低いCD4+値のHIV感染患者における活性高レトロウイルス治療下の皮下組換えヒトIL-2(SILCAAT)、および維持療法といわれ得る。好ましくは、本発明の治療剤は、高度に活性な抗レトロウイルス治療と組合せて使用される。本発明の治療剤はまた、補助剤(例えば、上記の補助剤および本明細書中に開示の補助剤、ならびに当該分野で公知の補助剤)と組合せて、単独または抗レトロウイルス剤と共にのいずれかで使用され得る。

#### 【1104】

本発明の治療剤を任意の上記薬剤または薬剤の組合せと組み合わせる場合、この用量は

必要に応じて調節される。NRTIは、組合される場合、一般的には用量の調節を必要としないが、NNRTIおよびPIは、互いのレベルおよび力価に影響し得る。このような用量の調節についての手引き、および一般的な抗レトロウイルス治療の開始、継続、管理、変更、および維持についての手引きは、開業医に周知であり、そして例えば、Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents In HIV-Infected Adults and Adolescents, Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV Infection, Dept. Health and Human Services and Henry J. Kaiser Foundation, Jan. 28, 2000, および<<<http://www.hivatis.org>>>ならびに他の科学文献において容易に入手可能である。

10

## 【1105】

他の実施形態では、本発明の治療剤は、抗日和見感染症薬剤と組み合わせて投与され得る。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得る抗日和見感染症薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されないTRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE<sup>TM</sup>, DAPSONE<sup>TM</sup>, PENTAMIDINE<sup>TM</sup>, ATOVAQUONE<sup>TM</sup>, ISONIAZID<sup>TM</sup>, RIFAMPIN<sup>TM</sup>, PYRAZINAMIDE<sup>TM</sup>, ETHAMBUTOL<sup>TM</sup>, RIFABUTIN<sup>TM</sup>, CLARITHROMYCIN<sup>TM</sup>, AZITHROMYCIN<sup>TM</sup>, GANCICLOVIR<sup>TM</sup>, FOSCARNET<sup>TM</sup>, CIDOFOVIR<sup>TM</sup>, FLUCONAZOLE<sup>TM</sup>, ITRACONAZOLE<sup>TM</sup>, KETOCONAZOLE<sup>TM</sup>, ACYCLOVIR<sup>TM</sup>, FAMCICOLVIR<sup>TM</sup>, PYRIMETHAMINE<sup>TM</sup>, LEUCOVORIN<sup>TM</sup>, NEUPOGEN<sup>TM</sup> (フィルグラスチム (filgrastim) / G-CSF), およびLEUKINE<sup>TM</sup> (サルグラモスチン (sargramostim) / GM-CSF)。特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見Pneumocystis carinii肺炎感染を予防的に処置または予防するために、TRIMETHOPRIM-SULFAMETHOXAZOLE<sup>TM</sup>、DAPSONE<sup>TM</sup>、PENTAMIDINE<sup>TM</sup>、および/またはATOVAQUONE<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見Mycobacterium avium複合感染を予防的に処置または予防するために、ISONIAZID<sup>TM</sup>、RIFAMPIN<sup>TM</sup>、PYRAZINAMIDE<sup>TM</sup>、および/またはETHAMBUTOL<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見Mycobacterium tuberculosis感染を予防的に処置または予防するために、RIFABUTIN<sup>TM</sup>、CLARITHROMYCIN<sup>TM</sup>、および/またはAZITHROMYCIN<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見サイトメガロウイルス感染を予防的に処置または予防するために、GANCICLOVIR<sup>TM</sup>、FOSCARNET<sup>TM</sup>、および/またはCIDOFOVIR<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見真菌感染を予防的に処置または予防するために、FLUCONAZOLE<sup>TM</sup>、ITRACONAZOLE<sup>TM</sup>、および/またはKETOCONAZOLE<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見単純ヘルペスウイルスI型および/またはII型感染を予防的に処置または予防するために、ACYCLOVIR<sup>TM</sup>および/またはFAMCICOLVIR<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見Toxoplasma gondii感染を予防的に処置または予防するために、PYRIMETHAMINE<sup>TM</sup>および/またはLEUCOVORIN<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。別の特定の実施形態において、本発明の治療剤は、日和見細菌感染を予防的に処置または予防するために、LEUCOVORIN<sup>TM</sup>および/またはNEUPOGEN<sup>TM</sup>との任意の組み合わせで使用される。

20

30

40

## 【1106】

50

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、抗ウイルス剤と組合せて投与される。本発明の治療剤と共に投与され得る抗ウイルス剤としては、アシクロビル、リバビリン、アマンタジン、およびリマンタジンが挙げられるが、これらに限定されない。

【1107】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、抗生物質薬剤と組合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る抗生物質としては、アモキシシリン、 $\beta$ -ラクタマーゼ、アミノ配糖体、 $\beta$ -ラクタム（糖ペプチド）、 $\beta$ -ラクタマーゼ、クリンダマイシン、クロラムフェニコール、セファロsporin、シプロフロキサシン、シプロフロキサシン、エリスロマイシン、フルオロキノロン類、マクロライド系抗生物質、メトロニダゾール、ペニシリン、キノロン類、リファンピン、ストレプトマイシン、スルホンアミド、テトラサイクリン、トリメトプリム、トリメトプリム-スルファメトキサゾール、およびバンコマイシンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【1108】

本発明の治療剤と組合わせて投与され得る従来の非特異的免疫抑制剤としては、ステロイド類、シクロsporin、シクロsporinアナログ、シクロホスファミドメチルプレドニゾン、プレドニゾン、アザチオプリン、FK-506、15-デオキシスペルグアリン（15-deoxyaspergualin）、および応答T細胞の機能を抑制することによって作用する他の免疫抑制剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【1109】

特定の実施形態において、本発明の治療剤は、免疫抑制剤と組合せて投与される。本発明の治療剤と共に投与され得る免疫抑制調製物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ORTHOCLONE<sup>TM</sup>（OKT3）、SANDIMMUNE<sup>TM</sup>/NEORAL<sup>TM</sup>/SANGDYA<sup>TM</sup>（シクロsporin）、PROGRAF<sup>TM</sup>（タクロリムス）、CELLCEPT<sup>TM</sup>（マイコフェノレート（mycophenolate））、アザチオプリン、グルコルチコステロイド（glucocorticosteroid）、およびRAPAMUNE<sup>TM</sup>（シロリムス（sirolimus））。特定の実施形態において、免疫抑制剤は、器官または骨髄移植の拒絶を予防するために使用され得る。

20

【1110】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、単独でかまたは1以上の静脈内免疫グロブリン調製物と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る静脈内免疫グロブリン調製物としては、GAMMAR<sup>TM</sup>、IVEEGAM<sup>TM</sup>、SANDOGLOBULIN<sup>TM</sup>、GAMMAGARD S/D<sup>TM</sup>、およびGAMIMUNE<sup>TM</sup>が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、本発明の治療剤は、移植治療（例えば、骨髄移植）において静脈内免疫グロブリン調製物と組み合わせて投与される。

30

【1111】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、単独または抗炎症性薬剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と共に投与され得る抗炎症性薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：糖質コルチコイドおよび非ステロイド性抗炎症剤、アミノアリアルカルボン酸誘導体、アリアル酢酸誘導体、アリアル酪酸誘導体、アリアルカルボン酸、アリアルプロピオン酸誘導体、ピラゾール類、ピラゾロン類、サリチル酸誘導体、チアジンカルボキサミド類、e-アセトアミドカプロン酸、S-アデノシルメチオニン、3-アミノ-4-ヒドロキシ酪酸、アミキセトリン（amixetrine）、ベンダザック、ベンジダミン、ブコローム、ジフェンピラミド、ジタゾール、エモルファゾン、グアイアズレン、ナブメトン、ニメスリド、オルゴテイン、オキサセプロール、パラニリン（paranyline）、ペリソキサール、ピフォキシム、プロカゾン、プロキサゾール、およびテニダブ。

40

【1112】

別の実施形態において、本発明の組成物は、化学療法剤と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と共に投与され得る化学療法剤としては、以下が挙げられるがこれらに限定

50

されない：抗生物質誘導体（例えば、ドキソルビシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、およびダクチノマイシン）；抗エストロゲン（例えば、タモキシフェン）；抗代謝剤（例えば、フルオロウラシル、5-FU、メトトレキサート、フロクスウリジン、インターフェロン-2b、グルタミン酸、プリカマイシン（plicamycin）、メルカプトプリン、および6-チオグアニン）；細胞傷害剤（例えば、カルムスチン、BCNU、ロムスチン、CCNU、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、エストラムスチン、ヒドロキシ尿素、プロカルバジン、マイトマイシン、ブスルファン、シスプラチン、および硫酸ピンクリスチン）；ホルモン（例えば、メドロキシプロゲステロン、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エチニルエストラジオール、エストラジオール、酢酸メゲストロール、メチルテストステロン、ジエチルスチルベストロールジホスフェート、クロロトリアニセン、およびテストラクトン）；ナイトロジェンマスタード誘導体（例えば、メファレン（mephalen）、コラムブシル（chorambucil）、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）およびチオテパ）；ステロイドおよび組合せ（例えば、ベタメタゾンリン酸ナトリウム）；ならびに他のもの（例えば、ジカルバジン、アスパラギナーゼ、ミトタン、硫酸ピンクリスチン、硫酸ピンブラスチン、およびエトポシド）。

10

## 【1113】

特定の実施形態において、本発明の組成物は、CHOP（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチン、およびプレドニゾン）と組み合わせて投与されるか、CHOPの成分の任意の組み合わせで投与される。別の実施形態において、本発明の治療剤は、リツキシマブ（Rituximab）と組み合わせて投与される。さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、リツキシマブおよびCHOPと共に、またはリツキシマブおよびCHOPの成分の任意の組み合わせと共に投与される。

20

## 【1114】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、サイトカインと組み合わせて投与される。本発明の治療剤と共に投与され得るサイトカインとしては、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL10、IL12、IL13、IL15、抗CD40、CD40L、IFN-およびTNF-が挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態において、本発明の治療剤は、任意のインターロイキン（IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20およびIL-21を含むが、これらに限定されない）と共に投与され得る。

30

## 【1115】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、脈管形成タンパク質と組み合わせて投与される。本発明の治療剤とともに投与され得る脈管形成タンパク質としては、欧州特許番号EP-399816に開示されるようなグリオーム由来増殖因子（GDGF）；欧州特許番号EP-682110に開示されるような血小板由来増殖因子A（PDGF-A）；欧州特許番号EP-282317に開示されるような血小板由来増殖因子B（PDGF-B）；国際公開番号WO92/06194号に開示されるような胎盤増殖因子（PLGF）；Hauserら、Growth Factors、4：259-268（1993）に開示されるような胎盤増殖因子2（PLGF-2）；国際公開番号WO90/13649号に開示されるような血管内皮増殖因子（VEGF）；欧州特許番号EP-506477に開示されるような血管内皮増殖因子A（VEGF-A）；国際公開番号WO96/39515号に開示されるような血管内皮増殖因子2（VEGF-2）；血管内皮増殖因子B（VEGF-3）；国際公開番号WO96/26736号に開示されるような血管内皮増殖因子B-186（VEGF-B186）；国際公開番号WO98/02543号に開示されるような血管内皮増殖因子D（VEGF-D）；国際公開番号WO98/07832号に開示されるような血管内皮増殖因子D（VEGF-D）；およびドイツ国特許番号DE19639601に開示されるような血管内皮増殖因子E（VEGF-E）が挙げ

40

50

られるが、これらに限定されない。上記の参考文献は、本明細書で参考として援用される。

【1116】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、造血成長因子と組合せて投与される。本発明の治療剤と共に投与され得る造血成長因子としては、LEUKINE<sup>TM</sup> (SARGRAMOSTIM<sup>TM</sup>) およびNEUPOGEN<sup>TM</sup> (FILGRASTIM<sup>TM</sup>) が挙げられるがこれらに限定されない。

【1117】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、線維芽細胞増殖因子と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と共に投与され得る線維芽細胞増殖因子としては、FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9、FGF-10、FGF-11、FGF-12、FGF-13、FGF-14、およびFGF-15が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【1118】

他の実施形態において、本発明の治療剤は、ブタまたはヒトのインスリンまたはその混合物；インスリンアナログ；組換えヒトインスリン（例えば、HUMULIN<sup>TM</sup> およびNOVOLIN<sup>TM</sup>）；経口低血糖症薬物（例えば、ORAMIDE<sup>TM</sup> およびORINASE<sup>TM</sup>（トルブタミド）、DIABINESE<sup>TM</sup>（クロルプロパミド）、TOLAMIDE<sup>TM</sup> およびTOLINASE<sup>TM</sup>（トラザミド）、DYMELOR<sup>TM</sup>（アセトヘキサミド）、グリベンクラミド（glibenclamide）、MICRONASE<sup>TM</sup>、DIBETA<sup>TM</sup> およびGLYNASE<sup>TM</sup>（グリブリド）、GLUCOTROL<sup>TM</sup>（グリピジド）、およびDIAMICRON<sup>TM</sup>（グリクラジド）、GLUCOPHAGE<sup>TM</sup>（メトホルミン）、PRECOSE<sup>TM</sup>（アカルボース）、AMARYL<sup>TM</sup>（グリメピリド（glimepiride））、およびシグリタゾン（ciglitazone）；チアゾリジンジオン（TZD）（例えば、ロシグリタゾン（rosiglitazone）、AVANDIA<sup>TM</sup>（マレイン酸ロシグリタゾン）、ACTOS<sup>TM</sup>（ピオグリタゾン（pioglitazone））、およびトログリタゾン（troglitazone））； $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤；ウシまたはブタのグルカゴン；ソマトスタチン（例えば、SANDOSTATIN<sup>TM</sup>（オクテオチド（octreotide）））；およびジアゾキシド（例えば、PROGLYCEM<sup>TM</sup>（ジアゾキシド））と共に投与され得る。なお他の実施形態において、本発明の治療剤は、以下の1つ以上と組合せて投与される：ピグアニド抗糖尿病剤、グリタゾン抗糖尿病剤、およびスルホニル尿素抗糖尿病剤。

20

30

【1119】

さらなる実施形態において、本発明の治療剤は、他の治療剤または予防レジメン（例えば、放射線治療）と組合せて投与される。

【1120】

（実施例29：Gタンパク質ケモカインレセプターの低下したレベルを処置する方法）

本発明は、身体における本発明のポリペプチドの増加したレベルを必要とする個体を処置する方法に関し、この方法は、このような個体に、本発明のアゴニスト（本発明のポリヌクレオチドを含む）の治療有効量を含む組成物を投与する工程を包含する。さらに、個体におけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドの標準の発現レベルまたは正常な発現レベルの低下により引き起こされる状態は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）アゴニストを、好ましくは分泌形態で投与することにより処置し得ることが理解される。従って、本発明はまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドのレベルの増加が必要な個体の処置方法を提供する。この方法は、このような個体に、このような個体におけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の活性レベルを増加させる量のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）アゴニストを含む治療剤を投与する工程を包含する。

40

【1121】

50

例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドのレベルが低下した患者は、そのアゴニストを、1日用量0.1～100 μg/kgで6日続けて服用する。投与および処方物に基づく投薬計画の正確な詳細は、実施例28に提供されている。

#### 【1122】

（実施例30：Gタンパク質ケモカインレセプターの上昇したレベルを処置する方法）

本発明はまた、身体における本発明のポリペプチドの減少したレベルを必要とする個体の処置方法に関し、この方法は、このような個体に、本発明のアнтаゴニスト（本発明のポリペプチドおよび抗体を含む）の治療有効量を含む組成物を投与する工程を包含する。

#### 【1123】

1つの例において、アンチセンス技術を使用して、Gタンパク質ケモカインレセプターの産生を阻害する。この技術は、癌のような様々な病因に起因するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチド（好ましくは、可溶化形態）のレベルを低下させる方法の1つの例である。

#### 【1124】

例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のレベルが異常に上昇したと診断された患者に、アンチセンスポリヌクレオチドを、0.5、1.0、1.5、2.0および3.0 mg/kg/日で21日間、静脈内投与する。この処置に対して十分に寛容化された場合は、7日間の休薬期間後に、この処置を繰り返す。このアンチセンスポリヌクレオチドの処方は、実施例28に提供されている。

#### 【1125】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を減少するための、またはその活性を阻害するための他の方法は、本明細書中に記載される（例えば、実施例57において）。

#### 【1126】

（実施例31：遺伝子治療を使用する処置方法 - エキソピボ）

遺伝子治療の1つの方法は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドを発現し得る線維芽細胞を患者に移植する。一般に、線維芽細胞は、皮膚生検により被験者から得られる。得られた組織を組織培養培地中に配置し、小片に分割する。組織の小塊を組織培養フラスコの湿潤表面に置き、約10片を各フラスコに置く。このフラスコを倒置し、しっかりと閉めた後、室温で一晩放置する。室温で24時間後、フラスコを反転させ、組織塊をフラスコの底に固定させたままにし、そして新鮮な培地（例えば、10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するHamのF12培地）を添加する。次に、フラスコを37℃で約1週間インキュベートする。

#### 【1127】

この時点で、新鮮な培地を添加し、次いで数日ごとに取り換える。さらに二週間培養した後に、単層の線維芽細胞が出現する。この単層をトリプシン処理し、さらに大きなフラスコにスケールアップする。

#### 【1128】

モロニー Maus 肉腫ウイルスの長末端反復が隣接する pMV-7 (Kirschmeier, P. T.ら、DNA, 7:219-25 (1988)) を EcoRI および HindIII で消化した後、仔ウシ腸ホスファターゼで処理する。線状ベクターをアガロースゲル上で分画し、そしてガラスビーズを使用して精製する。

#### 【1129】

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）をコードするDNAを、実施例5に記載のそれぞれ5'末端配列および3'末端配列に対応するPCRプライマーを使用して増幅し得る。好ましくは、この5'プライマーはEcoRI部位を含み、そしてこの3'プライマーはHindIII部位を含む。等量の、モロニー Maus 肉腫ウイルスの線状骨格および増幅したEcoRIおよびHindIIIフラグメントを、T4 DNAリガーゼの存在下で一緒に加える。得られた混合物を、この2つのフラグメントを連結するのに適した条件下で維持する。次に、連結混合物を使用し、細菌HB101を形質転換する。次に、それを、カナマイシンを含む寒天上にプレーティングし、ベクターが厳密に挿入され

10

20

30

40

50

たGタンパク質ケモカインレセプターを含むことを確認する。

【1130】

アンホトロピックpA317またはGP+am12パッケージング細胞を、10%仔ウシ血清(CS)、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中、組織培養でコンフルエントな密度まで増殖させる。次に、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)遺伝子を含むMSVベクターを培地に加え、そしてパッケージング細胞をこのベクターで形質導入する。このとき、このパッケージング細胞は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生する(ここで、このパッケージング細胞をプロデューサー細胞という)。

【1131】

形質導入されたプロデューサー細胞に新鮮な培地を添加し、次いでこの培地を10cmプレートのコンフルエントなプロデューサー細胞から採取する。感染性ウイルス粒子を含む使用済み培地を、ミリポアフィルターを通して濾過し、はがれたプロデューサー細胞を除去した後、この培地を使用して、線維芽細胞を感染させる。線維芽細胞のサブコンフルエントなプレートから培地を除去し、そしてプロデューサー細胞からの培地で速やかに置き換える。この培地を除去し、そして新鮮な培地と置き換える。ウイルスの力価が高ければ、実質的にすべての線維芽細胞が感染され、選択は必要ではない。力価が非常に低ければ、neoまたはhisのような選択マーカーを有するレトロウイルスベクターを使用することが必要である。一旦、線維芽細胞が効率的に感染したなら、その線維芽細胞を分析し、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質が産生されているか否かを決定する。

【1132】

次に、操作された線維芽細胞を、単独で、またはサイトデックス3マイクロキャリアーズ上でコンフルエントに増殖させた後のいずれかで、宿主に移植する。

【1133】

(実施例32:内因性Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)遺伝子を使用する遺伝子治療)

本発明に従う遺伝子治療の別の方法は、内因性Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)配列を、例えば、米国特許番号5,641,670(1997年6月24日発行);国際公開番号WO 96/29411(1996年9月26日公開);国際公開番号WO 94/12650(1994年8月4日公開);Kollerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:8932~8935(1989);およびZijlstraら、Nature, 342:435~438(1989)に記載されるように、相同組換えを介してプロモーターに作動可能に結合する工程を包含する。この方法は、その標的細胞中に存在するが、その細胞中では発現されないかまたは所望されるよりも低いレベルで発現される、遺伝子の活性化を包含する。

【1134】

プロモーターおよび標的化配列を含むポリヌクレオチド構築物を作製する。この標的配列は、プロモーターに隣接する、内因性Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の5'非コード配列に相同である。この標的化配列は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の5'末端に十分に近く、その結果、このプロモーターは、相同組換えの際にこの内因性配列に作動可能に連結される。このプロモーターおよび標的化配列を、PCRを使用して増幅し得る。好ましくは、この増幅したプロモーターは、5'末端および3'末端上に異なる制限酵素部位を含む。好ましくは、第1の標的化配列の3'末端は、増幅したプロモーターの5'末端と同じ制限酵素部位を含み、そして第2の標的化配列の5'末端は、増幅したプロモーターの3'末端と同じ制限部位を含む。

【1135】

この増幅したプロモーターおよび増幅した標的化配列を、適切な制限酵素で消化し、続いてウシ腸ホスファターゼで処理する。消化したプロモーターおよび消化した標的化配列を、T4 DNAリガーゼの存在下でともに加える。生じた混合物を、これら2つのフラ

10

20

30

40

50

グメントの連結に適切な条件下で維持する。この構築物をアガロースゲル上でサイズ分画し、次いでフェノール抽出およびエタノール沈殿により精製する。

【1136】

この実施例において、このポリヌクレオチド構築物を、エレクトロポレーションを介して裸のポリヌクレオチドとして投与する。しかし、このポリヌクレオチド構築物はまた、トランスフェクション促進剤（例えば、リポソーム、ウイルス配列、ウイルス粒子、沈殿剤など）とともに投与され得る。送達のこのような方法は、当該分野で公知である。

【1137】

一旦、細胞をトランスフェクトすると、相同組換えが生じて、このプロモーターがこの内因性Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）配列に作動可能に連結される。これは、この細胞中におけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の発現を生じる。発現は、免疫学的染色または当該分野で公知の他の任意の方法により、検出され得る。

【1138】

線維芽細胞を、皮膚生検により被験者から得る。得られた組織を、DMEM + 10%ウシ胎仔血清中に配置する。対数増殖期または定常期初期の線維芽細胞を、トリプシン処理し、そしてプラスチックの表面から栄養培地でリンスする。細胞懸濁液のアリコートをし、計数のために取り出し、そして残りの細胞を遠心分離に供する。上清を吸引し、そしてペレットを5mlのエレクトロポレーション緩衝液（20mM HEPES pH7.3、137mM NaCl、5mM KCl、0.7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、6mM デキストロース）に再懸濁する。この細胞を再遠心分離し、上清を吸引し、そして細胞をアセチル化ウシ血清アルブミン1mg/mlを含むエレクトロポレーション緩衝液に再懸濁する。この最終細胞懸濁物は、約3 × 10<sup>6</sup>細胞/mlを含む。エレクトロポレーションを、再懸濁直後に実施すべきである。

【1139】

プラスミドDNAを、標準的技術に従って調製する。例えば、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）遺伝子座に標的化するためのプラスミドを構築するために、プラスミドpUC18（MBI Fermentas、Amherst、NY）をHindIIIで消化する。CMVプロモーターを、5'末端にXbaI部位および3'末端にBamHI部位を備えてPCRにより増幅する。2つのGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）非コード遺伝子配列をPCRを介して増幅する：一方のステロイドホルモンレセプター非コード配列（Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）フラグメント1）を、5'末端にHindIII部位および3'末端にXbaI部位を備えて増幅する；他方のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）非コード配列（Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）フラグメント2）を、5'末端にBamHI部位および3'末端にHindIII部位を備えて増幅する。このCMVプロモーターおよびGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）フラグメント（1および2）を、適切な酵素（CMVプロモーター - XbaIおよびBamHI；Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）フラグメント1 - XbaI；Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）フラグメント2 - BamHI）で消化し、そしてともに連結する。生じた連結生成物をHindIIIで消化し、そしてHindIIIで消化したpUC18プラスミドと連結する。

【1140】

プラスミドDNAを、0.4cmの電極ギャップを備える滅菌キュベット（Bio-Rad）に添加する。最終DNA濃度は、一般的に、少なくとも120μg/mlである。次いで、この細胞懸濁液の0.5ml（約1.5 × 10<sup>6</sup>細胞を含む）をこのキュベットに添加し、そしてこの細胞懸濁液およびDNA溶液を、穏やかに混合する。エレクトロポレーションを、Gene-Pulsar装置（Bio-Rad）を用いて実施する。キャパシタンスおよび電圧を、それぞれ、960μFおよび250~300Vに設定する。電圧が増加すると、細胞の生存が減少するが、導入されたDNAをそのゲノム中に安定に組込む生存細胞の割合が劇的に増加する。これらのパラメーターの場合、パルス時間約14

10

20

30

40

50

~ 20 m S e c が観察されるはずである。

【1141】

エレクトロポレーションした細胞を、室温で約5分間維持し、次いで、このキュベットの巾着を、滅菌した移動ピペットを用いて穏やかに取り出す。この細胞を、10 cmのディッシュ中の、予め温めた栄養培地(15%ウシ血清を含むDMEM)10 mlに直接加え、そして37℃でインキュベートする。翌日、この培地を吸引し、そして10 mlの新鮮な培地で置換し、そしてさらに16~24時間インキュベートする。

【1142】

次いで、操作された線維芽細胞を、宿主中に、単独か、またはサイトデックス(cytodex)3マイクロキャリア(microcarrier)ビーズ上でコンフルエントになるまで増殖させた後かのいずれかで、注入する。ここで、この線維芽細胞は、タンパク質産物を生成する。次いで、この線維芽細胞を、上記のような患者に導入し得る。

【1143】

(実施例33: 遺伝子治療を使用する処置方法 - インビボ)

本発明の別の局面は、障害、疾患、および状態を処置するためにインビボ遺伝子治療方法を使用することである。この遺伝子治療法は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの発現を増大または減少させるための、動物への裸の核酸(DNA、RNA、およびアンチセンスDNAまたはRNA)Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)配列の導入に関する。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドは、プロモーター、または標的組織によるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの発現に必要な任意の他の遺伝子エレメントに、作動可能に連結され得る。このような遺伝子治療および送達の方法および技術は、当該分野で公知であり、例えば、WO90/11092、WO98/11779; 米国特許第5693622号、同第5705151号、同第5580859号; Tabata, H.ら、Cardiovasc. Res. 35(3): 470-479(1997); Chao J.ら、Pharmacol. Res. 35(6): 517-522(1997); Wolff, J. A. Neuromuscul. Disord. 7(5): 314-318(1997); Schwartz, B.ら、Gene Ther. 3(5): 405-411(1996); Tsurumi Yら、Circulation 94(12): 3281-3290(1996)(本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

【1144】

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド構築物は、注入可能な物質を動物の細胞に送達する任意の方法(例えば、組織(心臓、筋肉、皮膚、肺、肝臓、腸など)の間隙空間への注入)によって送達され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド構築物は、薬学的に受容可能な液体または水性キャリア中で送達され得る。

【1145】

用語「裸の」ポリヌクレオチド、DNAまたはRNAは、細胞への侵入を補助、促進、または容易にするように作用するいかなる送達ビヒクル(ウイルス配列、ウイルス粒子、リポソーム処方物、リポフェクチン、または沈澱剤などを含む)も含まない配列をいう。しかし、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドはまた、当業者に周知の方法によって調製され得るリポソーム処方物(例えば、Felgner, P. L.ら、(1995) Ann. NY Acad. Sci. 772: 126-139およびAbdallah B.ら、(1995) Biol. Cell 85(1): 1-7で教示されたもの)中で送達され得る。

【1146】

この遺伝子治療方法において使用されるGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドベクター構築物は、好ましくは、宿主ゲノムに組み込まれず、複製を可能にする配列も含まない構築物である。当業者に公知の任意の強力なプロモーターが、DNAの発現を駆動するために用いられ得る。他の遺伝子治療技術とは異なり、裸の核酸

10

20

30

40

50

配列を標的細胞に導入する1つの主要な利点は、その細胞におけるポリヌクレオチド合成の一過性の性質である。研究によって、非複製DNA配列が細胞に導入されて、6ヶ月までの間の期間、所望のポリペプチドの産生を提供し得ることが示された。

#### 【1147】

このGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド構築物は、動物内の組織(筋肉、皮膚、脳、肺、肝臓、脾臓、骨髄、胸腺、心臓、リンパ、血液、骨、軟骨、膵臓、腎臓、胆嚢、胃、腸、精巣、卵巣、子宮、直腸、神経系、眼、腺、および結合組織を包含する)の間隙空間に送達され得る。この組織の間隙空間は、細胞間液、ムコ多糖基質(器官組織の細網線維、血管または腔(chamber)の壁における弾性線維、線維性組織のコラーゲン線維間にある)、あるいは結合組織鞘性筋肉細胞内または骨の裂孔中の同じ基質を包含する。これは、同様に、循環の血漿およびリンパチャンネルのリンパ液により占められた空間である。筋肉組織の間隙空間への送達は、以下に考察する理由のために好ましい。それらは、これらの細胞を含む組織への注入によって、好都合に送達され得る。それらは、好ましくは、分化した持続性の非分裂細胞に送達され、そしてその細胞において発現されるが、送達および発現は、非分化細胞または完全には分化していない細胞(例えば、血液の幹細胞または皮膚線維芽細胞など)において達成され得る。インビボで、筋肉細胞は、ポリヌクレオチドを取り込み、そして発現するそれらの能力において、特に適格である。

10

#### 【1148】

裸のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド注入について、DNAまたはRNAの有効投薬量は、約0.05g/kg体重から約50mg/kg体重の範囲にある。好ましくは、この投薬量は、約0.005mg/kgから約20mg/kgであり、そしてより好ましくは、約0.05mg/kgから約5mg/kgである。もちろん、当業者が認識するように、この投薬量は、注入の組織部位に従って変化する。核酸配列の適切かつ有効な投薬量は、当業者によって容易に決定され得、そして処置される状態および投与経路に依存し得る。好ましい投与経路は、組織の間隙空間への非経口注入経路によってである。しかし、他の非経口経路もまた用いられ得、これには、例えば、特に肺または気管支組織、咽喉、または鼻の粘膜への送達のためのエアロゾル処方物の吸入が挙げられる。さらに、裸のGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド構築物が、血管形成術の間に、この手順において用いられるカテーテルによって動脈に送達され得る。

20

30

#### 【1149】

インビボでの筋肉における注入Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチドの用量応答効果を、以下のようにして決定する。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドをコードするmRNAの生成のための適切なGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)テンプレートDNAを、標準的な組換えDNA方法論に従って調製する。テンプレートDNA(これは環状または線状のいずれかであり得る)を裸のDNAとして使用するか、またはリボソームと複合体化するかのいずれかである。次いで、マウスの四頭筋に、種々の量のテンプレートDNAを注入する。

40

#### 【1150】

5~6週齢の雌性および雄性のBalb/Cマウスに、0.3mlの2.5%Avertinを腹腔内注射することにより麻酔する。1.5cmの切開を大腿前部で行い、そして四頭筋を直接可視化する。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)テンプレートDNAを、0.1mlのキャリアに入れて、1cc注射器で27ゲージ針を通して1分間にわたって、筋肉の遠位挿入部位から約0.5cmのところまで膝に、そして約0.2cmの深さで注入する。縫合を、将来の位置決定のために注入部位の上に配置し、そしてその皮膚をステンレス鋼クリップで閉じる。

#### 【1151】

適切なインキュベーション時間(例えば、7日)後、筋肉抽出物を、四頭全体を切り出すことによって調製する。個々の四頭筋の5枚毎の15μm切片を、Gタンパク質ケモカ

50

インレセプター（CCR5）タンパク質発現について組織化学的に染色する。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質発現についての時間経過を、異なるマウスからの四頭を異なる時間で採取すること以外は、同様な様式で行い得る。注入後の筋肉中のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）DNAの持続性を、注入したマウスおよびコントロールマウスからの全細胞性DNAおよびHIRT上清を調製した後、サザンブロット分析によって決定し得る。マウスにおける上記実験の結果を、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の裸のDNAを用いて、ヒトおよび他の動物において適切な投薬量および他の処置パラメーターを外挿するために使用し得る。

【1152】

（実施例34：Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）トランスジェニック動物）

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリペプチドはまた、トランスジェニック動物において発現され得る。マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット、ブタ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシおよびヒト以外の霊長類（例えば、ヒヒ、サルおよびチンパンジー）を含むがこれらに限定されない任意の種の動物は、トランスジェニック動物を作製するために用いられ得る。特定の実施形態において、本明細書に記載されるかまたはさもなければ当該分野で公知の技術が、遺伝子治療プロトコルの一部として、ヒトにおける本発明のポリペプチドの発現のために用いられる。

【1153】

当該分野で公知の任意の技術を、導入遺伝子（すなわち、本発明のポリヌクレオチド）の動物への導入に用いて、トランスジェニック動物の創始系統（founder line）を生成し得る。このような技術は、前核マイクロインジェクション（Patersonら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 691-698 (1994)；Carverら、Biotechnology (NY) 11: 1263-1270 (1993)；Wrightら、Biotechnology (NY) 9: 830-834 (1991)；およびHoppeら、米国特許第4,873,191号 (1989)；生殖細胞系へのレトロウイルス媒介遺伝子移入（Van der Puttenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152 (1985)）、胚盤胞または胚；胚性幹細胞における遺伝子標的化（Thompsonら、Cell 56: 313-321 (1989)）；細胞または胚のエレクトロポレーション（Lo、1983、Mol Cell Biol. 3: 1803-1814 (1983)）；遺伝子銃を用いた本発明のポリヌクレオチドの導入（例えば、Ulmerら、Science 259: 1745 (1993)を参照のこと）；胚性多能性（pluripotent）幹細胞への核酸構築物の導入および胚盤胞へのこの幹細胞の移入；ならびに精子媒介遺伝子移入（Lavitranoら、Cell 57: 717-723 (1989)）；などを含むがこれらに限定されない。このような技術の総説については、本明細書中にその全体が参考として援用される、Gordon、「Transgenic Animals」、Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229 (1989)を参照のこと。

【1154】

当該分野で公知の任意の技術を用いて、本発明のポリヌクレオチドを含むトランスジェニッククローンを生成し得る（例えば、培養された、静止状態に誘導された胚細胞、胎児細胞または成体の細胞由来の除核した卵母細胞の核への核移入（Campbellら、Nature 380: 64-66 (1996)；Wilmutら、Nature 385: 810-813 (1997)））。

【1155】

本発明は、その全ての細胞に導入遺伝子を有するトランスジェニック動物、ならびにくつつかの細胞（しかしその全ての細胞ではない）に導入遺伝子を有する動物（すなわち、モザイク動物またはキメラ）を提供する。導入遺伝子は、1つの導入遺伝子としてまたはコンカテマー（例えば、頭-頭タンデム型または頭-尾タンデム型）のような複数のコピ

10

20

30

40

50

ーとして組み込まれ得る。この導入遺伝子はまた、例えば、Laskoらの教示(Laskoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236(1992))に従って特定の細胞型に選択的に導入され得、そして活性化され得る。このような細胞型特異的活性化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そしてそれらは当業者に明らかである。ポリヌクレオチド導入遺伝子が、内在性遺伝子の染色体部位に組み込まれることが所望される場合、遺伝子の標的化が好ましい。

【1156】

手短かに言えば、このような技術が利用される場合、内在性遺伝子に対して相同ないくつかのヌクレオチド配列を含むベクターが、染色体配列との相同な組換えを介して内在性遺伝子のヌクレオチド配列に組み込まれ、そのヌクレオチド配列の機能を破壊することを目的として設計される。導入遺伝子はまた、特定の細胞型に選択的に導入され得、従って、例えば、Guら(Guら、Science 265:103-106(1994))の教示に従って、導入された細胞型においてのみ内在性遺伝子が不活化される。そのような細胞型特異的不活化に必要とされる調節配列は、目的の特定の細胞型に依存し、そしてそれらは当業者に明らかである。この段落に列挙される文書の各々の内容は、本明細書中でその全体において参考として援用される。

10

【1157】

トランスジェニック動物において偏在性または組織特異的な様式で本発明のポリペプチドを発現することに加えて、種々の他の手段(例えば、例えば、発達のまたは化学的に調節された発現)によってポリペプチドの発現を調節する構築物を作製することもまた、当業者に慣用的である。

20

【1158】

一旦、トランスジェニック動物が作製されると、その組換え遺伝子の発現は、標準的な技術を利用してアッセイされ得る。最初のスクリーニングは、サザンブロット分析またはPCR技術によって達成されて、導入遺伝子の組み込みが起きたことを動物組織の分析により確認し得る。トランスジェニック動物の組織における導入遺伝子のmRNA発現レベルはまた、動物から得た組織サンプルのノーザンブロット分析、インサイチュハイブリダイゼーション分析および逆転写酵素PCR(rt-PCR)を含むがこれらに限定されない技術を用いて評価され得る。トランスジェニック遺伝子発現組織のサンプルはまた、導入遺伝子産物に特異的な抗体を用いて免疫細胞化学的または免疫組織化学的に評価され得る。

30

【1159】

一旦、創始動物が生成されると、それらは、交配され、同系交配され、異系交配されるかまたは交雑されて、特定の動物のコロニーを生成し得る。そのような交配戦略の例は、以下を含むがこれらに限定されない：別の系統を樹立するための1つより多くの組み込み部位を有する創始動物の異系交配；各導入遺伝子の相加的発現効果によって、より高いレベルで導入遺伝子が発現する複合トランスジェニックを生成するための別々の系統の同系交配；発現の増強およびDNA分析による動物のスクリーニングの必要性の排除の両方のための、所定の組み込み部位に対してホモ接合性の動物を生成するヘテロ接合性トランスジェニック動物の交雑；複合ヘテロ接合性またはホモ接合性系統を生成するための別々のホモ接合系統の交雑；ならびに目的の実験モデルに適切な異なるバックグラウンド上に導入遺伝子を配置するための交配。

40

【1160】

本発明のトランスジェニック動物は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの生物学的機能の詳述、異常なGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の発現に関連する状態および/または障害の研究、ならびにこのような状態および/または障害の改善に有効な化合物についてのスクリーニングに有用な動物モデル系を含むがこれらに限定されない用途を有する。

【1161】

(実施例35：Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ノックアウト動物)

50

内因性 G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 遺伝子発現もまた、標的化された相同組換えを使用して、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 遺伝子および/またはそのプロモーターを不活性化あるいは「ノックアウトする」ことによって減少し得る (例えば、Smithiesら、Nature 317:230-234 (1985); ThomasおよびCapecchi、Cell 51:503-512 (1987); Thompsonら、Cell 5:313-321 (1989)を参照のこと; これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される)。例えば、内因性ポリヌクレオチド配列 (この遺伝子のコード領域または調節領域のいずれか) と相同性の DNA に隣接される、本発明の改変体、非機能的なポリヌクレオチド (または完全に関連のない DNA 配列) を、選択マーカーおよび/またはネガティブ選択マーカーを用いてまたは用いずに使用し、インビボで本発明のポリペプチドを発現する細胞をトランスフェクトし得る。別の実施形態において、当該分野で公知の技術を、目的の遺伝子を含むが、発現しない細胞中でノックアウトを作製するために使用する。標的化された相同組換えを介した、この DNA 構築物の挿入は、標的化された遺伝子の不活性化を生じる。このようなアプローチは、胚性幹細胞に対する改変が不活性化標的化された遺伝子を有する動物の子孫を作製するために使用され得る研究および農業分野に特に適する (例えば、ThomasおよびCapecchi 1987およびThompson 1989、前出を参照のこと)。しかし、このアプローチは、当業者に明白な適切なウイルスベクターを使用して、組換え DNA 構築物がインビボで要求された部位に直接投与されるか、または標的化される場合、ヒトにおける使用に慣用的に適合され得る。

10

20

#### 【1162】

本発明のさらなる実施形態において、本発明のポリペプチドを発現するために遺伝子操作される細胞、あるいは本発明のポリペプチドを発現しないように遺伝子操作された細胞 (例えば、ノックアウト) を、インビボで患者に投与する。このような細胞は、患者 (すなわち、ヒトを含む動物) または MHC 適合性ドナーから入手され得、そして線維芽細胞、骨髄細胞、血球 (例えば、リンパ球)、脂肪細胞、筋細胞、内皮細胞などを含み得るが、それらに限定されない。この細胞を、例えば、形質導入 (ウイルスベクターおよび好ましくは細胞ゲノム中に導入遺伝子を組み込むベクターを使用する)、またはトランスフェクション手順 (プラスミド、コスミド、YAC、裸の DNA、エレクトロポレーション、リポソームなどの使用を含むが、これらに限定されない) によって、細胞中に本発明のポリペプチドのコード配列を導入するために、あるいはこのコード配列および/または本発明のポリペプチドに結合している内因性の調節配列を破壊するために、組換え DNA 技術を使用してインビトロで遺伝子操作する。本発明のポリペプチドのコード配列を強力な構成的プロモーターもしくは誘導性プロモーターまたはプロモーター/エンハンサーの制御下に配置し、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の発現および好ましくは分泌を達成し得る。本発明のポリペプチドを発現および好ましくは分泌する操作した細胞を、例えば、循環中において、または腹腔内で患者中へ全身的に導入し得る。

30

#### 【1163】

あるいは、この細胞をマトリックスに組み込み得、そして身体に移植し得る (例えば、遺伝子操作した線維芽細胞を皮膚移植片の一部として移植し得る); 遺伝子操作した内皮細胞をリンパ移植片または脈管移植片の一部として移植し得る (例えば、Andersonら、米国特許第 5,399,349 号ならびに MulliganおよびWilson、米国特許第 5,460,959 号を参照のこと。これらの各々は、本明細書中でその全体が参考として援用される)。

40

#### 【1164】

投与される細胞が非自己または非 MHC 適合性細胞である場合、それらを、この導入細胞に対する宿主免疫応答の発生を妨害する周知の技術を使用して投与し得る。例えば、この細胞をカプセル性の形態で導入し得、この形態は、構成成分と即時の細胞外環境との交換を可能にしつつ、導入細胞が宿主免疫系によって認識されることを可能にしない。

#### 【1165】

50

本発明のノックアウト動物は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリペプチドの生物学的機能の詳述、異常なGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の発現に関連する疾患、障害および/または状態の研究、ならびにこのような疾患、障害および/または状態を寛解させるに有効な化合物のスクリーニングにおいて有用な動物モデル系を含むが、それらに限定されない用途を有する。

【1166】

(実施例36)

(B細胞増殖および分化の刺激または阻害を検出するアッセイ)

機能的体液性免疫応答の生成は、B系列の細胞とそれらの微小環境との間に、可溶性のシグナル伝達および同族のシグナル伝達の両方を必要とする。シグナルは、陽性の刺激(B系列の細胞がプログラムされた発生を持続するようにさせる)、または陰性の刺激(細胞が電流発生経路を阻止するように指示する)を伝え得る。現在までに、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-13、IL-14およびIL-15を含む、多数の刺激シグナルおよび阻害シグナルがB細胞応答性に影響することが見出されている。興味深いことに、これらのシグナルはそれ自体は弱いエフェクターであるが、種々の同時刺激タンパク質と組み合わせると、B細胞集団中の活性化、増殖、分化、ホーミング、耐性、および死を誘導し得る。

10

【1167】

B細胞同時刺激タンパク質の最も研究されたクラスの1つがTNFスーパーファミリーである。このファミリー内で、CD40、CD27およびCD30は、そのそれぞれのリガンドである、CD154、CD70およびCD153と共に種々の免疫応答を調節することが見出されている。これらのB細胞集団およびそれらの前駆細胞の増殖および分化の検出および/または観察を可能にするアッセイは、種々のタンパク質がこれらのB細胞集団上に、増殖および分化の点で有し得る効果を決定する際に価値のあるツールである。以下に列挙するのは、B細胞集団およびそれらの前駆体の分化、増殖、または阻害の検出を可能にするように設計された2つのアッセイである。

20

【1168】

(インビトロアッセイ)精製されたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質もしくはその短縮形態、または生成されたGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)リガンドを、B細胞集団およびそれらの前駆体において活性化、増殖、分化もしくは阻害および/または死を誘導する能力について評価する。精製したヒト扁桃腺B細胞に対するGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質の活性(定性的に0.1~10,000ng/mlの用量範囲にわたって測定した)を、標準的なBリンパ球同時刺激アッセイにおいて評価する。このアッセイでは、精製した扁桃腺B細胞を、プライミング因子として、ホルマリン固定Staphylococcus aureus Cowan I(SAC)、または固定した抗ヒトIgM抗体のいずれかの存在下で培養する。IL-2およびIL-15のような第2のシグナルは、トリチウム化チミジン取り込みにより測定した場合、SACおよびIgM架橋と協同してB細胞増殖を誘発する。新規な協同因子を、このアッセイを用いて容易に同定し得る。このアッセイは、CD3陽性細胞の磁気ビーズ(MACS)枯渇によりヒト扁桃腺B細胞を単離する工程を包含する。得られる細胞集団は、CD45R(B220)の発現により評価する場合、95%のB細胞より大きい。

30

40

【1169】

種々の希釈のそれぞれのサンプルを96ウェルプレートの個々のウェルに配置し、ここへ、培養培地(10%FBS、 $5 \times 10^{-5}$ M ME、100U/mlペニシリン、10 $\mu$ g/mlストレプトマイシン、および $10^{-5}$ 希釈のSACを含有するRPMI 1640)中で懸濁した、総量150 $\mu$ l中の、 $10^5$ B細胞を添加する。増殖または阻害を、因子の添加後72時間から開始して、 $^3$ H-チミジン(6.7Ci/mM)で20hパルス(1 $\mu$ Ci/ウェル)により定量する。陽性コントロールおよび陰性コントロールは、それぞれIL2および培地である。

50

## 【 1 1 7 0 】

(インビボアッセイ) B A L B / c マウスに、緩衝液のみ、または G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) タンパク質もしくはその短縮形態、または G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R ) リガンドの 2 m g / k g を、1 日 2 回注射 ( 腹腔内 ) する。マウスにこの処置を 4 日間連続して与え、この時点でこのマウスを屠殺し、そして分析のために種々の組織および血清を収集した。正常な脾臓ならびに G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) タンパク質で処理した脾臓由来の H & E 切片の比較により、脾臓細胞での G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) タンパク質の活性の結果、例えば、動脈周囲リンパ性鞘の拡散および / または赤色脾髄領域の有核の細胞充実性の有意な増加 ( これは、B 細胞集団の分化および増殖の活性化を示し得る ) が確認される。B 細胞マーカーである、抗 C D 4 5 R ( B 2 2 0 ) を用いる免疫組織化学的研究を用いて、脾臓細胞への任意の生理的な変化 ( 例えば、脾臓組織崩壊 ) が、樹立された T 細胞領域に浸潤する漠然と規定された B 細胞区画内の B 細胞提示の増加に起因するか否かを決定する。

10

## 【 1 1 7 1 】

G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) タンパク質で処置したマウス由来の脾臓のフローサイトメトリー分析を用いて、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) タンパク質が、T h B + である C D 4 5 R ( B 2 2 0 ) d u l l B 細胞の比を、コントロールマウスで観察される比よりも特異的に増加するか否かを示す。

## 【 1 1 7 2 】

同様に、増加した成熟 B 細胞のインビボでの提示の推定される結果は、血清 I g 力価の相対的な増加である。従って、血清 I g M および I g A レベルを緩衝液処置マウスと G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) タンパク質処置マウスとの間で比較する。

20

## 【 1 1 7 3 】

本実施例において記載する試験は、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) タンパク質の活性を試験する。しかし、当業者は、G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) ポリヌクレオチド ( 例えば、遺伝子治療 )、G タンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト ( リガンドを含む ) および / またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

## 【 1 1 7 4 】

( 実施例 3 7 )

30

( T 細胞増殖アッセイ )

C D 3 誘導性の増殖アッセイを P B M C で実行し、そして <sup>3</sup> H - チミジンの取り込みにより測定する。このアッセイを以下のように実行する。9 6 ウェルプレートを、C D 3 に対する m A b ( H I T 3 a , P h a r m i n g e n ) の 1 0 0 μ l / ウェル、またはアイソタイプ適合のコントロール m A b ( B 3 3 . 1 ) ( 0 . 0 5 M 炭酸水素塩緩衝液、p H 9 . 5 中、1 μ g / m l ) で 4 で 1 晩、コートし、次いで P B S で 3 回洗浄する。P B M C をヒト末梢血から、F / H 勾配遠心分離により単離し、そして G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) タンパク質の種々の濃度での存在下で、1 0 % F C S および P / S を含有する R P M I 中、m A b でコートしたプレートの 4 通りのウェル ( 5 × 1 0 <sup>4</sup> / ウェル ) に添加する ( 総量 2 0 0 μ l ) 。関連するタンパク質緩衝液および培地単独がコントロールである。3 7 での培養の 4 8 時間後、プレートを 1 0 0 0 r p m で 2 分間回転させ、そして 1 0 0 μ l の上清を除去し、そして、増殖への効果が観察される場合、I L - 2 ( または他のサイトカイン ) の測定のために - 2 0 で貯蔵した。ウェルに 0 . 5 μ C i の <sup>3</sup> H - チミジンを含む 1 0 0 μ l の培地を補充し、そして 3 7 で 1 8 ~ 2 4 時間培養する。ウェルを収集し、そして <sup>3</sup> H - チミジンの取り込みを増殖の指標として用いた。抗 C D 3 単独が増殖の陽性コントロールである。I L - 2 ( 1 0 0 U / m l ) をまた、増殖を増強するコントロールとして用いる。T 細胞の増殖を誘導しないコントロール抗体を G タンパク質ケモカインレセプター ( C C R 5 ) タンパク質の効果についての陰性コントロールとして用いる。

40

## 【 1 1 7 5 】

50

本実施例において記載される研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質の活性を試験した。しかし、当業者は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト（リガンドを含む）および/またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【1176】

（実施例38）

（MHCクラスII、同時刺激分子および接着分子の発現、ならびに単球および単球由来ヒト樹状細胞の細胞分化に対するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の効果）

樹状細胞を末梢血において見出される増殖前駆体の増殖により生成する：接着性PBMCまたは清浄化単球画分を、GM-CSF（50 ng/ml）およびIL-4（20 ng/ml）とともに7～10日間培養する。これらの樹状細胞は、非成熟細胞の特徴的表現型（CD1、CD80、CD86、CD40およびMHCクラスII抗原の発現）を有する。TNF- $\alpha$ のような活性化因子での処理は、表面表現型に迅速な変化（MHCクラスIおよびII、同時刺激分子および接着分子の発現の増加、FCRIIの下方制御、CD83の上方制御）を生じる。これらの変化は抗原提示能力の増加、および樹状細胞の機能的成熟と関連する。

【1177】

表面抗原のFACS分析を以下のように実施する。細胞を、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質もしくはそのリガンド、またはLPS（陽性コントロール）の漸増する濃度で1～3日処理し、1%BSAおよび0.02 mMアジ化ナトリウムを含有するPBSで洗浄し、次いで1：20希釈の適切なFITC標識モノクローナル抗体またはPE標識モノクローナル抗体とともに、4℃で30分間インキュベートする。さらなる洗浄後、標識した細胞をFACSscan（Becton Dickinson）でのフローサイトメトリーにより分析する。

【1178】

（サイトカインの産生に対する効果）

樹状細胞により生成されるサイトカイン、特にIL-12は、T細胞依存性免疫応答の開始において重要である。IL-12は、Th1ヘルパーT細胞免疫応答の発生に強力に影響し、そして細胞傷害性T細胞機能およびNK細胞機能を誘導する。ELISAを用いて以下のようにIL-12放出を測定する。樹状細胞（ $10^6$ /ml）を、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の漸増する濃度で24時間処理する。LPS（100 ng/ml）を、陽性コントロールとして細胞培養に添加する。次いで、細胞培養からの上清を収集し、そして市販のELISAキット（例えば、R&D Systems（Minneapolis, MN））を用いてIL-12含量について分析する。キットに提供される標準的プロトコルを用いる。

【1179】

（MHCクラスII、同時刺激分子および接着分子の発現に対する効果。）細胞表面抗原の3つの主なファミリー：接着分子、抗原提示に関与する分子、およびFcレセプターが、単球上で同定され得る。MHCクラスII抗原および他の同時刺激分子（例えば、B7およびICAM-I）の発現の調節は、単球の抗原提示能力、およびT細胞活性化を誘導する能力に変化を生じ得る。Fcレセプターの発現増加は、単球細胞傷害性活性、サイトカイン放出および食菌作用の改善と関連し得る。

【1180】

FACS分析は、以下のような表面抗原を試験するために用いられる。単球を、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質またはLPS（陽性コントロール）の漸増する濃度で1～5日処理し、1%BSAおよび0.02 mMアジ化ナトリウムを含有するPBSで洗浄し、次いで1：20希釈の適切なFITC標識モノクローナル抗体またはPE標識モノクローナル抗体とともに、4℃で30分間インキュベートする。さらな

10

20

30

40

50

る洗浄後、標識した細胞をFACSscan (Becton Dickinson)でのフローサイトメトリーにより分析する。

【1181】

(単球活性化および/または生存の増加)単球を活性化する(あるいは、不活化する)および/または単球の生存を増加する(あるいは、単球生存を低下させる)分子についてのアッセイは、当該分野で公知であり、そして本発明の分子が単球のインヒビターまたはアクチベーターとして機能するか否かを決定するために慣用的に適用され得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のアゴニストまたはアンタゴニストは、以下に記載の3つのアッセイを用いてスクリーニングされ得る。これらのアッセイのそれぞれについて、末梢血単核細胞(PBMC)を、Histopaque勾配(Sigma)を通じた遠心分離により、単一のドナーleukopak(American Red Cross, Baltimore, MD)から精製する。単球を向流遠心性エルトリエーション(counterflow centrifugal elutriation)によりPBMCから単離する。

10

【1182】

(単球生存アッセイ)ヒト末梢血単球は、血清または他の刺激の非存在下で培養した場合、次第に生存度を失う。それらの死は、内部調節されたプロセス(アポトーシス)から生じる。活性化因子、例えばTNFの培養への添加は、劇的に、細胞生存を改善し、そしてDNAの断片化を妨げる。プロピジウムヨード(PI)染色を用いて、以下のようにアポトーシスを測定する。単球を、100ng/mlのTNF-(陰性コントロール)の存在下、および試験される種々の濃度の化合物の存在下で、ポリプロピレンチューブ中の無血清培地(陽性コントロール)中で、48時間培養する。細胞を、最終濃度5μg/mlでPIを含有するPBS中で $2 \times 10^6$ /mlの濃度に懸濁し、次いでFACSscan分析の前に5分間室温でインキュベートする。PI取り込みは、この試験パラダイムにおけるDNAの断片化と相関することを示している。

20

【1183】

(サイトカイン放出への影響)単球/マクロファージの重要な機能は、刺激後のサイトカインの放出を通じた免疫系の他の細胞集団への調節活性である。サイトカイン放出を測定するためのELISAは、以下のように実施する。ヒト単球を、 $5 \times 10^5$ 細胞/mlの密度で、Gタンパク質ケモカインレセプターの漸増する濃度とともに、および同じ条件下でGタンパク質ケモカインレセプターの非存在下で、インキュベートする。IL-12の生成については、この細胞を、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質の存在下でIFN-(100U/ml)で1晩プライムする。次いで、LPS(10ng/ml)を添加する。馴化培地を24時間後に収集し、そして使用するまで凍結保存する。次いで、TNF-、IL-10、MCP-1およびIL-8の測定を市販のELISAキット(例えば、R&D Systems(Minneapolis, MN))を用い、キットに提供される標準的プロトコールを適用して実施する。

30

【1184】

(酸化的バースト(Oxidative burst))精製した単球を96ウェルプレートに $2 \sim 1 \times 10^5$ 細胞/ウェルでプレートする。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の漸増濃度をウェルの総量0.2mlの培養培地(RPMI 1640+10% FCS、グルタミンおよび抗生物質)に添加する。3日間のインキュベーション後、このプレートを遠心分離し、そして培地をウェルから除く。マクロファージの単層に、1ウェルあたり0.2mlのフェノールレッド溶液(140mM NaCl、10mMリン酸カリウム緩衝液pH7.0、5.5mM デキストロース、0.56mM フェノールレッドおよび19U/mlのHRPO)を、刺激物質(200nM PMA)とともに添加する。このプレートを37で2時間インキュベートし、そして1ウェルあたり20μlの1N NaOHを添加して反応を停止する。吸光度を610nmで読む。マクロファージにより生成されるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の量を算出するため、既知のモル濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液の標準曲線をそれぞれの実験について実施する。

40

50

## 【 1 1 8 5 】

この実施例において記載された研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質の活性を試験した。しかし、当業者はGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト（リガンドを含む）および/またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示された研究を容易に改変し得る。

## 【 1 1 8 6 】

（実施例39）

（Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の生物学的効果）

（星状細胞および神経アッセイ）

10

上記のように、*Escherichia coli*で発現され、そして精製された組換えGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を、皮質ニューロン細胞の生存、神経突起成長または表現型分化を促進する活性について、およびグリア線維性酸性タンパク質免疫陽性細胞、星状細胞の増殖の誘導について試験し得る。バイオアッセイのための皮質細胞の選択は、皮質構造中のFGF-1およびFGF-2の広く行き渡っている発現、ならびにFGF-2処理から生じる皮質ニューロン生存の以前に報告された増強に基づく。チミジン取り込みアッセイを用いて、例えば、これらの細胞へのGタンパク質ケモカインレセプターの活性を解明し得る。

## 【 1 1 8 7 】

さらに、インビトロにおける皮質ニューロンまたは海馬ニューロンへのFGF-2（塩基性FGF）の生物学的効果を記載する以前のレポートは、ニューロン生存および神経突起成長の両方における増大を実証している（Walicke, Pら、「Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension」*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3012~3016 (1986)、本明細書中のアッセイはその全体が参考として援用される）。しかし、PC-12細胞で実行される実験からの報告は、これらの2つの応答が必ずしも同義でないこと、そしてどのFGFを試験しているかだけでなく、どのレセプターが標的細胞で発現されているかにも依存し得ることを示唆する。神経突起成長を誘導するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の能力を、一次の皮質ニューロン培養パラダイムを用いて、例えば、チミジン取り込みアッセイを用いてFGF-2で得られた応答と比較し得る。

20

30

## 【 1 1 8 8 】

（線維芽細胞および内皮細胞アッセイ）

ヒト肺線維芽細胞をClonetics (San Diego, CA)から入手し、そしてCloneticsからの増殖培地で維持する。真皮性微小血管内皮細胞をCell Applications (San Diego, CA)から得る。増殖アッセイについては、ヒト肺線維芽細胞および真皮性微小血管内皮細胞を、96ウェルプレートの増殖培地中で1日間、5,000細胞/ウェルで培養し得る。次いでこの細胞を0.1%BSA基礎培地中で1日間インキュベートする。新鮮な0.1%BSA培地で培地を置換した後、細胞を試験タンパク質と3日間インキュベートする。Alamar Blue (Alamar Biosciences, Sacramento, CA)を10%の最終濃度になるように各ウェルに添加する。この細胞を4時間インキュベートする。細胞生存度をCyttoFluor蛍光リーダーでの読取りにより測定する。PGE<sub>2</sub>アッセイについては、ヒト肺線維芽細胞を、96ウェルプレート中で1日間、5,000細胞/ウェルで培養する。0.1%BSA基礎培地に培地を変換した後、細胞をIL-1とともに、またはそれをとみなわずに、FGF-2またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）と24時間インキュベートする。上清を収集し、そしてEIAキット (Cayman, Ann Arbor, MI)によりPGE<sub>2</sub>についてアッセイする。IL-6アッセイについては、ヒト肺線維芽細胞を、96ウェルプレート中で1日間、5,000細胞/ウェル

40

50

で培養する。0.1% BSA 基礎培地に培地を変換した後、細胞を IL-1 とともに、またはそれをとまわずに、FGF-2 または G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) と 24 時間インキュベートする。上清を収集し、そして ELISA キット (Endogen, Cambridge, MA) により IL-6 についてアッセイする。

【1189】

ヒト肺線維芽細胞を FGF-2 または G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) とともに基礎培地中で 3 日間培養し、その後、線維芽細胞の増殖への効果を評価するため Alamar Blue を添加する。FGF-2 は、G タンパク質ケモカインレセプターでの刺激に匹敵して用いられ得る 10 ~ 2500 ng/ml の刺激を示すはずである。

【1190】

(パーキンソンモデル)

パーキンソン病における運動機能の喪失は、黒質線条体のドーパミン作動性投射ニューロンの変性から生じる線条体ドーパミンの欠乏に起因する。広範に特徴付けされたパーキンソン病の動物モデルは、1-メチル-4フェニル1,2,3,6-テトラヒドロピリジン (MPTP) の全身投与を含む。CNS において、MPTP は、星状細胞に取り込まれ、そしてモノアミンオキシダーゼ B により 1-メチル-4-フェニルピリジン (MPP<sup>+</sup>) に異化され、そして放出される。引き続き、MPP<sup>+</sup> は、ドーパミンの高親和性再取り込みトランスポーターによりドーパミン作動性ニューロンに能動的に蓄積する。次いで、MPP<sup>+</sup> は、電気化学勾配によりミトコンドリア中で濃縮され、そしてニコチンアミド (nicotidamide) アデニンリニン酸：ユビキノ酸化還元酵素 (oxidoreductonase) (複合体 I) を選択的に阻害し、これにより電子伝達を妨害し、そして最終的に酸素ラジカルを生成する。

【1191】

FGF-2 (塩基性 FGF) が黒質のドーパミン作動性ニューロンへの栄養活性を有することが組織培養パラダイムにおいて実証されている (Ferrariら、Dev. Biol. 1989)。近年、Unsicker 博士のグループは、線条体のゲルフォームインプラントでの FGF-2 投与が MPTP 曝露と関連する毒性からの黒質のドーパミン作動性ニューロンのほぼ完全な防御を生じることを実証している (Otto および Unsicker, J. Neurosci., 1990)。

【1192】

FGF-2 を用いたデータに基づいて、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) は、インビトロにおけるドーパミン作動性ニューロン生存を増強する際において、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) が FGF-2 の作用と類似の作用を有するかどうかを決定するために評価され得、そして、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) はまた、線条体におけるドーパミン作動性ニューロンの、MPTP 処理と関連する損傷からの防御についてインビボで試験され得る。G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の潜在的効果を、まずドーパミン性ニューロン細胞培養パラダイムにおいてインビトロで試験する。妊娠 14 日の Wistar ラット胚由来の中脳底板を解剖することにより、培養物を調製する。この組織をトリプシンで解離し、そしてポリオルチニン-ラミニンでコートしたカバーガラスに 200,000 細胞/cm<sup>2</sup> の密度で播く。この細胞を、ホルモン補充物 (N1) を含有するダルベッコ改良イーグル培地および F12 培地中で維持する。インビトロで 8 日後培養物をパラホルムアルデヒドで固定し、そしてチロシンヒドロキシラーゼ (ドーパミン作動性ニューロンについての特異的マーカー) での免疫組織化学染色のために処理する。解離した細胞培養物を胚性ラットから調製する。培養培地を 3 日ごとに交換し、そしてこの因子もまたその時点に添加する。

【1193】

ドーパミン作動性ニューロンを妊娠 14 日目 (ドーパミン作動性前駆細胞が増殖する段階を過ぎた発生時間) で動物から単離するので、チロシンヒドロキシラーゼ免疫陽性ニューロンの数の増加は、インビトロで生存しているドーパミン作動性ニューロンの数の増加を示す。従って、もし G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) がドーパミン作動

10

20

30

40

50

性の生存を延長するように作用するならば、このことは、このGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）がパーキンソン病に關与し得ることを示唆する。

【1194】

本実施例において記載される研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質の活性を試験する。しかし、当業者は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト（リガンドを含む）および/またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【1195】

（実施例40）

（血管内皮細胞の増殖に対するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の効果）

1日目に、ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）を、4%ウシ胎仔血清（FBS）、16ユニット/mlヘパリン、および50ユニット/ml内皮細胞増殖補充物（ECGS、Biotec h n i q u e , I n c .）を含有するM199培地中で、35mmシャーレあたり2~5x10<sup>4</sup>細胞の密度で播種する。2日目、この培地を、10%FBS、8ユニット/mlヘパリンを含有するM199で置換する。配列番号2または配列番号22のGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質および陽性コントロール（例えば、VEGFおよび塩基性FGF（bFGF））を種々の濃度で添加する。4日目および6日目に、培地を交換する。8日目、Coulter Counterを用いて細胞数を決定する。

【1196】

HUVEC細胞数の増加は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）が血管内皮細胞を増殖し得ることを示す。

【1197】

本実施例において記載される研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質の活性を試験した。しかし、当業者は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト（リガンドを含む）および/またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【1198】

（実施例41）

（血管内皮細胞の増殖に対するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の刺激効果）

増殖因子の分裂促進活性の評価のために、電子共役試薬PMS（フェナジンメトサルフェート）を用いる、比色分析MTS（3-（4,5-ジメチルチアゾール-2-イル）-5-（3-カルボキシメトキシフェニル）-2-（4-スルフォフェニル）2H-テトラゾリウム）アッセイを実行した（Cell Titer 96 AQ, Promega）。細胞を0.1mlの血清補充培地中で96ウェルプレートに播種し（5,000細胞/ウェル）、そして一晩付着させる。0.5%FBS中、12時間の血清飢餓後、Heparin（8U/ml）を伴うかまたは伴わない、条件（0.5%FBS中のbFGF、VEGF<sub>165</sub>またはGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5））をウェルに48時間添加する。20mgのMTS/PMS混合物（1:0.05）を1ウェルあたりに添加し、そして37で1時間インキュベートさせ、その後ELISAプレートリーダーで490nmの吸光度を測定する。コントロールウェル（培地あり、細胞なし）のバックグラウンドの吸光度を差し引きし、そしてそれぞれの条件について7つのウェルを並行して実施する。Leakら、In Vitro Cell Dev Biol 30A:512~518（1994）を参照のこと。

【1199】

本実施例において記載される研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）

10

20

30

40

50

タンパク質の活性を試験した。しかし、当業者は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト（リガンドを含む）および/またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【1200】

（実施例42）

（内皮遊走の刺激）

本実施例は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）がリンパ性の内皮細胞遊走を刺激し得る可能性を探索するために用いられる。

【1201】

内皮細胞遊走アッセイは、48ウェルの微小走化性チャンバを用いて実行される（Neuroprobe Inc., Cabin John, MD; Falk, Wら、J. Immunological Methods 1980; 33: 239~247）。ポリビニルピロリドンを含まないポリカーボネートフィルター（これは8μmの孔径を備える）（Nucleopore Corp. Cambridge, MA）を室温で少なくとも6時間0.1%ゼラチンでコートし、そして滅菌空気のもとで乾燥する。0.25%ウシ血清アルブミン（BSA）を補充したM199中で試験物質を適切な濃度に希釈し、そして25μlの最終希釈を改変Boyden装置の底部チャンバに置く。コンフルエント未満の、早期継代（2~6）のHVECまたはBMEC培養物を洗浄し、そして細胞の脱離に必要な最小の時間トリプシン処理する。底部チャンバと上部チャンバとの間のフィルターを配置した後、1%FBSを含有する50μl M199中に懸濁した $2.5 \times 10^5$ 細胞を上部コンパートメントに播種する。次いでこの装置を、5%CO<sub>2</sub>を用いて湿潤にしたチャンバ中で37℃で5時間インキュベートして細胞を遊走させた。インキュベーション期間後、このフィルターを取り出し、そして非遊走細胞を有するフィルターの上部側をゴム性のポリスマン（police man）でかきとる。このフィルターをメタノールで固定し、そしてGiemsa溶液で染色する（Diff-Quick, Baxter, McGraw Park, IL）。遊走は、それぞれのウェルにおいて、3つの無作為の高出力視野（40x）の細胞を計数することにより定量する。そしてすべての群を4連で実行する。

【1202】

本実施例において記載される研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質の活性を試験した。しかし、当業者は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト（リガンドを含む）および/またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【1203】

（実施例43）

（新脈管形成における索形成に対するGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の効果）

新脈管形成における別の工程は、内皮細胞の分化により特徴付けられる索（cord）形成である。このバイオアッセイは、インビトロで培養した場合の微小血管内皮細胞の毛細管様構造（中空構造）を形成する能力を測定する。

【1204】

CADMEC（微小血管内皮細胞）を、増殖細胞（2継代）としてCell Applications Inc.から購入し、Cell Applications' CADMEC Growth Medium中で培養し、そして5継代で使用する。インビトロ新脈管形成アッセイのために、48ウェル細胞培養プレートのウェルをCell Applications' Attachment Factor Medium（200μl/ウェル）を用いて、37℃にて30分間コートする。CADMECを、7,500細胞/ウェルでコートしたウェルに播種し、Growth Medium中で一晩培養する。

10

20

30

40

50

次いで、この Growth Medium を、コントロール緩衝液または G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) (0.1 ~ 100 ng/ml) を含む 300 µg の Cell Applications' Chord Formation Medium と交換し、そしてこの細胞をさらに 48 時間培養する。毛細管様索の数および長さを、Boeckeler VIA-170 ビデオ画像分析装置の使用を通じて定量する。全てのアッセイを三連で行った。

【1205】

市販の (R&D) VEGF (50 ng/ml) を、陽性コントロールとして用いる。b-エストラジオール (1 ng/ml) を、陰性コントロールとして用いる。適切な緩衝液 (タンパク質なし) もまた、コントロールとして利用する。

10

【1206】

本実施例において記載される研究は、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) タンパク質の活性を試験した。しかし、当業者は、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチド (例えば、遺伝子治療)、G タンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト (リガンドを含む) および / またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

【1207】

(実施例 44)

(ニワトリ漿尿膜に対する脈管形成効果)

ニワトリ漿尿膜 (CAM) は、新脈管形成を試験するために十分に確立した系である。CAM における血管形成は、容易に可視化および定量可能である。G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) またはそのリガンドの、CAM における新脈管形成を刺激する能力を試験し得る。

20

【1208】

White Leghorn ニワトリ (*Gallus gallus*) の受精卵および日本ウズラ (*quail*) (*Coturnix coturnix*) を、37.8 °C および湿度 80% でインキュベートする。16 日齢のニワトリの分化した CAM および 13 日齢のウズラの胚を以下の方法で研究する。

【1209】

発生の 4 日目に、ニワトリ卵の卵殻に窓を作る。この胚を正常な発生について調べ、そしてこの卵をセロテープ (登録商標) で封着する。これらを、さらに 13 日目までインキュベートする。Thermanox カバーガラス (Nunc, Naperville, IL) を、直径約 5 mm のディスクに切る。滅菌かつ無塩成長因子、および試験されるべきタンパク質を蒸留水に溶解し、そして約 3.3 mg/5 ml をディスクにピペットで移す。風乾後、逆さにしたディスクを CAM に適用する。3 日後、標本を 3% グルタルアルデヒドおよび 2% ホルムアルデヒド中に固定し、そして 0.12 M カコジル酸ナトリウム緩衝液ですすぐ。これらを実体顕微鏡 [Wild M8] を用いて写真撮影し、上記のように半薄層切片化および超薄層切片化のために包埋する。コントロールを、キャリアディスクのみで行う。

30

【1210】

本実施例において記載される研究は、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) タンパク質の活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチド (例えば、遺伝子治療)、G タンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト (リガンドを含む) および / またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

40

【1211】

(実施例 45)

(マウスにおける Matrigel 移植片を用いる新脈管形成アッセイ)

G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) のインビボ新脈管形成アッセイは、既存の毛細管網様構造の、マウス細胞外マトリックス物質 (Matrigel) の移植した

50

カプセル中に新しい脈管を形成する能力を測定する。このタンパク質を、4 で液体 Matrigel と混合し、次いでこの混合物を、マウスに皮下（ここで、この混合物は凝固する）注射する。7日後、Matrigel の固体「プラグ」を取り除き、そして新しい血管の存在について試験する。Matrigel を、Becton Dickinson Labware / Collaborative Biomedical Products から購入する。

#### 【1212】

4 で解凍した時、Matrigel 物質は液体である。この Matrigel を、4 にて 150 ng/ml で G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) と混合し、冷 3 ml シリンジ中に引き抜く。約 8 週齢の雌性 C57Bl/6 マウスに、腹部の中腹側面の 2 つの部位に Matrigel および実験タンパク質の混合物を注射する (0.5 ml / 部位)。7日後、このマウスを頸椎脱臼により屠殺し、Matrigel プラグを取り除きそして洗浄する（すなわち、全ての付着する膜および腺維組織を取り除く）。複製した全プラグを中性緩衝化 10% ホルムアルデヒド中に固定し、パラフィン中に包埋し、そして Masson の Trichrome で染色後、組織学的試験のために切片を作製するために使用する。各プラグの 3 つの異なる領域由来の断面をプロセスする。選択した切片を vWF の存在について染色する。このアッセイについての陽性コントロールは、ウシ塩基性 FGF (150 ng/ml) である。Matrigel 単独を用いて、新脈管形成の基礎レベルを決定する。

10

#### 【1213】

本実施例において記載される研究は、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) タンパク質タンパク質の活性を試験する。しかし、当業者は、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、G タンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト（リガンドを含む）および / またはアンタゴニストの活性を試験するために、例示する研究を容易に改変し得る。

20

#### 【1214】

（実施例 46）

（ウサギ下肢モデルにおける虚血の救出）

G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の虚血に対するインビボでの効果を研究するため、ウサギ後肢虚血モデルを、以前に記載される (Takeshita, Sら、Am J. Pathol 147: 1649 - 1660 (1995)) ように 1 つの大腿動脈の外科的除去により作製する。大腿動脈の切除は、血栓の逆行性伝播および外腸骨動脈の閉塞を生じる。結果として、虚血肢への血流は、内腸骨動脈から生じる側副血管に依存する (Takeshita, Sら、Am J. Pathol 147: 1649 - 1660 (1995))。10 日の間隔で、ウサギの手術後の回復および内因性の側副血管の発達を可能にする。手術後 10 日目 (0 日目) に、ベースライン血管造影を行った後、虚血肢の内腸骨動脈を、500 mg の裸の G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 発現プラスミドを用いて、(R.ら、Hum Gene Ther. 4: 749 - 758 (1993); Leclerc, Gら、J. Clin. Invest. 90: 936 - 944 (1992)) に記載されるように、ヒドロゲル被覆バルーンカテーテルを用いる動脈遺伝子移入技術により、トランスフェクトする。G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) を処置に用いる場合、500 mg の G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) タンパク質またはコントロールの単回ボラスを、注入カテーテルを通じて 1 分間にわたり、虚血肢の内腸骨動脈中に送達する。30 日目に、種々のパラメーターを、これらのウサギで測定する：(a) BP 比 - 虚血肢の収縮期血圧 対 正常肢の収縮期血圧の比；(b) 血流および逆流 - 停止 FL：非拡張状態の間の血流、および最大 FL：完全拡張状態の間の血流（また、血管量の間接的測定）、そして逆流は、最大 FL：停止 FL の比に反映される；(c) 血管造影値 (angiographic score) - これを側副血管の血管造影により測定する。値を、かぶせたグリッド内の円の百分率（ウサギ大腿の総数 m で割った横断不透明化動脈を用いる）により決定する；(d) 毛細管 (cap

30

40

50

illary) 密度 - 後肢から得た光学顕微鏡用切片において決定した側副毛細血管の数。

【1215】

本実施例において記載される研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質の活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド(例えば、遺伝子治療)、Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト(リガンドを含む)および/またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【1216】

(実施例47)

(末梢動脈疾患モデル)

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を用いる新脈管形成治療は、末梢動脈疾患の場合、虚血周囲の血流の回復を得る新規の治療的ストラテジーである。実験プロトコルは以下を含む：

a) 一方の側の大腿動脈を、後肢の虚血筋肉を作製するために結紮し、他方の側の後肢は、コントロールの役割をする。

【1217】

b) Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質を、20mg~500mgの投薬量範囲で、一週間あたり静脈内および/または筋肉内に3回(おそらくそれより多く)で2~3週間、送達する。

【1218】

c) この虚血筋肉組織を、大腿動脈の結紮後、1、2、および3週間目に、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の発現の分析ならびに組織学のために収集する。生検もまた、他方の側の対側後肢の正常な筋肉において行う。

【1219】

本実施例において記載される研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質の活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変してGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド(例えば、遺伝子治療)、Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト(リガンドを含む)および/またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【1220】

(実施例48)

(虚血性心筋疾患モデル)

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を、側副血管の発達を刺激し得、かつ冠状動脈閉塞後の新しい血管を再構成し得る強力なミトジェンとして評価する。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の発現の変化を、インサイチュで調査する。実験プロトコルは、以下を含む：

a) 心臓を、ラットの左側開胸術を介して露出する。直ちに、左冠状動脈を、細い縫合糸(6-0)を用いて咬合し、そして胸郭を閉じる。

【1221】

b) Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質を、20mg~500mgの投薬範囲で、一週間あたり静脈内および/または筋肉内に3回(おそらくそれより多く)で2~4週間、送達する。

【1222】

c) 手術の30日後、この心臓を、形態測定のために取り出しそして横断切片化し、そしてインサイチュで分析する。

【1223】

本実施例において記載される研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質の活性を試験した。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)ポリヌクレオチド(例えば、遺伝子治療)、

10

20

30

40

50

Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト（リガンドを含む）および／またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

【1224】

（実施例49）

（TNF 誘導性接着分子発現のGタンパク質ケモカインレセプターによる抑制）

炎症および新脈管形成の領域に対するリンパ球の漸増は、リンパ球上の細胞表面接着分子（CAM）と血管内皮との間の特異的なレセプター-リガンド相互作用に関する。この接着プロセスは、通常の設定および病理学的設定の両方において、細胞間接着分子-1（ICAM-1）、血管細胞接着分子-1（VCAM-1）、および内皮細胞（EC）における内皮白血球接着分子-1（E-セレクチン）発現を含む、多段階カスケードに続く。これらの分子および他の分子の血管内皮における発現は、白血球が局所血管系に接着し得、そして炎症応答の発生の間に局所組織に溢出し得る効率を決定する。サイトカインおよび増殖因子の局所濃度は、これらのCAMの発現の調節に關与する。

10

【1225】

腫瘍壊死因子（TNF- $\alpha$ ）（強力な前炎症性サイトカイン）は、内皮細胞における3つ全てのCAMの刺激因子であり、そして広範な種々の炎症応答に關与し得、しばしば病理学的結果をもたらす。

【1226】

TNF- $\alpha$  誘導性CAM発現の抑制を媒介するGタンパク質ケモカインレセプター（CR5）の潜在能力を試験し得る。改変型ELISAアッセイ（これは、固相吸着剤としてECを使用する）を使用して、FGFファミリーのタンパク質のメンバーを用いて同時刺激した場合に、TNF- $\alpha$  処理ECにおけるCAM発現の量を測定する。

20

【1227】

この実験を行うために、ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）培養物を、プールした索採取物から得、そして10% FCSおよび1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充した増殖培地（EGM-2; Clonetics, San Diego, CA）中で、5% CO<sub>2</sub>を含む37°Cの加湿インキュベーターにおいて維持する。HUVECを、EGM培地中 $1 \times 10^4$ 細胞/ウェルの濃度で、96ウェルプレート中に、37°Cで18~24時間またはコンフルエントになるまで播種する。続いて、単層を、100 U/mlペニシリンおよび100 mg/mlストレプトマイシンを補充したRPMI-1640の無血清溶液で3回洗浄し、そして所定のサイトカインおよび／または増殖因子を用いて、24時間37°Cにて処理する。インキュベーション後、次いで、この細胞を、CAM発現について評価する。

30

【1228】

ヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）を、標準的な96ウェルプレートにおいてコンフルエントになるまで増殖させる。増殖培地を、細胞から取り除き、そして90  $\mu$ lの199培地（10% FBS）に置き換える。試験のためのサンプルおよびポジティブまたは陰性コントロールを、このプレートに三連で添加する（10  $\mu$ l容量）。プレートを、37°Cにて、5時間（セレクチンおよびインテグリン発現）または24時間（インテグリン発現のみ）のいずれかでインキュベートする。プレートを吸引して、培地を除去し、そして100  $\mu$ lの0.1%パラホルムアルデヒド-PBS（Ca<sup>++</sup>およびMg<sup>++</sup>を有する）を各ウェルに添加する。プレートを、4°Cにて30分間保持する。

40

【1229】

次いで、固定液をウェルから除去し、そしてウェルをPBS（+Ca、Mg）+0.5% BSAを用いて1回洗浄し、そして排水する。このウェルを乾燥させないこと。10  $\mu$ lの希釈した一次抗体を、試験ウェルおよびコントロールウェルに添加する。抗ICAM-1-Biotin、抗VCAM-1-Biotinおよび抗E-セレクチン-Biotinを、10  $\mu$ g/mlの濃度（0.1 mg/mlストック抗体の1:10希釈）で使用する。細胞を、加湿した環境において、37°Cにて30分間インキュベートする。ウェルを、PBS（+Ca、Mg）+0.5% BSAを用いて3回洗浄する。

50

## 【1230】

次いで、20  $\mu$ lの希釈したExtravidin-Alkaline Phosphotase (1:5, 000希釈)を各ウェルに添加し、そして37 にて30分間インキュベートする。ウェルを、PBS (+Ca, Mg) + 0.5% BSAを用いて3回洗浄する。1錠のp-ニトロフェノールホスフェート (pNPP)を、5mlのグリシン緩衝液 (pH 10.4)に溶解させる。グリシン緩衝液中のpNPP基質100  $\mu$ lを、各試験ウェルに添加する。三連の標準ウェルを、グリシン緩衝液中のExtravidin-Alkaline Phosphotaseの操作希釈 (working dilution) (1:5, 000 ( $10^0$ ) >  $10^{-0.5}$  >  $10^{-1}$  >  $10^{-1.5}$ )から調製する。5  $\mu$ lの各希釈物を、三連のウェルに添加し、そして各ウェル中の得られたAP含量は、5.50 ng、1.74 ng、0.55 ng、0.18 ngである。次いで、100  $\mu$ lのpNPP試薬を、標準ウェルの各々に添加しなければならない。このプレートを、37 にて4時間インキュベートしなければならない。3M NaOHの50  $\mu$ lの容量を全てのウェルに添加する。この結果を、プレートリーダーにおいて405 nmにて定量する。バックグラウンド減算オプションを、グリシン緩衝液のみで満たした空白ウェルにおいて使用する。このテンプレートを、各々の標準ウェルにおけるAP結合体の濃度を示すように設定する [5.50 ng; 1.74 ng; 0.55 ng; 0.18 ng]。結果を、各サンプル中の結合したAP結合体の量として示す。

10

## 【1231】

本実施例において記載される研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) タンパク質タンパク質活性を試験する。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) ポリヌクレオチド (例えば、遺伝子治療)、Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト (リガンドを含む) および/またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

20

## 【1232】

(実施例50)

(膜貫通フラグメントを使用してGタンパク質共役レセプター活性を阻害する方法)

WO94/05695および米国特許第5,508,384号は、74個のGPCRについての膜貫通領域の配列を示す。WO94/05695特許出願は、GPCRリガンドを結合し得るかまたはリガンド結合を調節し得る、GPCRのフラグメントまたは相同配列に対応するポリペプチドを記載しそして特許請求する。両方の文献は、ドーパミンD2レセプターの第3のTMドメインの膜にわたるフラグメントが、簡単な、小さい単層の小胞モデルにおいて、インタクトなレセプターのリガンドを特異的に結合したことを開示する。この使用したフラグメントは、一端にてリジン (これは、生理学的pHでは正に荷電する) で終結し、そして他端にてアスパラギン酸 (これは、生理学的pHでは負に荷電する) で終結する。このペプチドは、生物学的な膜へ容易に挿入することは予測されない。

30

## 【1233】

対照的に、本実施例は、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の生物学的活性を調節 (特に、阻害) することに関し、これは、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) を、正確なレセプター会合を干渉する分子に曝露することによる。特に、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の膜貫通ドメインの合成、単離および/または組換えのペプチド、フラグメントおよび/またはコンセンサスペプチドは、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 媒介シグナル伝達を阻害する。荷電残基を、一方の末端に付加し、膜におけるこのペプチドの正しい配向を促し得る。特に、このフラグメントの細胞外末端での2つの負に荷電した残基 (例えば、Asp) の付加は、アンタゴニスト活性を増強する。

40

## 【1234】

膜貫通ドメインのフラグメントを、Fmocアミノ酸誘導体を利用する、432A Applied Biosystems Peptide Synthesizer上でのフロースルー固相ペプチド合成によって合成し得る。ペプチドの合成中に生じ得るそして伸

50

長中のペプチド鎖のブロックを導き得る、凝集を克服するために、Ala、ValおよびLeuのFmocHmb誘導体を導入する。細胞膜内への透過中のペプチドの適切な配向を保証するため、および疎水性ペプチドの溶解度を改善するために、荷電残基を、ペプチド末端に付加する。ペプチドの純度は、逆相HPLCで評価し、そして構造は、マトリクス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析法(Tarasovaら、Ad. Exp. Med. Biol., Plenum Press, NY, 201-206頁(1998))によって確認する。

#### 【1235】

これらのフラグメントのアンタゴニスト効果を、Gタンパク質ケモカインレセプターを安定に発現するヒト腎臓癌(HEK)細胞に対して試験する。RANTESを、アゴニストとして使用する。Nuncカバーガラスチャンバースライド上で増殖させた細胞を、1  $\mu$ M Fura-2/AMと共に、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で20分間インキュベートし、PBSでリンスし、そしてZeiss Axiovert倒立顕微鏡のステージにマウントする。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>測定を、Attofluorデジタル画像化システム(Atto Instruments)を使用して行う。傾向を、505カットオフフィルターを使用する増感CCDカメラによってモニターする。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の較正を、1  $\mu$ M Furaを含むCa<sup>2+</sup>標準を使用して行う。これらのフラグメントのアンタゴニスト活性を、WO99/43711の実施例1~4に記載のように、さらに最適化する。

10

#### 【1236】

これらのフラグメントのアンタゴニスト活性をまた、当該分野で周知の方法およびWO99/43711においてCXCR4について記載したような方法により、Gタンパク質ケモカインレセプター-HIV細胞融合を阻害する能力およびGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)の標識リガンドの結合を阻害する能力によって試験する。

20

#### 【1237】

(実施例51)

(Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を発現するヘルペスウイルス不死化T細胞)

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)を発現するヘルペスウイルス不死化T細胞の構築は、Vellaら、J. Virol. Methods 79:51-63(1999)に記載されている。この細胞株または類似の細胞株が、本明細書中に開示される方法においてアゴニストおよびアンタゴニストをアッセイするために有用である。

30

#### 【1238】

(実施例52)

(CCR5リガンドおよび抗CCR5抗体の単離)

リガンドおよび抗体スクリーニングアッセイにおいて使用され得る、CCR5をそのネイティブ状態で可溶化するための一般的な方法は、Mirzabekovら、J. Biol. Chem. 274:28745-50(1999)に開示される。ヒト抗体のファージディスプレイライブラリーからCCR5抗体を選択する方法は、Osbourneら、Nat. Biotechnol. 16:778-81(1998)に開示される。Leeらは、CCR5特異的抗体2D7によって認識されるエピトープが、HIVの侵入を阻害するための抗体についての好ましい標的であることを開示する。Leeら、J. Biol. Chem. 274:9617-26(1999)。

40

#### 【1239】

本発明の抗体がHIVの細胞内への侵入(およびこれによる細胞内での複製)を無効にする能力について試験するためのさらなるアッセイは、Petrooulosら、Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44:920-8(2000)(これは、その全体が本明細書により参考として援用される)に記載される。Petrooulosらにおいて記載されるアッセイの条件を変更して、本発明の抗体を試験し得る。簡潔に述べると、患者由来のHIV株サンプル、HIVのenv遺伝子の位置にルシフェラーゼレポーター遺伝子を含むように操作した、樹立したHI

50

V株を使用し得る。特に、本発明の抗体の活性を無効化することを試験するため、CCR5指向性HIV株（例えば、BALおよびJRF L）を使用することが、有用である。さらに、標的細胞としてヒト胚性腎臓293細胞を使用するよりもむしろ、CD4およびCCR5を発現するように操作したU87細胞株を使用し得る。

【1240】

リガンドおよび抗体をスクリーニングする他の方法は、当該分野で周知であり、そして本明細書中に記載される。

【1241】

（実施例53）

（抗体中和についてのアッセイ）

抗体によるHIV-1の中和を測定するための細胞株ベースのアッセイは、Trkolaら、J. Virol. 73: 8966-74 (1999)に開示される。HIV中和抗体についてのアッセイおよび任意の段階でのHIVの結合または侵入を阻害する分子についてのスクリーニングは、Boritzら、J. Virol. 73: 6937-45 (1999)に開示される。コレセプター阻害を分析するための方法は、Klasseら、J. Virol. 73: 7453-66 (1999)に開示される。HIVの侵入、融合、複製等の中和をアッセイするさらなる方法は、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。

【1242】

（実施例54）

（Xenomouse<sup>T M</sup>株を用いた抗Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）抗体の生成）

ヒトIgG2 / 抗体のレパートリーを発現するように操作されたXenomouse<sup>T M</sup>株のマウスを、Abgenix, Inc, (Fremont, CA)から入手した。マウスの群を以下のスケジュールに従って免疫した。

【1243】

（免疫スケジュール1（XF3融合）：）

最初に、100μgのDNAプラスミド発現ベクター（全長Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）遺伝子（CCR5 pcDNA3T）をコードする）を含有するPBSを用いて、Xenomouse<sup>T M</sup>マウス（n=5）の尾部の基部に注射した。その後2週間間隔で3回皮下投与した。このそれぞれの投与は、CCR5発現ベクター含有不完全フロイントアジュバントでトランスフェクトした1千万個のCHO細胞（この後、「CCR5 CHO細胞」とする）からなる。この動物を12週間休息させ、次いで2週間まで間隔をあけた2回以上の皮下注射を与えた。このそれぞれの投与は、CCR5発現ベクター含有不完全フロイントアジュバントでトランスフェクトした1千万個のNSO細胞（この後、「CCR5 NSO細胞」とする）からなる。最終注射の3日後、マウスを屠殺して、ハイブリドーマを生成する目的のため、脾臓および/またはリンパ節細胞を収集した。この融合から生成したハイブリドーマを、「XF3 . . . 」と呼ぶ（表4）。

【1244】

（免疫スケジュール2（XF6融合）：）

最初に、7百万のCCR5 CHO細胞を含有する完全フロイントアジュバントを、Xenomouse<sup>T M</sup>マウス（n=5）に腹腔内注射した。次いで2週間間隔をあけた腹腔内注射を与えた。このそれぞれの投与は、1千万個のCCR5 CHO細胞からなる。この動物を5週間休息させ、次いで2週間まで間隔をあけた2回以上の腹腔内注射を与えた。このそれぞれの投与は、1千万個のCCR5 CHO細胞を含有する完全フロイントアジュバントからなる。最終注射の3日後、マウスを屠殺して、ハイブリドーマを生成する目的のため、脾臓および/またはリンパ節細胞を収集した。この融合から生成したハイブリドーマを、「XF6 . . . 」と呼ぶ（表4）。

【1245】

（免疫スケジュール3（XF7融合）：）

10

20

30

40

50

最初に、7百万のCCR5 CHO細胞を含有する完全フロイントアジュバントを、Xenomouse<sup>T M</sup>マウス(n=5)の尾の基部に注射した。その後2週間間隔で尾の基部にさらに6回まで注射した。このそれぞれの投与は、1千万個のCCR5 CHO細胞からなる。この動物を5週間休息させ、次いで2週間まで間隔をあけて尾部の基部に2回以上の注射を与えた。このそれぞれの投与は、CCR5 NSO細胞含有不完全フロイントアジュバントからなる。最終注射の3日後、マウスを屠殺して、ハイブリドーマを生成する目的のため、脾臓および/またはリンパ節細胞を収集した。この融合から生成したハイブリドーマを、「XF7 . . . 」と呼ぶ(表4)。

## 【1246】

(免疫スケジュール4(XF11融合):)

2週間間隔で、Xenomouse<sup>T M</sup>マウス(n=5)の足蹠への注射によって免疫した。各免疫は、全部で1千万のCCR5 NSO細胞を含有するRIBIアジュバントからなる。全部で8回のこのような免疫を投与した。最終注射の3日後、マウスを屠殺して、ハイブリドーマを生成する目的のため、脾臓および/またはリンパ節細胞を収集した。この融合から生成したハイブリドーマを、「XF11 . . . 」と呼ぶ(表4)。

## 【1247】

(免疫スケジュール5(XF12融合):)

最初に、1千万のCCR5 NSO細胞を含有する完全フロイントアジュバントを、腹腔内経路および皮下経路を組み合わせて用いて、Xenomouse<sup>T M</sup>マウス(n=5)を免疫した。その後2週間間隔で6回までさらなる免疫を行い、この各免疫は、1千万のCCR5 CHO細胞を含有する不完全フロイントアジュバントからなり、これも腹腔内経路および皮下経路の組み合わせによって投与した。1匹の動物を不完全フロイントアジュバントでの3回のブースト免疫(追加免疫)の3日後に融合用に屠殺した。最終注射の3日後、残りのマウスを屠殺して、ハイブリドーマを生成する目的のため、脾臓および/またはリンパ節細胞を収集した。この融合から生成したハイブリドーマを、「XF12 . . . 」と呼ぶ(表4)。

## 【1248】

(免疫スケジュール6(XF27/28融合体):)

## 【1249】

## 【表5】

CCR5/XF27&28 FP 免疫スケジュール					
動物 20匹のマウス					
日	行動	抗原	量	容量	アジュバント
第1日	注入	CCR5 NSO細胞	FP 5x10 <sup>6</sup> 細胞/ms	50μl	1:1 PBS/RIBI
第14日	注入	CCR5 NSO細胞	FP 5x10 <sup>6</sup> 細胞/ms	50μl	1:1 PBS/RIBI
第28日	注入	CCR5 NSO細胞	FP 5x10 <sup>6</sup> 細胞/ms	50μl	1:1 PBS/RIBI
第38日	注入	CCR5 NSO細胞	FP 5x10 <sup>6</sup> 細胞/ms	50μl	PBS
第41日	融合				

ハイブリドーマを当該分野で通常公知のプロトコルに従って生成した。これらのハイブリドーマを生成するために用いた融合パートナーは、ATCC、バッチF11545から購入したP3X63-AG8.653であった。

## 【1250】

これらのハイブリドーマによって生成した抗体をELISAおよびFACSスクリーニングの両方によって、CCR5に結合する能力についてスクリーニングした。

## 【1251】

(抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)特異的抗体についてのメンブレンELISAスクリーニング)

原形質膜調製。CCR5 CHO細胞およびベクターコントロールトランスフェクトCHO細胞由来の原形質膜を調製した。要するに、10<sup>8</sup>~10<sup>9</sup>のCCR5 CHOまたはCHO細胞を40~50ミリリットルの冷12mM Tris pH7.5, 250m

10

20

30

40

50

Mスクロースに懸濁した。速度可変式電気モホジネーターを用いたホモジナイゼーションによって、細胞を氷上で溶解した。細胞溶解物を顕微鏡で確認した。細胞ホモジネート270×gで、4で10分間遠心分離した。上清（原形質膜含有）を収集して、ペレット（核画分を含有）を廃棄した。次に、この上清を8000×gで4で10分間で遠心分離した。再度、この上清（原形質膜含有）を回収して、ペレット（ミトコンドリアおよびリソソーム画分を含有）を廃棄した。次に、この原形質膜を、100,000×gで4で60分間の超遠心での遠心分離によって上清から沈殿（スピアウト）させた。この上清を廃棄した。ペレット化した原形質膜を約1mlのPBS中に再懸濁した。再懸濁後、PBSを追加して、原形質膜の容量を5~10mlに増やした。均一な溶液が得られるまで、膜溶液を氷上で保持し、そして超音波処理（氷上）した。超音波処理中に溶液が過熱しないように注意をはらった。Pierce Chemical Company（Rockford Illinois）から入手可能なBCAタンパク質決定キットを用いて原形質膜タンパク質濃度を決定した。原形質膜を使用まで-70で保管した。

10

## 【1252】

メンブレンELISA。Immulon4プレート（Dy nex）を50μリットルのCCR5 CHOまたはベクターコントロールでトランスフェクトしたCHOの原形質膜（膜溶液は、PBS中で20μg/mlの濃度であった）のいずれかを用いて、4で一晩コーティングした。翌朝、このプレートをPBSTで3回洗浄した（PBST=PBS（0.01% Tween 20含有））。次いで200μl/ウェルの3%BSA/PBSを用いて、このプレートを室温で1時間ブロックした。ブロック溶液をプレートから除き、そして50μl/ウェルのサンプル（ハイブリドーマ上清）またはコントロールをプレートに添加して、室温で2時間または4で一晩インキュベートした。CCR5 CHO膜およびベクターコントロールトランスフェクトCHO膜の両方に対する結合について、各サンプル/コントロールを試験した。これらのプレートにカバーをかけ、そして穏やかに振盪しながら室温で1時間インキュベートした。次にこのプレートをPBSTで3回洗浄した。洗浄後、50μl/ウェルの2次抗体（Vector Goat 抗ヒトIgG（H+L）を0.25μg/mlで、0.1% BSA/PBST+1% Goat Serumに含有）をウェルに添加して、室温で1時間インキュベートした。このプレートをインキュベートしながら、ABC試薬（Vector Laboratories）を調製した。次いでこのプレートをPBSTで3回洗浄した。次に、50μl/ウェルの希釈ABCをこのプレートに添加して、室温で30分間インキュベートした。次いでこのプレートをPBSTで6回洗浄した。100μl/ウェルのTMB試薬（Sigma Chemical Company, St. Louis, MO）をこのウェルに添加して、室温で10分間インキュベートした。次いで25μl/ウェルの2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して、この反応を停止させた。プレートを405nmで読み取った。

20

30

## 【1253】

結果。238のハイブリドーマが、CCR5 CHO細胞の膜に対する結合を示した。このおよそ1/2が、ベクターコントロールトランスフェクトCHO膜に比べてCCR5 CHO膜への結合の増大を示した。これらのハイブリドーマのうち217（表4）を増殖し、そしてメンブレンELISAを繰り返した。2次スクリーニングからの結果は、このスクリーニング手順が再現可能であることを実証した。

40

## 【1254】

【表 6】

表 4 : CCR5 CHO X-フレニに結合する抗体を分類する/4ブリード-マ

XF3 融合	XF6 融合	XF7 融合	XF11 融合	XF12 融合
XF3.10B8	XF6.LNG9	XF7.1A10	XF11.1 E2	XF12.10B2
XF3.10C4	XF6.4D11	XF7.2 E10	XF11.1 B6	XF12.11F5
XF3.10G4	XF6.LNC6	XF7.2A2	XF11.1A11	XF12.12B11
XF3.10H12	XF6.LNF6	XF7.2C4	XF11.1A2	XF12.13H6
XF3.11B5	XF6.LNC11	XF7.3A5	XF11.1A8	XF12.15B11
XF3.13D3	XF6.LND9	XF7.3H1	XF11.1B10	XF12.1B8
XF3.14 E12	XF6.LNF2	XF7.3H2	XF11.1B12	XF12.2E1
XF3.15C2		XF7.3H8	XF11.1B4	XF12.2E12
XF3.15F6		XF7.4 E8	XF11.1B7	XF12.2H5
XF3.2A3		XF7.4 E9	XF11.1B9	XF12.2H8
XF3.2E5		XF7.4A6	XF11.1C1	XF12.3E2
XF3.3H1		XF7.4B2	XF11.1C7	XF12.3A9
XF3.4B6		XF7.4G3	XF11.1D10	XF12.3C2
XF3.4C5		XF7.4G7	XF11.1D8	XF12.3G11
XF3.5F1		XF7.4H4	XF11.1F8	XF12.4A8
XF3.6A1		XF7.4H7	XF11.1G11	XF12.4G7
XF3.6A2		XF7.5A1	XF11.1G8	XF12.5B10
XF3.6H11		XF7.5B8	XF11.1H7	XF12.5B11
XF3.7C11		XF7.5B9	XF11.2 E4	XF12.5F1
XF3.8D5		XF7.5H8	XF11.2 E5	XF12.5H1
XF3.8G10		XF7.6B11	XF11.2B9	XF12.6B12
XF3.9G3		XF7.6B12	XF11.2C9	XF12.6H1
XF3.LNA2		XF7.6B3	XF11.2D1	XF12.6H7
XF3.LNB12		XF7.6D12	XF11.2D10	XF12.7F12
XF3.LNC10		XF7.6D3	XF11.2D11	XF12.LND11
XF3.LNC11		XF7.6D7	XF11.2D5	
XF3.LNC2		XF7.7A9	XF11.2D8	
XF3.LNC3		XF7.7B6	XF11.2F3	
XF3.LNC4		XF7.7C11	XF11.2F5	
XF3.LNC6		XF7.7C4	XF11.2F6	
XF3.LND9		XF7.7E8	XF11.2F7	
XF3.LNE7		XF7.7F8	XF11.2F8	
XF3.LNF1		XF7.7G4	XF11.2F9	
XF3.LNH5		XF7.LN1B1	XF11.2G11	
		XF7.LN1B7	XF11.2G4	
		XF7.LN1D10	XF11.2G6	
		XF7.LN1D11	XF11.2G8	
		XF7.LN1D9	XF11.2G9	
		XF7.LN1E10	XF11.2H10	
		XF7.LN1E11	XF11.2H2	
		XF7.LN1E12	XF11.2H4	
		XF7.LN2A11	XF11.2H8	
		XF7.LN2A7	XF11.3A3	
			XF11.3B10	
			XF11.3B9	
			XF11.3C3	
			XF11.3C6	
			XF11.3C7	
			XF11.3D1	
			XF11.3D12	

(続きあり)

10

20

30

(続き)

			XF11.3D2	
			XF11.3D3	
			XF11.3F4	
			XF11.3G12	
			XF11.3G2	
			XF11.3G3	
			XF11.3H7	
			XF11.4E11	
			XF11.4A1	
			XF11.4A5	
			XF11.4B10	
			XF11.4B12	
			XF11.4B3	
			XF11.4B4	
			XF11.4C10	
			XF11.4C12	
			XF11.4C4	
			XF11.4D10	
			XF11.4D12	
			XF11.4D3	
			XF11.4D4	
			XF11.4D5	
			XF11.4F11	
			XF11.5 E2	
			XF11.5A2	
			XF11.5C10	
			XF11.5D12	
			XF11.5F2	
			XF11.5F3	
			XF11.5G10	
			XF11.5G11	
			XF11.5G4	
			XF11.5G5	
			XF11.5G6	
			XF11.5H1	
			XF11.5H4	
			XF11.5H5	
			XF11.6E12	
			XF11.6E4	
			XF11.6E7	
			XF11.6A3	
			XF11.6A5	
			XF11.6B3	
			XF11.6B4	
			XF11.6B9	
			XF11.6C11	
			XF11.6C5	
			XF11.6D7	
			XF11.6D8	
			XF11.6D9	
			XF11.6F2	
			XF11.6F9	
			XF11.6G1	

10

20

30

(続き)

(続き)

			XF11.6G6	
			XF11.6H11	
			XF11.6H2	
			XF11.6H4	
			XF11.6H7	

40

(抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)特異的抗体のFACSスクリーニング)

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)でトランスフェクトしたCHO細胞またはベクターコントロールでトランスフェクトしたCHO細胞を回収し、FACS緩衝液

50

(0.1% NaN<sub>3</sub>および0.1% BSA含有PBS)で洗浄した。百万の細胞を含有する100 $\mu$ lを、FACSチューブ(Falco<sub>n</sub> 2052)に分配した。10 $\mu$ lのハイブリドーマ上清を各チューブに加え、そして4 で20分間インキュベートした。CCR5 CHOおよびベクターコントロールでトランスフェクトしたCHO細胞の両方に対する結合について、各上清を分析した。細胞を洗浄し、そして100 $\mu$ lのFACS緩衝液に再懸濁し、そして10 $\mu$ lのビオチン化ヤギ抗ヒトIgG(H+L)(Vecto<sub>r</sub>)を1 $\mu$ g/mlでこのチューブに添加し、そして4 で20分間インキュベートした。細胞を洗浄し、100 $\mu$ lのFACS緩衝液に再懸濁し、そして5 $\mu$ lのStreptavidin PE(DAKO)を加え、その後4 で10分間インキュベーションした。細胞を洗浄し、200 $\mu$ lのFACS緩衝液(0.5 $\mu$ g/mlのプロビジウムヨードを含有)に再懸濁し、そしてFACSscan(Becton Dickinson)上で分析した。

10

## 【1255】

結果。FACS分析によってスクリーニングされた217のハイブリドーマ上清のうち、ベクターコントロールトランスフェクトしたCHO細胞に比べてCCR5 CHOに対する有意に増大した結合を示すものとして、XF11.1D8、XF11.4D10、XF11.4C4、XF11.5H1、およびXF11.1G8を、同定した。

## 【1256】

さらなるハイブリドーマを作製し、それらの上清を、抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)特異的抗体についてスクリーニングした。これらの多くはまた、コントロールと比較して、CCR5に対する有意に増大した結合を有することを見出した。これらは本明細書中で、好ましい抗体として記載され、そして表2に列挙されている。

20

## 【1257】

(実施例55)

特定の抗体を発現する細胞株由来のVHドメインおよびVLドメインを同定およびクローニングするための1つの方法は、この抗体を発現する細胞株から作製されたcDNA上のVHおよびVL特異的プライマーを用いてPCRを実施することである。要するに、RNAを細胞株から単離し、そしてEBV細胞株によって発現された抗体のVHドメインおよびVLドメインを増幅するように設計されたRT-PCRのためのテンプレートとして用いた。細胞は、TRIzol(登録商標)試薬(Life Technologies, Rockville, MD)中で溶解し得、そしてクロロホルムの1/5容量で抽出し得る。クロロホルムの添加後、この溶液を室温で10分間インキュベートさせ、そして卓上型遠心分離機で14,000rpmで4-15分間、遠心分離する。この上清を回収し、そして等量のイソプロパノールを用いてRNAを沈殿させる。沈殿したRNAを卓上型遠心分離機で14,000rpmで4-15分間、遠心分離することによってペレット化する。遠心分離後、この上清を廃棄して、75%エタノールで洗浄する。洗浄後、RNAを800rpmで4-5分間、再度遠心分離する。この上清を破棄して、ペレットを風乾させる。RNAをDEPC水中に溶解して、10分間60 に加熱する。RNAの量は、光学密度測定によって決定できる。

30

## 【1258】

1.5~2.5 $\mu$ gのRNAから、逆転写酵素およびランダムヘキサマープライマーを用いて、当該分野で周知の方法によって、cDNAを合成し得る。次いで、VHドメインおよびVLドメインのPCR増幅のためのテンプレートとして、cDNAを用いる。VH遺伝子およびVL遺伝子を増幅するために用いたプライマーを表5に示す。代表的には、PCR反応物は、単一の5'プライマーおよび単一の3'プライマーの使用を行う。時に、利用可能なRNAテンプレートの量が制限される場合、またはより大きい有効性のために、5'プライマーおよび/または3'プライマーの群が用いられ得る。例えば、時に、5つの全てのVH-5'プライマーおよび全てのJH3'プライマーを単一のPCR反応に用いる。PCR反応は、50 $\mu$ l容積(1 $\times$ PCR緩衝液、2mMの各dNTP、0.7単位のHigh Fidelity Taq polymerase、5'プライマー

40

50

混合液、3'プライマー混合液、および7.5 μlのcDNAを含有)で実行する。VHおよびVLの両方の5'および3'プライマー混合液は、個々のプライマーの、それぞれ、22 pmolおよび28 pmolと一緒にプールすることによって作製できる。PCR条件は以下である：96℃、5分間；次に25サイクルの94℃1分、50℃1分および72℃1分；次に伸長サイクルの72℃10分。反応終了後、サンプルチューブを4℃で保管する。

【1259】

【表7】

表5：VHドメインおよびVLドメインを増幅するために用いたプライマー配列

プライマー名	配列番号	プライマー配列 (5'-3')
VHプライマー		
Hu VH1-5'	23	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
Hu VH2-5'	24	CAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG
Hu VH3-5'	25	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
Hu VH4-5'	26	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCCGG
Hu VH5-5'	27	GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC
Hu VH6-5'	28	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
Hu JH1,2-5'	29	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
Hu JH3-5'	30	TGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC
Hu JH4,5-5'	31	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTCCC
Hu JH6-5'	32	TGAGGAGACGGTGACCCTGGTCCC
VLプライマー		
Hu Vkappa1-5'	33	GACATCCAGATGACCCAGTCTCC
Hu Vkappa2a-5'	34	GATGTTGTGATGACTCAGTCTCC
Hu Vkappa2b-5'	35	GATATTGTGATGACTCAGTCTCC
Hu Vkappa3-5'	36	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCC
Hu Vkappa4-5'	37	GACATCGTGATGACCCAGTCTCC
Hu Vkappa5-5'	38	GAAACGACACTCACGCAGTCTCC
Hu Vkappa6-5'	39	GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCC
Hu Vlambdai-5'	40	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Hu Vlambda2-5'	41	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Hu Vlambda3-5'	42	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Hu Vlambda3b-5'	43	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Hu Vlambda4-5'	44	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Hu Vlambda5-5'	45	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Hu Vlambda6-5'	46	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA
Hu Jkappa1-3'	47	ACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCC
Hu Jkappa2-3'	48	ACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC
Hu Jkappa3-3'	49	ACGTTTGATATCCACTTTGGTCCC
Hu Jkappa4-3'	50	ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC
Hu Jkappa5-3'	51	ACGTTTAACTCCAGTCGTGTCCC
Hu Jlambda1-3'	52	CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCC
Hu Jlambda2-3'	53	CAGTCTGCCCTGACTCAGCCTGC
Hu Jlambda3-3'	54	TCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
Hu Jlambda3b-3'	55	TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCC
Hu Jlambda4-3'	56	CACGTTATACTGACTCAACCGCC
Hu Jlambda5-3'	57	CAGGCTGTGCTCACTCAGCCGTC
Hu Jlambda6-3'	58	AATTTTATGCTGACTCAGCCCCA

10

20

30

40

【1260】

【表 8】

表6:抗CCR5抗体の配列

細胞株 / 抗体	VH DNA 配列 番号	VH タンパク質 配列 番号	VH CDR1 のAA	VH CDR2 のAA	VH CDR3 のAA	VL DNA 配列 番号	VL タンパク質 配列 番号	VL CDR1 のAA	VL CDR2 のAA	VL CDR3 のAA	ATCC 受託番号	ATCC 寄託日
XF11.1D8	59	60	31-35	50-65	98-110	61	62	24-35	51-57	90-98	PTA-3030	2001年2月7日
XF22.3C9	63	64	31-35	50-68	102-115	65	66	24-34	50-56	89-97	PTA-3702	2001年9月12日
XF22.9E6	67	68	31-35	50-65	98-115	69	70	24-35	51-57	90-98	PTA-3859	2001年11月14日
NS0mAb36F11	71	72	26-35	50-66	99-114	73	74	24-34	50-56	89-97		
NS0mAb43E2	75	76	26-35	50-66	99-114	77	78	24-34	50-56	89-97	PTA-5860	2004年3月15日
NS0mAb36F11/ AK38181	71	72	26-35	50-66	99-114	79	80	24-34	50-56	89-97	PTA-5859	2004年3月15日
NS0mAb43E2/ AK38181	75	76	26-35	50-66	99-114	79	80	24-34	50-56	89-97	PTA-5861	2004年3月15日

10

20

30

40

次いでPCRサンプルを1.3%アガロースゲル上で電気泳動する。予期されるサイズのDNAバンド(VHドメインについて約506塩基対、そしてVLドメインについて344塩基対)が、ゲルから切り出され得、そして当該分野で周知の方法を用いて精製され

50

得る。精製したPCR産物は、PCRクローニングベクター（Invitrogen Inc., CarlsbadのTAベクター）中に連結され得る。個々のクローニングされたPCR産物は、E. coliのトランスフェクションおよびブルー/ホワイト色選択後に単離され得る。次いで、クローニングされたPCR産物は、当該分野で通常公知の方法を用いて配列決定され得る。抗CCR5抗体XF11.1D8、XF22.3C9.6、およびXF22.9E6のVHドメインおよびVLドメインのポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、添付の配列表に示す（表6を参照のこと）。

#### 【1261】

VHドメインおよびVLドメインを含有するPCRバンドはまた、全長Ig発現ベクターを作成するために用いられ得る。VHおよびVLドメインは、重鎖（例えば、ヒトIgG1またはヒトIgG4）または軽鎖（ヒト またはヒト ）の定常領域のヌクレオチド配列を含むベクター中にクローニングされ得、その結果完全な重鎖または軽鎖分子は、適切な宿主細胞中にトランスフェクトされた場合、これらのベクターから発現され得る。さらに、クローニングされた重鎖および軽鎖が両方とも、1つの細胞株（1ベクターまたは2ベクターのいずれか由来）中で発現される場合、両方の鎖は、細胞培養培地中に分泌される完全な機能的抗体分子にアセンブルされ得る。完全な抗体分子をコードする発現ベクターを生成するためにVHおよびVLの抗体ドメインをコードするポリヌクレオチドを用いる方法は、当該分野で周知である。

10

#### 【1262】

（実施例56）

20

（免疫蛍光アッセイ）

例えば、細胞上でのGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現を確認するため、または細胞の表面上で発現されるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に結合する1つ以上の抗体の存在についてチェックするため、以下の免疫蛍光プロトコルを用い得る。要するに、10 μg/mlのウシII型コラーゲン含有DPBS（カルシウムおよびマグネシウム含有（DPBS++））を用いて、Lab-Tek IIチャンバースライドを4 で一晚コーティングする。次いでこのスライドを冷DPBS++で2回洗浄し、そして8000 CHO-CCR5またはCHO pC4形質転換細胞を、総量125 μlに播種し、そして95%酸素/5%二酸化炭素の存在下で37 でインキュベートする。培養培地を穏やかに吸引して除き、そして接着している細胞を周囲温度でDPBS++で2回洗浄する。このスライドを0~4 で1時間、DPBS++（0.2%BSA（ブロッカー）含有）でブロックする。ブロッキング溶液を穏やかに吸引して除き、そして125 μlの抗体含有溶液（抗体含有溶液は、例えば、通常希釈せずに用いられるハイブリドーマ培養上清、または通常約1/100希釈されている血清/血漿であり得る）。このスライドを0~4 で1時間インキュベートする。次いで、抗体溶液を穏やかに吸引して除き、そして細胞を、400 μlの氷冷したブロッキング溶液で5回洗浄する。次に、125 μlの1 μg/mlのローダミン標識二次抗体（例えば、抗ヒトIgG）を含有するブロッカーを細胞に添加する。再度、細胞を0~4 で1時間インキュベートする。次いで、二次抗体溶液を穏やかに吸引して除き、そして細胞を400 μlの氷冷したブロッキング溶液で3回、および冷DPBS++で5回洗浄する。次いで、この細胞を125 μlの3.7%ホルムアルデヒド含有DPBS++を用いて環境温度で15分間固定する。この細胞を400 μlのDPBS++を用いて環境温度で5回洗浄する。最後に、この細胞を50%水性グリセロールに入れて、ローダミンフィルターを用いる蛍光顕微鏡で見

30

40

#### 【1263】

（実施例57）

（Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）に対する結合を検出するためのウエスタンブロット）

Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）は、膜埋没タンパク質である。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質でのウエスタンブロットを実施する

50

ため、まず細胞膜が可溶化されなければならない。以下のプロトコールをMirzabekovら、J. Biol. Chem. 274: 28745 (1999) (本明細書においてその全体が参考として援用される) によって実行した。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)-CHO細胞、またはpC4-CHO(ベクター形質転換コントロールCHO)細胞の単一細胞懸濁液を、ペレット化して、25mlあたり、100mM(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、20mM Tris-HCl(pH7.5)および1%(w/v)Cymal<sup>TM</sup>-5(Anatrace Inc., Maumee, OH)、およびプロテアーゼインヒビター混合物(Complete<sup>TM</sup>の1錠(Roche Molecular Biochemicals))からなる可溶化緩衝液に再懸濁する。ロッキングプラットフォーム上での4 での30分のインキュベーション後、このサンプルを30分間14,000×gで遠心分離し、細胞細片を除く。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)は、例えば、セファロースビーズに結合体化された、Wuら、J. Exp. Med. 186: 1373 (1997)に記載のモノクローナル抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体2D7を用いて、可溶化された膜から免疫沈降される。免疫沈降後、このビーズを可溶化緩衝液を用いて大々的に洗浄し、そして2×SDSサンプル緩衝液中に再懸濁する。サンプルを11% SDS-ポリアクリルアミドゲルを通した電気泳動の前に55 で1時間、SDSサンプル緩衝液中でインキュベートする。次いで、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)サンプル上のウエスタンブロットを当該分野で公知の標準的プロトコールに従って実行し得る。

10

20

30

40

50

## 【1264】

(実施例58)

(Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)のウエスタンブロット、免疫沈降、および精製)

上記実施例57に記載した膜可溶化プロトコールまたはMirzabekovらをまた用いて、ウエスタンブロット、免疫沈降、または精製用の、Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)含有サンプルを調製し得る。

## 【1265】

(実施例59)

(Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)結合ポリペプチドの親和性のBIAコア分析)

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)に対する抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体の結合は、例えば、BIAコア(BIAcore)分析で分析し得る。Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)(またはそれに対する抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体の親和性を知りたい他の抗原)または抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体は、N-エチル-N'-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド/N-ヒドロキシスクシンイミド化学を用いてアミン基を介してBIAコアセンサーチップ(CM5チップ)に共有結合され得る。種々の希釈の抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体またはGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)(またはそれに対する抗Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)抗体の親和性を知りたい他の抗原)は、それぞれ総量50μlについて15μl/分でフローセル中に誘導化されたCM5チップをこえて流される。結合したタンパク質の量は、HBS緩衝液(10mM HEPES、pH7.4、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.005%界面活性剤p20)を用いたフローセルの洗浄の間に決定される。目的のタンパク質に関する結合特異性を、目的のタンパク質の存在下での可溶性競合物との競合によって決定する。

## 【1266】

フローセル表面は、20μlの10mMグリシン-HCl(pH2.3)を用いた洗浄によって結合タンパク質を置換することによって再生され得る。動態分析のために、フローセルを、異なる流速および異なるポリペプチド密度(CM5チップ上)で試験する。オンレート(on-rate)およびオフレート(off-rate)は、BIAeval

uation 3ソフトウェアにおいて動態評価プログラムを用いて決定され得る。

【1267】

(実施例60)

(ウイルス中和アッセイ)

本発明の抗体は、この抗体が、細胞(CCR5発現細胞)に感染するためのHIV-1のbailityを阻害するかまたは減少する能力についてアッセイされ得る。このアッセイには、Zolla-PaznerおよびSharpe、AIDS Res. Hum. Retrovir. 11:1449(1995)(本明細書においてその全体が参考として援用される)に記載のアッセイのようなウイルス中和アッセイを用いる。要するに、 $2 \times 10^5$ の休止しているPBMCを、本発明の抗体の適切な希釈物に添加する。1時間インキュベーションした後、この細胞をウイルスに2時間、曝露し、PHAおよびIL-2を含有する培養培地中で洗浄および再懸濁する。感染後種々の時点で(例えば、7日目および9日目)に、培養上清中のHIV p24抗原の量を、ELISAを用いて測定する。中和パーセントをコントロール実験(ここでは、HIVは、本発明の抗体の非存在下でか、あるいは(またはさらに)関連のない特異性を有するコントロール抗体(必要な場合、同位体結合されている)の非存在下で、細胞に感染させられている)に対して算出する。

10

【1268】

このアッセイのバリエーションは、休息しているPBMCでなく、活性なPBMC上で、それを実施することである。これは、ウイルス中和アッセイを実施する前2日間、PHAおよびIL-2の存在下でPBMCを培養することによって達成され得る。

20

【1269】

(実施例61)

(MIP-1 結合アッセイ)

本発明の抗体は、この抗体がCCR5の天然のリガンド(例えば、MIP1-)をCCR5レセプターに対する結合から防ぐ能力についてアッセイされ得る。

【1270】

以下の $^{125}I$ -MIP1- 結合アッセイは、本発明の抗体が、CCR5の天然のリガンド(MIP1-)をCCR5レセプターに対する結合から防ぐ能力を決定するために実施され得るアッセイの1例である。

30

【1271】

$25 \mu$ キュリーの $^{125}I$ -MIP1- (Amersham Pharmacia Biotech, カタログ番号IM310、 $25 \mu$ キュリー、 $2000 Ci/mmole$ )を1mlの蒸留水に溶解して、 $12.5 nM$ の保存溶液を作成する。培養細胞(例えば、CCR5 CHO)の場合、これをこの実験で使い、それをトリプシン処理し、洗浄し、そして結合緩衝液( $1 mM CaCl_2$ 、 $5 mM MgCl_2$ 、 $50 mM Hepes$ 、 $0.5\% BSA$ 、 $0.1\% NaN_3$ 、 $pH 7.5$ )中で $10 \times 10^6$ 細胞/mlに再懸濁する。末梢血液単核球(PBMC)がこのアッセイで用いられるべき場合、それらを健常ドナーから単離し、そして結合緩衝液中で $2 \times 10^6$ 細胞/mlに再懸濁する。

40

【1272】

MIP-1 のどの程度の濃度または量がこのアッセイ中の細胞を飽和するかを決定するため、一連の $^{125}I$ -MIP1- 希釈を所望の最終濃度の4倍で行う。(例えば、 $3 nM$ の最終濃度には、 $12 nM$ の溶液が調製されなければならない)。代表的に、所望の最終濃度の $^{125}I$ -MIP1- は、 $3 nM \sim 0.05 nM$ にわたる。さらに、冷(コールド)(非放射性的)MIP-1 の所望の最終濃度の4倍の溶液をつくる。代表的に、所望の最終濃度の冷MIP-1 は $200 nM$ であり、そのため $800 nM$ 溶液を調製する。

【1273】

細胞に対する $^{125}I$ -MIP1- の総結合を測定するため、 $25 \mu l$ 結合緩衝液、 $25 \mu l$ のホット $^{125}I$ -MIP1- 、および $50 \mu l$ 細胞懸濁液を丸底96ウェル

50

マイクロプレート (Costa, カタログ番号 3799) に添加する。細胞は常に最後に最後に加える。 $^{125}\text{I}$ -MIP1- の結合が非特異的である場合、結合は、コールド MIP-1 によっては効果的に競合されない。従って、結合の特異性を評価するため、 $25\ \mu\text{l}$  のコールド MIP-1 ( $800\ \text{nM}$ )、 $25\ \mu\text{l}$  のホット  $^{125}\text{I}$ -MIP1- (種々の希釈)、および  $50\ \mu\text{l}$  細胞懸濁液を丸底 96 ウェルマイクロプレートに添加する。ここでも、細胞は常に最後に添加する。次いでこの混合物を振盪器 (シェーカー) 中で室温で 1 時間インキュベートする。インキュベーション後、各サンプルを、 $200\ \mu\text{l}$  の油状混合物 (2 : 1 ジブチルホスファレート : ジオクチルフタレート) を含有するチューブの上部に移す。このチューブを、微小遠心分離器を用いて 20 秒間  $12000\ \text{rpm}$  で回転する。細胞ペレットを含有するチューブの底を切り取り、そして線計数器でカウントする。MIP-1 の結合が特異的である場合、競合アッセイでは線計数器において低い放射性活性が測定される。MIP-1 が G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) に結合することを確認するためのコントロールとして、適切な CCR5 非発現細胞 (例えば、ベクター形質転換 CHO 細胞) で実験を実施することを選択し得る。

10

#### 【1274】

ケモカインまたは抗体が同じ G タンパク質共役レセプターへの結合について MIP-1 と競合し得るか否かを決定するための競合アッセイを実施するため、所望の最終濃度の 4 倍のコールドケモカインまたは抗体の階段希釈物を調製する。さらに、所望の最終濃度の 4 倍の  $^{125}\text{I}$ -MIP1- の溶液を調製する。このタイプの競合アッセイについて、 $^{125}\text{I}$ -MIP1- の  $2\ \text{nM}$  溶液 (最終濃度  $0.5\ \text{nM}$  となる) を調製する。

20

#### 【1275】

細胞に対する  $^{125}\text{I}$ -MIP1- の総結合を測定するため、 $25\ \mu\text{l}$  の結合緩衝液、 $25\ \mu\text{l}$  のホット  $^{125}\text{I}$ -MIP1- ( $2\ \text{nM}$ )、および  $50\ \mu\text{l}$  の細胞懸濁液を丸底 96 ウェルマイクロプレートに添加する。細胞は常に最後に最後に加える。別の基質 (例えば、抗 G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体、または別のケモカイン) が MIP-1 のレセプター (すなわち、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5)) を結合する場合、漸増量のコールド (非放射性) 物質 (例えば、抗 G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体、または別のケモカイン) の存在は、MIP-1 レセプター (すなわち、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5)) に対する結合について競合する。従って、物質が MIP-1 レセプター (すなわち、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5)) に結合し、そしてそのレセプター (すなわち、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5)) に対する結合から MIP-1 を阻害する (放射性標識) か否かを決定するため、 $25\ \mu\text{l}$  のコールド物質 (例えば、種々の希釈の抗 G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) 抗体)、 $25\ \mu\text{l}$  のホット  $^{125}\text{I}$ -MIP1- ( $2\ \text{nM}$ )、および  $50\ \mu\text{l}$  細胞懸濁液を丸底 96 ウェルマイクロプレートに添加する。ここでも、細胞は常に最後に添加する。次いでこの混合物を振盪器 (シェーカー) 中で室温で 1 時間インキュベートする。インキュベーション後、各サンプルを、 $200\ \mu\text{l}$  の油状混合物 (2 : 1 ジブチルホスファレート : ジオクチルフタレート) を含有するチューブの上部に移す。このチューブを、微小遠心分離器を用いて 20 秒間  $12000\ \text{rpm}$  で回転する。細胞ペレットを含有するチューブの底を切り取り、そして線計数器でカウントする。MIP-1 の結合が特異的である場合、競合アッセイでは、線計数器において低い放射性活性が測定される。MIP-1 が G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) に結合することを確認するためのコントロールとして、適切な CCR5 非発現細胞 (例えば、ベクター形質転換 CHO 細胞) で実験を実施することを選択し得る。

30

40

#### 【1276】

本発明の抗体が、CCR5 レセプターに対する結合から CCR5 の天然のリガンド (MIP1-) を妨げる能力を決定するための、別であるが同様のアッセイは、Lopalco ら、J. Immunol., 164 : 3426 (2000) および Trkola ら、Nature, 384 : 184 (1996) (本明細書においてその全体が参考として援

50

用される)に記載されている。要するに、 $10^6$ 個のCCR5発現細胞(例えば、CD4+T細胞、CCR5形質転換CHO細胞)を、本発明の抗体の適切な希釈とともに氷上でインキュベートする。インキュベーションの45分後、 $0.2\mu\text{Ci}$ の放射標識MIP1-(例えば、 $^{125}\text{I}$ -MIP1-(DuPont-NEN、Boston, MA))を $0.1\text{nM}$ の最終濃度に添加する。氷上での2時間のインキュベーション後、Grassieら、J Exp Med. 174:53(1991)(本明細書においてその全体が参考として援用される)に記載のような2段階勾配を用いて、未結合放射活性を取り除く。この2段階勾配では、下部の層は、10%スクロース含有ウシ胎仔血清からなり、そして上部の層は、80%シリコン(Sigma Aldrich)および20%鉱物油(Sigma Aldrich)からなる。細胞ペレット中の結合した放射活性を線

10

## 【1277】

(実施例62)

本発明のポリペプチド、およびアゴニストまたはアンタゴニストは、それがMIP1-に反応してGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞の走化性を増強するか、阻害するか、または有意に変化しない能力についてアッセイされ得る。タンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞は、同種集団の精製したGタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)発現細胞、または異種集団(例えば、末梢血単球、PBMC)であり得る。

20

## 【1278】

CCR5発現細胞のMIP1-誘導性走化性を測定するための以下のアッセイは、(蛍光)トレーサー分子で細胞を標識する工程、フィルター(これを通して細胞が通過し得る)を含む96ウェルプレートのウェル中に走化性を誘導する工程、および蛍光励起を介して遊走細胞の数を測定する工程、を包含する。このアッセイを実施するためには、以下の物質が必要である:

HBSS(カルシウムなし)(マグネシウムなし)(Biofluidsカタログ番号:p325-000)

Albumin, Bovine Powder, V画分, IgGフリー(Sigmaカタログ番号:A2058)

ChemoTx #105-2(T細胞、PBMC、NK細胞用)、108-1(好酸球、PMN用)(Neuro Probe, Inc)

Calcein, AM( $1\text{mg/ml}$ 含有ドライDMSO)(Molecular Probesカタログ番号:C-3099)

PBS、 $1\times$ 、pH7.4(カルシウムおよびマグネシウムなし)(Biofluidsカタログ番号:p312-00)。

30

## 【1279】

要するに、細胞(例えば、PBMC)をHBSS(Biofluidsカタログ番号:p325-000)/0.1%BSAで2回洗浄し、緩衝液中に $10\times 10^6$ 細胞/mlで再懸濁する。 $5\mu\text{l}$ のカルセイン(calcein)AM( $1\text{mg/ml}$ ストック)を1mlの細胞懸濁液に添加する。細胞をルーズキャップを備えた37インキュベーターで30分間インキュベートする。インキュベーション後、細胞をHBSS/0.1%BSAで2回洗浄し、そしてHBSS/0.1%BSA緩衝液中で $10\times 10^6$ /mlに再懸濁する。試験ケモカインまたはコントロール緩衝液の $29\mu\text{l}$ を、走化性マイクロプレートの底部チャンバに加える。フィルターを96ウェルプレート位置に留め付け、フィルターと溶液との間にエアバルブジェットがないようにする。次に $20\mu\text{l}$ の細胞をこのフィルターの上部にロードし、そしてこのプレートをカバーして蒸発を防ぐ。次いでこのプレートを、T細胞、PBMC、PMNおよびNK細胞については2時間、好酸球については3時間、37でインキュベートする。インキュベート後、PBS緩衝液を用いてこのフィルターの上部を注意深くフラッシュし、次いでスクイージー(ふき取り布)を用いてこのフィルターの上部から遊走していない細胞を穏やかにふき取る。Cyt o F l

40

50

uor 蛍光リーダーを用いて、485 nmの励起 / 530 nmの放射でこのプレートおよびフィルターを読み取る。結果を走化性指数で表す。これは、コントロール培地中の自発的な細胞遊走を上回る、走化性に応答する遊走細胞の数の増大倍数を示す。

【1280】

Gタンパク質ケモカインレセプター（例えば、抗Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）抗体）のアゴニストまたはアンタゴニストが、CCR5発現細胞において走化性を誘導するMIP-1の能力を増強するか、阻害するか、または有意に変更し得ないかをアッセイするために、このプロトコールは、容易に改変され得る。これを行うため、フィルターの上部での細胞のロードの前に、抗Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）抗体（可能性として、用量反応曲線を作成するためにはいくつかの濃度で）とともに細胞を事前インキュベートし得る。

10

【1281】

本発明のポリペプチド、およびそのアゴニストまたはアンタゴニストがMIP-1に  
 応答してGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）発現細胞の走化性を増強するか、  
 阻害するか、または有意に変更しない能力を測定するための別のアッセイは、96ウェル  
 マイクロプレートではなく、トランスウェルチャンバで実施し得る。このアッセイを実  
 施するには、以下の物質が必要である：

RPMI-1640 (GIBCO-BRLカタログ番号：21870-084)

Albumin, Bovine Powder, V画分, IgGフリー (Sigmaカ  
 タログ番号：A2058)

20

Transwell (トランスウェル) プレート (Costarカタログ番号：342  
 1)、直径6.5 mm、5.0 μm孔径

MIP-1 (R&D Systemsカタログ番号：271-BME)

リンパ球分離培地 (Lymphocyte Separation Medium) (I  
 CN Biochemicalカタログ番号：50494)

要するに、PBMCを、リンパ球分離培地 (Lymphocyte Separati  
 on Medium) を用いて新鮮ヒト末梢血から単離し、そして10% FBSを有する  
 RPMI-1640中で2日間培養する。培養したPBMCをRPMI-1640/0.  
 5% BSA中に $20 \times 10^6$ 細胞/mlで再懸濁する。MIP-1をRPMI-16  
 40/0.5% BSA中に希釈して、10、100および1000 ng/mlの最終濃  
 度にする。600 μlのMIP-1溶液またはRPMI-1640/0.5% BSA  
 単独をトランスウェルの底部チャンバに添加し、そして100 μlの細胞懸濁液をこのフ  
 イルターの上部に添加する。細胞を37で4時間インキュベートする。インキュベー  
 ション後、チャンバ底部に遊走する細胞を回収し、次いで例えば、遊走細胞集団の数およ  
 び型を決定するために、FACS分析を実施する。結果を走化性係数で表す。これは、コン  
 トロール培地中の自発的な細胞遊走を上回る、走化性に応答する遊走細胞の数の増大倍  
 数を示す。

30

【1282】

本発明の抗体が、CCR5の天然のリガンドであるMIP1-ベータを、MIP-1  
 発現細胞における走化性の誘導から防ぐ能力を決定するためのさらなるアッセイは、L  
 o p a l c o r a、J. Immunol. 164:3426 (2000)に記載されている。  
 要するに、本発明の抗体の存在下で、PBMCを（例えば、フィトヘムアグルチニンおよ  
 びIL-2を用いて）、3日間、活性化する。次いで、 $3 \times 10^5$ の活性化PBMCを  
 含有する50 μlの1640 RPMI (3%ヒト血清アルブミン含有)を、5 μmの孔径を  
 有するフィルターなし (bare filter) トランスウェル (CoStar) の上  
 部チャンバに入れる。1.5 μgのMIP1-を下部チャンバに入れる。トランスウェ  
 ルチャンバを37でインキュベートしながら、走化性を半時間生じさせた。次いで、上  
 部チャンバから下部チャンバへ遊走した細胞をFACS分析で定量した。結果は遊走係数  
 (すなわち、MIP1-を含有する下部チャンバに遊走する細胞の数 / コントロール培  
 地のみを含有する下部チャンバへ遊走する細胞の数) で示す。

40

50

## 【1283】

(実施例63)

(Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)タンパク質の誘引後のカルシウム移動(動員))

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)が誘引される場合、細胞内貯蔵からのカルシウムおよび細胞外間隙からのカルシウムが動員される。このカルシウム動員は、UV光で励起され得る、蛍光Ca<sup>++</sup>インジケータ(例えば、Molecular Probes, Eugene, OR(カタログ番号F-1221))から入手可能な、例えばFura-2、AMなどを用いてモニタリングされ得る。Fura-2 AMを用いてカルシウム動員をモニターするためのアッセイは以下に記載される。

10

## 【1284】

要するに、細胞(例えば、精製PBMCまたはCCR5トランスフェクト細胞(例えば、CCR5 CHO細胞))を、カルシウム緩衝液(20mM HEPES緩衝液、125mM NaCl、5mM KCl、0.5mMグルコース、1mM CaCl<sub>2</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.025% BSA、pH7.4)中に5×10<sup>6</sup>細胞/mlで懸濁する。Fura-2、AM(50μg/バイアル)を25μlのDMSOに溶解する。2mlの細胞懸濁液に1μlのFura-2 AMを添加することにより、細胞を色素で標識する。次いで、この細胞を暗野中で室温で30分間インキュベートする。インキュベーション後、細胞をカルシウム緩衝液で2回洗浄し、そしてカルシウム緩衝液中に、1×10<sup>6</sup>細胞/mlで懸濁する。2mlの細胞懸濁液を37℃の連続攪拌キュベットに入れる。日立(Hitachi)分光光度計で、340nmおよび380nmの二重の励起波長、ならびに510nmの単一放射波長を用いて、[Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub>濃度を測定する。ベースラインを60秒間で確立し、その後、試験ケモカイン、または抗Gタンパク質共役レセプター(CCR5)抗体を添加する。次いで、20μlの試験ケモカイン(最終濃度の100倍)を、キュベットに添加し、そして細胞内カルシウム濃度の変化を分光光度計でモニターする。このアッセイは、例えば、抗Gタンパク質共役レセプター(CCR5)抗体が作用薬(アゴニスト性)(カルシウム動員を誘導する)であるか、または拮抗薬(アンタゴニスト性)(カルシウム動員を誘導できない)である場合に用いられ得る。

20

## 【1285】

(実施例64:糖尿病マウスおよび糖質コルチコイド損傷創傷治癒モデル)

(糖尿病db+/db+マウスモデル)

Gタンパク質ケモカインレセプター(CCR5)が治癒プロセスを促進することを実証するために、創傷治癒の遺伝的糖尿病マウスモデルを、使用する。db+/db+マウスにおける全層(full thickness)創傷治癒モデルは、損傷創傷治癒の十分に特徴付けられた、臨床的に関連性のある、そして再現可能なモデルである。糖尿病性創傷の治癒は、収縮よりむしろ肉芽組織の形成および再上皮形成に依存する(Gartner, M.H.ら、J.Surg.Res.52:389(1992); Greenhalgh, D.G.ら、Am.J.Pathol.136:1235(1990))。

30

## 【1286】

この糖尿病動物は、I型真性糖尿病において観察される特徴的な特性の多くを有する。ホモ接合(db+/db+)マウスは、それらの正常なヘテロ接合(db+/+m)同腹仔と比較して肥満である。変異体糖尿病(db+/db+)マウスは、第4染色体上に単一の常染色体性の劣性変異(db+)を有する(Colemanら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:283-293(1982))。動物は、多食症、多渴症、および多尿症を示す。変異体糖尿病マウス(db+/db+)は、上昇した血中グルコース、増加したまたは正常なインスリンレベル、および抑制された細胞媒介性免疫を有する(Mandelら、J.Immunol.120:1375(1978); Debray-Sachs, M.ら、Clin.Exp.Immunol.51(1):1-7(1983); Leiterら、Am.J.of Pathol.114:46-55(1985))。末梢神経障害、心筋合併症、および微小血管損傷、基底膜肥厚、およ

40

50

び糸球体濾過異常は、これらの動物において記載されている (Norido, F.ら、Exp. Neurol. 83 (2) : 221 - 232 (1984); Robertsonら、Diabetes 29 (1) : 60 - 67 (1980); Giacomelliら、Lab Invest. 40 (4) : 460 - 473 (1979); Coleman, D. L., Diabetes 31 (補遺) : 1 - 6 (1982))。これらのホモ接合糖尿病マウスは、高血糖症を発症し、そしてこれは、ヒトII型糖尿病に類似してインスリンに対して耐性である (Mandelら、J. Immunol. 120 : 1375 - 1377 (1978))。

#### 【1287】

これらの動物において観察された特徴は、このモデルにおける治癒が、ヒト糖尿病において観察される治癒に類似し得ることを示す (Greenhalghら、Am. J. of Pathol. 136 : 1235 - 1246 (1990))。

10

#### 【1288】

遺伝的糖尿病の雌性C57BL/KsJ (db+/db+)マウス、およびそれらの非糖尿病 (db+/+m)ヘテロ接合性同腹仔を、この研究に用いる (Jackson Laboratories)。これらの動物は6週齢で購入し、そしてこれらの動物は研究の開始時に8週齢である。動物を個別に飼育し、そして自由に食物および水を与える。全ての操作を、無菌技術を用いて行う。この実験を、Human Genome Sciences, IncのInstitutional Animal Care and Use Committee and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animalsの規則およびガイドラインに従って行う。

20

#### 【1289】

創傷プロトコルを、以前に報告された方法 (Tsuboi, R.およびRifkin, D. B., J. Exp. Med. 172 : 245 - 251 (1990))に従って行う。簡単には、創傷させる日に、動物を、脱イオン水に溶解したAvertin (0.01 mg/mL)、2, 2, 2-トリプロモエタノールおよび2-メチル-2-ブタノールの腹腔内注射で麻酔する。この動物の背面領域を剃毛し、そして皮膚を70%エタノール溶液およびヨウ素で洗浄する。手術範囲を、創傷させる前に滅菌ガーゼで乾燥させる。次いで、8mmの全層の創傷を、Keyes組織パンチを用いて作製する。創傷させた直後に、周囲の皮膚を、創傷の拡大を取り除くために穏やかに伸ばす。実験の間この創傷を開放させる。処置の適用を、創傷させた日から開始して5日間連続で、局所的に与える。処置の前に、創傷を、滅菌生理食塩水およびガーゼスポンジを用いて穏やかに洗浄する。

30

#### 【1290】

創傷を視覚的に検査し、そして手術の日およびその後2日間隔で、固定した距離で写真撮影する。創傷閉鎖を、1~5日目および8日目の毎日の測定により決定する。創傷を目盛り付き (Calibrated) Jamesonカリパスを用いて水平および垂直に測定する。創傷を、肉芽組織がもはや目に見えずかつ創傷を連続した上皮が覆う場合に治癒したとみなす。

40

#### 【1291】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5)を、ビヒクル中で8日間、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5)の異なる用量の範囲 (1日あたり創傷あたり4 mg ~ 500 mg)を用いて投与する。ビヒクルコントロール群には、50 mLのビヒクル溶液を与えた。

#### 【1292】

動物を、8日目にペントバルビタールナトリウム (300 mg/kg)の腹腔内注射で安楽死させる。次いで、創傷および周囲の皮膚を、組織学および免疫組織化学のために収集する。組織標本を、さらなる処理のために、生検スポンジの間の組織カセット内で10%中性緩衝化ホルマリン中に置く。

50

#### 【1293】

各々10匹の動物(5匹の糖尿病および5匹の非糖尿病コントロール)の3つの群: 1) ビヒクルブラシーボコントロール、2) 非処置群、および3) 処置群を、評価する。

【1294】

創傷閉鎖を、水平軸および垂直軸で面積を測定すること、および創傷の面積の合計を得ることにより分析する。次いで、収縮を、最初の創傷の面積(0日)と処置後(8日)の面積との間の差異を確立することにより評価する。1日目のこの創傷面積は、 $64\text{ mm}^2$ (皮膚パンチに対応するサイズ)である。計算を以下の式を用いて行う:

$$[8\text{日目の開放面積}] - [1\text{日目の開放面積}] / [1\text{日目の開放面積}]$$

標本を10%緩衝化ホルマリン中に固定し、そしてパラフィン包埋塊を、創傷表面に対して垂直に切り出し(5mm)、そしてReichert-Jungマイクロトームを用いて切断する。慣用的なヘマトキシリン-エオシン(H&E)染色を、二等分した創傷の横断切片で行う。創傷の組織学的試験を用いて、修復した皮膚の治癒プロセスおよび形態的な外見を、Gタンパク質ケモカインレセプターを用いる処置によって改変したかどうかを評価する。この評価は、細胞蓄積、炎症細胞、毛細管、線維芽細胞、再上皮形成、および表皮成熟の存在の検証を含む(Greenhalgh, D.G.ら、Am. J. Pathol. 136:1235(1990))。目盛り付きレンズマイクロメーターを盲検観察者(blinded observer)が用いる。

【1295】

組織切片をまた、ABC Elite検出システムを使用してポリクローナルウサギ抗ヒトケラチン抗体で免疫組織化学的に染色する。ヒト皮膚を陽性組織コントロールとして用いる一方、非免疫IgGを陰性コントロールとして用いる。ケラチノサイト増殖を、目盛り付きレンズマイクロメーターを用いて創傷の再上皮形成の程度を評価することによって決定する。

【1296】

皮膚標本における増殖細胞核抗原/サイクリン(PCNA)を、ABC Elite検出システムを用いて抗PCNA抗体(1:50)を使用することにより実証する。ヒト結腸癌は、陽性組織コントロールとして役割を果たし、そしてヒト脳組織を、陰性組織コントロールとして用いる。各標本は、1次抗体の脱落および非免疫マウスIgGとの置換を有する切片を含む。これらの切片の順位は、0~8のスケール(わずかな増殖を反映するより低い側のスケール~激しい増殖を反映するより高い側)の増殖の程度に基づく。

【1297】

実験データを、片側t検定を用いて分析する。 $< 0.05$ のp値を有意とみなす。

【1298】

(ステロイド障害性ラットモデル)

ステロイドによる創傷治癒の障害は、種々のインビトロおよびインビボ系において十分に実証されている(Wahl, Glucocorticoids and Wound healing: Anti-inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects. 280-302(1989)); Wahlら、J. Immunol. 115:476-481(1975); Werberら、J. Exp. Med. 147:1684-1694(1978)。糖質コルチコイドは、新脈管形成を阻害すること、血管透過性(Ebertら、An. Intern. Med. 37:701-705(1952))、線維芽細胞増殖、およびコラーゲン合成(Beckら、Growth Factors. 5:295-304(1991); Haynesら、J. Clin. Invest. 61:703-797(1978))を低下させること、ならびに循環する単球の一過性の減少を生じること(Haynesら、J. Clin. Invest. 61:703-797(1978); Wahl, 「Glucocorticoids and wound healing」: Anti-inflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, 280-302頁(1989))によって創傷治癒を遅延させる。障害性創傷治癒に対するステロイドの全

10

20

30

40

50

身性投与は、ラットにおいて十分に確立された現象である (Beckら、Growth Factors. 5: 295 - 304 (1991); Haynesら、J. Clin. Invest. 61: 703 - 797 (1978); Wahl, 「Glucocorticoids and wound healing」: Antiinflammatory Steroid Action: Basic and Clinical Aspects, Academic Press, New York, 280 - 302頁 (1989); Pierceら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2229 - 2233 (1989))。

【1299】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) が治癒プロセスを促進し得ることを実証するために、治癒が、メチルプレドニゾロンの全身性投与により損なわれる、ラットの全層切除皮膚創傷に対するGタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の複数の局所適用の効果を評価する。

10

【1300】

若年成体の雄性Sprague Dawleyラット (体重250~300g) (Charles River Laboratories) をこの実験に用いる。この動物を、8週齢で購入する。研究の開始時は9週齢である。ラットの治癒応答は、創傷の時点で、メチルプレドニゾロンの全身性投与 (17mg/kg/ラット、筋肉内) により損なわれる。動物を個別に飼育し、そして自由に食物と水を与える。全ての操作を、無菌技術を用いて行う。この研究を、Human Genome Sciences, IncのInstitutional Animal Care and Use Committee and the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animalsの規則およびガイドラインに従って行う。

20

【1301】

創傷プロトコルは、上記A節に従う。創傷させる日に、動物をケタミン (5mg/kg) およびキシラジン (5mg/kg) の筋肉内注射で麻酔する。この動物の背面領域を剃毛し、そして皮膚を70%エタノールおよびヨウ素溶液で洗浄する。手術範囲を、創傷させる前に滅菌ガーゼで乾燥させる。8mmの全層創傷をKeyes組織パンチを用いて作製する。実験の間、この創傷の左を開放する。試験物質の適用を、創傷させ、次いでメチルプレドニゾロン投与した日から開始して、7日間連続で、1日1回、局所的に与える。処置の前に、創傷を滅菌生理食塩水およびガーゼスポンジを用いて穏やかに洗浄する。

30

【1302】

創傷を視覚的に検査し、そして創傷させた日および処置の終りに、固定した距離で写真撮影する。創傷閉鎖を、1~5日目の毎日および8日目の測定により決定する。創傷を目盛り付き (Calibrated) Jamesonノギスを用いて水平および垂直に測定する。創傷を、肉芽組織がもはや目に見えずかつ創傷を連続した上皮が覆う場合に、治癒したとみなす。

40

【1303】

Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) を、ビヒクル中で8日間、Gタンパク質ケモカインレセプター (CCR5) の異なる用量の範囲 (1日あたり創傷あたり4mg~500mg) を用いて投与する。ビヒクルコントロール群は、50mLのビヒクル溶液を受けた。

【1304】

動物を、8日目にペントバルビタールナトリウム (300mg/kg) の腹腔内注射で安楽死させる。次いで、創傷および周囲の皮膚を、組織学のために収集する。組織標本を、さらなるプロセッシングのために、生検スポンジの間の組織カセット内で10%中性緩衝ホルマリン中に置く。

50

【1305】

各々10匹の動物（メチルプレドニゾロンを用いる5匹および糖質コルチコイドを用いない5匹）の4つの群を評価する：1）非処置群、2）ビヒクルプラシーボコントロール、および3）Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）処置群。

#### 【1306】

創傷閉鎖を、垂直軸および水平軸で面積を測定すること、および創傷の面積の合計を得ることにより分析する。次いで、閉鎖を、最初の創傷の面積（0日）と処置後（8日）の面積との間の差異を確立することにより評価する。1日目のこの創傷面積は、 $64\text{ mm}^2$ （皮膚パンチに対応するサイズ）である。計算を以下の式を用いて行う：

$$[8\text{日目の開放面積}] - [1\text{日目の開放面積}] / [1\text{日目の開放面積}]$$

標本を10%緩衝化ホルマリン中に固定し、そしてパラフィン包埋塊を、創傷表面に対して垂直に切り出し（5mm）、そしてOlympusマイクロームを用いて切断する。慣用的なヘマトキシリン-エオシン（H&E）染色を、二等分した創傷の横断切片で行う。創傷の組織学的試験は、修復した皮膚の治癒プロセスおよび形態的な外見を、本発明のアゴニストまたはアンタゴニストを用いる処置によって改善したかどうかを評価することを可能にする。目盛り付きレンズマイクロメーターを盲検観察者（blinded observer）が用いて、創傷の隙間の距離を決定する。

#### 【1307】

実験データを、片側t検定を用いて分析する。 $< 0.05$ のp値を有意とみなす。

#### 【1308】

本実施例において記載される研究は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質の活性を試験する。しかし、当業者は、例証した研究を容易に改変して、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド（例えば、遺伝子治療）、Gタンパク質ケモカインレセプターのアゴニスト（リガンドを含む）、および/またはアンタゴニストの活性を試験し得る。

#### 【1309】

（実施例65：糖尿病マウスモデルにおけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の評価）

実施例64で用いられた糖尿病マウスモデルはまた、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）が、糖尿病状態自体を防止、処置、および/または改善する際に効果的であるか否かを決定するために用いられ得る。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）を、db+/db+マウスが糖尿病を発症する前かその後かのいずれかの種々の一定期間に、このマウスに非経口的に投与し、そして血糖レベル、および/またはインスリンレベルを測定し（または疾患の重篤度を測定するための当業者に公知の他の方法で）、投与が糖尿病の発症または重篤度を防止、遅延、または減少するか否かを決定される。

#### 【1310】

本実施例は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）タンパク質の活性を試験する。しかし、当業者は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）ポリヌクレオチド、アゴニスト（リガンドを含む）、および/またはアンタゴニストの活性を試験する例示された研究（例えば、遺伝子治療）を容易に修飾し得る。

#### 【1311】

（実施例66：炎症性腸疾患および大腸炎のモデルにおけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の評価）

本研究の目的は、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）が、飲用水中のデキストラン硫酸ナトリウムに任意に曝すことによって誘導されたマウス大腸炎モデルにおいて効果的であるか否かを決定することである。

#### 【1312】

6~8週齢の老雌Swiss Websterマウス（20~25g、Charles River, Raleigh, NC）を、硫酸ナトリウム（DSS, 36,000-44,000 MW, American International Chemistry, Natick, MA）の4%溶液を1週間任意に投与されて誘導された炎症性腸疾患

10

20

30

40

50

のモデルにおいて用いる。Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニスト、アンタゴニスト、好ましくは本発明の抗体を、毎日非経口投与により与える（ $n = 10$ ）。これらのパラメータを用いて、効果を決定する：1）糞便の評価に基く臨床スコア；2）結腸の評価に基く組織学的スコア；および3）体重の変化。臨床スコアは、4つのスコアの最大値を総計する2つの部分から構成される。糞便の一貫性は、次のように等級付けられる：0 = 堅い；1 = 柔らかい；2 = 下痢。糞便中の血もまた、0 = 血なし；1 = 超自然的な血；および2 = ひどい直腸の出血と、0 ~ 2のスケールで評価される。3より大きい平均グループスコアは、致死性の可能性および処置可能な段階を超えて進行した疾患を示す。臨床スコアは、0、4、5、6、および7日に獲得した。組織学的スコアを達するために、昇り順、横軸、および降り順の結腸のスライドを、炎症スコア（0 ~ 3）および秘密スコア（crypt score）（0 ~ 4）に基く盲目的な様式で評価される。体重を、毎日測定する。データを、平均 + SEMとして表わす。独立学生t試験を用いて、疾患コントロールと比較して有意な差異を決定する（\*  $p < 0.05$ ；\*\*  $p < 0.01$ ；\*\*\*  $p < 0.001$ ）。

10

### 【1313】

この研究から得られた結果は、IBDおよび大腸炎（潰瘍性大腸炎を含む）におけるGタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）の役割を示し得る。従って、Gタンパク質ケモカインレセプター（CCR5）のアゴニスト、アンタゴニスト、ならびに本発明の抗体およびフラグメントを用いて、IBD、大腸炎、および/または潰瘍性大腸炎、ならびに任意の他の腸の炎症を有する患者を処置、防止、または改善し得る。

20

### 【1314】

（実施例67：CCR5発現細胞に対する43E2抗体および43E2/AK38181抗体の結合親和性の決定）

完全なヒトIgG4ケモカインレセプター5（CCR5）モノクローナル抗体の43E2および43E2/AK38181の、ヒトT細胞白血病細胞株CEM.NKR（Trkola Aら、J. Virol. 73: 8966 - 8974 (1999)）の表面上に発現されたCCR5に対する結合親和性を決定するため、定量的な結合飽和アッセイを実施した。

### 【1315】

（方法論）

Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassay (DELFIATM) Eu-標識キット（カタログ番号1244-302, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA）を使用して、製造業者の指示書に従って、43E2抗体および43E2/AK38181抗体をユーロピウム（Eu）により標識した。標識剤は、N1-（p-イソチオシアネートベンジル（isothiocyanateobenzyl））ジエチレントリアミンN1、N2、N3、N3-テトラ酢酸（DTTA）のEu-キレートである。このDTTA基は、 $Eu^{3+}$ と共に安定な錯体を形成し、そしてこのイソチオシアネート基は、アルカリpHにおいて抗体の第一級アミノ基と反応して、安定な共有結合のチオウレア結合を形成する。43E2抗体および43E2/AK38181抗体を、pH 9.3の $Na_2CO_3$ 緩衝液で一晩透析し、250  $\mu$ L中の0.5 mgの43E2および43E2/AK38181を、0.2 mgの標識剤で4で一晩標識した。50 mmol/LのTrisHCl（pH 7.8）および0.9% NaClの溶離緩衝液を使用したサイズ排除クロマトグラフィーによって、Eu標識された43E2およびEu標識された43E2/AK38181を、未反応のキレートから精製した。各々の標識抗体の $Eu^{3+}$ 含量およびタンパク質濃度を決定した。

30

40

### 【1316】

Eu-43E2およびEu-43E2/AK38181の結合飽和アッセイを実施した。96ウェルプレートにおいて、CCR5をトランスフェクトしたCEM.NKR細胞をウェルあたり30万~50万個で、そして種々の濃度のEu-43E2およびEu-43

50

E2/AK38181を、100倍過剰の未標識のCCR5mAb004の存在下または非存在下で1時間、室温(RT)で行った。完全培地で2回洗浄することによって、細胞に結合したEu-43E2およびEu-43E2/AK38181を未結合の物質から分離した。細胞を洗浄するため、150 $\mu$ Lの完全培地を加え、そしてRTで5分間1500RPMで遠心分離した。マルチチャンネルピペッターを用いて上清を用心して取り除いた。洗浄後、これらの細胞を100 $\mu$ Lの培地に再懸濁した。各々の細胞懸濁物のうち50 $\mu$ Lを、FluoroNUNC<sup>TM</sup>96ウェルプレートのウェルに移した。このウェルに100 $\mu$ Lの増感剤溶液を添加し、そして穏やかに振盪しながら室温で5分間インキュベートした。増感剤は低pH溶液であり、キレートからEuを遊離させる。遊離したEuから発される蛍光を、時間分解蛍光光度分析(VICTOR 1420 DELFIA<sup>TM</sup>フルオロメーター、Wallac Oy、Turku、Finland)によって決定した。これらのデータを、Prizmソフトウェア(GraphPad Software, San Diego, CA)で分析し、平衡解離定数(Kd)を決定した。

10

## 【1317】

(結果)

図7A~Bに示されるように、Eu-43E2は、CCR5をトランスフェクトしたCEM.NKR細胞にKd 2.36nMで特異的に結合し、一方、Eu-43E2/AK38181はCCR5をトランスフェクトしたCEM.NKR細胞にKd 1.18nMで特異的に結合した。これらの知見は、両方の抗体が、CCR5発現細胞に高い親和性で特異的に結合すること、およびこれら2つの抗体が、表面上に発現されたCCR5に対する結合親和性において、約2倍の差異を示すことを実証する。

20

## 【1318】

(実施例68:30種のHIV-1株のパネルを利用する、ウイルス侵入に対する43E2抗体および43E2/AK38181抗体の効果)

独立したHIV-1株を、そのエンベロープタンパク質の配列に基づき、別々のクレードに分類した。43E2抗体および43E2/AK38181抗体が、HIV-1クレードの集まりの代表である、二重指向性またはCCR5指向性のエンベロープタンパク質を発現するヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)の集まりの侵入をブロックし得ることを実証するため、これらの異なるクレード(A~G)の代表である、30種の二重指向性ウイルスまたはCCR5指向性ウイルスを、独立したHIV-1(env)-ルシフェラーゼに発現されるエンベロープタンパク質を試験するために選択した(以下に記載される)。

30

## 【1319】

(方法論)

試験するウイルスおよびそれらのクレードは、代表的なクレードA~Gのウイルス、臨床単離体、および他のHIV-1侵入インヒビター(例えば、エンフュービルタイド(enfuvirtide))に耐性のウイルスを含み、表7のカラム1およびカラム2に列挙される。

## 【1320】

(表7:HIV-1-ルシフェラーゼ偽性化(pseudotyped)ウイルスについての43E2および43E2/AK38181の阻害)

40

【表 9】

ウイルス	クレード	43E2		43E2/AK38181	
		IC50 <sup>A</sup>	IC90	IC50	IC90
301593	B/二重指向性 (CCR5 + CXCR4)	0.0001	0.0007	0.0001	0.0005
301657	B	0.0225	1.3131	0.0044	0.1477
301660	B	0.0019	0.2838	0.0018	0.0313
301714	B	0.0359	>2.0000 <sup>B</sup>	0.0050	0.2561
301727	B	0.0201	1.1803	0.0033	0.0880
302056	B	0.008	0.4249	0.0023	0.0394
302073	B	0.0101	0.7282	0.0016	0.0620
92BR025	B	0.0056	0.0950	0.0010	0.0102
92RW008	A	0.006	0.2669	0.0015	0.0262
92RW009	A	0.0032	0.1109	0.0011	0.0140
92RW026	A	0.0028	0.3905	0.0013	0.0400
92TH001	E	0.0012	0.0148	0.0006	0.0042
92TH003	E	0.0009	0.0064	0.0006	0.0024
92UG005	D	0.0024	0.0795	0.0014	0.0123
93BR029	F	0.0042	0.2584	0.0016	0.0268
93IN101	C	0.001	0.0277	0.0011	0.0075
93UG082	D	0.0024	0.1613	0.0014	0.0194
ASJM108	B	0.0087	0.6355	0.0022	0.0478
ASM57	B	0.0085	0.6539	0.0012	0.0495
ASM80	B	0.0077	0.3842	0.0020	0.0378
BAL	B	0.0309	0.8086	0.0049	0.0677
DU151	C	0.0022	0.0644	0.0013	0.0161
G3	G	0.0023	0.0955	0.0009	0.0125
JRCSFSDM DIM	B/エンフュービル耐性	0.0097	0.7843	0.0028	0.0710
JRCSFSDM SIM	B/エンフュービル耐性	0.0111	0.7868	0.0021	0.0717
JRFL	B	0.0055	0.3434	0.0022	0.0565
QZ4589	B	0.0127	1.1577	0.0036	0.1051
RU570	G	0.0052	0.2846	0.0017	0.0243
SF162	B	0.0111	1.0866	0.0053	0.1126
エンフュービル耐性	B/エンフュービル耐性	0.0085	0.5781	0.0025	0.0605
中央値		0.0058	0.3434	0.0017	0.0386
平均		0.0084	0.4485	0.0021	0.0507

<sup>A</sup> IC<sub>50</sub> 値および IC<sub>90</sub> 値は μM として報告される。

<sup>B</sup> 2,000 超のものは中央値および平均から除外した。

## 【1321】

HIV-1 株 NL4-3 は、その env 遺伝子内に挿入されたルシフェラーゼレポーター遺伝子を含み、結果として env 遺伝子を欠いており (Richman, D. D. ら, Proc Natl Acad Sci, 100: 4144-9 (2003))、これを利用して本実験を行った。env 遺伝子はウイルスの複製および増殖に必須であるので、ヘルパープラスミド上にこの env 遺伝子を提供する。このウイルス増殖工程を、HIV-ルシフェラーゼウイルスをコードするプラスミドと、env 遺伝子を発現するプラスミドとの同時トランスフェクションによって、HEK293T 細胞中で実施する。ウイルスは代表的に、トランスフェクションの 48 時間後に収集する。得られたウイルスは、増殖工程の間にヘルパープラスミド上の env タンパク質をコードする遺伝子を発現することによって任意のウイルス由来の env タンパク質有し、偽性化され (pseudotype) 得る。ここに記載した実験において、HIV-ルシフェラーゼウイルスを、表 7 のカラム 1 およびカラム 2 に列挙される独立したクレードを代表する HIV-1 株の集まりに由

10

20

30

40

50

来するenvタンパク質によって、偽性化した。次いで、得られたHIV-レポーターウイルスを、43E2抗体および43E2/AK38181抗体の存在下でU87大グリア細胞の単回の感染のために使用し、そして侵入レベルを、市販の溶解緩衝液およびルシフェラーゼ試薬(Promega)を使用したルシフェラーゼ活性のレベルの関数として、測定した。U87大グリア細胞株をCD4およびCCR5を発現するように操作しておき(U87/CD4/CCR5)、これによってHIV-1侵入の阻害を評価するための感知システムを提供する。コントロールとして、また、HIV-1レセプターと無関係にU87大グリア細胞に侵入し得る、広宿主性のマウス白血病ウイルス(aMLV)を発現するウイルスを、調製した。

【1322】

上記のようなアッセイをまた、臨床診療に耐性のウイルスの特徴付けのため、そして抗レトロウイルス治療の開発のために使用した(PhenoSense<sup>TM</sup> Assay, Virologic, Inc., San Francisco, CA; Richman, D.D.ら, Proc Natl Acad Sci, 100:4144-9(2003))。

【1323】

U87/CD4/CCR5細胞を、ある用量範囲の43E2抗体、43E2/AK38181抗体またはCCR5非特異的IgG4アイソタイプコントロール抗体の存在下または非存在下で、3連でプレインキュベートし、次いでウイルスにより攻撃した。処置の約48時間後に、この細胞溶解物中のルシフェラーゼ活性を測定することによって、侵入レベルを決定した。試験した各々の抗体濃度に対して、抗体非存在下でのルシフェラーゼ活性と、抗体存在下で得られたレベルとを比較することによって、阻害レベルを決定した：

阻害% = { 1 - [ (抗体存在下でのルシフェラーゼ) / (抗体非存在下でのルシフェラーゼ) ] } × 100。

【1324】

(結果)

阻害レベルを、抗体濃度に対してプロットし、そして侵入を50%ブロックするのに必要とされる抗体量中央値(IC<sub>50</sub>)、侵入を80%ブロックするのに必要とされる抗体量中央値(IC<sub>80</sub>)、侵入を90%ブロックするのに必要とされる抗体量中央値(IC<sub>90</sub>)、および侵入を95%ブロックするのに必要とされる抗体量中央値(IC<sub>95</sub>)を計算し、そして表8に示す。さらに、個々の43E2+ウイルスの組合せ、または43E2/AK38181+ウイルスの組合せについてのIC<sub>50</sub>値およびIC<sub>90</sub>値を、表7のカラム3およびカラム4に示す。

【1325】

(表8：HIV-ルシフェラーゼ偽性化ウイルスの43E2抗体および43E2/AK38181抗体についての阻害濃度中央値(μM))

【表10】

	43E2	43E2/AK38181
IC <sub>50</sub>	0.0058	0.0017
IC <sub>80</sub>	0.1036	0.0130
IC <sub>90</sub>	0.3434	0.0386
IC <sub>95</sub>	1.056	0.1237

【1326】

43E2抗体および43E2/AK38181抗体がHIV-1侵入をブロックする能力は、クレードに無関係である。さらに、43E2抗体および43E2/AK38181抗体は、他のHIV-1侵入インヒビター(例えば、エンフュービルタイド)による阻害

10

20

30

40

50

に耐性な HIV - 1 株の侵入をブロックし得る。両方の抗体はまた、HIV - 1 の二重指向性 (CCR5 + CXCR4) の株の侵入を阻害する。しかしながら、43E2 / AK38181 は、43E2 より、約 1 / 3 の IC<sub>50</sub> および約 1 / 10 の IC<sub>90</sub> を示す。43E2 抗体および 43E2 / AK38181 抗体は、予想通り、aMLV エンベロープを有する HIV - 1 偽性化ウイルスを、ブロックできなかった。なぜなら、MLV は侵入のために CCR を必要としないからである。

#### 【1327】

(実施例 69 : 43E2 抗体および 43E2 / AK38181 抗体は、活性化した初代ヒト T 細胞への HIV - 1 侵入を阻害する)

CCR5 指向性ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV - 1) が、健常なヒトドナー由来の CD8 を除いた活性化 T 細胞への侵入をブロックするための、43E2 抗体および 43E2 / AK38181 抗体の有効性を決定するため、組換え HIV - 1 - ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子システムを利用した。このようなウイルスで感染させた細胞におけるレポーター遺伝子の活性の測定は、HIV - 1 の侵入についての、便利で、再現性がありかつ定量的な測定を提供する (Strizki, J. M. ら, Proc Natl Acad Sci, 98 : 12718 - 23 (2001); Richman, D. D. ら, Proc Natl Acad Sci, 100 : 4144 - 9 (2003))。

#### 【1328】

(方法論)

HIV - ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子システムにおいて、このホタルルシフェラーゼ遺伝子を、HIV - 1 株 NL4 - 3 の nef 遺伝子内に挿入する (HIV - 1 (nef))。HIV - 1 (nef) はまた、vpr 遺伝子および env 遺伝子内に不活性化変異を含む (Heř, J Virology, 69 : 6705 - 6711 (1995))。この env 遺伝子はウイルスの複製および増殖に必須であるので、この env 遺伝子は、HIV - 1 (nef) のためのヘルパープラスミドを増殖のため提供されなければならない。この増殖工程を、HIV - 1 (nef) をコードするプラスミドと、env 遺伝子を発現するプラスミドとの同時トランスフェクションによって、HEK293T 細胞中で実施する。ウイルスを代表的に、トランスフェクションの 48 時間後に収集収集する。得られたウイルスは、増殖工程の間にヘルパープラスミド上のエンベロープタンパク質をコードする遺伝子を発現することによって任意のウイルス由来のエンベロープタンパク質有し、偽性化され (pseudotype) 得る。ここに記載した実験において、HIV - 1 (nef) を、HIV - 1 JRFL 株に由来するエンベロープタンパク質によって偽性化した。この株は、主要な補欠レセプターとして CCR5 を使用する (CCR5 指向性)。次いで、得られた HIV - 1 - レポーターウイルスを、推定のインヒビターの存在下または非存在下で、選択された標的細胞の単回の感染のために使用し得、そしてウイルス侵入レベルを、市販の溶解緩衝液およびルシフェラーゼ試薬 (Promega) を使用したルシフェラーゼ活性のレベルによって測定し得る。

#### 【1329】

この例において、HIV - 1 ネガティブな 3 人のドナーより末梢血単核細胞 (PBMC) を単離し、抗 CD - 3 / IL - 2 を用いて活性化させ、そして 48 時間培養して、活性化 T 細胞について富化した。CD8 T 細胞を除き、そして 50 μL の懸濁物中に、ウェルあたり 150,000 細胞 (70 ~ 80% の T 細胞) を播種した。細胞を、2000 nM までの濃度範囲における 43E2 抗体、43E2 / AK38181 抗体または CCR5 非特異的 IgG4 アイソタイプコントロール抗体の存在下または非存在下で、3 連で 2 時間インキュベートした。プレインキュベートした細胞を、HIV - 1 - JRFL レポーターウイルス (10 μL のストックウイルス、2500 ng / mL の抗原 p24 の力価) で感染させ、そして感染の 72 時間後の細胞を収集し、そしてルシフェラーゼキット (Promega) を使用して、ルシフェラーゼ活性を測定した。試験した各々の用量について、侵入 % を以下の式によって計算した：

(抗体存在下で観察されたルシフェラーゼ活性レベル) / (抗体非存在下で観察された

10

20

30

40

50

ルシフェラーゼレベル) × 100。

これらのデータ点は、3連の測定の平均 ± 標準偏差を表す。

【1330】

(結果)

図8A~Cに示されるように、43E2抗体および43E2/AK38181抗体は、3人の異なるドナー由来の、活性化したCD4富化したヒトT細胞へのHIV-1-JRFLの侵入をブロックし、一方、CCR5非特異的IgG4アイソタイプコントロール抗体は、ウイルス侵入に対して効果を有さなかった。3つの実験すべてにおいて、43E2/AK38181のIC<sub>50</sub>は43E2のIC<sub>50</sub>の1/10以下であり、そして試験した最高濃度において、43E2/AK38181は、80~90%の侵入を阻害し得、一方、43E2は60%の侵入をブロックし得た。

10

【1331】

本発明が、前述の詳細な説明および実施例において特に記載された方法以外の方法で実施され得ることは、明らかである。本発明の多くの改変および変化が、上述の技術に照らして可能であり、したがって添付の特許請求の範囲に含まれる。

【1332】

発明の背景、詳細な説明、および実施例における列挙された各文献(特許、特許出願、学术论文、要約、研究マニュアル、本、または他の開示を含む)の開示は、これによって本明細書中で参考として援用される。米国特許出願第09/195,662号(1998年11月18日出願)の開示は、本明細書中で参考として援用される。米国仮出願第60/181,258号(2000年2月9日出願);同第60/187,999号(2000年3月9日出願);同第60/234,336号(2000年9月22日出願);および同60/552,184(2004年3月12日出願)の開示は、本明細書中で参考として援用される。国際公開WO98/54317の開示は、本明細書中で参考として援用される。さらに、米国特許第5,707,815号の配列表は、本明細書中で参考として援用される。

20

【1333】

寄託された微生物または他の生物学的材料に関する表示

(PCT Rule 13bis)

A. 表示は、明細書中表2の箇所而言及された寄託された微生物または他の生物学的材料に関してなされた。

B. 寄託物の表示

その他の寄託物が追加の用紙に記載されている.:

寄託機関の名称: アメリカン タイプ カルチャー コレクション  
寄託機関の住所: アメリカ合衆国  
バージニア 20110-2209, マナサス  
ユニバーシティー プールーバード10801

10

	受託番号	寄託日		受託番号	寄託日
1	PTA-4053	2002年2月1日	2	PTA-4054	2002年2月1日
3	PTA-5860	2004年3月15日	4	PTA-5859	2004年3月15日
5	PTA-5861	2004年3月15日	6		

20

30

40

(カナダ)

出願人は、出願に基づきカナダ国特許が発行されるか、あるいは同出願が拒絶または放棄されて回復され得なくなるかもしくは取り下げられるまでは、特許庁長官 (Commissioner of Patents) が、長官により指名された独立の専門家に対してのみ出願中で言及された寄託済みの生物学的材料のサンプルの供与を許可する旨を請求し、出願人は、国際出願の公表のための規則上の準備が完了する前に、書面によりその旨を国際事務局に告知しなければならない。

10

(ノルウェー)

出願人はここにおいて、出願が(ノルウェー特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにノルウェー特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、ノルウェー特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりノルウェー特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、ノルウェー特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

20

(オーストラリア)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は、特許の付与前において、あるいは出願の放棄(lapsing)、拒絶あるいは取り下げ前において、発明に対し利害関係を有さない当業者である対象者(skilled addressee)に対してのみ行われる旨を、告知するものである(オーストラリア国特許法第3.25(3)号規定)。

30

(フィンランド)

出願人はここにおいて、出願が(特許および統制委員会(National Board of Patents and Regulations)により)公開に付されるかあるいは公開を経ずに国立特許および法規委員会による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。

40

## (英国)

出願人はここにおいて、微生物のサンプルの供与は専門家に対してのみ利用可能にされる旨を、請求する。この旨の請求は、出願の国際公表のための規則上の準備が完了する前に、出願人により国際事務局に対してなされなければならない。

## (デンマーク)

出願人はここにおいて、出願が(デンマーク特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにデンマーク特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、デンマーク特許法第22条および第33条(3)に基づき出願が公に利用可能にされる時点以前に、出願人によりデンマーク特許庁に対してなされるものとする。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、デンマーク特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

10

20

## (スウェーデン)

出願人はここにおいて、出願が(スウェーデン特許庁により)公開に付されるかあるいは公開を経ずにスウェーデン特許庁による決定を受けるまでは、サンプルの供与は当該技術の専門家に対してのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、優先日から16ヶ月が経過するよりも前に、出願人により国際事務局に対してなされるものとする(好ましくはPCT Applicant's GuideのVolume Iのannex Zに記載された書式PCT/RO/134による)。そのような請求が出願人によりなされた場合は、第三者によるサンプルの供与のいかなる請求においても、利用される専門家を表示するものとする。専門家は、スウェーデン特許庁により作成された公認専門家のリスト(list of recognized experts)に記載された任意の者か、あるいは、個々の場合において出願人により承認された任意の者であり得る。

30

## (オランダ)

出願人はここにおいて、オランダ特許の発行日まで、あるいは出願が拒絶、取り下げあるいは放棄(lapsed)される日までは、特許法31F(1)の規定に基づき、微生物は専門家へのサンプル供与の形でのみ行われる旨を、請求する。この旨の請求は、オランダ王国特許法の第22C条または第25条に基づき出願が公に利用可能にされる日のうちいずれか早い方の日付よりも前に、出願人によりオランダ工業所有権局に対して提出されるものとする。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【1334】

以下の図面は、本発明の実施形態の例示であり、特許請求の範囲によって含まれるよう

50

な発明の範囲を限定することを意味しない。

【図 1】図 1 は、DNA 配列および本発明のレセプターを連結された G タンパク質の対応する推定アミノ酸配列を示す。アミノ酸に関する標準的な一文字略語が使用される。配列決定は、373 自動化 DNA シーケンサー (Applied Biosystems, Inc.) を用いて行った。

【図 2】図 2 は、本発明の G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5)、およびヒト MCP-1 レセプター (配列番号 9) のアミノ酸アライメントを示す。この図は、BLAST 分析によって決定された、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) タンパク質のアミノ酸配列とヒト MCP-1 レセプター A (MCP-1 RA) (配列番号 9) の翻訳産物との間の同定領域を示す。2 つのポリペプチドの間の同一アミノ酸は、線によって示され、一方、高度に保存的アミノ酸は、コロンによって示され、そして保存的アミノ酸は、ピリオドによって示される。同一領域、高度に保存的アミノ酸および保存的アミノ酸、を実験することによって、当業者は、この 2 つのポリペプチド間の保存的ドメインを容易に同定し得る。これらの保存的ドメインは、本発明の好ましい実施形態である。

【図 3】図 3 は、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) アミノ酸配列の分析を示す。ターンおよびコイル領域；親水性および疎水性；両親媒性領域；可撓性領域；抗原性指標および表面確率が示され、そして全てはデフォルト設定を使用して作製された。「抗原性指標または Jameson-Wolf」グラフにおいて、正のピークは、G タンパク質ケモカインレセプター (CCR5) タンパク質の高度に抗原性領域の位置、すなわち、本発明のエピトープ保有ペプチドが得られ得る領域を示す。これらのグラフにより規定されたドメインは、本発明により意図される。図 3 に示されるデータはまた、表 1 において、表形式で示される。その欄は、見出し「Res」、「Position」およびローマ数字 I ~ XIV で分類される。この欄の見出しは、図 3 および表 1 中に示されるアミノ酸配列の以下の特徴をいう：「Res」：配列番号 2 ならびに図 1 A および 1 B のアミノ酸残基；「Position」：配列番号 2 ならびに図 1 A および 1 B 中の対応する残基の位置；I：領域 - Garnier-Robson；II：領域 - Chou-Fasman；III：領域 - Garnier-Robson；IV：領域 - Chou-Fasman；V：ターン、領域 - Garnier-Robson；VI：ターン、領域 - Chou-Fasman；VII：コイル、領域 - Garnier-Robson；VIII：親水性プロット - Kyte-Doolittle；IX：疎水性プロット - Hopp-Woods；X：両親媒性領域 - Eisenberg；XI：両親媒性領域 - Eisenberg；XII：可撓性領域 - Karplus-Schulz；XIII：抗原性指標 - Jameson-Wolf；および XIV：表面確率プロット - Emini。

【図 4】図 4 は、抗 CCR5 抗体 36F11 の VH (それぞれ、配列番号 71 および 72) および VL (それぞれ、配列番号 73 および 74) のポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。各 CDR は、ヌクレオチド配列上の線で示される。表 6 もまた参照のこと。

【図 5】図 5 は、抗 CCR5 抗体 43E2 の VH (それぞれ、配列番号 75 および 76) および VL (それぞれ、配列番号 77 および 78) のポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。各 CDR は、ヌクレオチド配列上の線で示される。表 6 もまた参照のこと。

【図 6】図 6 は、抗 CCR5 抗体 AK38181 の VL ドメイン (それぞれ、配列番号 79 および 80) のポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。各 CDR は、ヌクレオチド配列上の線で示される。表 6 もまた参照のこと。

【図 7 A】図 7 A は、図 5 のユーロピウム (Eu) 標識された 43E2 抗体がヒト T 細胞白血病細胞株 CEM.NKR の表面上に発現された CCR5 に結合する、結合飽和アッセイを示す。解離定数 (Kd) は、各々の図に対して凡例に示される。また、実施例 67 を参照のこと。

【図 7 B】図 7 B は、Eu 標識された 43E2 / AK38181 抗体がアッセイされてい

10

20

30

40

50

る結合飽和アッセイを示す。この抗体は、I g G 4 定常ドメイン（配列番号 8 2 ）と融合された配列番号 7 6 の V H ドメインを有する重鎖と、ヒト 定常ドメイン（配列番号 8 3 ）と融合された配列番号 8 0 の V L ドメインを含む軽鎖（上記図 6 より）とを含む。解離定数（K d）は、各々の図に対して凡例に示される。また、実施例 6 7 を参照のこと。

【図 8 A】図 8 A ~ C は、C C R 5 指向性ヒト免疫不全ウイルス 1 型株（H I V - 1 - J R F L）が、健常なヒトドナーより単離された C D 8 を除いた活性化 T 細胞に侵入することに対する、4 3 E 2 抗体、4 3 E 2 / A K 3 8 1 8 1 抗体または C C R 5 非特異的 I g G 4 アイソタイプ抗体の効果を示す。これらのデータ点は、3 連の測定値の平均 ± 標準偏差を表す。データの線が破線と交差する抗体濃度は、I C <sub>50</sub> を表す。

【図 8 B】図 8 A ~ C は、C C R 5 指向性ヒト免疫不全ウイルス 1 型株（H I V - 1 - J R F L）が、健常なヒトドナーより単離された C D 8 を除いた活性化 T 細胞に侵入することに対する、4 3 E 2 抗体、4 3 E 2 / A K 3 8 1 8 1 抗体または C C R 5 非特異的 I g G 4 アイソタイプ抗体の効果を示す。これらのデータ点は、3 連の測定値の平均 ± 標準偏差を表す。データの線が破線と交差する抗体濃度は、I C <sub>50</sub> を表す。

【図 8 C】図 8 A ~ C は、C C R 5 指向性ヒト免疫不全ウイルス 1 型株（H I V - 1 - J R F L）が、健常なヒトドナーより単離された C D 8 を除いた活性化 T 細胞に侵入することに対する、4 3 E 2 抗体、4 3 E 2 / A K 3 8 1 8 1 抗体または C C R 5 非特異的 I g G 4 アイソタイプ抗体の効果を示す。これらのデータ点は、3 連の測定値の平均 ± 標準偏差を表す。データの線が破線と交差する抗体濃度は、I C <sub>50</sub> を表す。

10

【図 1 A】

```

10          30          50
GTGAGATGGTCTTCATGAATTC000CAAGAGCC000CAAGCTCTCATCTAGTGGACAG
70          90          110
GGAAGCTAGCAGCAAA000TCC00TCACTAGSAA000TCAATGCTTGG000CAAAAGACAG
130         150         170
TTAATCAATGTAGACATCTATGTAGGCAATAAAA000TATGATGTATAAAA000AGTTT
190         210         230
GCATTCATGAGG000CACTAAATACATTTAGSACTTTATAAAA000CACTTTTATTTA
250         270         290
TGCACAGG000TGAACAAGATG000TATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATAT
310         330         350
TATACATGGAGCCCTGG000CAAAATCAATGTGAAGCAATGG000CG000CTCTG000T
Y T S E P C P K I N V K Q I A A R L L P
370         390         410
CC00CTACTCACTGGTGTCTCTTTGGTTTGG000CAACATGCTGGTCACTCTCATC
P L Y S L V F I F G F V G N M L V L I I
430         450         470
CTGATAA000TCCAAAG000TGGAGAGCATGACTGACATCTACTCTCAAC000TGGCCATC
L I N C Q R L E S M T D I Y L L N L A I
490         510         530
TCTGACCTGTTTTCTTACTGTC000TCTG000CTCACTATGCTG000CG000CAGTGG
S D L F F L L T Y P F W A H Y A A A Q W
550         570         590
GACTTTGGAATACAATGTCTCACTCTTGACAG000CTCTATTTATAG000TCTCTCT
D F G N T M C Q L L T G L Y F I G F F S
610         630         650
GGAATCTCTTTCATCATCTCTGACAAATGATAGGTACCTGGCTATGCTCATGCTGCTG
G I F F I I L L T I D R Y L A I V H A V
670         690         710
TTTCTTTAAAGCCAGGAG000TCA000TGG000TGGTGAACAAGTGTGATCACTTGG000T
F A L K A R T V T F G V V T S V I T W V
730         750         770
GTGGCTGTGTTTGGCTCTCC000GAAATCACTCTTTACCAGATCTCAAAAAGAGGTCTT
V A V F A S L P G I I F T R S Q K E G L
790         810         830
CATTACACCTGCAGCTCTCAATTTCCATACAGCATGATCAATTTGGAAGAATTTCCAG
H Y T C S S H F P Y S Q Y Q F W K N F Q
850         870         890
ACATTAAGATAGTCACTCTGG000TGGTCTG000CTGCTTGTGATGGTCACTGCTACT
T L K I V I L G L V L P L L V M V I C Y
910         930         950
TGGGAATCTTAA000CACTCTCTTGGTGTGAAATGAGAAGAGAG000CAGG000CTGTG
S G I L K T L L R C R N E K K R H R A V

```

FIG.1A

【図 1 B】

```

970          990          1010
AGGCTTATCTCACCATCATGATGTTATTTTCTCTCTGG000TCC000CAACATGCTG
R L I F T I M I V Y F L F W A P Y N I V
1030         1050         1070
CTTCTCTGAA000CACTTCCAGGAATCTTTGG000TGAATAATG000TCAAGCTCTA000CAG
L L L N T F Q E F F G L N N C S S S N R
1090         1110         1130
TTGGACCAAGCTATG000AGGTGACAGAGACTCTTGG000TGAAGCAAG000TCAAC000C
L D Q A M Q V T E T L G M T H C C I N P
1150         1170         1190
ATCATCTATG000CTTTG000GGGAGAGTTCAGAA000CACTCTTGTCTCTTCCAAAAG
I I Y A F V G E K F R N Y L L V F F Q K
1210         1230         1250
CACATTTGCCAAAG000CTTTCGAAATGCTGTTCTATTTCCAGCAAG000GCTCC000AGGGA
H I A K R F C K C C S I F Q Q E A P E R
1270         1290         1310
GCAAGCTCAGTTTACAC000GATCCACTGG000GAGCAAAATATCTG000CTTGTGACAC
A S S V Y T R S T G E Q E I S V G L *
1330         1350         1370
GGACTCAAGTGG000CTGGTGA000CAGTGTG000CAGATGTCACATGGCTTAGTTTTCATACACA
1390         1410
GCTTGG000CTGG000TGG000TGGAGAG000CTTTT

```

FIG.1B



【 図 6 】

AK38181 VL

```

1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT TCA TCT GGA GGA GAG AGA GTC ACC 60
1 D I Q M T Q S P L S R S L S A S V G D R V T T 20
          CDR1
61 ATC ACT TGC CAG GCG AGT CAG GGC ATY CGC AAA TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAA AAA CCA 120
21 I T C Q A S D G G I R K Y L N H W Y Q K P 40
          CDR2
121 GGG AAA GTC GCT AAG CTC CTC ATC TAC GAT GCA TCC AAT TTG GAA ACA GGG GTC CCA TCA 180
41 G K V F K L L I Y D A S N L R T G G V P C S 60
181 ACG TTC AGT GGA AGT GGA TCA GGC ACA GAT TTT ACT TTC GCC ATC AGC AGC CTG CAG CCG 240
61 R F S G G S G G T D P T F A I S S L L C P F 80
          CDR3
241 GAA GAT ACT ACT ACA TAT TAC TGT CAA CAA TAT GAT GAT TTC CCG TCC ACC TTC GGC CAG 300
81 E D T A T Y Y C Q Q Y D D F P F T F G Q 100
301 GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA CCT 324
101 G T R L E I K R 108

```

FIG. 6

【 図 7 A 】

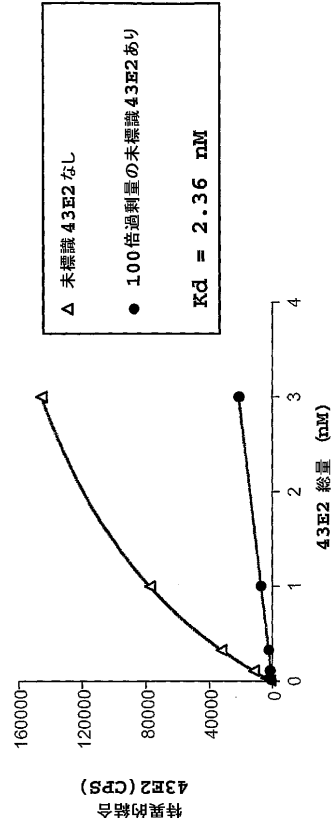


FIG. 7A

【 図 7 B 】

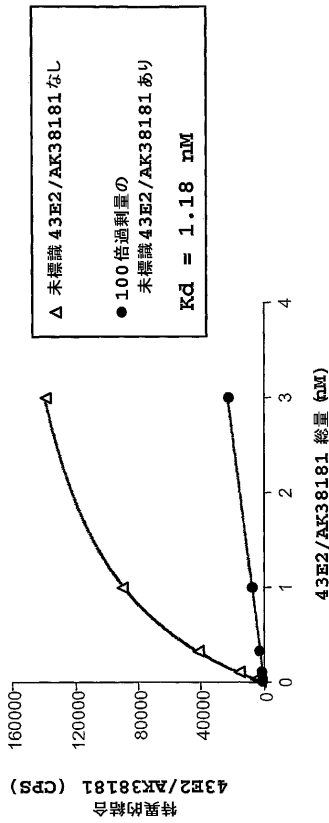


FIG. 7B

【 図 8 A 】

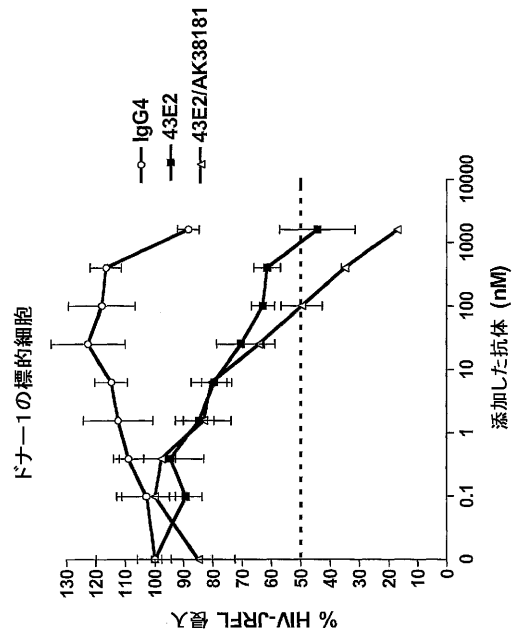


FIG. 8A

【 図 8 B 】

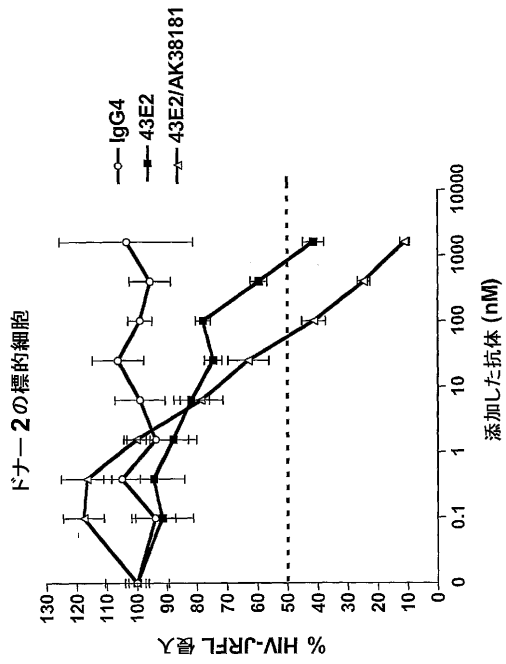


FIG. 8B

【 図 8 C 】

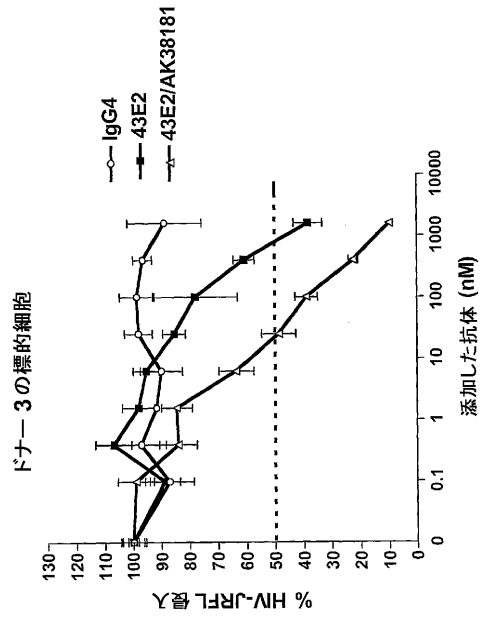


FIG. 8C

【 配列表 】

[2008507255000001.xml](#)

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成18年10月26日 (2006.10.26)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表


【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[2008507255000001.app](#)

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/08377
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C07K 16/28; C12N 15/13 US CL : 424/143.1, 144.1; 530/388.22; 536/23.53 According to International Patent Classification (IPC) of to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/143.1, 144.1; 530/388.22; 536/23.53 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,075,181 (KUCHERLAPATI et al.) 13 June 2000 (13.06.2000), see entire document.	1-13, 32, 33, 35-37, 41, 42, 51, 52
Y	VILA-CORO et al. HIV-1 Infection Through the CCR5 Receptor is Blocked by Receptor Dimerization. Proceedings of the National Academy of Science, 28 March 2000, Vol. 97, No. 7, pages 3388-3393, see entire document.	1-13, 32, 33, 35-37, 41, 42, 51, 52
Y	OLSON et al. Differential Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion, gp120 Binding, and CC-Chemokine Activity by Monoclonal Antibodies to CCR5. Journal of Virology, May 1999, Vol. 73, No. 5, pages 4145-4155, see entire document.	1-13, 32, 33, 35-37, 41, 42, 51, 52
Y	WU et al. Interaction of Chemokine Receptor CCR5 with its Ligands: Multiple Domains for HIV-1 gp120 Binding and a Single Domain for Chemokine Binding. Journal of Experimental Medicine, 20 October 1997, Vol. 186, No. 6, pages 1373-1381, see entire document.	1-13, 32, 33, 35-37, 41, 42, 51, 52
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"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 10 November 2005 (10.11.2005)		Date of mailing of the international search report 04 JAN 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer:  John D. Ulm Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/08377

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: 14-31, 34, 38-40, 43-50  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US05/08377

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
Geneseq, UniProt, PIR 79, Issued Patents, Published Applications for: SEQ ID NO:76.  
STN/Medline and WEST for: HIV, CCR5, Block?, antiod?, xenomouse.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	S
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/18 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	1 0 1
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 25/18	
	A 6 1 P 31/12	
	A 6 1 P 31/18	
	A 6 1 P 31/14	
	A 6 1 P 35/00	
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/574	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ロシュケ, ビクター

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 0, ロックビル, ランバーティナ プレイス 1 3 8 4 4

(72)発明者 ローゼン, クレイグ エー.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 8 2, レイトンズビル, ローリング ヒル レーン 2 2 4 0 0

(72)発明者 ルーベン, スティーブン エム.

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 3 3, ブルックビル, パイライト レーン 1 9 4 2

0

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA04 CA20 DA02 DA06 EA04 GA11 GA13 HA14  
4B063 QA01 QQ43 QQ53 QR32 QR48 QR51 QR62 QS25 QS33 QS34  
4B064 AG27 CA02 CA10 CA19 CC24 CD02 CD07 CD09 CD12 CD13  
CE12 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90X AA93X AB01 AB02 BA02 BA05  
BB03 BB08 BB10 BB12 BB17  
4C084 AA17 ZB332 ZC751  
4C085 AA13 AA14 BB17 BB36 CC22 DD62 EE03  
4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	人G蛋白趋化因子受体 ( CCR5 ) HDGNR 10		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008507255A</a>	公开(公告)日	2008-03-13
申请号	JP2007503099	申请日	2005-03-11
[标]申请(专利权)人(译)	人类基因科学公司		
申请(专利权)人(译)	人类Jinommu科学公司		
[标]发明人	ロシュケビクター ローゼンクレイグエー ルーベンスティーブンエム		
发明人	ロシュケ, ビクター ローゼン, クレイグ エー. ルーベン, スティーブン エム.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12Q1/68 A61K39/395 A61K45/00 A61P43/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P31/04 A61P37/06 A61P1 /04 A61P25/00 A61P25/18 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/14 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/574 C07K14/705 C07K14/715		
CPC分类号	A61P1/04 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P25/18 A61P25/28 A61P29 /00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/7158 C07K16/2866 C07K2317/21 C07K2317/52 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/30 G01N2333/715		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.B C12P21/08 C12Q1/68.A A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.N A61K39/395.S A61K39/395.T A61K45/00 A61P43/00.121 A61P29/00 A61P37/02 A61P31/04 A61P37/06 A61P29/00. 101 A61P1/04 A61P25/00.101 A61P25/18 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/14 A61P35/00 G01N33/53. D G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA43 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/GA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064 /CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CD02 4B064/CD07 4B064/CD09 4B064/CD12 4B064/CD13 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BB03 4B065 /BB08 4B065/BB10 4B065/BB12 4B065/BB17 4C084/AA17 4C084/ZB332 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB17 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/DD62 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045 /AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/552184 2004-03-12 US		
其他公开文献	JP2008507255A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及称为人G蛋白趋化因子受体 ( CCR5 ) HDGNR10的人蛋白质, 以及编码该蛋白质的分离的多核苷酸。本发明还涉及结合人G蛋白趋化因子受体 ( CCR5 ) HDGNR10的人抗体和编码这些抗体的多核苷酸。还提供了用于产生人G蛋白趋化因子受体 ( CCR5 ) HDGNR10和人抗人G蛋白趋化因子受体 ( CCR5 ) HDGNR10抗体的载体, 宿主细胞, 抗体和重组方法。本发明还涉及

用于诊断和治疗与该人蛋白质和这些人抗体相关的疾病，病症和/或病症的诊断和治疗方法。