(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2003－523744

(P2003－523744A)

(43)公表日 平成15年8月12日(2003.8.12)

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	ZNA	Ａ６１Ｋ 31/7088		２Ｇ０４５
Ａ６１Ｋ 31/7088				
39/395		39/395	Ｄ	４Ｂ０２４
			Ｎ	４Ｂ０６４
		45/00		４Ｂ０６５
45/00		48/00		４Ｃ０８４

審査請求　未請求　予備審査請求（全640数）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2001－558065(P2001－558065)

(86)(22)出願日　平成13年2月9日(2001.2.9)
(85)翻訳文提出日　平成14年8月8日(2002.8.8)
(86)国際出願番号　PCT/US01/04153
(87)国際公開番号　WO01/058916
(87)国際公開日　平成13年8月16日(2001.8.16)
(31)優先権主張番号　60/181,258
(32)優先日　平成12年2月9日(2000.2.9)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/187,999
(32)優先日　平成12年3月9日(2000.3.9)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　ヒューマン　ジノーム　サイエンシーズ，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，　キー　ウエスト　アベニュー　9410

(72)発明者　ローゼン，　クレイグ　エイ．
アメリカ合衆国　メリーランド　20882，レイトンズビル，　ローリング　ヒル　ロード　22400

(74)代理人　弁理士　山本　秀策　（外２名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＣＲ５に対する抗体

(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。

【特許請求の範囲】

【請求項１】　以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む二次抗体に、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％同一である一次抗体をコードする、単離されたポリヌクレオチド：

（ａ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｂ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｃ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｄ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｅ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｆ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｇ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｈ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｉ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｊ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｋ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ｌ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ｍ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ｎ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ｏ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ｐ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｑ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｒ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｓ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｔ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｕ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｖ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｗ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｘ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｙ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｚ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ａａ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶ

Ｌドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ａｂ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ａｃ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；および

（ａｄ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域。

【請求項２】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＨドメインを含む二次抗体に、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、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項３】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＬドメインを含む二次抗体に、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、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項４】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＨドメインおよび定常ドメインを含む二

次抗体に、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、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項５】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＬドメインおよび定常ドメインを含む二次抗体に、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、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項６】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＨドメインおよびＶＬドメインを含む二次抗体に、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、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項７】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリド

ーマ細胞株によって発現される抗体のＶＨドメインおよび定常ドメインならびにＶＬドメインおよび定常ドメインを含む二次抗体に、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、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項８】　前記定常ドメインが、ＩｇＧ定常ドメインかまたはＩｇＡ定常ドメインである、請求項４に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項９】　前記定常ドメインが、κ定常ドメインかまたはλ定常ドメインである、請求項５に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項１０】　前記一次抗体が、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、単鎖Ｆｖ、またはジスルフィド結合Ｆｖである、請求項１に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項１１】　前記一次抗体が、モノクローナル抗体である、請求項１～請求項１０のいずれか１項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項１２】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）ポリペプチドの細胞外部分に免疫特異的に結合する、請求項１～請求項１１のいずれか１項に記載の単離されたポリヌクレオチド：

（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；および

（ｄ）細胞外ループ３。

【請求項１３】　前記一次抗体がヒト抗体である、請求項１～請求項１２のいずれか１項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項１４】　前記一次抗体がヒト化抗体である、請求項１～請求項１２のいずれか１項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項１５】　前記ポリヌクレオチドが、異種ポリヌクレオチドと融合されている、請求項１～請求項１４のいずれか１項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項１６】　請求項１～請求項１５のいずれか１項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項１７】　請求項１６に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項１８】　請求項１～請求項１５のいずれか１項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、宿主細胞。

【請求項１９】　抗体を作製する方法であって、以下：

（ａ）請求項１～請求項１５のいずれか１項に記載の単離されたポリヌクレオチドによってコードされる抗体を発現させる工程；および

（ｂ）該抗体を回収する工程、

を包含する、方法。

【請求項２０】　請求項１９に記載の方法によって作製される、抗体。

【請求項２１】　以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む二次抗体に、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、単離された一次抗体：

（ａ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｂ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｃ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｄ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｅ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＨド

メインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｆ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｇ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｈ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｉ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｊ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｋ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ｌ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ｍ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ｎ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ｏ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＨドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ｐ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｑ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｒ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｓ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｔ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも１つのＣＤＲ領域；

（ｕ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｖ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｗ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｘ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｙ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも２つのＣＤＲ領域；

（ｚ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｄ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ａａ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｄ１０によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ａｂ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．４Ｃ４によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；

（ａｃ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．５Ｈ１によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域；および

（ａｄ）ハイブリドーマ細胞株ＸＦ１１．１Ｇ８によって発現される抗体のＶＬドメインの少なくとも３つのＣＤＲ領域。

【請求項２２】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＨドメインを含む二次抗体に、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、請求項２１に記載の単離された一次抗体：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項２３】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＬドメインを含む二次抗体に、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、請求項２１に記載の単離された一次抗体：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項２４】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＨドメインおよび定常ドメインを含む二次抗体に、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、請求項２１に記載の単離された一次抗体：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項２５】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＬドメインおよび定常ドメインを含む二次抗体に、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、請求項２１に記載の単離された一次抗体：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項２６】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＨドメインおよびＶＬドメインを含む二次抗体に、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、請求項２１に記載の単離された一次抗体：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項２７】　前記一次抗体が、以下からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって発現される抗体のＶＨドメインおよび定常ドメインならびにＶＬドメインおよび定常ドメインを含む二次抗体に、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、請求項２１に記載の単離された一次抗体：

（ａ）ＸＦ１１．１Ｄ８；

（ｂ）ＸＦ１１．４Ｄ１０；

（ｃ）ＸＦ１１．４Ｃ４；

（ｄ）ＸＦ１１．５Ｈ１；および

（ｅ）ＸＦ１１．１Ｇ８。

【請求項２８】　前記定常ドメインが、ＩｇG定常ドメインかまたはＩｇＡ定常ドメインである、請求項２４に記載の単離された一次抗体。

【請求項２９】　前記定常ドメインが、κ定常ドメインかまたはλ定常ドメインである、請求項２５に記載の単離された一次抗体。

【請求項３０】　前記単離された一次抗体が、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、請求項２０～請求項２９のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項３１】　前記単離された一次抗体が、以下からなる群より選択されるＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）ポリペプチドの細胞外部分に免疫特異的に結合する、請求項２０～請求項３０のいずれか１項に記載の単離された一次抗体：

（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；および

（ｄ）細胞外ループ３。

【請求項３２】　前記単離された一次抗体が、モノクローナル抗体である、請求項２０～請求項３１のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項３３】　前記単離された一次抗体が、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、単鎖Ｆｖ、またはジスルフィド結合Ｆｖである、請求項２０～請求項３２のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項３４】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-7}Ｍの解離定数（K_D）を有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項３５】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-8}Ｍの解離定数（K_D）を有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項３６】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-9}Ｍの解離定数（K_D）を有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項３７】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-10}Ｍの解離定数（K_D）を有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項３８】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-11}Ｍの解

離定数（K_D）を有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項３９】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-12}Mの解離定数（K_D）を有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項４０】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-3}／秒のオフレートを有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項４１】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-4}／秒のオフレートを有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項４２】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-5}／秒のオフレートを有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項４３】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-6}／秒のオフレートを有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項４４】　前記単離された一次抗体が、少なくとも10^{-7}／秒のオフレートを有する、請求項２０～請求項３３のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項４５】　前記単離された一次抗体が、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２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項４６】　前記単離された一次抗体が、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２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項４７】　前記単離された一次抗体が、Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）を中和する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項４８】　前記単離された一次抗体が、Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）発現細胞に結合するＨＩＶウイルスの能力を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項４９】　前記単離された一次抗体が、Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）発現細胞に感染するＨＩＶウイルスの能力を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項５０】　前記単離された一次抗体が、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の結合を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項５１】　前記単離された一次抗体が、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誘導性の走化性を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項５２】　前記単離された一次抗体が、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の結合を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項５３】　前記単離された一次抗体が、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誘導性の走化性を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項５４】　前記単離された一次抗体が、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の結合を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項５５】　前記単離された一次抗体が、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誘導性の走化性を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項５６】　前記単離された一次抗体が、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の結合を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項５７】　前記単離された一次抗体が、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誘導性の走化性を阻害する、請

求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項５８】　前記単離された一次抗体が、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の結合を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項５９】　前記単離された一次抗体が、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の走化性を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項６０】　前記単離された一次抗体が、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－１αの結合を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項６１】　前記単離された一次抗体が、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－１α誘導性の走化性を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項６２】　前記単離された一次抗体が、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－１βの結合を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項６３】　前記単離された一次抗体が、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－１β誘導性の走化性を阻害する、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項６４】　前記単離された一次抗体が、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、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項６５】　前記単離された一次抗体が、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、請求項２０～請求項４４のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項６６】　前記単離された一次抗体が、検出可能な標識と結合または結合体化されている、請求項２０～請求項６５のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項６７】　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、請求項６６に記載の単離された一次抗体。

【請求項６８】　前記単離された一次抗体が、放射線標識と結合または結合体化されている、請求項２０～請求項６５のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項６９】　前記単離された一次抗体が、治療薬剤と結合されている、請求項２０～請求項６５のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項７０】　前記治療薬剤が、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、または抗脈管形成剤である、請求項６９に記載の単離された一次抗体。

【請求項７１】　前記治療薬剤が、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、請求項６９に記載の単離された一次抗体。

【請求項７２】　前記一次抗体が、細胞毒性薬剤に結合体化されている、請求項２０～請求項６５のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項７３】　請求項２０～請求項６５のいずれか１項に記載の単離された一次抗体と、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。

【請求項７４】　薬学的に需要可能なキャリア中に含まれる、請求項２０～請求項６５のいずれか１項に記載の単離された一次抗体。

【請求項７５】　請求項２０～請求項６５のいずれか１項に記載の単離された一次抗体を発現するよう操作された細胞株。

【請求項７６】　請求項７５に記載の細胞株から発現される、単離された一次抗体。

【請求項７７】　請求項２０～請求項７４、または請求項７６のいずれか１項に記載の単離された一次抗体を動物に投与する工程を包含する、疾患または障害を処置、予防または改善する方法。

【請求項７８】　前記動物がヒトである、請求項７７に記載の方法。

【請求項７９】　前記疾患または障害が炎症に関連する、請求項７７に記載の方法。

【請求項８０】　前記疾患または障害が、免疫細胞の不完全な走化性または

異常な走化性に関連する、請求項７７に記載の方法。

【請求項８１】　前記疾患または障害が、不完全なＴ細胞－抗原提示細胞相互作用または異常なＴ細胞－抗原提示細胞相互作用に関連する、請求項７７に記載の方法。

【請求項８２】　前記疾患または障害が、感染疾患である、請求項７７に記載の方法。

【請求項８３】　前記疾患または障害が、自己免疫疾患である、請求項７７に記載の方法。

【請求項８４】　前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチである、請求項８３に記載の方法。

【請求項８５】　前記疾患または障害が、神経変性疾患である、請求項７７に記載の方法。

【請求項８６】　前記疾患または障害が、ウイルス感染である、請求項７７に記載の方法。

【請求項８７】　前記ウイルス感染が、ＨＩＶ感染である、請求項８６に記載の方法。

【請求項８８】　前記ＨＩＶ感染が、初期ＨＩＶ感染である、請求項８７に記載の方法。

【請求項８９】　前記ウイルス感染が、サイトメガロウイスル感染である、請求項８７に記載の方法。

【請求項９０】　前記ウイルス感染が、ポックスウイルス感染である、請求項８７に記載の方法。

【請求項９１】　前記疾患または障害が、ＨＩＶ感染に関連する状態である、請求項７７に記載の方法。

【請求項９２】　前記ＨＩＶ感染に関連する状態が、ニューモシスティスカリニ肺炎である、請求項９１に記載の方法。

【請求項９３】　前記ＨＩＶ感染に関連する状態が、カポージ肉腫である、請求項９１に記載の方法。

【請求項９４】　前記単離された一次抗体が、化学療法薬剤と組み合わせて

投与される、請求項７７に記載の方法。

【請求項９５】　前記単離された一次抗体が、抗レトロウイルス療法を組み合わせて投与される、請求項７７に記載の方法。

【請求項９６】　前記単離された一次抗体が、動物に予防的に投与される、請求項７７に記載の方法。

【請求項９７】　前記疾患または障害が、異常なＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）発現、Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）機能の欠損、異常なＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）リガンド発現、またはＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）リガンド機能の欠損に関連する、請求項７７に記載の方法。

【請求項９８】　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であって、以下：

（ａ）請求項２０～請求項７４、または請求項７６のいずれか１項に記載の単離された一次抗体を用いて、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を、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（例えば、正常な生物学的サンプルにおけるレベル）と比較する工程、

を包含する、方法。

【請求項９９】　癌および他の過剰増殖疾患を検出、診断、予測、またはモニターする方法であって、以下：

（ａ）請求項２０～請求項７４、または請求項７６のいずれか１項に記載の単離された一次抗体を用いて、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を、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比較する工程、

を包含する、方法。

【請求項１００】　請求項２０～請求項７４、または請求項７６のいずれか

１項に記載の単離された一次抗体を含む、キット。

【請求項１０１】　コントロール抗体を含む、請求項１００に記載のキット。

【請求項１０２】　以下からなる群より選択される配列に少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子：

（ａ）配列番号１のポリヌクレオチドフラグメント、またはＡＴＣＣ受託番号第９７１８３号に含まれるｃＤＮＡ配列のポリヌクレオチドフラグメント；

（ｂ）配列番号２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、またはＡＴＣＣ受託番号第９７１８３号に含まれるｃＤＮＡ配列；

（ｃ）配列番号２のポリペプチドドメインをコードするポリヌクレオチド、またはＡＴＣＣ受託番号第９７１８３号に含まれるｃＤＮＡ配列；

（ｄ）配列番号２のポリペプチドエピトープをコードするポリヌクレオチド、またはＡＴＣＣ受託番号第９７１８３号に含まれるｃＤＮＡ配列；

（ｅ）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、または生物学的活性を有するＡＴＣＣ受託番号第９７１８３号に含まれるｃＤＮＡ配列；

（ｆ）配列番号１の改変体であるポリヌクレオチド；

（ｇ）配列番号１の対立遺伝子改変体であるポリヌクレオチド；

（ｈ）配列番号２の種ホモログをコードするポリヌクレオチド；

（ｉ）ストリンジェントな条件下で（ａ）～（ｆ）で特定されるポリヌクレオチドのいずれか１つにハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであって、ここで、該ポリヌクレオチドが、ストリンジェントな条件下で、Ａ残基のみのヌクレオチド配列またはＴ残基のみのヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズしない、ポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

（発明の背景）

本発明は、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（ＣＣＲ５）ＨＤＧＮＲ１０（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「ＨＤＧＮＲ１０」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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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ＨＩＶ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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）はまた、ＣＣＲ５としても公知である。

【０００２】

（発明の背景）

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、ｃＡＭＰ）を含むシグナル伝達経路に関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（Ｌｅｆｋｏｗｉｔｚ，Ｎａｔｕｒｅ，３５１：３５３－３５４（１９９１））。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関与するタンパク質またはＰＧ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、ＧＰＣ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ＧＰＣレセプター（Ｋｏｂｉｌｋａ，Ｂ．Ｋ．ら，ＰＮＡＳ，８４：４６－５０（１９８７）；Ｋｏｂｉｌｋａ，Ｂ．Ｋ．ら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３８：６５０－６５６（１９

８７）；Ｂｕｎｚｏｗ，Ｊ．Ｒ．ら，Ｎａｔｕｒｅ，３３６：７８３－７８７（１９８８））、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（ａｃｔｕａｔｏｒ　ｐｒｏｔｅｉｎ）（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）（Ｓｉｍｏｎ，Ｍ．Ｉ．ら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５２：８０２－８（１９９１））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ＧＴＰの存在に依存し、そしてＧＴＰ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α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。

【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、トロンビン、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。

【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（Ｊｏｈｎｓｏｎら、Ｅｎｄｏｃ．，Ｒｅｖ．，１０：３１７－３３１（１９８９）を参照のこと）。異なるＧタンパク質のα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。

【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、αおよびβの２つのサブファミリーに分類される。α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。β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。

【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関与する。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。

【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。

【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－１α、ＭＩＰ－１β、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（Ｌｉｕら，Ｃｅｌｌ　８６：１（１９９６））。

【００１３】

近年、ＨＩＶは、世界の主要な致死性感染疾患であり、１９９９年に２６０万人の死亡者を出した。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。

【００１４】

（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】

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】

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）ポリペプチドかあるいは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。

【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、グレーヴス病、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。

【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、グレーヴス病、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。

【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、１つ以上の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。

【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。１つ以上のＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）またはそれら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れらのいずれか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ドメイン、またはＶＬ　ＣＤＲ）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、１つ以上のＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）またはそれら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、もしくはそれら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、１つ以上の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ペス

ト条約の条項に拠ってなされた。

【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。１つ以上のＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）またはそれら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　ＣＤＲ、Ｌ鎖、ＶＬドメインまたはＶＬ　ＣＤＲ）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、１つ以上のＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）またはそれら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。

【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、１つ以上の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１つ以上の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１つ以上のＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）ポリペプチドを結合する抗体を提供する。

【００２７】

本発明はさらに、Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）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、ＨＩＶ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（ＣＣＲ５）抗体は、ＨＩＶ感染および／またはＨＩＶ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（ＣＣＲ５）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、ＨＩＶ感染および／またはＨＩＶ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。

【００２８】

本発明はまた、Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）アゴニストまたはＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）アンタゴニストのいずれかとして作用する、１つ以上の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（ＣＣＲ５）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、本発明の坑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－β　ＭＩＰ－１α、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有するか、または代替的にそれらからなるｓｃＦｖｓ、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有するか、または代替的にそれらからなるｓｃＦｖｓ、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有するか、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有するか、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。

【００３２】

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有するか、または代替的にそれらからなるワクチンを提供する。

【００３３】

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。

【００３４】

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。

【００３５】

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する方法が提供される。

【００３６】

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。

【００３７】

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。

【００３８】

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。

【００３９】

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ビ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。

【００４０】

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ない。

【００４１】

（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。

【００４２】

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。

【００４３】

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。

【００４４】

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。

【００４５】

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）。

【００４６】

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。

【００４７】

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。

【００４８】

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。

【００４９】

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。

【００５０】

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。

【００５１】

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ー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。このマーカー配列は、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ー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、マーカー配列は、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））。

【００５２】

用語「遺伝子」とは、ポリペプチド鎖の生成に関与する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。

【００５３】

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テ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。

【００５４】

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関する。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関する。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、実質的に、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。

【００５５】

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。

【００５６】

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関する。

【００５７】

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。

【００５８】

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。

【００５９】

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。

【００６０】

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。

【００６１】

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もよく、または（ｉｖ）さらなる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もよく、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）であってもよい。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。

【００６２】

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。

【００６３】

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。

【００６４】

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。

【００６５】

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。

【００６６】

用語「遺伝子」とは、ポリペプチド鎖の生成に関与する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。

【００６７】

用語「単離された」とは、物質がそれの元々の環境（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。

【００６８】

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。

【００６９】

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。

【００７０】

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。

【００７１】

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。

【００７２】

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なよう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。

【００７３】

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の誘導体；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。

【００７４】

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。

【００７５】

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λ　P_L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。

【００７６】

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。

【００７７】

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。

【００７８】

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。

【００７９】

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、ｐｈａｇｅｓｃｒｉｐｔ、ｐｓｉＸ１７４、ｐｂｌｕｅｓｃｒｉｐｔ　ＳＫ、ｐｂｓｋｓ、ｐＮＨ８Ａ、ｐＮＨ１６ａ、ｐＮＨ１８Ａ、ｐＮＨ４６Ａ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）；ｐｔｒｃ９９ａ、ｐＫＫ２２３－３、ｐＫＫ２３３－３、ｐＤＲ５４０、ｐＲＩＴ５（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）。真核生物：ｐＷＬＮＥＯ、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。

【００８０】

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、λ　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。

【００８１】

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））。

【００８２】

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。

【００８３】

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。

【００８４】

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。

【００８５】

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）、ａ－因子、酸性ホスファターゼ、または熱ショックタンパ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。

【００８６】

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。

【００８７】

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　Ｂｉｏｔｅｃ、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される。

【００８８】

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。

【００８９】

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。

【００９０】

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。

【００９１】

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。

【００９２】

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。

【００９３】

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。

【００９４】

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。

【００９５】

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。

【００９６】

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。

【００９７】

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　ＷＯ９２／０１８１０に記載される。

【００９８】

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。

【００９９】

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。

【０１００】

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。

【０１０１】

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。

【０１０２】

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。

【０１０３】

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。

【０１０４】

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（ｉｎｉｔｉｔａｔｉｎｇ）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。

【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、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。

【０１０６】

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、転写に関与する遺伝子の領域と相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。

【０１０７】

正常な生物学的活性を妨げるような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。

【０１０８】

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。

【０１０９】

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。

【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。

【０１１１】

この化合物は、適した薬学的キャリアと組み合わせて用いられ得る。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。

【０１１２】

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。

【０１１３】

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１０μｇ／ｋｇ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８ｍｇ／ｋｇ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１０μｇ／ｋｇから約１ｍｇ／ｋｇ体重である。

【０１１４】

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。

【０１１５】

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。

【０１１６】

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。

【０１１７】

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。

【０１１８】

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、ｐｏｌ　ＩＩＩ、およびβ－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。

【０１１９】

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；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（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。

【０１２０】

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　Ｔｈｅａｐｙ、１：５～１４（１９９０）にて記載されるようなＰＥ５０１、ＰＡ３１７、Ψ－２、Ψ－ＡＭ、ＰＡ１２、Ｔ１９－１４Ｘ、ＶＴ－１９－１７－Ｈ２、ΨＣＲＥ、ΨＣＲＩＰ、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$CaPO_4$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、または脂質に結合させて、次いで宿主に投与し得る

。

【０１２１】

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。

【０１２２】

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。

【０１２３】

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。

【０１２４】

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学的遮断の後に同様の挙動が現れるレセプターを同定することによって同定され得る。

【０１２５】

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、この遺伝子のコード領域を単離することを含む。本発明の遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識されたオリゴヌクレオチドが使用され、ライブラリーのメンバーがプローブにハイブリダイズすることを決定するために、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する。

【０１２６】

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ける比色定量アッセイ、ＭａｃＣｏｎｋｅｙプレートでの発現、相補性実験）における発現のための適切なベクターに変異レセプター遺伝子を挿入し得る。一旦「変異」遺伝子が同定されると、次いで、その「変異」レセプター遺伝子のキャリアについての集団をスクリーニングし得る。

【０１２７】

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（Ｓａｉｋｉら、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。

【０１２８】

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。

【０１２９】

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、Ｃｏｔｔｏｎら、ＰＮＡＳ、８５：４３９７－４４０１（１９８５））。

【０１３０】

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。

【０１３１】

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。

【０１３２】

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に含む。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。

【０１３３】

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の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相関づけることにおいて重要な第一段階である。

【０１３４】

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。

【０１３５】

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。

【０１３６】

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）。

【０１３７】

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。

【０１３８】

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。

【０１３９】

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２０ｋｂあたり１遺伝子と仮定する）。

【０１４０】

ポリペプチド、それらのフラグメントまたは他の誘導体、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。

【０１４１】

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。

【０１４２】

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（１９

８３））、およびヒトモノクロナール抗体を産生する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。

【０１４３】

単鎖抗体の産生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。

【０１４４】

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。

【０１４５】

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。

【０１４６】

「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。

【０１４７】

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１μｇのプラスミドまたはＤＮＡフラグメントを、約２０μｌ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、５～５０μｇ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。

【０１４８】

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。

【０１４９】

「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。

【０１５０】

「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０．５μｇ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る。

【０１５１】

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

【０１５２】

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、およびブロットへ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。

【０１５３】

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。

【０１５４】

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。

【０１５５】

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、３００ｋｂ未満、２００ｋｂ未満、１００ｋｂ未満、５０ｋｂ未満、１５ｋｂ未満、１０ｋｂ未満、７．５ｋｂ未満、５ｋｂ未満、２．５ｋｂ未満、２．０ｋｂ未満、または１ｋｂ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。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。

【０１５６】

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。

【０１５７】

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、ストリンジェント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。「ストリンジェント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℃での一晩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。

【０１５８】

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ェ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ェンシーを生じる）；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ェンシー条件は、６×ＳＳＰＥ（２０×ＳＳＰＥ＝3Ｍ ＮａＣｌ；０．２Ｍ NaH_2PO_4；０．０２Ｍ ＥＤＴＡ、ｐＨ７．４）、０．５％ ＳＤＳ、３０％ホルムアミド、１００μｇ／ｍｌサケ精子ブロッキング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ェンシーを達成するために、ストリンジェント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。

【０１５９】

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ブ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。代表的なブロッキング試薬としては、デンハルト試薬、ＢＬＯＴＴＯ、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。特異的ブ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。

【０１６０】

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。

【０１６１】

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。

【０１６２】

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（ｐｈｏｓｐｈｏｔｉｄｙｌｉｎｏｓｉｔｏｌ）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、γ－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）；Ｓｅｉｆｔｅｒら、Ｍｅｔｈ Ｅｎｚｙｍｏｌ １８２：６２６－６４６（１９９０）；Ｒａｔｔａｎら, Ａｎｎ ＮＹ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ６６３：４８－６２（１９９２）を参照のこと）。

【０１６３】

「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。

【０１６４】

「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、用量依存性を伴なってもまたは伴なわなくても、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）。

【０１６５】

（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。

【０１６６】

引き続く発現分析もまた、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。

【０１６７】

（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。

【０１６８】

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。

【０１６９】

（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）、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」、細胞外「部分」、および細胞内「部分」）。

【０１７０】

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。

【０１７１】

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。

【０１７２】

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。

【０１７３】

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。

【０１７４】

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。

【０１７５】

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。

【０１７６】

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。

【０１７７】

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。

【０１７８】

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。

【０１７９】

（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。

【０１８０】

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。

【０１８１】

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。

【０１８２】

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。

【０１８３】

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ープログラム（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ー予測の一部として、ＭｃＧｅｏｃｈおよびｖｏｎ　Ｈｅｉｎｊｅの方法が援用される。

【０１８４】

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。

【０１８５】

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。

【０１８６】

（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。

【０１８７】

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。

【０１８８】

「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。

【０１８９】

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。

【０１９０】

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。

【０１９１】

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。

【０１９２】

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ーは：Ｍａｔｒｉｘ＝Ｕｎｉｔａｒｙ、ｋ－ｔｕｐｌｅ＝４、Ｍｉｓｍａｔｃｈ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝１、Ｊｏｉｎｉｎｇ　Ｐｅｎａｌｔｙ＝３０、Ｒａｎｄ

ｏｍｉｚａｔｉｏｎ 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。

【０１９３】

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、特定のパラメーターを用いて上記の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。

【０１９４】

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個の不対合塩基は、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。

【０１９５】

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（ｉｎｄｅｌｓ））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。

【０１９６】

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ー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。ＦＡＳ

ＴＤＢアミノ酸整列に用いられる好ましいパラメーターは：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。

【０１９７】

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ー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。

【０１９８】

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個の不対合残基は、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。

【０１９９】

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至適化する（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。

【０２００】

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１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。

【０２０１】

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γ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））。

【０２０２】

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。

【０２０３】

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。

【０２０４】

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。

【０２０５】

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　Ｃｈｒｏ

ｍｏｓｏｍｅｓ：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。

【０２０６】

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）および可溶生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、ポリペプチドを発現する細胞を誘導するポリペプチド（例えば、遊離しているかまたは細胞表面に発現している同族のリガンド）の能力を決定することによって測定され得る。

【０２０７】

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、妥当な数がまた、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が、当該分野でさらに認識される。これは、下記にさらに記載されるように、タンパク質の機能にあまり影響しないかまたは有意には影響しそうにないかのいずれかであるアミノ酸置換（例えば、１つの脂肪族アミノ酸を第２の脂肪族アミノ酸で置換すること）を当業者が完全に承知しているからである。

【０２０８】

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、Ｂｏｗｉｅ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。

【０２０９】

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。

【０２１０】

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ャニング変異誘発（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。

【０２１１】

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かを示す。例えば、最も埋もれている（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。

【０２１２】

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Ｌ８１；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ８２；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ８３；W，またはYで置換されたＦ８５；F，またはYで置換されたＷ８６；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ８７；K，またはRで置換されたＨ８８；F，またはWで置換されたＹ８９；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換された；Ａ９１G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ９０；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ９２；Nで置換されたＱ９３；F，またはYで置換されたＷ９４；Eで置換されたＤ９５；W，またはYで置換されたＦ９６；A，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＧ９７；Qで置換されたＮ９８；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ９９；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはVで置換されたＭ１００；Nで置換されたＱ１０２；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ１０３；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ１０４；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ１０５；A，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＧ１０６；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ１０７；F，またはWで置換されたＹ１０８；W，またはYで置換されたＦ１０９；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ１１０；A，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＧ１１１；W，またはYで置換されたＦ１１２；W，またはYで置換されたＦ１１３；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｔ，M，またはVで置換されたＳ１１４；A，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＧ１１５；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ１１６；W，またはYで置換されたＦ１１７；W，またはYで置換されたＦ１１８；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ１１９；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換され

たＩ１２０；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ１２１；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ１２２；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ１２３；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ１２４；Eで置換されたＤ１２５；H，またはKで置換されたＲ１２６；F，またはWで置換されたＹ１２７；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ１２８；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ１２９；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ１３０；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ１３１；K，またはRで置換されたＨ１３２；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ１３３；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ１３４；W，またはYで置換されたＦ１３５；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ１３６；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ１３７；H，またはRで置換されたＫ１３８；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ１３９；H，またはKで置換されたＲ１４０；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ１４１；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ１４２；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ１４３；W，またはYで置換されたＦ１４４；A，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＧ１４５；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ１４６；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ１４７；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ１４８；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｔ，M，またはVで置換されたＳ１４９；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ１５０；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ１５１；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ１５２；F，またはYで置換されたＷ１５３；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ１５４；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ１５５；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ１５６；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ１５７；W，またはYで置換されたＦ１５８；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ１５９；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｔ，M，またはVで置換されたＳ１６０；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ１６１；A，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＧ１６３；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ

，M，またはVで置換されたＩ１６４；A，G，L，S，T，M，またはVで置換されたＩ１６５；W，またはYで置換されたＦ１６６；A，G，Ｉ，L，S，M，またはVで置換されたＴ１６７；H，またはKで置換されたＲ１６８；A，G，Ｉ，L，T，M，またはVで置換されたＳ１６９；Nで置換されたＱ１７０；H，またはRで置換されたＫ１７１；Dで置換されたＥ１７２；A，Ｉ，L，S，T，M，またはVで置換されたＧ１７３；A，G，Ｉ，S，T，M，またはVで置換されたＬ１７４；K，またはRで置換されたＨ１７５；F，またはWで置換されたＹ１７６；A，G，Ｉ，L，S，M，またはVで置換されたＴ１７７；A，G，Ｉ，L，T，M，またはVで置換されたＳ１７９；A，G，Ｉ，L，T，M，またはVで置換されたＳ１８０；K，またはRで置換されたＨ１８１；W，またはYで置換されたＦ１８２；F，またはWで置換されたＹ１８４；A，G，Ｉ，L，T，M，またはVで置換されたＳ１８５；Nで置換されたＱ１８６；F，またはWで置換されたＹ１８７；Nで置換されたＱ１８８；W，またはYで置換されたＦ１８９；F，またはYで置換されたＷ１９０；H，またはRで置換されたＫ１９１；Qで置換されたＮ１９２；W，またはYで置換されたＦ１９３；Nで置換されたＱ１９４；A，G，Ｉ，L，S，M，またはVで置換されたＴ１９５；A，G，Ｉ，S，T，M，またはVで置換されたＬ１９６；H，またはRで置換されたＫ１９７；A，G，L，S，T，M，またはVで置換されたＩ１９８；A，G，Ｉ，L，S，T，またはMで置換されたＶ１９９；A，G，L，S，T，M，またはVで置換されたＩ２００；A，G，Ｉ，S，T，M，またはVで置換されたＬ２０１；A，Ｉ，L，S，T，M，またはVで置換されたＧ２０２；A，G，Ｉ，S，T，M，またはVで置換されたＬ２０３；A，G，Ｉ，L，S，T，またはMで置換されたＶ２０４；A，G，Ｉ，S，T，M，またはVで置換されたＬ２０５；A，G，Ｉ，S，T，M，またはVで置換されたＬ２０７；A，G，Ｉ，S，T，M，またはVで置換されたＬ２０８；A，G，Ｉ，L，S，T，またはMで置換されたＶ２０９；A，G，Ｉ，L，S，T，またはVで置換されたＭ２１０；A，G，Ｉ，L，S，T，またはMで置換されたＶ２１１；A，G，L，S，T，M，またはVで置換されたＩ２１２；F，またはWで置換されたＹ２１４；A，G，Ｉ，L，T，M，またはVで置換されたＳ２

１５；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ２１６；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２１７；Ｌ２１８Ａ，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Ｋ２１９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ２２０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２２１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２２２；Ｈ，またはＫで置換されたＲ２２３；Ｈ，またはＫで置換されたＲ２２５；Ｑで置換されたＮ２２６；Ｄで置換されたＥ２２７；Ｈ，またはＲで置換されたＫ２２８；Ｈ，またはＲで置換されたＫ２２９；Ｈ，またはＫで置換されたＲ２３０；Ｋ，またはＲで置換されたＨ２３１；Ｈ，またはＫで置換されたＲ２３２；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ２３３；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ２３４；Ｈ，またはＫで置換されたＲ２３５；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２３６；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２３７；Ｗ，またはＹで置換されたＦ２３８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ２３９；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２４０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＶで置換されたＭ２４１；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２４２；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ２４３；Ｆ，またはＷで置換されたＹ２４４；Ｗ，またはＹで置換されたＦ２４５；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２４６；Ｗ，またはＹで置換されたＦ２４７；Ｆ，またはＹで置換されたＷ２４８；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ２４９；Ｆ，またはＷで置換されたＹ２５１；Ｑで置換されたＮ２５２；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２５３；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ２５４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２５５；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２５６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２５７；Ｑで置換されたＮ２５８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ２５９；Ｗ，またはＹで置換されたＦ２６０；Ｎで置換されたＱ２６１；Ｄで置換されたＥ２６２；Ｗ，またはＹで置換されたＦ２６３；Ｗ，またはＹで置換されたＦ２６４；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ２６５；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，または

Ｖで置換されたＬ２６６；Ｑで置換されたＮ２６７；Ｑで置換されたＮ２６８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ２７０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ２７１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ２７２；Ｑで置換されたＮ２７３；Ｈ，またはＫで置換されたＲ２７４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２７５；Ｅで置換されたＤ２７６；Ｎで置換されたＱ２７７；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ２７８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＶで置換されたＭ２７９；Ｎで置換されたＱ２８０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ２８１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ２８２；Ｄで置換されたＥ２８３；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ２８４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２８５；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ２８６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＶで置換されたＭ２８７；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ２８８；Ｋ，またはＲで置換されたＨ２８９；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２９２；Ｑで置換されたＮ２９３；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２９５；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２９６；Ｆ，またはＷで置換されたＹ２９７；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ２９８；Ｗ，またはＹで置換されたＦ２９９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ３００；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ３０１；Ｄで置換されたＥ３０２；Ｈ，またはＲで置換されたＫ３０３；Ｗ，またはＹで置換されたＦ３０４；Ｈ，またはＫで置換されたＲ３０５；Ｑで置換されたＮ３０６；Ｆ，またはＷで置換されたＹ３０７；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ３０８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ３０９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ３１０；Ｗ，またはＹで置換されたＦ３１１；Ｗ，またはＹで置換されたＦ３１２；Ｎで置換されたＱ３１３；Ｈ，またはＲで置換されたＫ３１４；Ｋ，またはＲで置換されたＨ３１５；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ３１６；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ３１７；Ｈ，またはＲで置換されたＫ３１８；Ｈ，またはＫで置換されたＲ３１９；Ｗ，またはＹで置換されたＦ３

２０；H，またはRで置換されたＫ３２２；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ３２５；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ３２６；W，またはＹで置換されたＦ３２７；Ｎで置換されたＱ３２８；Ｎで置換されたＱ３２９；Ｄで置換されたＥ３３０；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ３３１；Ｄで置換されたＥ３３３；H，またはＫで置換されたＲ３３４；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ３３５；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ３３６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ３３７；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ３３８；Ｆ，またはＷで置換されたＹ３３９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ３４０；H，またはＫで置換されたＲ３４１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ３４２；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ３４３；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ３４４；Ｄで置換されたＥ３４５；Ｎで置換されたＱ３４６；Ｄで置換されたＥ３４７；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ３４８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ３４９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ３５０；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ３５１；および／あるいはＡ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ３５２。

【０２１３】

寄託されたＨＤＧＮＲ１０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（ＣＣＲ５）（配列番号２２）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；Ｓ７Ａ，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；Ｎで置換されたＱ２１；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；Ｑ２７Ｎで置換されたＫ２６；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；Ｈ，またはＲで置換されたＫ５９；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；Ｈ，またはＲで置換されたＫ６２；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Ｌ８１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ８２；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ８３；Ｗ，またはＹで置換されたＦ８５；Ｆ，またはＹで置換されたＷ８６；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ８７；Ｋ，またはＲで置換されたＨ８８；Ｆ，またはＷで置換されたＹ８９；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ９０；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ９１；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ９２；Ｎで置換されたＱ９３；Ｆ，またはＹで置換されたＷ９４；Ｅで置換されたＤ９５；Ｗ，またはＹで置換されたＦ９６；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ９７；Ｑで置換されたＮ９８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ９９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＶで置換されたＭ１００；Ｎで置換されたＱ１０２；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ１０３；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ１０４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ１０５；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ１０６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ１０７；Ｆ，またはＷで置換されたＹ１０８；Ｗ，またはＹで置換されたＦ１０９；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ１１０；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ１１１；Ｗ，またはＹで置換されたＦ１１２；Ｗ，またはＹで置換されたＦ１１３；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ１１４；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ１１５；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ１１６；Ｗ，またはＹで置換されたＦ１１７；Ｗ，またはＹで置換されたＦ１１８；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ１１９；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ１２０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換され

たＬ１２１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ１２２；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ１２３；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ１２４；Ｅで置換されたＤ１２５；Ｈ，またはＫで置換されたＲ１２６；Ｆ，またはＷで置換されたＹ１２７；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ１２８；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ１２９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ１３０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ１３１；Ｋ，またはＲで置換されたＨ１３２；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ１３３；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ１３４；Ｗ，またはＹで置換されたＦ１３５；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ１３６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ１３７；Ｈ，またはＲで置換されたＫ１３８；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ１３９；Ｈ，またはＫで置換されたＲ１４０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ１４１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ１４２；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ１４３；Ｗ，またはＹで置換されたＦ１４４；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ１４５；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ１４６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ１４７；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ１４８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ１４９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ１５０；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ１５１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ１５２；Ｆ，またはＹで置換されたＷ１５３；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ１５４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ１５５；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ１５６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ１５７；Ｗ，またはＹで置換されたＦ１５８；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ１５９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ１６０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ１６１；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ１６３；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ１６４；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ

，M，またはVで置換されたＩ１６５；W，またはYで置換されたＦ１６６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ１６７；H，またはKで置換されたＲ１６８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，M，またはVで置換されたＳ１６９；Nで置換されたＱ１７０；H，またはRで置換されたＫ１７１；Dで置換されたＥ１７２；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＧ１７３；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ１７４；K，またはRで置換されたＨ１７５；F，またはWで置換されたＹ１７６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ１７７；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，M，またはVで置換されたＳ１７９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，M，またはVで置換されたＳ１８０；K，またはRで置換されたＨ１８１；W，またはYで置換されたＦ１８２；F，またはWで置換されたＹ１８４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，M，またはVで置換されたＳ１８５；Nで置換されたＱ１８６；F，またはWで置換されたＹ１８７；Nで置換されたＱ１８８；W，またはYで置換されたＦ１８９；F，またはYで置換されたＷ１９０；H，またはRで置換されたＫ１９１；Qで置換されたＮ１９２；W，またはYで置換されたＦ１９３；Nで置換されたＱ１９４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ１９５；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ１９６；H，またはRで置換されたＫ１９７；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ１９８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ１９９；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ２００；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２０１；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＧ２０２；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２０３；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ２０４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２０５；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２０７；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２０８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ２０９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはVで置換されたM２１０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ２１１；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ２１２；F，またはWで置換されたＹ２１４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，M，またはVで置換されたＳ２１５；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＧ２

１６；A，G，L，S，T，M，またはVで置換されたＩ２１７；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２１８；H，またはRで置換されたＫ２１９；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ２２０；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２２１；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２２２；H，またはKで置換されたＲ２２３；H，またはKで置換されたＲ２２５；Qで置換されたＮ２２６；Dで置換されたＥ２２７；H，またはRで置換されたＫ２２８；H，またはRで置換されたＫ２２９；H，またはKで置換されたＲ２３０；K，またはRで置換されたＨ２３１；H，またはKで置換されたＲ２３２；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ２３３；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ２３４；H，またはKで置換されたＲ２３５；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２３６；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ２３７；W，またはYで置換されたＦ２３８；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ２３９；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ２４０；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはVで置換されたＭ２４１；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ２４２；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ２４３；F，またはWで置換されたＹ２４４；W，またはYで置換されたＦ２４５；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２４６；W，またはYで置換されたＦ２４７；F，またはYで置換されたＷ２４８；G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＡ２４９；F，またはWで置換されたＹ２５１；Qで置換されたＮ２５２；A，G，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＩ２５３；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはMで置換されたＶ２５４；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２５５；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２５６；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２５７；Qで置換されたＮ２５８；A，G，Ｉ，Ｌ，Ｓ，M，またはVで置換されたＴ２５９；W，またはYで置換されたＦ２６０；Nで置換されたＱ２６１；Dで置換されたＥ２６２；W，またはYで置換されたＦ２６３；W，またはYで置換されたＦ２６４；A，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＧ２６５；A，G，Ｉ，Ｓ，Ｔ，M，またはVで置換されたＬ２６６；Qで置換されたＮ２６７；Qで置

換されたＮ２６８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ２７０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ２７１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ２７２；Ｑで置換されたＮ２７３；Ｈ，またはＫで置換されたＲ２７４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２７５；Ｅで置換されたＤ２７６；Ｎで置換されたＱ２７７；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ２７８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＶで置換されたＭ２７９；Ｎで置換されたＱ２８０；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ２８１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ２８２；Ｄで置換されたＥ２８３；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ２８４；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ２８５；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ２８６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＶで置換されたＭ２８７；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ２８８；Ｋ，またはＲで置換されたＨ２８９；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２９２；Ｑで置換されたＮ２９３；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２９５；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ２９６；Ｆ，またはＷで置換されたＹ２９７；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ２９８；Ｗ，またはＹで置換されたＦ２９９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ３００；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ３０１；Ｄで置換されたＥ３０２；Ｈ，またはＲで置換されたＫ３０３；Ｗ，またはＹで置換されたＦ３０４；Ｈ，またはＫで置換されたＲ３０５；Ｑで置換されたＮ３０６；Ｆ，またはＷで置換されたＹ３０７；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ３０８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ３０９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ３１０；Ｗ，またはＹで置換されたＦ３１１；Ｗ，またはＹで置換されたＦ３１２；Ｎで置換されたＱ３１３；Ｈ，またはＲで置換されたＫ３１４；Ｋ，またはＲで置換されたＨ３１５；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ３１６；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ３１７；Ｈ，またはＲで置換されたＫ３１８；Ｈ，またはＫで置換されたＲ３１９；Ｗ，またはＹで置換されたＦ３２０；Ｈ，またはＲで置換されたＫ３２２；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ

，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ３２５；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ３２６；Ｗ，またはＹで置換されたＦ３２７；Ｎで置換されたＱ３２８；Ｎで置換されたＱ３２９；Ｄで置換されたＥ３３０；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ３３１；Ｄで置換されたＥ３３３；Ｈ，またはＫで置換されたＲ３３４；Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＡ３３５；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ３３６；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ３３７；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ３３８；Ｆ，またはＷで置換されたＹ３３９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ３４０；Ｈ，またはＫで置換されたＲ３４１；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ３４２；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｍ，またはＶで置換されたＴ３４３；Ｄで置換されたＥ３４４；Ｅ３４５Ｄで置換された；Ｎで置換されたＱ３４６；Ｄで置換されたＥ３４７；Ａ，Ｇ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＩ３４８；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＳ３４９；Ａ，Ｇ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，またはＭで置換されたＶ３５０；Ａ，Ｉ，Ｌ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＧ３５１；および／あるいはＡ，Ｇ，Ｉ，Ｓ，Ｔ，Ｍ，またはＶで置換されたＬ３５２。

【０２１４】

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。

【０２１５】

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。

【０２１６】

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。（Ｐｉｎｃｋａｒｄら，Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：３３１－３４０（１９６７）；Ｒｏｂｂｉｎｓら，Ｄｉａｂｅｔｅｓ　３６：８３８－８４５（１９８７）；Ｃｌｅｌａｎｄら，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ｄｒｕｇ　Ｃａｒｒｉｅｒ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　１０：３０７－３７７（１９９３））。

【０２１７】

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、またはC）；Ｌ３９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ４０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ４１（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）；Ｉ４２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC；Ｆ４３（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）；Ｇ４４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ４５（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）；Ｖ４６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｇ４７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｎ４８（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）；Ｍ４９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ５０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ５１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ５２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、

W、Y、P、またはC）；Ｌ５３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ５４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ５５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ５６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｎ５７（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）；Ｃ５８（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）；Ｑ５９（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）；Ｒ６０（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）；Ｌ６１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｅ６２（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）；Ｓ６３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｍ６４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｔ６５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｄ６６（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）；Ｉ６７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｙ６８（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）；Ｌ６９（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）；Ａ９０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ａ９１（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）；Ｆ９６（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）；Q１０２（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）；GL１１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；F１１２（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）；F１１３（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）；S１１４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；GL１５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；I１１６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；F１１７（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）；F１１８（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）；１１１９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；I１１２０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、

W、Y、P、またはC）；Ｌ１２１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ１２２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｔ１２３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１２４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｄ１２５（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）；Ｒ１２６（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）；Ｙ１２７（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）；Ｌ１２８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ａ１２９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１３０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１３１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｈ１３２（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）；Ａ１３３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１３４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ１３５（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）；Ａ１３６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ１３７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｋ１３８（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）；Ａ１３９　（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｒ１４０（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）；Ｔ１４１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１４２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｔ１４３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P

、またはC）；Ｆ１４４（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）；Ｇ１４５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１４６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１４７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｔ１４８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｓ１４９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１５０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１５１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｔ１５２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｗ１５３（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）；Ｖ１５４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１５５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ａ１５６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、Ｆ９　W、Y、P、またはC）；Ｖ１５７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ１５８（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）；Ａ１５９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｓ１６０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ１６１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｐ１６２（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）；Ｇ１６３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１６４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１６５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ１６６（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）；Ｔ１６７（以下と置換された：D、

Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｒ１６８（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）；Ｓ１６９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｑ１７０（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）；Ｋ１７１（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）；Ｅ１７２（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）；Ｇ１７３（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ１７４（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｈ１７５（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）；Ｙ１７６（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）；Ｔ１７７（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｃ１７８　（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）；Ｓ１７９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｓ　１８０（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｈ１８１（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）；Ｆ１８２（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）；Ｐ１８３　（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）；Ｙ１８４（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）；Ｓ１８５（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｑ１８６（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）；Ｙ１８７（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）；Ｑ１８８（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）；Ｆ１８９（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）；Ｗ１９０（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）；Ｋ１９１（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）；Ｎ１９２（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）；Ｆ１９３（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）；Ｑ１９４（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）；Ｔ１９５（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ１９６（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｋ１９７（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）；Ｉ１９８（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；ＶＵ　９９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｉ２００（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ２０１（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｇ２０２（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ２０３（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｖ２０４（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ２０５（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｐ２０６（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）；Ｌ２０７（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ２０８（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｖ２０９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｍ２１０（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｖ２１１（以下と

置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ２１２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｃ２１３（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）；Ｙ２１４（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）；Ｓ２１５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｇ２１６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；１２１７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２１８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｋ２１９（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）；Ｔ２２０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２２１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２２２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｒ２２３（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）；Ｃ２２４（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）；Ｒ２２５（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）；Ｎ２２６（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）；Ｅ２２７（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）；Ｋ２２８（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）；Ｋ２２９（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）；Ｒ２３０（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）；Ｈ２３１（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）；Ｒ２３２（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）；Ａ２３３（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｖ２３４　（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｒ２３５（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）；Ｌ２３６（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｉ２３７（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｆ２３８（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）；Ｔ２３９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｉ２４０（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｍ２４１（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｉ２４２（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｖ２４３（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｙ２４４（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）；Ｆ２４５（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）；Ｌ２４６（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｆ２４７（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）；Ｗ２４８（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）；Ａ２４９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｐ２５０（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）；Ｙ２５１　（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）；Ｎ２５２（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）；１２５３（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｖ２５４（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ２５５（以下と

置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２５６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２５７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｎ２５８（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）；Ｔ２５９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ２６０（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）；Ｑ２６１（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）；Ｅ２６２（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）；Ｆ２６３（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）；Ｆ２６４（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）；Ｇ２６５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２６６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｎ２６７（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）；Ｎ２６８（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）；Ｃ２６９（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）；Ｓ２７０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｓ２７１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｓ２７２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｎ２７３（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）；Ｒ２７４（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）；Ｌ２７５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｄ２７６（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）；Ｑ２７７（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）；Ａ２７８（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｍ２７９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｑ２８０　（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）；Ｖ２８１（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｔ２８２（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｅ２８３（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）；Ｔ２８４（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ２８５（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｇ２８６（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｍ２８７（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｔ２８８（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｈ２８９（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）；Ｃ２９０（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）；Ｃ２９１（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）；Ｉ２９２（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｎ２９３（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）；Ｐ２９４（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）；Ｉ２９５（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｉ２９６（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｙ２９７（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、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｓ３３７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ３３８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｙ３３９（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）；Ｔ３４０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｒ３４１（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）；Ｓ３４２（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｔ３４３（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｇ３４４（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｅ３４５（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）；Ｑ３４６（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）；Ｅ３４７（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）；Ｉ３４８（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｓ３４９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｖ３５０（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｇ３５１（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Ｌ３５２（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ。

【０２１８】

ＨＤＧＮＲ１０が寄託された（ｄｅｐｏｓｉｔｅｄ）クローン（配列番号２２）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（ＣＣＲ５）の保存的置換には以下が挙げられる：ＭＩ（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、Ｋ、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、Ｔ、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）；Ｑ２１（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）；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、またはＣ）；Ｌ３９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｖ４０（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｆ４１（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）；Ｉ４２（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｆ４３（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）；Ｇ４４（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｆ４５（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）；Ｖ４６（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｇ４７（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｎ４８（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）；Ｍ４９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ５０（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｖ５１（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｉ５２（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ５３（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；１５４（以下と置換さ

れた：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ５５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ５６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｎ５７（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）；Ｃ５８（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）；Ｋ５９（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）；Ｒ６０（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）；Ｌ６１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｋ６２（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）；Ｓ６３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｍ６４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｔ６５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｄ６６（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）；Ｉ６７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｙ６８（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）；Ｌ６９（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）；Ａ９０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ａ９１（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）；Ｆ９６（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、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ１１２（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）；Ｆ１１３（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）；Ｓ１１４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｇ１１５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１１６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ１１７（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）；Ｆ１１８（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）；Ｉ１１９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１２０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ１２１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ１２２（以下と置換され

た：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｔ１２３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１２４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｄ１２５（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）；Ｒ１２６（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）；Ｙ１２７（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）；Ｌ１２８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ａ１２９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１３０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１３１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｈ１３２（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）；Ａ１３３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１３４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ１３５（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）；Ａ１３６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ１３７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｋ１３８（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）；Ａ１３９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｒ１４０（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）；Ｔ１４１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１４２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｔ１４３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ１４４（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）；Ｇ１４５（以下と

置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１４６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１４７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｔ１４８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｓ１４９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１５０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１５１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｔ１５２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｗ１５３（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）；Ｖ１５４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１５５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ａ１５６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１５７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ１５８（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）；Ａ１５９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｓ１６０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ１６１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｐ１６２（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）；Ｇ１６３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１６４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ１６５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ１６６（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）；Ｔ１６７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｒ１６８（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）；Ｓ１６９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｑ１７０（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）；Ｋ１７１（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）；Ｅ１７２（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）；Ｇ１７３（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｌ１７４（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｈ１７５（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）；Ｙ１７６（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）；Ｔ１７７（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｃ１７８（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）；Ｓ１７９（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｓ１８０（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｈ１８１（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）；Ｆ１８２（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）；Ｐ１８３（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）；Ｙ１８４（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）；Ｓ１８５（以下と置換された：Ｄ、Ｅ、Ｈ、Ｋ、Ｒ、Ｎ、Ｑ、Ｆ、Ｗ、Ｙ、Ｐ、またはＣ）；Ｑ１８６（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）；Ｙ１８７（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）；Ｑ１８８（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）；Ｆ１８９（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）；Ｗ１９０（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）；Ｋ１９１（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）；Ｎ１９２（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）；Ｆ１９３（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）；Ｑ１９４（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）；Ｔ１９５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ１９６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｋ１９７（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）；Ｉ１９８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ１９９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；１２００（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２０１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｇ２０２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２０３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ２０４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２０５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｐ２０６（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）；Ｌ２０７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２０８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ２０９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｍ２１０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ２１１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ２１２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また

はC）；Ｃ２１３（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）；Ｙ２１４（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）；Ｓ２１５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｇ２１６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ２１７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２１８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｋ２１９（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）；Ｔ２２０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２２１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２２２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｒ２２３（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）；Ｃ２２４（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）；Ｒ２２５（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）；Ｎ２２６　（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）；Ｅ２２７（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）；Ｋ２２８（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）；Ｋ２２９（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）；Ｒ２３０（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）；Ｈ２３１（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）；Ｒ２３２（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）；Ａ２３３　（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ２３４（以下と置換された：

D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｒ２３５（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）；Ｌ２３６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ２３７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ２３８（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）；Ｔ２３９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｉ２４０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｍ２４１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；１２４２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ２４３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｙ２４４（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）；Ｆ２４５（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）；Ｌ２４６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ２４７（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）；Ｗ２４８（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）；Ａ２４９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｐ２５０（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）；Ｙ２５１（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）；Ｎ２５２（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）；Ｉ２５３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ２５４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２５５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２５６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、また

はC）；Ｌ２５７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｎ２５８（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）；Ｔ２５９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｆ２６０（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）；Ｑ２６１（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）；Ｅ２６２（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）；Ｆ２６３（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）；Ｆ２６４（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）；Ｇ２６５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｌ２６６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｎ２６７（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）；Ｎ２６８（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）；Ｃ２６９（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）；Ｓ２７０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｓ２７１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｓ２７２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｎ２７３（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）；Ｒ２７４（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）；Ｌ２７５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｄ２７６（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）；Ｑ２７７（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）；Ａ２７８（以下と

置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；M２７９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Q２８０（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）；V２８１（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；T２８２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；E２８３（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）；T２８４（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；L２８５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；G２８６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；M２８７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；T２８８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；H２８９（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）；C２９０（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）；C２９１（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）；I２９２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；N２９３（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）；P２９４（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）；I２９５（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；I２９６（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Y２９７（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、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；S３３７（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；V３３８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Y３３９（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）；T３４０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；R３４１（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）；S３４２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；T３

４３（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｅ３４４（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）；Ｅ３４５（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）；Ｑ３４６（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）；Ｅ３４７（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）；Ｉ３４８（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｓ３４９（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｖ３５０（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）；Ｇ３５１（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Ｌ３５２（以下と置換された：D、E、H、K、R、N、Q、F、W、Y、P、またはC）。

【０２１９】

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。

【０２２０】

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。

【０２２１】

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。

【０２２２】

（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。

【０２２３】

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ＨＤＧＮＲ１０ＤＮＡ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ＨＤＧＮＲ１０ＤＮＡ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。

【０２２４】

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、およびそう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。

【０２２５】

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、。

【０２２６】

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。

【０２２７】

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－ｌｌ～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；Ｖ２５～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；Ｌ３６～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；Ｇ４７～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；Ｌ６９～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；Ｌ８０～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－８

８～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～Ｌ３５２；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；１－１１９～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－３５２；Ｖ－１５４～Ｌ－３５２；Ｖ－１５５～Ｌ－３５２；Ａ－１５６～Ｌ－３５２；Ｖ－１５７～Ｌ－３５２；Ｆ－１５８～Ｌ－３５２；Ａ－１５９～Ｌ－３５２；Ｓ－１６０～Ｌ－３５２；Ｌ－１６１～Ｌ－３５２；Ｐ－１６２～Ｌ－３５２；Ｇ－１６３～Ｌ－３５２；Ｉ－１６４～Ｌ－３５２；Ｉ－１６５～Ｌ－３５２；Ｆ－１６６～Ｌ－３５２；Ｔ－１６７～Ｌ－３５２；Ｒ－１６８～Ｌ－３５２；Ｓ－１６９～Ｌ－３５２；Ｑ－１７０～Ｌ－３５２；Ｋ－１７１～Ｌ－３５２；Ｅ－１７２～Ｌ－３５２；Ｇ－１７３～Ｌ－３５２；Ｌ－１７４～Ｌ－３５２；Ｈ－１７５～Ｌ－３５２；Ｙ－１７

６～Ｌ－３５２；Ｔ－１７７～Ｌ－３５２；Ｃ－１７８～Ｌ－３５２；Ｓ－１７
９～Ｌ－３５２；Ｓ－１８０～Ｌ－３５２；Ｈ－１８１～Ｌ－３５２；Ｆ－１８
２～Ｌ－３５２；Ｐ－１８３～Ｌ－３５２；Ｙ－１８４～Ｌ－３５２；Ｓ－１８
５～Ｌ－３５２；Ｑ－１８６～Ｌ－３５２；Ｙ－１８７～Ｌ－３５２；Ｑ－１８
８～Ｌ－３５２；Ｆ－１８９～Ｌ－３５２；Ｗ－１９０～Ｌ－３５２；Ｋ－１９
１～Ｌ－３５２；Ｎ－１９２～Ｌ－３５２；Ｆ－１９３～Ｌ－３５２；Ｑ－１９
４～Ｌ－３５２；Ｔ－１９５～Ｌ－３５２；Ｌ－１９６～Ｌ－３５２；Ｋ－１９
７～Ｌ－３５２；Ｉ－１９８～Ｌ－３５２；Ｖ－１９９～Ｌ－３５２；Ｉ－２０
０～Ｌ－３５２；Ｌ－２０１～Ｌ－３５２；Ｇ－２０２～Ｌ－３５２；Ｌ－２０
３～Ｌ－３５２；Ｖ－２０４～Ｌ－３５２；Ｌ－２０５～Ｌ－３５２；Ｐ－２０
６～Ｌ－３５２；Ｌ－２０７～Ｌ－３５２；Ｌ－２０８～Ｌ－３５２；Ｖ－２０
９～Ｌ－３５２；Ｍ－２１０～Ｌ－３５２；Ｖ－２１１～Ｌ－３５２；Ｉ－２１
２～Ｌ－３５２；Ｃ－２１３～Ｌ－３５２；Ｙ－２１４～Ｌ－３５２；Ｓ－２１
５～Ｌ－３５２；Ｇ－２１６～Ｌ－３５２；Ｉ－２１７～Ｌ－３５２；Ｌ－２１
８～Ｌ－３５２；Ｋ－２１９～Ｌ－３５２；Ｔ－２２０～Ｌ－３５２；Ｌ－２２
１～Ｌ－３５２；Ｌ－２２２～Ｌ－３５２；Ｒ－２２３～Ｌ－３５２；Ｃ－２２
４～Ｌ－３５２；Ｒ－２２５～Ｌ－３５２；Ｎ－２２６～Ｌ－３５２；Ｅ－２２
７～Ｌ－３５２；Ｋ－２２８～Ｌ－３５２；Ｋ－２２９～Ｌ－３５２；Ｒ－２３
０～Ｌ－３５２；Ｈ－２３１～Ｌ－３５２；Ｒ－２３２～Ｌ－３５２；Ａ－２３
３～Ｌ－３５２；Ｖ－２３４～Ｌ－３５２；Ｒ－２３５～Ｌ－３５２；Ｌ－２３
６～Ｌ－３５２；Ｉ－２３７～Ｌ－３５２；Ｆ－２３８～Ｌ－３５２；Ｔ－２３
９～Ｌ－３５２；Ｉ－２４０～Ｌ－３５２；Ｍ－２４１～Ｌ－３５２；Ｉ－２４
２～Ｌ－３５２；Ｖ－２４３～Ｌ－３５２；Ｙ－２４４～Ｌ－３５２；Ｆ－２４
５～Ｌ－３５２；Ｌ－２４６～Ｌ－３５２；Ｆ－２４７～Ｌ－３５２；Ｗ－２４
８～Ｌ－３５２；Ａ－２４９～Ｌ－３５２；Ｐ－２５０～Ｌ－３５２；Ｙ－２５
１～Ｌ－３５２；Ｎ－２５２～Ｌ－３５２；Ｉ－２５３～Ｌ－３５２；Ｖ－２５
４～Ｌ－３５２；Ｌ－２５５～Ｌ－３５２；Ｌ－２５６～Ｌ－３５２；Ｌ－２５
７～Ｌ－３５２；Ｎ－２５８～Ｌ－３５２；Ｔ－２５９～Ｌ－３５２；Ｆ－２６
０～Ｌ－３５２；Ｑ－２６１～Ｌ－３５２；Ｅ－２６２～Ｌ－３５２；Ｆ－２６

３～Ｌ－３５２；Ｆ－２６４～Ｌ－３５２；Ｇ－２６５～Ｌ－３５２；Ｌ－２６６～Ｌ－３５２；Ｎ－２６７～Ｌ－３５２；Ｎ－２６８～Ｌ－３５２；Ｃ－２６９～Ｌ－３５２；Ｓ－２７０～Ｌ－３５２；Ｓ－２７１～Ｌ－３５２；Ｓ－２７２～Ｌ－３５２；Ｎ－２７３～Ｌ－３５２；Ｒ－２７４～Ｌ－３５２；Ｌ－２７５～Ｌ－３５２；Ｄ－２７６～Ｌ－３５２；Ｑ－２７７～Ｌ－３５２；Ａ－２７８～Ｌ－３５２；Ｍ－２７９～Ｌ－３５２；Ｑ－２８０～Ｌ－３５２；Ｖ－２８１～Ｌ－３５２；Ｔ－２８２～Ｌ－３５２；Ｅ－２８３～Ｌ－３５２；Ｔ－２８４～Ｌ－３５２；Ｌ－２８５～Ｌ－３５２；Ｇ－２８６～Ｌ－３５２；Ｍ－２８７～Ｌ－３５２；Ｔ－２８８～Ｌ－３５２；Ｈ－２８９～Ｌ－３５２；Ｃ－２９０～Ｌ－３５２；Ｃ－２９１～Ｌ－３５２；Ｉ－２９２～Ｌ－３５２；Ｎ－２９３～Ｌ－３５２；Ｐ－２９４～Ｌ－３５２；Ｉ－２９５～Ｌ－３５２；Ｉ－２９６～Ｌ－３５２；Ｙ－２９７～Ｌ－３５２；Ａ－２９８～Ｌ－３５２；Ｆ－２９９～Ｌ－３５２；Ｖ－３００～Ｌ－３５２；Ｇ－３０１～Ｌ－３５２；Ｅ－３０２～Ｌ－３５２；Ｋ－３０３～Ｌ－３５２；Ｆ－３０４～Ｌ－３５２；Ｒ－３０５～Ｌ－３５２；Ｎ－３０６～Ｌ－３５２；Ｙ－３０７～Ｌ－３５２；Ｌ－３０８～Ｌ－３５２；Ｌ－３０９～Ｌ－３５２；Ｖ－３１０～Ｌ－３５２；Ｆ－３１１～Ｌ－３５２；Ｆ－３１２～Ｌ－３５２；Ｑ－３１３～Ｌ－３５２；Ｋ－３１４～Ｌ－３５２；Ｈ－３１５～Ｌ－３５２；Ｉ－３１６～Ｌ－３５２；Ａ－３１７～Ｌ－３５２；Ｋ－３１８～Ｌ－３５２；Ｒ－３１９～Ｌ－３５２；Ｆ－３２０～Ｌ－３５２；Ｃ－３２１～Ｌ－３５２；Ｋ－３２２～Ｌ－３５２；Ｃ－３２３～Ｌ－３５２；Ｃ－３２４～Ｌ－３５２；Ｓ－３２５～Ｌ－３５２；Ｉ－３２６～Ｌ－３５２；Ｆ－３２７～Ｌ－３５２；Ｑ－３２８～Ｌ－３５２；Ｑ－３２９～Ｌ－３５２；Ｅ－３３０～Ｌ－３５２；Ａ－３３１～Ｌ－３５２；Ｐ－３３２～Ｌ－３５２；Ｅ－３３３～Ｌ－３５２；Ｒ－３３４～Ｌ－３５２；Ａ－３３５～Ｌ－３５２；Ｓ－３３６～Ｌ－３５２；Ｓ－３３７～Ｌ－３５２；Ｖ－３３８～Ｌ－３５２；Ｙ－３３９～Ｌ－３５２；Ｔ－３４０～Ｌ－３５２；Ｒ－３４１～Ｌ－３５２；Ｓ－３４２～Ｌ－３５２；Ｔ－３４３～Ｌ－３５２；Ｇ－３４４～Ｌ－３５２；Ｅ－３４５～Ｌ－３５２；Ｑ－３４６～Ｌ－３５２；および／またはＥ－３４７～Ｌ－３５２。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。

【０２２８】

さらに、本発明は、配列番号２２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ＨＤＧＮＲ１０クローン（配列番号２２）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－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～Ｌ３５２；Ｅ－１８～Ｌ－３５２；Ｐ－１９～Ｌ－３５２；Ｃ－２０～Ｌ－３５２；Ｑ－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；１－２８～Ｌ－３５２；Ａ－２９～Ｌ－３５２；Ａ－３０～Ｌ－３５２；Ｒ－３１～Ｌ－３５２；Ｌ－３２～Ｌ－３５２；Ｌ－３３～Ｌ－３５２；Ｐ３４～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；Ｋ－５９～Ｌ－３５２；Ｒ－６０～Ｌ－３５２；Ｌ－６１～Ｌ－３５２；Ｋ－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；Ｙ８９～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－ｌｌｌ～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；Ｖ－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－３５２；Ｖ－１５４～Ｌ－３５２；Ｖ－１５５～Ｌ－３５２；Ａ－１５６～Ｌ－３５２；Ｖ－１５７～Ｌ－３５２；Ｆ－１５８～Ｌ－３５２；Ａ－１５９～Ｌ－３５２；Ｓ－１６０～Ｌ－３５２；Ｌ－１６１～Ｌ－３５２；Ｐ－１６２～Ｌ－３５２；Ｇ－１６３～Ｌ－３５２；Ｉ－１６４～Ｌ－３５２；Ｉ－１６５～Ｌ－３５２；Ｆ－１６６～Ｌ－３５

２；Ｔ－１６７～Ｌ－３５２；Ｒ－１６８～Ｌ－３５２；Ｓ－１６９～Ｌ－３５
２；Ｑ－１７０～Ｌ－３５２；Ｋ－１７１～Ｌ－３５２；Ｅ－１７２～Ｌ－３５
２；Ｇ－１７３～Ｌ－３５２；Ｌ－１７４～Ｌ－３５２；Ｈ－１７５～Ｌ－３５
２；Ｙ－１７６～Ｌ－３５２；Ｔ－１７７～Ｌ－３５２；Ｃ－１７８～Ｌ－３５
２；Ｓ－１７９～Ｌ－３５２；Ｓ－１８０～Ｌ－３５２；Ｈ－１８１～Ｌ－３５
２；Ｆ－１８２～Ｌ－３５２；Ｐ－１８３～Ｌ－３５２；Ｙ－１８４～Ｌ－３５
２；Ｓ－１８５～Ｌ－３５２；Ｑ－１８６～Ｌ－３５２；Ｙ－１８７～Ｌ－３５
２；Ｑ－１８８～Ｌ－３５２；Ｆ－１８９～Ｌ－３５２；Ｗ－１９０～Ｌ－３５
２；Ｋ－１９１～Ｌ－３５２；Ｎ－１９２～Ｌ－３５２；Ｆ－１９３～Ｌ－３５
２；Ｑ－１９４～Ｌ－３５２；Ｔ－１９５～Ｌ－３５２；Ｌ－１９６～Ｌ－３５
２；Ｋ－１９７～Ｌ－３５２；Ｉ－１９８～Ｌ－３５２；Ｖ－１９９～Ｌ－３５
２；Ｉ－２００～Ｌ－３５２；Ｌ－２０１～Ｌ－３５２；Ｇ－２０２～Ｌ－３５
２；Ｌ－２０３～Ｌ－３５２；Ｖ－２０４～Ｌ－３５２；Ｌ－２０５～Ｌ－３５
２；Ｐ－２０６～Ｌ－３５２；Ｌ－２０７～Ｌ－３５２；Ｌ－２０８～Ｌ－３５
２；Ｖ－２０９～Ｌ－３５２；Ｍ－２１０～Ｌ－３５２；Ｖ－２１１～Ｌ－３５
２；Ｉ－２１２～Ｌ－３５２；Ｃ－２１３～Ｌ－３５２；Ｙ－２１４～Ｌ－３５
２；Ｓ－２１５～Ｌ－３５２；Ｇ－２１６～Ｌ－３５２；Ｉ－２１７～Ｌ－３５
２；Ｌ－２１８～Ｌ－３５２；Ｋ－２１９～Ｌ－３５２；Ｔ－２２０～Ｌ－３５
２；Ｌ－２２１～Ｌ－３５２；Ｌ－２２２～Ｌ－３５２；Ｒ－２２３～Ｌ－３５
２；Ｃ－２２４～Ｌ－３５２；Ｒ－２２５～Ｌ－３５２；Ｎ－２２６～Ｌ－３５
２；Ｅ－２２７～Ｌ－３５２；Ｋ－２２８～Ｌ－３５２；Ｋ－２２９～Ｌ－３５
２；Ｒ－２３０～Ｌ－３５２；Ｈ－２３１～Ｌ－３５２；Ｒ－２３２～Ｌ－３５
２；Ａ－２３３～Ｌ－３５２；Ｖ－２３４～Ｌ－３５２；Ｒ－２３５～Ｌ－３５
２；Ｌ－２３６～Ｌ－３５２；Ｉ－２３７～Ｌ－３５２；Ｆ－２３８～Ｌ－３５
２；Ｔ－２３９～Ｌ－３５２；Ｉ－２４０～Ｌ－３５２；Ｍ－２４１～Ｌ－３５
２；Ｉ－２４２～Ｌ－３５２；Ｖ－２４３～Ｌ－３５２；Ｙ－２４４～Ｌ－３５
２；Ｆ－２４５～Ｌ－３５２；Ｌ－２４６～Ｌ－３５２；Ｆ－２４７～Ｌ－３５
２；Ｗ－２４８～Ｌ－３５２；Ａ－２４９～Ｌ－３５２；Ｐ－２５０～Ｌ－３５
２；Ｙ－２５１～Ｌ－３５２；Ｎ－２５２～Ｌ－３５２；Ｉ－２５３～Ｌ－３５

２；Ｖ－２５４～Ｌ－３５２；Ｌ－２５５～Ｌ－３５２；Ｌ－２５６～Ｌ－３５
２；Ｌ－２５７～Ｌ－３５２；Ｎ－２５８～Ｌ－３５２；Ｔ－２５９～Ｌ－３５
２；Ｆ－２６０～Ｌ－３５２；Ｑ－２６１～Ｌ－３５２；Ｅ－２６２～Ｌ－３５
２；Ｆ－２６３～Ｌ－３５２；Ｆ－２６４～Ｌ－３５２；Ｇ－２６５～Ｌ－３５
２；Ｌ－２６６～Ｌ－３５２；Ｎ－２６７～Ｌ－３５２；Ｎ－２６８～Ｌ－３５
２；Ｃ－２６９～Ｌ－３５２；Ｓ－２７０～Ｌ－３５２；Ｓ－２７１～Ｌ－３５
２；Ｓ－２７２～Ｌ－３５２；Ｎ－２７３～Ｌ－３５２；Ｒ－２７４～Ｌ－３５
２；Ｌ－２７５～Ｌ－３５２；Ｄ－２７６～Ｌ－３５２；Ｑ－２７７～Ｌ－３５
２；Ａ－２７８～Ｌ－３５２；Ｍ－２７９～Ｌ－３５２；Ｑ－２８０～Ｌ－３５
２；Ｖ－２８１～Ｌ－３５２；Ｔ－２８２～Ｌ－３５２；Ｅ－２８３～Ｌ－３５
２；Ｔ－２８４～Ｌ－３５２；Ｌ－２８５～Ｌ－３５２；Ｇ－２８６～Ｌ－３５
２；Ｍ－２８７～Ｌ－３５２；Ｔ－２８８～Ｌ－３５２；Ｈ－２８９～Ｌ－３５
２；Ｃ－２９０～Ｌ－３５２；Ｃ－２９１～Ｌ－３５２；Ｉ－２９２～Ｌ－３５
２；Ｎ－２９３～Ｌ－３５２；Ｐ－２９４～Ｌ－３５２；Ｉ－２９５～Ｌ－３５
２；Ｉ－２９６～Ｌ－３５２；Ｙ－２９７～Ｌ－３５２；Ａ－２９８～Ｌ－３５
２；Ｆ－２９９～Ｌ－３５２；Ｖ－３００～Ｌ－３５２；Ｇ－３０１～Ｌ－３５
２；Ｅ－３０２～Ｌ－３５２；Ｋ－３０３～Ｌ－３５２；Ｆ－３０４～Ｌ－３５
２；Ｒ－３０５～Ｌ－３５２；Ｎ－３０６～Ｌ－３５２；Ｙ－３０７～Ｌ－３５
２；Ｌ－３０８～Ｌ－３５２；Ｌ－３０９～Ｌ－３５２；Ｖ－３１０～Ｌ－３５
２；Ｆ－３１１～Ｌ－３５２；Ｆ－３１２～Ｌ－３５２；Ｑ－３１３～Ｌ－３５
２；Ｋ－３１４～Ｌ－３５２；Ｈ－３１５～Ｌ－３５２；Ｉ－３１６～Ｌ－３５
２；Ａ－３１７～Ｌ－３５２；Ｋ－３１８～Ｌ－３５２；Ｒ－３１９～Ｌ－３５
２；Ｆ－３２０～Ｌ－３５２；Ｃ－３２１～Ｌ－３５２；Ｋ－３２２～Ｌ－３５
２；Ｃ－３２３～Ｌ－３５２；Ｃ－３２４～Ｌ－３５２；Ｓ－３２５～Ｌ－３５
２；Ｉ－３２６～Ｌ－３５２；Ｆ－３２７～Ｌ－３５２；Ｑ－３２８～Ｌ－３５
２；Ｑ－３２９～Ｌ－３５２；Ｅ－３３０～Ｌ－３５２；Ａ－３３１～Ｌ－３５
２；Ｐ－３３２～Ｌ－３５２；Ｅ－３３３～Ｌ－３５２；Ｒ－３３４～Ｌ－３５
２；Ａ－３３５～Ｌ－３５２；Ｓ－３３６～Ｌ－３５２；Ｓ－３３７～Ｌ－３５
２；Ｖ－３３８～Ｌ－３５２；Ｙ－３３９～Ｌ－３５２；Ｔ－３４０～Ｌ－３５

２；Ｒ－３４１～Ｌ－３５２；Ｓ－３４２～Ｌ－３５２；Ｔ－３４３～Ｌ－３５２；Ｅ－３４４～Ｌ－３５２；Ｅ－３４５～Ｌ－３５２；Ｑ－３４６～Ｌ３５２；および／またはＥ－３４７～Ｌ－３５２。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。

【０２２９】

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。

【０２３０】

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。

【０２３１】

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；Ｄ２～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－２～Ｒ－３３４；Ｄ－２～Ｅ－３３３；Ｄ－２～Ｐ－３３２；Ｄ－２～Ａ３３１；Ｄ－２～Ｅ－３３０；Ｄ－２～Ｑ－３２９；Ｄ－２～Ｑ－３２８；Ｄ－２～Ｆ－３２７；Ｄ－２～Ｉ－３２６；Ｄ－２～Ｓ－３２５；Ｄ－２～Ｃ－３２４；Ｄ－２～Ｃ－３２３；Ｄ－２～Ｋ－３２２；Ｄ－２～Ｃ－３２１；Ｄ－２～Ｆ－３２０；Ｄ－２～Ｒ－３１９；Ｄ－２～Ｋ－３１８；Ｄ－２～Ａ－３１７；Ｄ－２～Ｉ－３１６；Ｄ－２～Ｈ－３１５；Ｄ－２～Ｋ－３１４；Ｄ－２～Ｑ－３１３；Ｄ－２～Ｆ－３１２；Ｄ－２～Ｆ－３１１；Ｄ－２～Ｖ－３１０；Ｄ－２～Ｌ－３０９；Ｄ－２～Ｌ３０８；Ｄ－２～Ｙ－３０７；Ｄ－２～Ｎ－３０６；Ｄ－２～Ｒ－３０５；Ｄ－２～Ｆ－３０４；Ｄ－２～Ｋ－３０３；Ｄ－２～Ｅ－３０２；Ｄ－２～Ｇ－３０１；Ｄ－２～Ｖ－３００；Ｄ－２～Ｆ－２９９；Ｄ－２～Ａ－２９８；Ｄ－２～Ｙ－２９７；Ｄ－２～Ｉ－２９６；Ｄ－２～Ｉ－２９５；Ｄ－２～Ｐ－２９４；Ｄ－２～Ｎ－２９３；Ｄ－２～Ｉ－２９２；Ｄ－２～Ｃ－２９１；Ｄ－２～Ｃ－２９０；Ｄ－２～Ｈ－２８９；Ｄ－２～Ｔ－２８８；Ｄ－２～Ｍ－２８７；Ｄ－２～Ｇ－２８６；Ｄ－２～Ｌ－２８５；Ｄ－２～Ｔ－２８４；Ｄ－２～Ｅ－２８３；Ｄ－２～Ｔ－２８２；Ｄ－２～Ｖ－２８１；Ｄ－２～Ｑ－２８０；Ｄ－２～Ｍ－２７９；Ｄ－２～Ａ－２７８；Ｄ－２～Ｑ－２７７；Ｄ－２～Ｄ－２７６；Ｄ－２～Ｌ－２７５；Ｄ－２～Ｒ－２７４；Ｄ－２～Ｎ－２７３；Ｄ－２～Ｓ－２７２；Ｄ－２～Ｓ－２７１；

D－2～S－２７０；D－2～C－２６９；D－2～N－２６８；D－2～N－２６７；D－2～L－２６６；D－2～G－２６５；D－2～F－２６４；D－2～F－２６３；D－2～E－２６２；D２～Q－２６１；D－2～F－２６０；D－2～T－２５９；D－2～N－２５８；D－2～L－２５７；D－2～L－２５６；D－2～L－２５５；D－2～V－２５４；D－2～I－２５３；D－2～N－２５２；D－2～Y－２５１；D－2～P－２５０；D－2～A－２４９；D－2～W－２４８；D－2～F－２４７；D－2～L－２４６；D－2～F－２４５；D－2～Y－２４４；D－2～V－２４３；D－2～I－２４２；D－2～M－２４１；D－2～I－２４０；D－2～T－２３９；D－2～F－２３８；D－2～I－２３７；D－2～L－２３６；D－2～R－２３５；D－2～V－２３４；D－2～A－２３３；D－2～R－２３２；D－2～H－２３１；D－2～R－２３０；D－2～K－２２９；D－2～K－２２８；D－2～E－２２７；D－2～N－２２６；D－2～R－２２５；D－2～C－２２４；D－2～R－２２３；D－2～L－２２２；D－2～L２２１；D－2～T－２２０；D－2～K－２１９；D－2～L－２１８；D－2～I－２１７；D－2～G－２１６；D－2～S－２１５；D－2～Y－２１４；D－2～C－２１３；D－2～I－２１２；D－2～V－２１１；D－2～M－２１０；D－2～V－２０９；D－2～L－２０８；D－2～L－２０７；D－2～P－２０６；D－2～L－２０５；D－2～V－２０４；D－2～L－２０３；D－2～G－２０２；D－2～L－２０１；D－2～I－２００；D－2～V－１９９；D－2～I－１９８；D－2～K－１９７；D－2～L－１９６；D－2～T－１９５；D－2～Q－１９４；D－2～F－１９３；D－2～N－１９２；D－2～K－１９１；D－2～W－１９０；D－2～F－１８９；D－2～Q－１８８；D－2～Y－１８７；D２～Q－１８６；D－2～S－１８５；D－2～Y－１８４；D－2～P－１８３；D－2～F－１８２；D－2～H－１８１；D－2～S－１８０；D－2～S－１７９；D－2～C－１７８；D－2～T－１７７；D－2～Y－１７６；D－2～H１７５；D－2～L－１７４；D－2～G－１７３；D－2～E－１７２；D－2～K－１７１；D－2～Q－１７０；D－2～S－１６９；D－2～R－１６８；D－2～T－１６７；D－2～F－１６

６；Ｄ－２～Ｉ－１６５；Ｄ－２～Ｉ－１６４；Ｄ－２～Ｇ－１６３；Ｄ－２～Ｐ－１６２；Ｄ－２～Ｌ－１６１；Ｄ－２～Ｓ－１６０；Ｄ－２～Ａ－１５９；Ｄ－２～Ｆ－１５８；Ｄ－２～Ｖ－１５７；Ｄ－２～Ａ－１５６；Ｄ－２～Ｖ－１５５；Ｄ－２～Ｖ－１５４；Ｄ－２～Ｗ－１５３；Ｄ－２～Ｔ－１５２；Ｄ－２～Ｉ－１５１；Ｄ－２～Ｖ－１５０；Ｄ－２～Ｓ－１４９；Ｄ－２～Ｔ－１４８；Ｄ－２～Ｖ－１４７；Ｄ－２～Ｖ１４６；Ｄ－２～Ｇ－１４５；Ｄ－２～Ｆ－１４４；Ｄ－２～Ｔ－１４３；Ｄ－２～Ｖ－１４２；Ｄ－２～Ｔ－１４１；Ｄ－２～Ｒ－１４０；Ｄ－２～Ａ－１３９；Ｄ－２～Ｋ－１３８；Ｄ－２～Ｌ－１３７；Ｄ－２～Ａ－１３６；Ｄ－２～Ｆ－１３５；Ｄ－２～Ｖ－１３４；Ｄ－２～Ａ－１３３；Ｄ－２～Ｈ－１３２；Ｄ－２～Ｖ－１３１；Ｄ－２～１－１３０；Ｄ－２～Ａ－１２９；Ｄ－２～Ｌ－１２８；Ｄ－２～Ｙ－１２７；Ｄ－２～Ｒ－１２６；Ｄ－２～Ｄ－１２５；Ｄ－２～１－１２４；Ｄ－２～Ｔ－１２３；Ｄ－２～Ｌ－１２２；Ｄ－２～Ｌ－１２１；Ｄ－２～Ｉ－１２０；Ｄ－２～１－１１９；Ｄ－２～Ｆ－１１８；Ｄ－２～Ｆ－１１７；Ｄ－２～Ｉ－１１６；Ｄ－２～Ｇ－１１５；Ｄ－２～Ｓ－１１４；Ｄ－２～Ｆ－１１３；Ｄ－２～Ｆ－１１２；Ｄ－２～Ｇ－ｌｌｌ；Ｄ－２～Ｉ－１１０；Ｄ－２～Ｆ－１０９；Ｄ－２～Ｙ－１０８；Ｄ－２～Ｌ－１０７；Ｄ－２～Ｇ－１０６；Ｄ２～Ｔ－１０５；Ｄ－２～Ｌ－１０４；Ｄ－２～Ｌ－１０３；Ｄ－２～Ｑ－１０２；Ｄ－２～Ｃ－１０１；Ｄ－２～Ｍ－１００；Ｄ－２～Ｔ－９９；Ｄ－２～Ｎ－９８；Ｄ－２～Ｇ－９７；Ｄ－２～Ｆ－９６；Ｄ－２～Ｄ－９５；Ｄ－２～Ｗ－９４；Ｄ－２～Ｑ－９３；Ｄ－２～Ａ－９２；Ｄ－２～Ａ－９１；Ｄ－２～Ａ－９０；Ｄ－２～Ｙ－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～Ｉ－６７；Ｄ－２～Ｄ－６６；Ｄ－２～Ｔ－６５；Ｄ－２～Ｍ－６４；Ｄ－２～Ｓ－６３；Ｄ－２～Ｅ－６２；Ｄ－２～Ｌ－６１；Ｄ－２～Ｒ－６０；Ｄ－２～Ｑ－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－２～１－５２；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～Ｉ－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－２７；Ｄ－２～Ｋ－２６；Ｄ－２～Ｖ－２５；Ｄ－２～Ｎ－２４；Ｄ－２～Ｉ－２３；Ｄ－２～Ｋ－２２；Ｄ－２～Ｐ－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～Ｉ－１２；Ｄ－２～Ｄ－ｌｌ；Ｄ－２～Ｙ－１０；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。

【０２３２】

さらに、本発明は、配列番号２２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：Ｄ２～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～Ｅ－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－２～Ｒ－３３４；Ｄ－２～Ｅ－３３３；Ｄ－２～Ｐ－３３２；Ｄ－２～Ａ－３３１；Ｄ－２～Ｅ－３３０；Ｄ－２～Ｑ－３２９；Ｄ－２～Ｑ－３２８；Ｄ－２～Ｆ－３２７；Ｄ－２～１－３２６；Ｄ－２～Ｓ－３２５；Ｄ－２～Ｃ－３２４；Ｄ－２～Ｃ－３２３；Ｄ２～Ｋ－３２２；Ｄ－２～Ｃ－３２１；Ｄ－２～Ｆ－３２０；Ｄ－２～Ｒ－３１９；Ｄ－２～Ｋ－３１８；Ｄ－２～Ａ－３１７；Ｄ－２～Ｉ－３１６；Ｄ－２～Ｈ－３１５；Ｄ－２～Ｋ－３１４；Ｄ－２～Ｑ－３１３；Ｄ－２～Ｆ

－３１２；Ｄ－２～Ｆ３１１；Ｄ－２～Ｖ－３１０；Ｄ－２～Ｌ－３０９；Ｄ－２～Ｌ－３０８；Ｄ－２～Ｙ－３０７；Ｄ－２～Ｎ－３０６；Ｄ－２～Ｒ－３０５；Ｄ－２～Ｆ－３０４；Ｄ－２～Ｋ－３０３；Ｄ－２～Ｅ－３０２；Ｄ－２～Ｇ－３０１；Ｄ－２～Ｖ－３００；Ｄ－２～Ｆ－２９９；Ｄ－２～Ａ－２９８；Ｄ－２～Ｙ－２９７；Ｄ－２～Ｉ－２９６；Ｄ－２～Ｉ－２９５；Ｄ－２～Ｐ－２９４；Ｄ－２～Ｎ－２９３；Ｄ－２～Ｉ－２９２；Ｄ－２～Ｃ－２９１；Ｄ－２～Ｃ－２９０；Ｄ－２～Ｈ－２８９；Ｄ－２～Ｔ－２８８；Ｄ２～Ｍ－２８７；Ｄ－２～Ｇ－２８６；Ｄ－２～Ｌ－２８５；Ｄ－２～Ｔ－２８４；Ｄ－２～Ｅ－２８３；Ｄ－２～Ｔ－２８２；Ｄ－２～Ｖ－２８１；Ｄ－２～Ｑ－２８０；Ｄ－２～Ｍ－２７９；Ｄ－２～Ａ－２７８；Ｄ－２～Ｑ－２７７；Ｄ－２～Ｄ２７６；Ｄ－２～Ｌ－２７５；Ｄ－２～Ｒ－２７４；Ｄ－２～Ｎ－２７３；Ｄ－２～Ｓ－２７２；Ｄ－２～Ｓ－２７１；Ｄ－２～Ｓ－２７０；Ｄ－２～Ｃ－２６９；Ｄ－２～Ｎ－２６８；Ｄ－２～Ｎ－２６７；Ｄ－２～Ｌ－２６６；Ｄ－２～Ｇ－２６５；Ｄ－２～Ｆ－２６４；Ｄ－２～Ｆ－２６３；Ｄ－２～Ｅ－２６２；Ｄ－２～Ｑ－２６１；Ｄ－２～Ｆ－２６０；Ｄ－２～Ｔ－２５９；Ｄ２～Ｎ－２５８；Ｄ－２～Ｌ－２５７；Ｄ－２～Ｌ－２５６；Ｄ－２～Ｌ－２５５；Ｄ－２～Ｖ－２５４；Ｄ－２～Ｉ－２５３；Ｄ－２～Ｎ－２５２；Ｄ－２～Ｙ－２５１；Ｄ－２～Ｐ－２５０；Ｄ－２～Ａ－２４９；Ｄ－２～Ｗ－２４８；Ｄ－２～Ｆ２４７；Ｄ－２～Ｌ－２４６；Ｄ－２～Ｆ－２４５；Ｄ－２～Ｙ－２４４；Ｄ－２～Ｖ－２４３；Ｄ－２～Ｉ－２４２；Ｄ－２～Ｍ－２４１；Ｄ－２～Ｉ－２４０；Ｄ－２～Ｔ－２３９；Ｄ－２～Ｆ－２３８；Ｄ－２～Ｉ－２３７；Ｄ－２～Ｌ－２３６；Ｄ－２～Ｒ－２３５；Ｄ－２～Ｖ－２３４；Ｄ－２～Ａ－２３３；Ｄ－２～Ｒ－２３２；Ｄ－２～Ｈ－２３１；Ｄ－２～Ｒ－２３０；Ｄ－２～Ｋ－２２９；Ｄ－２～Ｋ－２２８；Ｄ－２～Ｅ－２２７；Ｄ－２～Ｎ－２２６；Ｄ－２～Ｒ－２２５；Ｄ－２～Ｃ２２４；Ｄ－２～Ｒ－２２３；Ｄ－２～Ｌ－２２２；Ｄ－２～Ｌ－２２１；Ｄ－２～Ｔ－２２０；Ｄ－２～Ｋ－２１９；Ｄ－２～Ｌ－２１８；Ｄ－２～Ｉ－２１７；Ｄ－２～Ｇ－２１６；Ｄ－２～Ｓ－２１５；Ｄ－２～Ｙ－２１４；Ｄ－２～Ｃ－２１３；Ｄ－２～Ｉ－２１２；Ｄ－２～Ｖ－２１１；Ｄ－２～Ｍ－２１０；Ｄ－２～Ｖ－２０９；Ｄ－２～Ｌ－２０８；Ｄ－２～Ｌ

－２０７；Ｄ－２～Ｐ－２０６；Ｄ－２～Ｌ－２０５；Ｄ－２～Ｖ－２０４；Ｄ－２～Ｌ－２０３；Ｄ－２～Ｇ－２０２；Ｄ－２～Ｌ－２０１；Ｄ－２～Ｉ－２００；Ｄ－２～Ｖ－１９９；Ｄ－２～Ｉ－１９８；Ｄ－２～Ｋ－１９７；Ｄ－２～Ｌ－１９６；Ｄ－２～Ｔ－１９５；Ｄ－２～Ｑ－１９４；Ｄ－２～Ｆ－１９３；Ｄ－２～Ｎ－１９２；Ｄ－２～Ｋ－１９１；Ｄ－２～Ｗ－１９０；Ｄ－２～Ｆ－１８９；Ｄ－２～Ｑ－１８８；Ｄ－２～Ｙ－１８７；Ｄ－２～Ｑ－１８６；Ｄ－２～Ｓ－１８５；Ｄ－２～Ｙ－１８４；Ｄ－２～Ｐ－１８３；Ｄ－２～Ｆ－１８２；Ｄ－２～Ｈ－１８１；Ｄ－２～Ｓ－１８０；Ｄ－２～Ｓ－１７９；Ｄ－２～Ｃ１７８；Ｄ－２～Ｔ－１７７；Ｄ－２～Ｙ－１７６；Ｄ－２～Ｈ－１７５；Ｄ－２～Ｌ－１７４；Ｄ－２～Ｇ－１７３；Ｄ－２～Ｅ－１７２；Ｄ－２～Ｋ－１７１；Ｄ－２～Ｑ－１７０；Ｄ－２～Ｓ－１６９；Ｄ－２～Ｒ－１６８；Ｄ－２～Ｔ－１６７；Ｄ－２～Ｆ－１６６；Ｄ－２～Ｉ－１６５；Ｄ－２～Ｉ－１６４；Ｄ－２～Ｇ－１６３；Ｄ－２～Ｐ－１６２；Ｄ－２～Ｌ－１６１；Ｄ－２～Ｓ－１６０；Ｄ－２～Ａ－１５９；Ｄ－２～Ｆ－１５８；Ｄ－２～Ｖ－１５７；Ｄ－２～Ａ－１５６；Ｄ－２～Ｖ－１５５；Ｄ－２～Ｖ－１５４；Ｄ－２～Ｗ－１５３；Ｄ－２～Ｔ－１５２；Ｄ－２～１－１５１；Ｄ－２～Ｖ－１５０；Ｄ－２～Ｓ１４９；Ｄ－２～Ｔ－１４８；Ｄ－２～Ｖ－１４７；Ｄ－２～Ｖ－１４６；Ｄ－２～Ｇ－１４５；Ｄ－２～Ｆ－１４４；Ｄ－２～Ｔ－１４３；Ｄ－２～Ｖ－１４２；Ｄ－２～Ｔ－１４１；Ｄ－２～Ｒ－１４０；Ｄ－２～Ａ－１３９；Ｄ－２～Ｋ－１３８；Ｄ－２～Ｌ－１３７；Ｄ－２～Ａ－１３６；Ｄ－２～Ｆ－１３５；Ｄ－２～Ｖ－１３４；Ｄ－２～Ａ－１３３；Ｄ－２～Ｈ－１３２；Ｄ－２～Ｖ－１３１；Ｄ－２～Ｖ－１３０；Ｄ－２～Ａ－１２９；Ｄ－２～Ｌ－１２８；Ｄ－２～Ｙ－１２７；Ｄ－２～Ｒ－１２６；Ｄ－２～Ｄ－１２５；Ｄ－２～Ｉ－１２４；Ｄ－２～Ｔ－１２３；Ｄ－２～Ｌ－１２２；Ｄ－２～Ｌ－１２１；Ｄ－２～Ｉ－１２０；Ｄ－２～１－１１９；Ｄ－２～Ｆ－１１８；Ｄ－２～Ｆ－１１７；Ｄ－２～１－１１６；Ｄ－２～Ｇ－１１５；Ｄ－２～Ｓ－１１４；Ｄ－２～Ｆ－１１３；Ｄ－２～Ｆ－１１２；Ｄ－２～Ｇ－ｌｌｌ；Ｄ－２～Ｉ－１１０；Ｄ－２～Ｆ－１０９；Ｄ－２～Ｙ－１０８；Ｄ－２～Ｌ－１０７；Ｄ－２～Ｇ－１０６；Ｄ－２～Ｔ－１０５；Ｄ－２～Ｌ－１０４；Ｄ－２～Ｌ－１０３；Ｄ

－２～Ｑ－１０２；Ｄ－２～Ｃ－１０１；Ｄ－２～Ｍ－１００；Ｄ－２～Ｔ－９９；Ｄ－２～Ｎ－９８；Ｄ－２～Ｇ－９７；Ｄ－２～Ｆ－９６；Ｄ－２～Ｄ－９５；Ｄ－２～Ｗ－９４；Ｄ－２～Ｑ－９３；Ｄ－２～Ａ－９２；Ｄ－２～Ａ－９１；Ｄ－２～Ａ－９０；Ｄ－２～Ｙ－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－２～１－６７；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－２７；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。

【０２３３】

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。

【０２３４】

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。

【０２３５】

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タンパ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末端から、または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。

【０２３６】

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タンパク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。

【０２３７】

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～Ｆ９６；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；１－１１９～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－１７５；Ｐ－１６２～Ｙ－１７６；Ｇ－１６３～Ｔ－１７７；Ｉ－１６４～Ｃ－１７８；Ｉ－１６５～Ｓ－１７９；Ｆ－１６６～Ｓ－１８０；Ｔ－１６７～Ｈ－１８１；Ｒ－１６８～Ｆ－１８２；Ｓ－１６９～Ｐ－１８３；Ｑ－１７０～Ｙ－１８４；Ｋ－１７１～Ｓ－１８５；Ｅ－１７２～Ｑ－１８６；Ｇ－１７３～Ｙ－１

８７；Ｌ－１７４～Ｑ－１８８；Ｈ－１７５～Ｆ－１８９；Ｙ－１７６～Ｗ－１
９０；Ｔ－１７７～Ｋ－１９１；Ｃ－１７８～Ｎ－１９２；Ｓ－１７９～Ｆ－１
９３；Ｓ－１８０～Ｑ－１９４；Ｈ－１８１～Ｔ－１９５；Ｆ－１８２～Ｌ－１
９６；Ｐ－１８３～Ｋ－１９７；Ｙ－１８４～Ｉ－１９８；Ｓ－１８５～Ｖ－１
９９；Ｑ－１８６～Ｉ－２００；Ｙ－１８７～Ｌ－２０１；Ｑ－１８８～Ｇ－２
０２；Ｆ－１８９～Ｌ－２０３；Ｗ－１９０～Ｖ－２０４；Ｋ－１９１～Ｌ－２
０５；Ｎ－１９２～Ｐ－２０６；Ｆ－１９３～Ｌ－２０７；Ｑ－１９４～Ｌ－２
０８；Ｔ－１９５～Ｖ－２０９；Ｌ－１９６～Ｍ－２１０；Ｋ－１９７～Ｖ－２
１１；Ｉ－１９８～Ｉ－２１２；Ｖ－１９９～Ｃ－２１３；Ｉ－２００～Ｙ－２
１４；Ｌ－２０１～Ｓ－２１５；Ｇ－２０２～Ｇ－２１６；Ｌ－２０３～Ｉ－２
１７；Ｖ－２０４～Ｌ－２１８；Ｌ－２０５～Ｋ－２１９；Ｐ－２０６～Ｔ－２
２０；Ｌ－２０７～Ｌ－２２１；Ｌ－２０８～Ｌ－２２２；Ｖ－２０９～Ｒ－２
２３；Ｍ－２１０～Ｃ－２２４；Ｖ－２１１～Ｒ－２２５；Ｉ－２１２～Ｎ－２
２６；Ｃ－２１３～Ｅ－２２７；Ｙ－２１４～Ｋ－２２８；Ｓ－２１５～Ｋ－２
２９；Ｇ－２１６～Ｒ－２３０；Ｉ－２１７～Ｈ－２３１；Ｌ－２１８～Ｒ－２
３２；Ｋ－２１９～Ａ－２３３；Ｔ－２２０～Ｖ－２３４；Ｌ－２２１～Ｒ－２
３５；Ｌ－２２２～Ｌ－２３６；Ｒ－２２３～Ｉ－２３７；Ｃ－２２４～Ｆ－２
３８；Ｒ－２２５～Ｔ－２３９；Ｎ－２２６～Ｉ－２４０；Ｅ－２２７～Ｍ－２
４１；Ｋ－２２８～Ｉ－２４２；Ｋ－２２９～Ｖ－２４３；Ｒ－２３０～Ｙ－２
４４；Ｈ－２３１～Ｆ－２４５；Ｒ－２３２～Ｌ－２４６；Ａ－２３３～Ｆ－２
４７；Ｖ－２３４～Ｗ－２４８；Ｒ－２３５～Ａ－２４９；Ｌ－２３６～Ｐ－２
５０；Ｉ－２３７～Ｙ－２５１；Ｆ－２３８～Ｎ－２５２；Ｔ－２３９～Ｉ－２
５３；Ｉ－２４０～Ｖ－２５４；Ｍ－２４１～Ｌ－２５５；Ｉ－２４２～Ｌ－２
５６；Ｖ－２４３～Ｌ－２５７；Ｙ－２４４～Ｎ－２５８；Ｆ－２４５～Ｔ－２
５９；Ｌ－２４６～Ｆ－２６０；Ｆ－２４７～Ｑ－２６１；Ｗ－２４８～Ｅ－２
６２；Ａ－２４９～Ｆ－２６３；Ｐ－２５０～Ｆ－２６４；Ｙ－２５１～Ｇ－２
６５；Ｎ－２５２～Ｌ－２６６；Ｉ－２５３～Ｎ－２６７；Ｖ－２５４～Ｎ－２
６８；Ｌ－２５５～Ｃ－２６９；Ｌ－２５６～Ｓ－２７０；Ｌ－２５７～Ｓ－２
７１；Ｎ－２５８～Ｓ－２７２；Ｔ－２５９～Ｎ－２７３；Ｆ－２６０～Ｒ－２

７４；Ｑ－２６１～Ｌ－２７５；Ｅ－２６２～Ｄ－２７６；Ｆ－２６３～Ｑ－２７７；Ｆ－２６４～Ａ－２７８；Ｇ－２６５～Ｍ－２７９；Ｌ－２６６～Ｑ－２８０；Ｎ－２６７～Ｖ－２８１；Ｎ－２６８～Ｔ－２８２；Ｃ－２６９～Ｅ－２８３；Ｓ－２７０～Ｔ－２８４；Ｓ－２７１～Ｌ－２８５；Ｓ－２７２～Ｇ－２８６；Ｎ－２７３～Ｍ－２８７；Ｒ－２７４～Ｔ－２８８；Ｌ－２７５～Ｈ－２８９；Ｄ－２７６～Ｃ－２９０；Ｑ－２７７～Ｃ－２９１；Ａ－２７８～Ｉ－２９２；Ｍ－２７９～Ｎ－２９３；Ｑ－２８０～Ｐ－２９４；Ｖ－２８１～Ｉ－２９５；Ｔ－２８２～Ｉ－２９６；Ｅ－２８３～Ｙ－２９７；Ｔ－２８４～Ａ－２９８；Ｌ－２８５～Ｆ－２９９；Ｇ－２８６～Ｖ－３００；Ｍ－２８７～Ｇ－３０１；Ｔ－２８８～Ｅ－３０２；Ｈ－２８９～Ｋ－３０３；Ｃ－２９０～Ｆ－３０４；Ｃ－２９１～Ｒ－３０５；Ｉ－２９２～Ｎ－３０６；Ｎ－２９３～Ｙ－３０７；Ｐ－２９４～Ｌ－３０８；Ｉ－２９５～Ｌ－３０９；Ｉ－２９６～Ｖ－３１０；Ｙ－２９７～Ｆ－３１１；Ａ－２９８～Ｆ－３１２；Ｆ－２９９～Ｑ－３１３；Ｖ－３００～Ｋ－３１４；Ｇ－３０１～Ｈ－３１５；Ｅ－３０２～Ｉ－３１６；Ｋ－３０３～Ａ－３１７；Ｆ－３０４～Ｋ－３１８；Ｒ－３０５～Ｒ－３１９；Ｎ－３０６～Ｆ－３２０；Ｙ－３０７～Ｃ－３２１；Ｌ－３０８～Ｋ－３２２；Ｌ－３０９～Ｃ－３２３；Ｖ－３１０～Ｃ－３２４；Ｆ－３１１～Ｓ－３２５；Ｆ－３１２～Ｉ－３２６；Ｑ－３１３～Ｆ－３２７；Ｋ－３１４～Ｑ－３２８；Ｈ－３１５～Ｑ－３２９；１－３１６～Ｅ－３３０；Ａ－３１７～Ａ－３３１；Ｋ－３１８～Ｐ－３３２；Ｒ－３１９～Ｅ－３３３；Ｆ－３２０～Ｒ－３３４；Ｃ－３２１～Ａ－３３５；Ｋ－３２２～Ｓ－３３６；Ｃ－３２３～Ｓ－３３７；Ｃ－３２４～Ｖ－３３８；Ｓ－３２５～Ｙ－３３９；Ｉ－３２６～Ｔ－３４０；Ｆ－３２７～Ｒ－３４１；Ｑ－３２８～Ｓ－３４２；Ｑ－３２９～Ｔ－３４３；Ｅ－３３０～Ｇ－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。

【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２２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～Q－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；Q－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～K－５９；V－４６～R－６０；G－４７～L－６１；N－４８～K－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；K－５９～A－７３；R－６０～Ｉ－７４；L－６１～S－７５；K－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－ｌｌｌ；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－ｌｌｌ～Ｄ－１２５；Ｆ－１１２～Ｒ－１２６；Ｆ－１１３～Ｙ
－１２７；Ｓ－１１４～Ｌ－１２８；Ｇ－１１５～Ａ－１２９；Ｉ－１１６～Ｖ
－１３０；Ｆ－１１７～Ｖ－１３１；Ｆ－１１８～Ｈ－１３２；１－１１９～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；Ｖ－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
－１７５；Ｐ－１６２～Ｙ－１７６；Ｇ－１６３～Ｔ－１７７；Ｉ－１６４～Ｃ
－１７８；Ｉ－１６５～Ｓ－１７９；Ｆ－１６６～Ｓ－１８０；Ｔ－１６７～Ｈ
－１８１；Ｒ－１６８～Ｆ－１８２；Ｓ－１６９～Ｐ－１８３；Ｑ－１７０～Ｙ
－１８４；Ｋ－１７１～Ｓ－１８５；Ｅ－１７２～Ｑ－１８６；Ｇ－１７３～Ｙ
－１８７；Ｌ－１７４～Ｑ－１８８；Ｈ－１７５～Ｆ－１８９；Ｙ－１７６～Ｗ
－１９０；Ｔ－１７７～Ｋ－１９１；Ｃ－１７８～Ｎ－１９２；Ｓ－１７９～Ｆ
－１９３；Ｓ－１８０～Ｑ－１９４；Ｈ－１８１～Ｔ－１９５；Ｆ－１８２～Ｌ
－１９６；Ｐ－１８３～Ｋ－１９７；Ｙ－１８４～Ｉ－１９８；Ｓ－１８５～Ｖ
－１９９；Ｑ－１８６～Ｉ－２００；Ｙ－１８７～Ｌ－２０１；Ｑ－１８８～Ｇ

－２０２；Ｆ－１８９～Ｌ－２０３；Ｗ－１９０～Ｖ－２０４；Ｋ－１９１～Ｌ－２０５；Ｎ－１９２～Ｐ－２０６；Ｆ－１９３～Ｌ－２０７；Ｑ－１９４～Ｌ－２０８；Ｔ－１９５～Ｖ－２０９；Ｌ－１９６～Ｍ－２１０；Ｋ－１９７～Ｖ－２１１；Ｉ－１９８～Ｉ－２１２；Ｖ－１９９～Ｃ－２１３；Ｉ－２００～Ｙ－２１４；Ｌ－２０１～Ｓ－２１５；Ｇ－２０２～Ｇ－２１６；Ｌ－２０３～Ｉ－２１７；Ｖ－２０４～Ｌ－２１８；Ｌ－２０５～Ｋ－２１９；Ｐ－２０６～Ｔ－２２０；Ｌ－２０７～Ｌ－２２１；Ｌ－２０８～Ｌ－２２２；Ｖ－２０９～Ｒ－２２３；Ｍ－２１０～Ｃ－２２４；Ｖ－２１１～Ｒ－２２５；Ｉ－２１２～Ｎ－２２６；Ｃ－２１３～Ｅ－２２７；Ｙ－２１４～Ｋ－２２８；Ｓ－２１５～Ｋ－２２９；Ｇ－２１６～Ｒ－２３０；Ｉ－２１７～Ｈ－２３１；Ｌ－２１８～Ｒ－２３２；Ｋ－２１９～Ａ－２３３；Ｔ－２２０～Ｖ－２３４；Ｌ－２２１～Ｒ－２３５；Ｌ－２２２～Ｌ－２３６；Ｒ－２２３～Ｉ－２３７；Ｃ－２２４～Ｆ－２３８；Ｒ－２２５～Ｔ－２３９；Ｎ－２２６～Ｉ－２４０；Ｅ－２２７～Ｍ－２４１；Ｋ－２２８～Ｉ－２４２；Ｋ－２２９～Ｖ－２４３；Ｒ－２３０～Ｙ－２４４；Ｈ－２３１～Ｆ－２４５；Ｒ－２３２～Ｌ－２４６；Ａ－２３３～Ｆ－２４７；Ｖ－２３４～Ｗ－２４８；Ｒ－２３５～Ａ－２４９；Ｌ－２３６～Ｐ－２５０；Ｉ－２３７～Ｙ－２５１；Ｆ－２３８～Ｎ－２５２；Ｔ－２３９～Ｉ－２５３；Ｉ－２４０～Ｖ－２５４；Ｍ－２４１～Ｌ－２５５；Ｉ－２４２～Ｌ－２５６；Ｖ－２４３～Ｌ－２５７；Ｙ－２４４～Ｎ－２５８；Ｆ－２４５～Ｔ－２５９；Ｌ－２４６～Ｆ－２６０；Ｆ－２４７～Ｑ－２６１；Ｗ－２４８～Ｅ－２６２；Ａ－２４９～Ｆ－２６３；Ｐ－２５０～Ｆ－２６４；Ｙ－２５１～Ｇ－２６５；Ｎ－２５２～Ｌ－２６６；Ｉ－２５３～Ｎ－２６７；Ｖ－２５４～Ｎ－２６８；Ｌ－２５５～Ｃ－２６９；Ｌ－２５６～Ｓ－２７０；Ｌ－２５７～Ｓ－２７１；Ｎ－２５８～Ｓ－２７２；Ｔ－２５９～Ｎ－２７３；Ｆ－２６０～Ｒ－２７４；Ｑ－２６１～Ｌ－２７５；Ｅ－２６２～Ｄ－２７６；Ｆ－２６３～Ｑ－２７７；Ｆ－２６４～Ａ－２７８；Ｇ－２６５～Ｍ－２７９；Ｌ－２６６～Ｑ－２８０；Ｎ－２６７～Ｖ－２８１；Ｎ－２６８～Ｔ－２８２；Ｃ－２６９～Ｅ－２８３；Ｓ－２７０～Ｔ－２８４；Ｓ－２７１～Ｌ－２８５；Ｓ－２７２～Ｇ－２８６；Ｎ－２７３～Ｍ－２８７；Ｒ－２７４～Ｔ－２８８；Ｌ－２７５～Ｈ

－２８９；Ｄ－２７６～Ｃ－２９０；Ｑ－２７７～Ｃ－２９１；Ａ－２７８～Ｉ－２９２；Ｍ－２７９～Ｎ－２９３；Ｑ－２８０～Ｐ－２９４；Ｖ－２８１～Ｉ－２９５；Ｔ－２８２～Ｉ－２９６；Ｅ－２８３～Ｙ－２９７；Ｔ－２８４～Ａ－２９８；Ｌ－２８５～Ｆ－２９９；Ｇ－２８６～Ｖ－３００；Ｍ－２８７～Ｇ－３０１；Ｔ－２８８～Ｅ－３０２；Ｈ－２８９～Ｋ－３０３；Ｃ－２９０～Ｆ－３０４；Ｃ－２９１～Ｒ－３０５；Ｉ－２９２～Ｎ－３０６；Ｎ－２９３～Ｙ－３０７；Ｐ－２９４～Ｌ－３０８；Ｉ－２９５～Ｌ－３０９；Ｉ－２９６～Ｖ－３１０；Ｙ－２９７～Ｆ－３１１；Ａ－２９８～Ｆ－３１２；Ｆ－２９９～Ｑ－３１３；Ｖ－３００～Ｋ－３１４；Ｇ－３０１～Ｈ－３１５；Ｅ－３０２～Ｉ－３１６；Ｋ－３０３～Ａ－３１７；Ｆ－３０４～Ｋ－３１８；Ｒ－３０５～Ｒ－３１９；Ｎ－３０６～Ｆ－３２０；Ｙ－３０７～Ｃ－３２１；Ｌ－３０８～Ｋ－３２２；Ｌ－３０９～Ｃ－３２３；Ｖ－３１０～Ｃ－３２４；Ｆ－３１１～Ｓ－３２５；Ｆ－３１２～１－３２６；Ｑ－３１３～Ｆ－３２７；Ｋ－３１４～Ｑ－３２８；Ｈ－３１５～Ｑ－３２９；Ｉ－３１６～Ｅ－３３０；Ａ－３１７～Ａ－３３１；Ｋ－３１８～Ｐ－３３２；Ｒ－３１９～Ｅ－３３３；Ｆ－３２０～Ｒ－３３４；Ｃ－３２１～Ａ－３３５；Ｋ－３２２～Ｓ－３３６；Ｃ－３２３～Ｓ－３３７；Ｃ－３２４～Ｖ－３３８；Ｓ－３２５～Ｙ－３３９；Ｉ－３２６～Ｔ－３４０；Ｆ－３２７～Ｒ－３４１；Ｑ－３２８～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。

【０２３９】

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。

【０２４０】

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。　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。

【０２４１】

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。

【０２４２】

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。

【０２４３】

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って検出される。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。

【０２４４】

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ブロッティングのような、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．ら，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。

【０２４５】

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。

【０２４６】

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αヘリックスおよびαヘリックス形成領域（「α領域」）、βシートおよびβシート形成領域（「β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、α両親媒性領域、β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Ｈ領域、β領域、ターン領域、およびコイル領域；Ｃｈｏｕ－ＦａｓｍａｎのＨ領域、β領域、およびコイル領域；Ｋｙｔｅ－Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ領域および疎水性領域；Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇ　Ｈおよびβ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。

【０２４７】

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αヘリックスおよびαヘリックス形成領域（「α－領域」）、β－シートおよびβ－シート形成領域（「β－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、α両親媒性領域、β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れるフラグメントを含む。

【０２４８】

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（ＣＣＲ５）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*ＳＴＡＲ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ＶＩＩＩ、ＩＸ、ＸＩＩＩ、およびＸＩＶ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（ＣＣＲ５）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ＶＩＩＩ、ＩＸ、ＸＩＩＩ、およびＸＩＶにおいて提示されるデータから決定される。

【０２４９】

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*ＳＴＡＲ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。

【０２５０】

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、Ｇａｒｎｉｅｒ－Ｒｏｂｓｏｎのα－領域、β－領域、ターン領域、およびコイル領域、Ｃｈｏｕ－Ｆａｓｍａｎのα－領域、β－領域、およびターン領域、Ｋｙｔｅ－Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅの親水性領域およびＨｏｐｐ－Ｗｏｏｄｓの疎水性領域、Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇのα－両親媒性領域およびβ－両親媒性領域、Ｋａｒｐｌｕｓ－Ｓｃｈｕｌｚの可撓性領域、高い抗原性指標のＪａｍｅｓｏｎ－Ｗｏｌｆの領域、ならびにＥｍｉｎｉの表面形成領域が挙げられる。

【０２５１】

【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

表 1(つづき)

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	.	.	.	-1.54	1.40	.	*	.	-0.60	0.33
Asn	71	A	A	.	B	.	.	.	-1.84	1.40	.	.	.	-0.60	0.15
Leu	72	.	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

表 1（つづき）

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	0.63
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

表 1（つづき）

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

表 1（77ページ）

残基		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	1.59	*	*	.	-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	T	.	.	-1.14	1.86	.	.	.	-0.20	0.23
Trp	248		.	.	.	B	.	.	C	-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

表 1(77ページ)

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	.	.	.	.	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

表1(つづき)

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	.	.	C	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

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。

【０２５２】

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。

【０２５３】

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。

【０２５４】

（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。

【０２５５】

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いう。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分として定義され、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、抗体がその抗原に免疫特異的に結合し得るタンパク質の一部として定義される。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。

【０２５６】

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、ミリストイ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。

【０２５７】

エピトープとして機能するフラグメントは、任意の従来の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）。

【０２５８】

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。

【０２５９】

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であることが示されている。

【０２６０】

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。

【０２６１】

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。

【０２６２】

本発明をペプチドを産生するエピトープはまた、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　Ｆｅｂ；（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）。

【０２６３】

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。

【０２６４】

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。

【０２６５】

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、Ｃ

Ｈ２、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０　４１３　６２２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、ＥＰ　３９４，８２７；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒ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　８８：８９７２－８９７）。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、Ｎｉ２＋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。

【０２６６】

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Ｐａｔｔｅｎら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　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セグメントをアセンブルすることを含む。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って改変され得る。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。

【０２６７】

（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。

【０２６８】

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、κ軽鎖およびλ軽鎖として分類される。重鎖は、μ、δ、γ、αまたはε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。

【０２６９】

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。

【０２７０】

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 Ｐｒｏｔｅｉｎｓ 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。

【０２７１】

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、Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ&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）」（Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒら、「Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ（Ｊａｎｕｓｉｎｓ）ｔａｒｇｅｔ ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ ｏｎ ＨＩＶ ｉｎｆｅｃｔｅｄ ｃｅｌｌｓ」ＥＭＢＯ Ｊ １０：３６５５－３６５９（１９９１）およびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒら、「Ｊａｎｕｓｉｎ：ｎｅｗ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｄｅｓｉｇｎ ｆｏｒ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ｒｅａｇｅｎｔｓ」Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ Ｓｕｐｐｌ ７：５１－５２（１９９２））。

【０２７２】

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。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、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（すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子）をいう。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、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、κまたはλ形態の軽鎖と対になり得る。

【０２７３】

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’）２、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、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉらによる米国特許第５，９３９，５９８号に記載されるような）から単離された抗体を含む。

【０２７４】

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、ＰＣＴ公開WO　９３／１７７１５；WO９２／０８８０２；WO　９１／００３６０；WO　９２／０５７９３；Ｔｕｔｔら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０－６９（１９９１）；米国特許第４，４７４，８９３号；同第４，７１４，６８１号；同第４，９２５，６４８号；同第５，５７３，９２０号；同第５，６０１，８１９号；Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－１５５３（１９９２）を参照のこと。

【０２７５】

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Ｔｈｒ１６～Ｖａｌ２５、Ｇｌｎ５９～Ｔｈｒ６５、Ｔｈｒ１６７～Ｌｅｕ１７４、Ｓｅｒ１７９～Ｓｅｒ１８５、Ｌｅｕ２２２～Ａｌａ２３３、Ａｓｎ２６８～Ｇｌｎ２７７、Ｈｉｓ３１５～Ｓ

ｅｒ３２５、Ｇｌｕ３３０～Ｓｅｒ３３６、Ｔｙｒ３３９～Ｉｌｅ３４８、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（ＣＣＲ５）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８９～１０２、１６７～１９５および／または２６１～２７４）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。

【０２７６】

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（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）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６５％、少なくとも６０％、少なくとも５５％および少なくとも５０％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９５％未満の、９０％未満の、８５％未満の、８０％未満の、７５％未満の、７０％未満の、６５％未満の、６０％未満の、５５％未満のおよび５０％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体が含まれる。

【０２７７】

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。

【０２７８】

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、ＣＸＲＣ１、ＣＸＲＣ２、ＣＸＣＲ３、ＣＸＣＲ４および／またはＣＸＣＲ５のような）とは、交差反応しない。

【０２７９】

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、Ｃ

ＣＲ６、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。

【０２８０】

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。

【０２８１】

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。

【０２８２】

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。

【０２８３】

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、５×１０$^{-2}$M、１０$^{-2}$M、５×１０$^{-3}$M、１０$^{-3}$M、５×１０$^{-4}$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、５×１０$^{-5}$M、１０$^{-5}$M、５×１０$^{-6}$M、１０$^{-6}$M、５×１０$^{-7}$M、１０$^{-7}$M、５×１０$^{-8}$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、５×１０$^{-9}$M、１０$^{-9}$M、５×１０$^{-10}$M、１０$^{-10}$M、５×１０$^{-11}$M、１０$^{-11}$M、５×１０$^{-12}$M、１０$^{-12}$M、５×１０$^{-13}$M、１０$^{-13}$M、５×１０$^{-14}$M、１０$^{-14}$M、５×１０$^{-15}$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。

【０２８４】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、５×１０$^{-2}$秒$^{-1}$、１０$^{-2}$秒$^{-1}$、５×１０$^{-3}$秒$^{-1}$または１０$^{-3}$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、５×１０$^{-4}$秒$^{-1}$、１０$^{-4}$秒$^{-1}$、５×１０$^{-5}$秒$^{-1}$、１０$^{-5}$秒$^{-1}$、５×１０$^{-6}$秒$^{-1}$、１０$^{-6}$秒$^{-1}$、５×１０$^{-7}$秒$^{-1}$、または１０$^{-7}$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。

【０２８５】

他の実施形態において、本発明の抗体は、１０^{3}M^{-1}秒$^{-1}$、５×１０^{3}M^{-1}秒$^{-1}$、１０^{4}M^{-1}秒$^{-1}$または５×１０^{4}M^{-1}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}秒$^{-1}$、５×１０^{5}M^{-1}秒$^{-1}$、１０^{6}M^{-1}秒$^{-1}$、５×１０^{6}M^{-1}秒$^{-1}$、または１０^{7}M^{-1}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。

【０２８６】

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。

【０２８７】

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。

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ス（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。

【０２８８】

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。

【０２８９】

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。

【０２９０】

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重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重鎖に含まれる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重鎖に含まれる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重鎖に含まれる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。

【０２９１】

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（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　ＣＤＲ１およびＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ１およびＶＬ　ＣＤＲ２、ＶＨ　ＣＤＲ１およびＶＬ　ＣＤＲ３、ＶＨ　ＣＤＲ２およびＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２およびＶＬ　ＣＤＲ２、ＶＨ　ＣＤＲ２およびＶＬ　ＣＤＲ

３、ＶＨ　ＣＤＲ３およびＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ３およびＶＬ　ＣＤＲ２、ＶＨ　ＣＤＲ３およびＶＬ　ＣＤＲ３、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。

【０２９２】

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。

【０２９３】

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（ＣＣ

Ｒ５）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）、β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。

【０２９４】

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。

【０２９５】

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，Ｃｕｒｒｅｎ

ｔ 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。

【０２９６】

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。

【０２９７】

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。

【０２９８】

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、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－β、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６０を参照のこと））、ＭＩＰ１－β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。

【０２９９】

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－β）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－β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（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（ＣＣ

Ｒ５）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。

【０３００】

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。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。

【０３０１】

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－β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－β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－β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－β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－β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、ＭＩＰ１－β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　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－β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。

【０３０２】

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。

【０３０３】

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。

【０３０４】

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－β；抗ＣＤ４抗体のようなＣＤ４結合ポリペプチド；間質由来の因子　１α（ＳＤＦ－α）のようなＣＸＣＲ４結合ポリペプチド；および／またはＭＩＰ１－α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－β；抗ＣＤ４抗体のようなＣＤ４結合ポリペプチド；間質由来の因子　１α（ＳＤＦ－α）のようなＣＸＣＲ４結合ポリペプチド；および／またはＭＩＰ１－α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。

【０３０５】

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）。

【０３０６】

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。

【０３０７】

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。

【０３０８】

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（ｃｏｖａｌｅｎｔ 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（ｐｈｏｓｐｈｙｌａｔｉｏｎ）、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、特異的化学切断、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。

【０３０９】

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－ゲラン杆菌）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。

【０３１０】

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。

【０３１１】

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用いてマウスを免疫化することによって、産生され得る。

【０３１２】

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。

【０３１３】

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細胞の不死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、ＧＭ １５００、ＳＫＯ－００７、ＲＰＭＩ ８２２６、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。

【０３１４】

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’）２フラグメントは、例えば、パパイン（Ｆａｂフラグメントを産生する）またはペプシン（Ｆ（ａｂ’）２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’）２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。

【０３１５】

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、レパー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ＶＩＩＩタンパク質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）。

【０３１６】

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’）２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、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　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）。

【０３１７】

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、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　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　Ｅｎｇｉｎｅｅ

ｒｉｎｇ 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）。

【０３１８】

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；（これらの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。

【０３１９】

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、従来の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ールの詳細な議論については、例えば、ＰＣＴ公開WO９８／２４８９３；WO９２／０１０４７；WO９６／３４０９６；WO９６／３３７３５；欧州特許第０　５９８　８７７；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。

【０３２０】

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。（Ｊｅｓｐｅｒｓら、Ｂｉｏ／ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１２：８９９－９０３（１９８８））。

【０３２１】

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、ＦＡＳＥＢＪ．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。

【０３２２】

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．８：２２４５～２２

５０（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。

【０３２３】

（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。

【０３２４】

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。

【０３２５】

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。

【０３２６】

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。

【０３２７】

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。

【０３２８】

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™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™種を２４５ｋｂおよび１０１９０ｋｂ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κ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™マウスを作製するために、ヒト重鎖遺伝子座およびκ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。Ｍｅｎｄｅａら、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｎｅｔｉｃｓ １５：１４６～１５６（１９９７）、ＧｒｅｅｎおよびＪａｋｏｂｏｖｉｓ 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。

【０３２９】

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 ０ ４７１ １５１ 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。

【０３３０】

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。

【０３３１】

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）；Ｋｈｏｌｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｎｏｌ．６：２９２（１９７６）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．、５７１～６８１頁（１９８１））。簡単には、ＸｅｎｏＭｏｕｓｅ™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、適切な骨髄腫細胞株と融合した。任意の適切な骨髄腫細胞株が、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髄腫細胞株（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。

【０３３２】

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髄型細胞株と融合し、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。

【０３３３】

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、およびＸＦ１１．１Ｇ８。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κ軽鎖を発現する。ＩｇＧ２を発現する種を使用して本発明

の細胞株および抗体を作製した。従って、細胞株によって産生された各抗体は、ヒトκ軽鎖を有する完全ヒトＩｇＧ２重鎖である。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。

【０３３４】

ハイブリドーマＸＦ１１．１Ｄ８を２００１年２月７日にＡＴＣＣに寄託し、ＡＴＣＣ受託番号＿＿＿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＿＿＿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＿＿＿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＿＿＿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＿＿＿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。

【０３３５】

（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ハイブリドーマ細胞株）

【０３３６】

【表２】

ハイブリドーマ		ATCC 受託番号	ATCC 寄託日
XF11.1D8			2001年2月7日
XF11.4D10			2001年2月7日
XF11.4C4			2001年2月7日
XF11.5H1			2001年2月7日
XF11.1G8			2001年2月7日

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。

【０３３７】

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７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。

【０３３８】

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。

【０３３９】

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ＶＨ　ＣＤＲ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（ＣＣＲ５）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）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ＨＶ　ＣＤＲ２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、こられから構成される。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）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（ＣＣＲ５）もしくはＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）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。

【０３４０】

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に含まれる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（ＣＣＲ５）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）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重鎖に含まれる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）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重鎖に含まれる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（ＣＣＲ５）もしくはＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）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。

【０３４１】

本発明はまた、Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）ポリペプチドまたは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ＶＨ　ＣＤＲおよび１、２、３以上のＶＬ　ＣＤＲ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（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ＶＨ　ＣＤＲおよびＶＬ　ＣＤＲのＶＨ　ＣＤＲ１およびＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ１およびＶＬ　ＣＤＲ２、ＶＨ　ＣＤＲ１およびＶＬ　ＣＤＲ３、ＶＨ　ＣＤＲ２およびＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ２およびＶＬ　ＣＤＲ２、ＶＨ　ＣＤＲ２およびＶＬ　ＣＤＲ３、ＶＨ　ＣＤＲ３およびＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＨ　ＣＤＲ３およびＶＬ　ＣＤＲ２、ＶＨ　ＣＤＲ３およびＶＬ　ＣＤＲ３、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ｓｃＦｖ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、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。

【０３４２】

（Ｘｅｎｏｍｏｕｓ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（ＣＣＲ５）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ＶＨ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ＶＬ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ＶＨ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ＶＬ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。

【０３４３】

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、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（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。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ＰＣＲ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ＶＨドメイン、ＶＨＣＤＲ１、ＶＨＣＤＲ２、ＶＨＣＤＲ３、ＶＬドメイン、ＶＬＣＤＲ１、ＶＬＣＤＲ２、またはＶＬＣＤＲ３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）、β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。

【０３４４】

例えば、フレームワーク領域のみかまたは抗体分子のＣＤＲ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。

【０３４５】

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、ストリンジェントな条件下で（例えば、約５０～６５℃での０．２×ＳＳＣ／０．１％　ＳＤＳ中での１回以上の洗浄が後に続く、約４５℃で６×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）、高度にストリンジェントな条件下で（例えば、約６８℃での０．１×ＳＳＣ／０．２％　ＳＤＳ中での１回以上の洗浄が後に続く、約４５℃で６×ＳＳＣ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ェント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。

【０３４６】

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。

【０３４７】

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％、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ＶＬドメインを含むか、あるいはそれらからなる。

【０３４８】

（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、またはファージディスプレイライブラリーを作成するために使用され得る。さらに、本発明のポリペプチド抗体は、化学的に合成され得るか、または組換え発現系の使用を介して産生され得る。

【０３４９】

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’の単一のＴヌクレオチド突出（これは、ＰＣＲ反応について使用される多数のＤＮＡポリメラーゼによって、ＰＣＲ産物の５’および３’末端に付加された突出する単一のアデニンヌクレオ

チドに相補的である）からなるＰＣＲクローニング部位を有するベクターを使用してクローン化され得る。次いで、ＶＨドメインおよびＶＬドメインは、当該分野で公知の従来の方法を使用して配列決定され得る。

【０３５０】

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κＶＬドメインおよびλＶＬドメインについてのヒトκ定常領域またはλ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（例えば、Ｇｕｏら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．８２：９２５－３１（１９９７）およびＡｍｅｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１８４：１７７－８６（１９９５を参照のこと（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））。

【０３５１】

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。

【０３５２】

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。

【０３５３】

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。

【０３５４】

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。

【０３５５】

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。

【０３５６】

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。

【０３５７】

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ｐＣｏｍｂ　３　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ＶＩＩＩ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５，８２１，０４７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）。

【０３５８】

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）；Ｎｅｕｂ

ｅｒｇｅｒ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可変領域を有する（例えば、ヒト化抗体）。

【０３５９】

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（Ｓｋｅｒｒａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：１０３８－１０４１（１９８８））。

【０３６０】

（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。

【０３６１】

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、重鎖または軽鎖の可変ドメインを含有する）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可変ドメイン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、そしてこの抗体の可変ドメインは、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。

【０３６２】

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。

【０３６３】

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された、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（Ｆｏｅｃｋｉｎｇら、Ｇｅｎｅ　４５：１０１（１９８６）；Ｃｏｃｋｅｔｔら、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　８：２（１９９０））。

【０３６４】

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　ｆｒａｍ

ｅ）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（Ｒｕｔｈｅｒ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、トロンビンまたは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。

【０３６５】

昆虫系においては、Ａｕｔｏｇｒａｐｈａ ｃａｌｉｆｏｒｎｉｃａ核多角体病ウィルス（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。このウィルスは、Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞において増殖する。抗体をコードする配列は、このウィ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。

【０３６６】

哺乳動物宿主細胞においては、多数のウィルスに基づく発現系が利用され得る。アデノウィ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、アデノウィルスの転写／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、アデノウィルスゲノムに挿入され得る。ウィ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ィルスを生じる（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）。

【０３６７】

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。

【０３６８】

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。ウィ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そして細胞株に拡張され得る細胞増殖巣を形成する。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、特に有用であり得る。

【０３６９】

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、Ｄｒａｃｏｐｏｌｉ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）。

【０３７０】

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））。

【０３７１】

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）またはメトトレキセ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Ｃｏｃｌｅｔｔ，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。

【０３７２】

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。

【０３７３】

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。

【０３７４】

（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０　４１３　６２２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０　３２２　０９４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、ＰＮＡＳ　８９：１４２８－１４３２（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。

【０３７５】

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；ＥＰ　３０７，４３４；ＥＰ　３６７，１６６；ＰＣＴ公開第ＷＯ９６／０４３８８号；第ＷＯ９１／０６５７０号；Ａｓｈｋｅｎａｚｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：１０５３５－１０５３９（１９９１）；Ｚｈｅｎｇら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５４：５５９０－５６００（１９９５）；およびＶｉｌら、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。

【０３７６】

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；Ｔｒａｕｎｅ

ｃｋｅｒ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）。

【０３７７】

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．ＵＳＡ８６：８２１－８２４（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。

【０３７８】

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、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－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}Ｉ、^{123}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{111}Ｉｎ、^{112}Ｉｎ、^{113m}Ｉｎ、^{115m}Ｉｍ）、テクネチウム（^{99}Ｔｃ、^{99m}Ｔｃ）、タリウム（^{201}Ｔｉ）、ガリウム（^{68}Ｇａ、^{67}Ｇａ）、パラジウム（^{103}Ｐｄ）、モリブデン（^{99}Ｍｏ）、キセノン（^{133}Ｘｅ）、フッ素（^{18}Ｆ）、^{153}Ｓｍ、^{177}Ｌｕ、^{159}Ｇｄ、^{149}Ｐｍ、^{140}Ｌａ、^{175}Ｙｂ、^{166}Ｈｏ、^{90}Ｙ、^{47}Ｓｃ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{142}Ｐｒ、^{105}Ｒｈ、および^{97}Ｒｕが挙げられる。

【０３７９】

特定の実施形態において、本発明のニュートロカインαポリペプチドおよび／またはニュートロカインαＳＶポリペプチドは、^{111}Ｉｎ、^{177}Ｌｕ、^{90}Ｙ、^{166}Ｈｏ、および^{153}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、本発明のニュートロカインαポリペプチドおよび／またはニュートロカインαＳＶ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}Ｉｎである。別の好ましい実施形態において、本発明のニュートロカインαポリペプチドおよび／またはニュートロカインαＳＶ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}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、本発明のニュートロカインαポリペプチドおよび／またはニュートロカインαＳＶ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。

【０３８０】

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）、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン（ｄｉｈｙｄｒｏｘｙ　ａｎｔｈｒａｃｉｎ　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（ｃｙｃｌｏｔｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、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）、ブレオマイシン、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。

【０３８１】

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、α－インターフェロン、β－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－α、ＴＮＦ－β、ＡＩＭ　Ｉ（国際公開第WO９７／３３８９９号を参照のこと）、ＡＩＭ　ＩＩ（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））、ＶＥＧＩ（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。

【０３８２】

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。

【０３８３】

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。

【０３８４】

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。

【０３８５】

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。

【０３８６】

（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Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、Ｃｅｌｌ，９６：７３７－４９（１９９９

）を参照のこと）が挙げられる。

【０３８７】

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。

【０３８８】

（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）。

【０３８９】

免疫沈降プロトコルは、一般に、ＲＩＰＡ緩衝液（１％ＮＰ－４０またはＴｒ

ｉｔｏｎ 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％Ｔｒａｓｙｌｏｌ）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、バ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、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。

【０３９０】

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－Ｔｗｅｅｎ２０）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３２Ｐまたは１２５Ｉ）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。

【０３９１】

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ォターゼ）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、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。

【０３９２】

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、３Ｈまたは１２５Ｉ）、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含む。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、３Ｈまたは１２５Ｉ）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。

【０３９３】

好ましい実施形態において、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。

【０３９４】

（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ィ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。

【０３９５】

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。

【０３９６】

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。

【０３９７】

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、および抗レトロウィルス剤）（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ィ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。

【０３９８】

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、５×１０$^{-2}$M、１０$^{-2}$M、５×１０$^{-3}$M、１０$^{-3}$M、５×１０$^{-4}$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、５×１０$^{-5}$M、１０$^{-5}$M、５×１０$^{-6}$M、１０$^{-6}$M、５×１０$^{-7}$M、１０$^{-7}$M、５×１０$^{-8}$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、５×１０$^{-9}$M、１０$^{-9}$M、５×１０$^{-10}$M、１０$^{-10}$M、５×１０$^{-11}$M、１０$^{-11}$M、５×１０$^{-12}$M、１０$^{-12}$M、５×１０$^{-13}$M、１０$^{-13}$M、５×１０$^{-14}$M、１０$^{-14}$M、５×１０$^{-15}$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。

【０３９９】

（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。

【０４００】

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。

【０４０１】

遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌら，Ｃｌｉ

ｎｉｃａｌ 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。

【０４０２】

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（ＫｏｌｌｅｒおよびＳｍｉｔｈｉｅｓ, Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ ８６：８９３２－８９３５（１９８９）；Ｚｉｊｌｓｔｒａら, Ｎａｔｕｒｅ 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。

【０４０３】

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。

【０４０４】

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；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ、Ｄｕｐｏｎｔ）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、ＷｕおよびＷｕ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．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（ｆｕｓｏｇｅｎｉｃ）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、ＰＣＴ公開第ＷＯ９２／０６１８０号；同第ＷＯ９２／２２６３５号；同第ＷＯ９２／２０３１６号；同第ＷＯ９３／１４１８８号、同第ＷＯ９３／２０２２１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（ＫｏｌｌｅｒおよびＳｍｉｔｈｉｅｓ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８９３２－８９３５（１９８９）；Ｚｉｊｌｓｔｒａら，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：４３５－４３８（１９８９））。

【０４０５】

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（Ｍｉｌｌｅｒら，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．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、Ｂｏｅｓｅｎら，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ 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、ｍｄｒＩ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：Ｃｌｏｗｅｓら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９３：６４４－６５１（１９９４）；Ｋｉｅｍら，Ｂｌｏｏｄ 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）。

【０４０６】

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。

【０４０７】

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）。

【０４０８】

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。

【０４０９】

この実施形態においては、得られた組換え細胞のインビボ投与の前に、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。

【０４１０】

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、そして当業者により決定され得る。

【０４１１】

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）。

【０４１２】

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。

【０４１３】

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）。

【０４１４】

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。

【０４１５】

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。

【０４１６】

（治療的／予防的な投与および組成物）

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。

【０４１７】

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。

【０４１８】

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、注入またはボーラス注射により、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リザーバのようなリ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。

【０４１９】

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て）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、シアラスティック（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。

【０４２０】

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）。

【０４２１】

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　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　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Ｂａｌ

ｌ（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、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）。

【０４２２】

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））。

【０４２３】

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。

【０４２４】

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ー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、チョーク、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、投与形態に適するべきである。

【０４２５】

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で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。

【０４２６】

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。

【０４２７】

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。

【０４２８】

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。

【０４２９】

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。

【０４３０】

（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。

【０４３１】

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。

【０４３２】

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（１２５Ｉ、１２１Ｉ）、炭素（１４Ｃ）、硫黄（３５Ｓ）、トリチウム（３Ｈ）、インジウム（１１２Ｉｎ）、およびテクネチウム（９９Ｔｃ））；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。

【０４３３】

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。

【０４３４】

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９９ｍＴｃ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。

【０４３５】

用いられる標識の型および投与の様式を含む、いくつかの可変要素に依存して、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。

【０４３６】

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。

【０４３７】

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（ｐｏｓｉｔｉｏｎ）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。

【０４３８】

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（ｐａｔｅｎｔ）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。

【０４３９】

（キット）

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）に結合体化され得るか、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）。

【０４４０】

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はたローダミン）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。

【０４４１】

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。

【０４４２】

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。

【０４４３】

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。

【０４４４】

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。

【０４４５】

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。

【０４４６】

（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。

【０４４７】

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。

【０４４８】

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。

【０４４９】

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。

【０４５０】

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０　４１３　６２２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０　３２２　０９４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。

【０４５１】

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（ＥＰ　３９４，８２７；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒ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））。

【０４５２】

同様に、ＥＰ－Ａ－Ｏ　４６４　５３３（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－Ａ　０２３２　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（Ｄ．Ｂｅｎｎｅｔｔら、Ｊ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ　８：５２－５８（１９９５）；Ｋ．Ｊｏｈａｎｓｏｎら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７０：９４５９－９４７１（１９９５）を参照のこと）。

【０４５３】

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．ＵＳＡ８６：８２１－８２４（１９８９）に記載されるように、ヘキサーヒスチジンは、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））。

【０４５４】

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。

【０４５５】

（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。

【０４５６】

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、ウィルスベクターは、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。

【０４５７】

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λＰＬ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。

【０４５８】

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）；酵母細胞のような真菌細胞（例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅまたはＰｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ（ＡＴＣＣ受託番号２０１１７８））；Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌｉａ　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。

【０４５９】

グルタミンシンターゼ（ＧＳ）はたは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、ＮＳ０）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。

【０４６０】

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，Ｃａｒｌｂａｄ，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。

【０４６１】

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、Ｄａｖｉｓ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。

【０４６２】

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。

【０４６３】

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。

【０４６４】

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ーフィック（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_2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_2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）のうちの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．１

５：３８５９－７６（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。

【０４６５】

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Ｐｉｃｈｅａ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　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。

【０４６６】

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、ｐＧＡＰＺα、ｐＰＩＣ９、ｐＰＩＣ３．５、ｐＨＩＬ－Ｄ２、ｐＨＩＬ－Ｓ１、ｐＰＩＣ３．５Ｋ、およびＰＡＯ８１５）の代わりに用いられ得る。

【０４６７】

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ｐＧＡＰＺα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。

【０４６８】

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、新しい転写ユニットを形成する（例えば、１９９７年6月２４日に発行された米国特許第５，６４１，６７０号；１９９８年3月３１日に発行された米国特許第５，７３３，７６１号；１９９６年9月２６日に公開された国際公開第WO　９６／２９４１１号；１９９４年8月４日に公開された国際公開第WO　９４／１２６５０；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。これらの開示の各々は、それら全体において参考として援用される）。

【０４６９】

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、ａ－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、デザイナーアミノ酸（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。

【０４７０】

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／ブロッキング基による誘導体化、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、$NaBH_4$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。

【０４７１】

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。

【０４７２】

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。

【０４７３】

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。

【０４７４】

ポリエチレングリコール分子（または他の化学的部分）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。

【０４７５】

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。

【０４７６】

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。

【０４７７】

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。

【０４７８】

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。

【０４７９】

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、リポ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（ｏｓｅｔｅｏｐｒｏｔｅｇｅｒｉｎ）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。

【０４８０】

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（Ｌａｎｄｓｃｈｕｌｚ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WO　９４／１０３０８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。

【０４８１】

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　Ｌｅｔｔｅｒｓ　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。

【０４８２】

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。

【０４８３】

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ポ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）。

【０４８４】

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ポ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）。

【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。

【０４８６】

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。

【０４８７】

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。

【０４８８】

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。

【０４８９】

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塩基ほどの短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。

【０４９０】

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。

【０４９１】

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。

【０４９２】

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（ＣＣＲ５）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。

【０４９３】

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（ＣＣＲ５）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。

【０４９４】

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。

【０４９５】

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３１’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。

【０４９６】

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ー（ｉｎｄｉｃａｔｏｒ）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。

【０４９７】

「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ｍＲＮＡ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ｍＲＮＡ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ｍＲＮＡ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ｍＲＮＡ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ｍＲＮＡ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ｍＲＮＡ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。

【０４９８】

「生物学的サンプル」とは、本発明のポリペプチドまたはｍＲＮＡ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ｍＲＮＡを含む場合、組織生検が好ましい供給源である。

【０４９９】

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。

【０５００】

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。

【０５０１】

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。

【０５０２】

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 Ｖｉｒａｌ 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）。

【０５０３】

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。

【０５０４】

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（三重らせン－Ｌｅｅら，Ｎｕｃｌ．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。

【０５０５】

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。

【０５０６】

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、米国軍は、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。

【０５０７】

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。

【０５０８】

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。（Ｅｒｌｉｃｈ，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。

【０５０９】

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。

【０５１０】

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。

【０５１１】

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）遺伝し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。

【０５１２】

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。

【０５１３】

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。

【０５１４】

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。

【０５１５】

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。

【０５１６】

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（ｓｕｂｔｒａｃｔ－ｏｕｔ）」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。

【０５１７】

（Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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。

【０５１８】

Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）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（Ｊａｌｋａｎｅｎ，Ｍ．，ら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６－９８５（１９８５）；Ｊａｌｋａｎｅｎ，Ｍ．，ら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３０８７－３０９６（１９８７）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（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）、および放射性同位体（例えば、ヨウ素（１２５Ｉ、１２１Ｉ）、炭素（１４

Ｃ）、硫黄（３５Ｓ）、トリチウム（３Ｈ）、インジウム（１１２Ｉｎ）、およびテクネチウム（９９Ｔｃ））、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。

【０５１９】

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。

【０５２０】

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．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。

【０５２１】

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（ＣＣＲ５）ポリペプチドの発現をアッセイする工程；（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。

【０５２２】

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サプレッサー）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。

【０５２３】

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。

【０５２４】

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。

【０５２５】

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。

【０５２６】

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。

【０５２７】

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。

【０５２８】

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。

【０５２９】

（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ＷＯ９０／１１０９２を参照のこと。

【０５３０】

従って、例えば、患者由来の細胞は、エキソビボで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。

【０５３１】

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、薬学的に受容可能な液体または水性キャリアにて送達され得る。

【０５３２】

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、リポソーム処方物、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、リポ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。

【０５３３】

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ｐＷＬＮＥＯ、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。

【０５３４】

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。

【０５３５】

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。

【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）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。

【０５３７】

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。

【０５３８】

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。

【０５３９】

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。

【０５４０】

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。

【０５４１】

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、８６：６０７７～６０

８１（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。

【０５４２】

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。

【０５４３】

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。

【０５４４】

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。

【０５４５】

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。このサンプルを一晩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。

【０５４６】

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、予め形成されたリポソームをＤＮＡと直接混合する。正に荷電したリ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^{2+}－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. Ｃｏｍｍｕｍ. 、７６：８３６（１９７７）；Ｆｒａｌｅｙら、Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ、７６：３３４８（１９７９））；界面活性剤透析（Ｅｎｏｃｈら、Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ、７６：１４５（１９７９））；および逆相エバポレーション（ＲＥＶ）（Ｆｒａｌｅｙ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。

【０５４７】

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（ｒａｔｉｏｎ）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。

【０５４８】

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。

【０５４９】

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、エキソビボまたはインビ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。

【０５５０】

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　Ｔｈｅａｐｙ、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$CaPO_4$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。

【０５５１】

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、インビトロまたはインビ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。

【０５５２】

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、エキソビボまたはインビボで細胞を操作する。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（Ｓｃｈｗａｒｔｚｅｔら、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、コトンラットの肺へのα－１－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ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５２：４３１～４３４（１９９１）；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、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ら Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７６：６６０６（１９７９））。

【０５５３】

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、Ｋｏｚ

ａｒｓｋｙおよびＷｉｌｓｏｎ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖｅｌ．、３：４９９～５０３（１９９３）；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄら、Ｃｅｌｌ、６８：１４３～１５５（１９９２）；Ｅｎｇｅｌｈａｒｄｔら、Ｈｕｍａｎ Ｇｅｎｅｔ．Ｔｈｅｒ．、４：７５９～７６９（１９９３）；Ｙａｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ、７：３６２～３６９（１９９４）；Ｗｉｌｓｏｎら、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ＥｌａおよびＥｌｂ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。

【０５５４】

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。

【０５５５】

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、エキソビボまたはインビボ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，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。

【０５５６】

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ら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ（１９８９）において見い出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、エキソビボまたはインビボのいずれかで、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。

【０５５７】

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。

【０５５８】

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。

【０５５９】

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。

【０５６０】

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ポソーム、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。

【０５６１】

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（ＣＣＲ５）配列の発現を駆動する。

【０５６２】

Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）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、ＶＥＧＦ－１、ＶＥＧＦ－２、ＶＥＧＦ－３、上皮増殖因子αおよびβ、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α、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。

【０５６３】

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）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。

【０５６４】

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（ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ）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ー（ｄｅｐｏｔ）、他の市販デポー（ｄｅｐｏｔ）物質、浸透圧ポンプ（例えば、Ａｌｚａ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（Ｋａｎｅｄａら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４３：３７５（１９８９））。

【０５６５】

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。

【０５６６】

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。

【０５６７】

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。

【０５６８】

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、Ｓｔｒｉｂｌｉｎｇら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１８９：１１２７７～１

１２８１（１９９２）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、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。

【０５６９】

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。

【０５７０】

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。

【０５７１】

（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。

【０５７２】

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－１α、ＭＩＰ－１β、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（ｃｏ－ｒｅｃｅｐｔｏｒ）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。

【０５７３】

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－１αおよびＭＩＰ－１β）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－１αおよびＭＩＰ－１β）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。

【０５７４】

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、グレーヴ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）。

【０５７５】

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。

【０５７６】

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。

【０５７７】

（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、ＨＩ

Ｖ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。

【０５７８】

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、カポージ肉腫、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、脳のトキソプラスマ症、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、バーキットリンパ腫、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スマ症、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。

【０５７９】

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。

【０５８０】

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。

【０５８１】

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ージ肉腫を診断、処置、予防、および／または改善し得る。

【０５８２】

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。

【０５８３】

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。

【０５８４】

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。

【０５８５】

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。

【０５８６】

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。

【０５８７】

（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ーまたは検出因子（ｄｅｔｅｃｔｏｒ）として使用され得る。

【０５８８】

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。

【０５８９】

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（多能性幹細胞を含む）の分化および増殖を増加させ得る。

【０５９０】

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。

【０５９１】

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（ｕｎｓｐｅｃｉｆｉｅｄ）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、κ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。

【０５９２】

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。

【０５９３】

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・第四鰓嚢症候群、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。

【０５９４】

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。

【０５９５】

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得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、Ｃ５、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。

【０５９６】

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。

【０５９７】

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。

【０５９８】

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）または瘢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。

【０５９９】

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。

【０６００】

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、そ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、自己免疫性甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、自己免疫性肺炎症、ギヤンバレー症候群、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。

【０６０１】

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。

【０６０２】

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。

【０６０３】

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に関与するが、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を予防するにおいて有効な治療であり得る。

【０６０４】

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、炎症応答に関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、感染に関連する炎症（例えば、敗血症性ショック、または全身炎症応答症候群）、虚血再灌流障害に関連する炎症、内毒素致死に関連する炎症、補体媒介性超急性拒絶に関連する炎症、腎炎に関連する炎症、サイトカインまたはケモカインが誘導する肺傷害に関連する

炎症、炎症性腸疾患に関連する炎症、クローン病に関連する炎症、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、膵炎、サルコイドーシス、皮膚炎、腎虚血再灌流障害、グレーヴズ病、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）。

【０６０５】

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、肺胞炎、胆管胆嚢炎、虫垂炎、亀頭炎、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（ｃｏｃｈｌｉｔｉｓ）、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、歯髄炎、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。

【０６０６】

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。

【０６０７】

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（Ｌｅｏｋｏｃｙｔｏｓｅｓ）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。

【０６０８】

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。

【０６０９】

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、ヴィスコットー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。

【０６１０】

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。

【０６１１】

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。

【０６１２】

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、バーキットリンパ腫、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。

【０６１３】

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、そ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。

【０６１４】

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。

【０６１５】

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。

【０６１６】

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。

【０６１７】

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。

【０６１８】

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。

【０６１９】

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。

【０６２０】

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。

【０６２１】

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。

【０６２２】

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。

【０６２３】

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。

【０６２４】

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。

【０６２５】

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。

【０６２６】

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。

【０６２７】

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。

【０６２８】

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。

【０６２９】

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。

【０６３０】

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。

【０６３１】

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。

【０６３２】

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。

【０６３３】

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。

【０６３４】

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。

【０６３５】

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。

【０６３６】

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。

【０６３７】

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。

【０６３８】

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。

【０６３９】

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手段として使用される。

【０６４０】

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手段として使用される。

【０６４１】

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。

【０６４２】

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手段として使用される。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、狼瘡および関節炎）、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。

【０６４３】

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。

【０６４４】

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、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。

【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、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、未定量有意性の単一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、関連性の特発性単一クローン性高ガンマグロブリン血症、およびプラス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。

【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、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。

【０６４７】

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。

【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、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。

【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、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。

【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、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。

【０６５１】

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。

【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、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。

【０６５３】

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、帯状疱疹（例えば、重篤な帯状疱疹）、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、それらに限定されない。

【０６５４】

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。

【０６５５】

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、バーキットリンパ腫、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。

【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、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。

【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、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。

【０６５８】

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。

【０６５９】

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。

【０６６０】

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。

【０６６１】

（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。

【０６６２】

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。

【０６６３】

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。

【０６６４】

（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。

【０６６５】

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：アルボウイルス、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、ブンヤウイルス科、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、パポバウイルス科、パルボウイルス科、ピコルナウイルス科、ポックスウイルス科（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、バーキットリンパ腫、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、カポージ、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）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。

【０６６６】

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。

【０６６７】

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。

【０６６８】

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。

【０６６９】

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、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｏｓｉｓ、Ｂａｃｉｌｌａｃｅａｅ（例えば、Ａｎｔｈｒａｘ、Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、Ｂａｃｔｅｒｏｉｄａｃｅａｅ、Ｂｌａｓｔｏｍｙｃｏｓｉｓ、Ｂｏｒｄｅ

ｔｅｌｌａ、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、Ｇｏｎｏｒｒｈｅａ、Ｍｅｎｉｇｏｃｏｃｃａｌ）、Ｍｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａｃｅａの感染症（例えば、Ａｃｔｉｎｏｂａｃｉｌｌｕｓ、Ｈｅａｍｏｐｈｉｌｕｓ（例えば、ＨｅａｍｏｐｈｉｌｕｓインフルエンザＢ型）、Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ）、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ、Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａｃｅａｅ、Ｃｈｌａｍｙｄｉａｃｅａｅ、Ｓｙｐｈｉｌｉｓ、Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｓｐｐ．、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃａｌ、Ｍｅｎｉｎｇｉｏｃｏｃｃａｌ、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、性感染病、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、ボツリヌム、および／またはＢ型髄膜炎。

【０６７０】

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、トキソプラスマ症、トリパノソーマ症、およびトリコモナス（Ｔｒｉｃｈｏｍｏｎａｓ）症、ならびに胞子虫症（Ｓｐｏｒｏｚｏａｎ）（例えば、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｖｉｒａｘ、Ｐｌａｓｍｏｄｉｕｍ ｆａｌｃｉｐａｒｉｕｍ、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、およびトキソプラスマ症。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、マラリアを処置、予防および／または診断するために使用される。

【０６７１】

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。

【０６７２】

（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、神経系の一部分を切断する病変、または圧縮損傷を含む）；（３）悪性病変（ここで、神経系の一部分は、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、神経系の一部分は、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踏病または筋萎縮性側索硬化症（ＡＬＳ）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Ｂ１２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、マルキアファーヴァ－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）。

【０６７３】

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、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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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。

【０６７４】

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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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。

【０６７５】

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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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。

【０６７６】

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．Ｎｅ

ｕｒｏｌ．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。

【０６７７】

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－ツース病）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。

【０６７８】

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。

【０６７９】

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）。

【０６８０】

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。

【０６８１】

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、ピルビン酸カルボキシラーゼ欠損、ピ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、マチャドージョセフ病、オリー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）。

【０６８２】

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）。

【０６８３】

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－ヤーコプ病）、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）、アプサンスてんかん、ミオクローヌスてんかん（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。

【０６８４】

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：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、大脳トキソプラスマ症、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、ブレーン膿瘍、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。

【０６８５】

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－ヤーコプ症候群、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スマ症。

【０６８６】

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、髄膜症、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、ヴェルドニッヒ－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）、プラーダーーヴィリ症候群、レット症候群、ルービンスタインーテービ症候群、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（ｈｙｄｒａｎｇｅｎｃｅｐｈａｌｙ）を含む））、アルノルトーキアーリ奇形、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）。

【０６８７】

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：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、ヴェルドニッヒーホフマン病、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、ブ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、ブ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、失声症および嗄声））、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、舞踏病、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、ブラウンーセカール

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）。

【０６８８】

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）、ＰＯＥＭＳ症候群、坐骨神経痛、味覚性発汗症およびテタニー）。

【０６８９】

（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。

【０６９０】

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。

【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。

【０６９２】

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。

【０６９３】

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。

【０６９４】

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。

【０６９５】

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）。

【０６９６】

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－ｍｅｓｓａｇｅ）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。

【０６９７】

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、リポ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。

【０６９８】

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。

【０６９９】

「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。

【０７００】

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。

【０７０１】

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。

【０７０２】

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。

【０７０３】

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。

【０７０４】

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てか、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）と組み合わせて、有利に利用され得る。

【０７０５】

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、5×10^{-2}M、10^{-2}M、5×10^{-3}M、10^{-3}M、5×10^{-4}M、10^{-4}M未満の解離定数すなわちＫｄ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、5×10^{-5}M、10^{-5}M、5×10^{-6}M、10^{-6}M、5×10^{-7}M、10^{-7}M、5×10^{-8}M、または10^{-8}M未満の解離定数すなわちＫｄ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、5×10^{-9}M、10^{-9}M、5×10^{-10}M、10^{-10}M、5×10^{-11}M、10^{-11}M、5×10^{-12}M、10^{-12}M、5×10^{-13}M、10^{-13}M、5×10^{-14}M、10^{-14}M、5×10^{-15}M、または10^{-15}M未満の解離定数すなわちＫｄを有する親和性が挙げられる。

【０７０６】

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）。

【０７０７】

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－Ｏｓｔｈｏｆ　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）と組み合わせて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；１

１１－１１２；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）。

【０７０８】

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、α４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てかのいずれかで、達成され得る。

【０７０９】

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。

【０７１０】

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。

【０７１１】

（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。

【０７１２】

心臓血管の疾患、障害、および／または状態としては、動動脈瘻（ａｒｔｅｒｉｏ－ａｒｔｅｒｉａｌ　ｆｉｓｔｕｌａ）、動静脈瘻、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）、エブスタイン奇形、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、リュタンバッシェ症候群、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。

【０７１３】

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－ｉｎｆａｒｃｔｉｏ

ｎ 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）、気心膜症、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）。

【０７１４】

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－ギャノング－レヴァイン症候群、マヘー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・ド・ポワント、および心室性頻拍が挙げられる。

【０７１５】

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（ｈｅａｒ ｍｕｒｍｕｒｓ）、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。

【０７１６】

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、弁下部性大動脈狭搾症、弁下部性肺動脈狭搾症、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。

【０７１７】

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。

【０７１８】

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、ヒッペルーリンダウ疾患（Ｈｉｐｐｅｌ－Ｌｉｎｄａｕ　Ｄｉｓｅａｓｅ）、クリペルートルノネーウェーバー症候群、スタージーウェーバー症候群、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（ａｔａｃｉａ　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。

【０７１９】

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。

【０７２０】

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。

【０７２１】

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（ｓｕｂａｒａｘｈｎｏｉｄ　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。

【０７２２】

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。

【０７２３】

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、チャーグ－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。

【０７２４】

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。

【０７２５】

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

ジデポー、他の市販のデポー物質、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。

【０７２６】

（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。

【０７２７】

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。

【０７２８】

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、または軽減するために使用され得る。

【０７２９】

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プュイトラン拘縮。

【０７３０】

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。

【０７３１】

（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．Ｏｐｔｈａｌｍｏｌ．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）。

【０７３２】

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；カポージ肉腫；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ージ肉腫のような、癌を処置または予防するために、局所送達され得る。

【０７３３】

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。

【０７３４】

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、ルベオーシス、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；過形成性瘢痕（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（Ｏｓｌｅｒ－Ｗｅｂｂｅｒ）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。

【０７３５】

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瘢痕またはケロイドに投与する工程を包含する、過形成性瘢痕およびケロイドを処置するための方法が提供される。

【０７３６】

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、過形成性瘢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、過形成性瘢痕およびケロイド（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、過形成性瘢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。

【０７３７】

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、Ｗａｌｔｍａｎら、Ａｍ．Ｊ．Ｏｐｈｔｈａｌ．８５：７０４～７１０（１９７８）およびＧａｒｔｎｅｒら、Ｓｕｒｖ．Ｏｐｈｔｈａｌ．２２：２９１～３１２（１９７８）による総説を参照のこと。

【０７３８】

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。角膜が血管化するようになる場合、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（ｏｐａｃｉｔａｔｅ）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。

【０７３９】

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を補助するために直ちに開始され得る。

【０７４０】

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膜を「防御」するための縁周囲（ｐｅｒｉｌｉｍｂｉｃ）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。

【０７４１】

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。

【０７４２】

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。

【０７４３】

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。

【０７４４】

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、過形成性瘢痕、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。

【０７４５】

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、カポージ肉腫、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（ｕｖｉｃｔｉｓ））

、遅延型創傷治癒、子宮内膜症、脈管形成、顆粒化、過形成性瘢痕（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（Ｒｏｃｈｅｌｅ　ｍｉｎａｌｉａ　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。

【０７４６】

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。

【０７４７】

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、外科縫合糸に組み込まれ得る。

【０７４８】

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。

【０７４９】

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。

【０７５０】

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。

【０７５１】

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、パクリタキセル、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、プラスミノーゲン活性化インヒビター－１、プラスミノー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。

【０７５２】

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。

【０７５３】

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、バナジルアセチルアセトネートおよび硫酸バナジル（硫酸バナジル一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。

【０７５４】

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、例えばモリブデニル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。

【０７５５】

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、α，α－ジピリジル，アミノプロピオニトリルフマレートを含む）；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；エポネマイシン；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；α２－抗プラスミン（Ｈｏｌｍｅｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２（４）：１６５９～１６６４、１９８７）；ビサントレン（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；Ａｎｇｏｓｔａｔｉｃステロイド；ＡＧＭ－１４７０；カルボキシアミノイミダゾール（ｃａｒｂｏｘｙｎａｍｉｎｏｌｍｉｄａｚｏｌｅ）；およびメタロプロテイナーゼインヒビター（例えば、ＢＢ９４）。

【０７５６】

（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。

【０７５７】

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。

【０７５８】

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。

【０７５９】

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。

【０７６０】

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。

【０７６１】

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。

【０７６２】

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応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応答性でない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。

【０７６３】

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ー分析に供される。陽性プールを同定し、そしてサブプールを、反復性のサプ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。

【０７６４】

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。

【０７６５】

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（ＣＣＲ

５）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Ｐａｔｔｅｎ，Ｐ．Ａ．ら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ　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）－α、表皮増殖因子（ＥＧＦ）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）、ＴＧＦ－β、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（ｄｏｒｓａ

ｌｉｎ）、増殖分化因子（ＧＤＦ）、ノーダル（ｎｏｄａｌ）、ＭＩＳ、インヒビン－α、ＴＧＦ－β１、ＴＧＦ－β２、ＴＧＦ－β３、ＴＧＦ－β５、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。

【０７６６】

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。

【０７６７】

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^{3}［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^{3}［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、^{3}［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。

【０７６８】

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。

【０７６９】

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プター（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。

【０７７０】

また、図３および表１に開示されるβ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β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βプリーツシート領域の任意の組合わ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（ＣＣ

Ｒ５）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β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、あるいはこれらかなら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β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。

【０７７１】

（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。

【０７７２】

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。

【０７７３】

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。

【０７７４】

「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、α毒素、リシン、アブリン、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、α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体、エトポシドまたはマイトマイシンＣのリン酸誘導体、シトシンアラビノシド、ダウノルビシン、およびドキソルビシンのフェノキシアセトアミド誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０７７５】

（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。

【０７７６】

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。

【０７７７】

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。

【０７７８】

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。

【０７７９】

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。

【０７８０】

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、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。

【０７８１】

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。

【０７８２】

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活性化に関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関連する影響、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。

【０７８３】

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。

【０７８４】

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。

【０７８５】

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チド（Ｉｇ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、Ｌａｍら、Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２－８４（１９９１）；Ｈｏｕｇｈｔｅｎら、Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８４－８６（１９９１）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、Ｓｏｎｇｙａｎｇら、Ｃｅｌｌ ７２：７６７－７７８（１９９３）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Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆａｂ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）。

【０７８６】

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。

【０７８７】

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応答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。

【０７８８】

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得ることがまた、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応答した障害の経過は、終点として役立ち得る。

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。

【０７８９】

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。

【０７９０】

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。

【０７９１】

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。

【０７９２】

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、^{35}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。

【０７９３】

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。

【０７９４】

（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。

【０７９５】

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（Ｗｉｃｋｓｔｒｏｍ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２×連結緩衝液（２０ｍＭ　ＴＲＩＳ　ＨＣｌ　ｐＨ７．５、１０ｍＭ　$MgCl_2$、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ＥｃｏＲ１／ＨｉｎｄＩＩＩ部位に連結される（ＷＯ９１／１５５８０）。

【０７９６】

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。

【０７９７】

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。

【０７９８】

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。

【０７９９】

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。

【０８００】

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）；Ｌｅｍａｉｔ

ｒｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８４：６４８－６５２（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。

【０８０１】

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－ブロモウラシル、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ルメチル）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、β－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、β－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。

【０８０２】

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、キシルロース、およびヘキソース。

【０８０３】

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。

【０８０４】

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、２－０－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））。

【０８０５】

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。

【０８０６】

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。

【０８０７】

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。

【０８０８】

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。

【０８０９】

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。

【０８１０】

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、そして水晶体嚢外白内障（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マイ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。

【０８１１】

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。

【０８１２】

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。

【０８１３】

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。

【０８１４】

（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。

【０８１５】

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、β－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（Ｓｃｈｏｎｅｂｅｒｇら、ＥＭＢＯ Ｊ．１５：１２８３（１９９６）；Ｗｏｎｇら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５：６２１９（１９９０）；Ｍｏｎｎｏｔら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７１：１５０７（１９９６）；Ｇｕｄｅｒｍａｎ

ｎ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（Ｈｅｒｔ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。

【０８１６】

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）。

【０８１７】

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て試験される。

【０８１８】

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。

【０８１９】

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。

【０８２０】

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。

【０８２１】

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。

【０８２２】

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^{2+}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。

【０８２３】

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^{2+}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。

【０８２４】

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に結合する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、上記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、ＨＩＶ－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。

【０８２５】

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（ＣＣＲ５）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ＴＭ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。

【０８２６】

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。

【０８２７】

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、哺乳度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（ＣＣＲ５）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。

【０８２８】

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。

【０８２９】

用語「Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）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４～５０長、好ましくは少なくとも４～３０長、および好ましくは少なくとも１０～３０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５０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。

【０８３０】

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

ＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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５０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。

【０８３１】

「負に荷電した」は、生理学的ｐＨ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、ＡｓｐおよびＧｌｕが挙げられる。「酸性」残基は、生理学的ｐＨにおいて負に荷電した残基である。

【０８３２】

「正に荷電した」は、生理学的ｐＨ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、ＬｙｓおよびＡｒｇが挙げられる。「塩基性」残基は、生理学的ｐＨにおいて正に荷電した残基である。

【０８３３】

「中性」は、生理学的ｐＨ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。

【０８３４】

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ーまたは事象が、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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）の能力）をさらにカバーする。

【０８３５】

「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。

【０８３６】

「Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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。

【０８３７】

節「ＨＩＶ感染を阻害する」とは、本発明のペプチドが、ＨＩＶのＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）への結合またはを阻害すること、またはＨＩＶ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（ＣＣＲ５）の生物学的活性を阻害することを意味する。

【０８３８】

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。

【０８３９】

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。

【０８４０】

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。

【０８４１】

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。

【０８４２】

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。

【０８４３】

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：

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、７３～９７、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、２７

８～３００、２７９～３００、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。

【０８４４】

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。

【０８４５】

（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。

【０８４６】

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）に対してマイトジェン性であり、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。

【０８４７】

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。

【０８４８】

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。

【０８４９】

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。

【０８５０】

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。

【０８５１】

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。

【０８５２】

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。

【０８５３】

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（ｃａｒｉｃａｄｉｃ）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。

【０８５４】

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。

【０８５５】

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、ミクロピッグ（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。

【０８５６】

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。

【０８５７】

（実施例）

（実施例１）

（ＨＤＧＮＲ１０の細菌発現および精製）

ＨＤＧＮＲ１０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ＨＤＧＮＲ１０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ＨＤＧＮＲ１０に対して３’のベクター配列を用いて最初に増幅する。ＨＤＧＮＲ１０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’ＣＧＧＡＡＴＴＣＣＴＣＣＡＴＧＧＡＴＴＡＴＣＡＡＧＴＧＴＣＡ３’（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ＨＤＧＮＲ１０コード配列の１８ヌクレオチドを含む。３’配列５’ＣＧＧＡＡＧＣＴＴＣＧＴＣＡＣＡＡＧＣＣＣＡＣＡＧＡＴＡＴ３’（配列番号４）は、ＨｉｎｄＩＩＩ部位に相補的な配列、それに続いてＨＤＧＮＲ１０コード配列の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^r）、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．ｃｏｌｉＭ１５株Ｍ１５／ｒｅｐ４（Ｑｉａｇｅｎ，Ｉｎｃ．）をＳａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．ら、Ｍｏｌｅｃ

ｕｌａｒ 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^r）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。

【０８５８】

所望の構築物を含有するクローンを、Ａｍｐ（１００μｇ／ｍｌ）およびＫａｎ（２５μｇ／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（$O.D._{600}$）が０．４と０．６と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ＨＤＧＮＲ１０を精製した（Ｈｏｃｈｕｌｉ，Ｅら、Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒａｐｈｙ ４１１：１７７－１８４（１９８４））。ＨＤＧＮＲ１０（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。

【０８５９】

（実施例２）

（ＣＯＳ細胞における組換えＨＤＧＮＲ１０の発現）

プラスミドHDGNR１０　HAの発現は、ベクターｐｃDNAＩ／Amp（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に由来し、このベクターｐｃDNAＩ／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デニル化部位。HDGNR１０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。

【０８６０】

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：

HDGNR１０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HDGNR１０のコード配列の１８ヌクレオチドを含む；３’配列（５’ＣＴＡＧＣＴＣＧＡＧＴＣＡＡＧＣＧＴＡＧＴＣＴＧＧＧＡＣＧＴＣＧＴＡＴＧＧＧＴＡＧＣＡＣＡＡＧＣＣＣＡＣＡＧＡＴＡＴＴＴＣ３’）（配列番号６）は、ＸｈｏＩ部位、翻訳終止コドン、HAタグ、およびHDGNR１０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HDGNR１０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ｐｃDNＡＩ／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　Ｐｉｎｅ

ｓ 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ーティングし、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ＨＤＧＮＲ１０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。ＨＤＧＮＲ１０ 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。

【０８６１】

（実施例３）

（Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ発現系を使用するＨＤＧＮＲ１０のクローニングおよび発現）

全長ＨＤＧＮＲ１０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。

【０８６２】

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、ＨＤＧＮＲ１０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）。

【０８６３】

３’プライマーは、配列５’ＣＧＧＧＡＴＣＣＣＧＣＴＣＡＣＡＡＧＣＣＣＡＣＡＧＡＴＡＴ３’（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ＨＤＧＮＲ１０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。

【０８６４】

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β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）。

【０８６５】

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。

【０８６６】

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。

【０８６７】

５μｇ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、１．０μｇの市販の線状化バキュロウイルス（「ＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ™ ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　ＤＮＡ」，Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ．）とともに同時トランスフェクトした。

【０８６８】

１μｇのＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ™ウイルスＤＮＡおよび５μｇのプラスミドｐＢａｃ　ＨＤＧＮＲ１０を、５０μｇ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、１０μｌのリポフェクチンおよび９０μｌ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１ｍｌを有する３５mm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℃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１ｍｌ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℃で４日間継続した。

【０８６９】

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プラークアッセイを行った。改変により、「Ｂｌｕｅ　Ｇａｌ」（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ）を含むアガロースゲルを用いて、青色染色されたプラークの容易な単離を可能にした。（「プラークアッセイ」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）。

【０８７０】

段階希釈の４日後、ウイルスを細胞に添加し、青色染色されたプラークを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、２００μｌ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。

【０８７１】

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ＳＦ９００　ＩＩ培地（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ）で置換した。４２時間後、５μＣｉの^{3}

^{5}Ｓ－メチオニンおよび５μＣｉの^{35}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。

【０８７２】

（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℃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。

【０８７３】

モロニーマウス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。

【０８７４】

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。等量のモロニーマウス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ーティングする。

【０８７５】

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、そしてパッケージング細胞をベクターで形質導入する。この時点でパッケージング細胞は、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ング細胞は、プロデューサー細胞と呼ばれる）。

【０８７６】

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。

【０８７７】

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ビ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。

【０８７８】

（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）。

【０８７９】

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。

【０８８０】

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

$MgCl_2$、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－Ｅｌｍｅｒ　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。

【０８８１】

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））。

【０８８２】

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。

【０８８３】

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。

【０８８４】

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。

【０８８５】

（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）。

【０８８６】

（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ブ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™ ＤＮＡ ｌａｂｅｌｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて、製造者の指示に従って、P^{32}で標識する。標識後、プローブを、ＣＨＲＯＭＡ ＳＰＩＮ－１００™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。

【０８８７】

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）ブロット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を、ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ™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、ブ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。

【０８８８】

（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１００ｂｐのＰＣＲフラグメントの存在によって決定する。

【０８８９】

（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^{r}）、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。

【０８９０】

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^{r}）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。

【０８９１】

所望の構築物を含むクローンを、Ａｍｐ（１００μｇ／ｍｌ）およびＫａｎ（２５μｇ／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．$_{600}$）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。

【０８９２】

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、ニッケルーニトリロ三酢酸（「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　ＱＩＡｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎｉｓｔ（１９９５）ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．，前出を参照のこと）。

【０８９３】

手短に言えば、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。

【０８９４】

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。

【０８９５】

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）シャイン－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（ｌａｑＩｑ）。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。

【０８９６】

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。

【０８９７】

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。

【０８９８】

（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。

【０８９９】

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。

【０９００】

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７０００×ｇ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。

【０９０１】

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。７０００×ｇ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。

【０９０２】

不溶性粒子を除去するための高速遠心分離（３０，０００×ｇ）に続き、Ｇｕ

ＨＣｌ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。

【０９０３】

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。

【０９０４】

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　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）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４０ｍＭ　酢酸ナトリウム、ｐＨ６．０で平衡化する。両方のカラムを、４０ｍＭ　酢酸ナトリウム、ｐＨ６．０、２００ｍＭ　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（０．２Ｍ　ＮａＣｌ、５０ｍＭ　酢酸ナトリウム、ｐＨ６．０から１．０Ｍ　ＮａＣｌ、５０ｍＭ　酢酸ナトリウム、ｐＨ６．５の範囲）を用いて溶出させる。画分を、溶出液の定常A_{280}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す

る。

【０９０５】

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。５μｇ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、０．１ｎｇ／ｍｌ未満である。

【０９０６】

（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β－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、クローン化した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。

【０９０７】

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。

【０９０８】

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、寄託されたクローンに含まれる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）。

【０９０９】

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。

【０９１０】

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。

【０９１１】

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。

【０９１２】

このポリヌクレオチドを含む５μｇ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、１．０μｇの市販の線状化バキュロウイルスＤＮＡ（「ＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ™ ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ　ＤＮＡ」，Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）とともに同時トランスフェクトする。１μｇのＢａｃｕｌｏＧｏｌｄ™ウイルスＤＮＡおよび５μｇのプラスミドを、５０μｌ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、１０μｌのリポフェクチンおよび９０μｌ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１ｍｌを加えた３５mm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℃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１ｍｌのグレース昆虫培地を添加する。次いで培養を２７℃で４日間継続する。

【０９１３】

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プラークアッセイを行う。「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（青色に着色したプラークを生ずる）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「プラークアッセイ」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、青色に着色したプラー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、２００μｌ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、３５mm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℃に貯蔵する。

【０９１４】

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、５μＣｉの^{35}Ｓ－メチオニンおよび５μＣｉの^{35}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。

【０９１５】

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。

【０９１６】

（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デ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、ＨＴＬＶＩ、ＨＩＶＩ）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。

【０９１７】

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）、ｐＳＶ２ＤＨＦＲ（ＡＴＣＣ　３７１４６）、ｐＢＣ１２ＭＩ（ＡＴＣＣ　６７１０９）、ｐＣＭＶＳｐｏｒｔ２．０、ならびにｐＣＭＶＳｐｏｒｔ３．０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、Ｃｏｓ７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。

【０９１８】

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。ＤＨＦＲ、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。

【０９１９】

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。ＤＨ

ＦＲ（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。

【０９２０】

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。

【０９２１】

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。

【０９２２】

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）。

【０９２３】

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。

【０９２４】

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。５μｇ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、０．５μｇ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、１ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を補充したα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５０ｎｇ／ｍｌのメトトレキサートおよび1ｍｇ／ｍｌのＧ４１８を補充したαマイナスＭＥＭ中のハイブリドー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（５０ｎＭ、１００ｎＭ、２００ｎＭ、４００ｎＭ、８００ｎＭ）を使用して、６ウェルのペトリ皿または１０ｍｌ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（１μM、２μM、５μM、１０mM、２０mM）を含む新たな６ウェルプレートに移す。同じ手順を、１００～２００μM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。

【０９２５】

（実施例１３：N末端および／またはC末端欠失変異体の構築）

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で開示される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。

【０９２６】

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。

【０９２７】

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。

【０９２８】

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をともに連結する。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。

【０９２９】

（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；ＥＰ　Ａ　３９４，８２７；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒ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。

【０９３０】

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。

【０９３１】

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。

【０９３２】

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）。

【０９３３】

ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域：

ＧＧＧＡＴＣＣＧＧＡＧＣＣＣＡＡＡＴＣＴＴＣＴＧＡＣＡＡＡＡＣＴＣＡＣＡ
ＣＡＴＧＣＣＣＡＣＣＧＴＧＣＣＣＡＧＣＡＣＣＴＧＡＡＴＴＣＧＡＧＧＧＴＧ
ＣＡＣＣＧＴＣＡＧＴＣＴＴＣＣＴＣＴＴＣＣＣＣＣＣＡＡＡＡＣＣＣＡＡＧＧ
ＡＣＡＣＣＣＴＣＡＴＧＡＴＣＴＣＣＣＧＧＡＣＴＣＣＴＧＡＧＧＴＣＡＣＡＴ
ＧＣＧＴＧＧＴＧＧＴＧＧＡＣＧＴＡＡＧＣＣＡＣＧＡＡＧＡＣＣＣＴＧＡＧＧ
ＴＣＡＡＧＴＴＣＡＡＣＴＧＧＴＡＣＧＴＧＧＡＣＧＧＣＧＴＧＧＡＧＧＴＧＣ
ＡＴＡＡＴＧＣＣＡＡＧＡＣＡＡＡＧＣＣＧＣＧＧＧＡＧＧＡＧＣＡＧＴＡＣＡ
ＡＣＡＧＣＡＣＧＴＡＣＣＧＴＧＴＧＧＴＣＡＧＣＧＴＣＣＴＣＡＣＣＧＴＣＣ
ＴＧＣＡＣＣＡＧＧＡＣＴＧＧＣＴＧＡＡＴＧＧＣＡＡＧＧＡＧＴＡＣＡＡＧＴ
ＧＣＡＡＧＧＴＣＴＣＣＡＡＣＡＡＡＧＣＣＣＴＣＣＣＡＡＣＣＣＣＣＡＴＣＧ
ＡＧＡＡＡＡＣＣＡＴＣＴＣＣＡＡＡＧＣＣＡＡＡＧＧＧＣＡＧＣＣＣＣＧＡＧ
ＡＡＣＣＡＣＡＧＧＴＧＴＡＣＡＣＣＣＴＧＣＣＣＣＣＡＴＣＣＣＧＧＧＡＴＧ
ＡＧＣＴＧＡＣＣＡＡＧＡＡＣＣＡＧＧＴＣＡＧＣＣＴＧＡＣＣＴＧＣＣＴＧＧ
ＴＣＡＡＡＧＧＣＴＴＣＴＡＴＣＣＡＡＧＣＧＡＣＡＴＣＧＣＣＧＴＧＧＡＧＴ
ＧＧＧＡＧＡＧＣＡＡＴＧＧＧＣＡＧＣＣＧＧＡＧＡＡＣＡＡＣＴＡＣＡＡＧＡ
ＣＣＡＣＧＣＣＴＣＣＣＧＴＧＣＴＧＧＡＣＴＣＣＧＡＣＧＧＣＴＣＣＴＴＣＴ
ＴＣＣＴＣＴＡＣＡＧＣＡＡＧＣＴＣＡＣＣＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡＧＣＡＧＧＴ
ＧＧＣＡＧＣＡＧＧＧＧＡＡＣＧＴＣＴＴＣＴＣＡＴＧＣＴＣＣＧＴＧＡＴＧＣ
ＡＴＧＡＧＧＣＴＣＴＧＣＡＣＡＡＣＣＡＣＴＡＣＡＣＧＣＡＧＡＡＧＡＧＣＣ
ＴＣＴＣＣＣＴＧＴＣＴＣＣＧＧＧＴＡＡＡＴＧＡＧＴＧＣＧＡＣＧＧＣＣＧＣ
ＧＡＣＴＣＴＡＧＡＧＧＡＴ（配列番号１０）。

【０９３４】

（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。

【０９３５】

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。

【０９３６】

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（ＳＰ２Ｏ）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。

【０９３７】

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。

【０９３８】

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、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２９：１２０２（１９８５）；Ｏｉら、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　４：２１４（１９８６）；Ｃａｂｉｌｌｙら、米国特許第４，８１６，５６７号；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら、ＥＰ　１７１４９６；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、ＥＰ　１７３４９４；Ｎｅｕｂｅｒｇｅ

ｒ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）。

【０９３９】

（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）。

【０９４０】

（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×ＴＹ（１％グルコースおよび１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する）（２×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×ＴＹ－ＡＭＰ－ＧＬＵを接種（ｉｎｎｏｃｕｌａｔｅ）し、２×10^8ＴＵのΔ遺伝子３ヘルパー（Ｍ１３Δ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×ＴＹ（１００μｇ／ｍｌアンピシリンおよび５０μｇ／ｍｌカナマイシンを含有する）中に再懸濁し、そして一晩増殖させる。ファージをＰＣＴ公報ＷＯ９２／０１０４７に記載のように調製する。

【０９４１】

Ｍ１３Δ遺伝子ＩＩＩを以下のように調製する：Ｍ１３Δ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ーを有する。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Ｍ１３Δ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、１００μｇ／ｍｌのアンピシリンおよび２５μｇ／ｍｌのカナマイシンを含有する２×ＴＹブロス（２×ＴＹ－ＡＭＰ－ＫＡＮ）３００ｍｌ中で再懸濁し、そして３７℃で振盪しながら一晩増殖させた。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０．４５μｍのフィルター（Ｍｉｎｉｓａｒｔ　ＮＭＬ；Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ）を通過させ、約10^{13}形質導入単位／ｍｌ（アンピシリン耐性クローン）の最終濃度を得る。

【０９４２】

（ライブラリーパニング）

Ｉｍｍｕｎｏｔｕｂｅｓ（Ｎｕｎｃ）を、本発明のポリペプチドの１００μｇ／ｍｌまたは１０μｇ／ｍｌのいずれかの４ｍｌを用いてＰＢＳ中で一晩被膜する。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Δ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。

【０９４３】

（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。

【０９４４】

（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－１α、ＭＩＰ－１β、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。

【０９４５】

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　Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ）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。

【０９４６】

２９３Ｔ細胞（Ｐ＋２０を過ぎて細胞を保有しない）を、2×10^{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　Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ）を含む）／１０％熱非働化ＦＢＳ（１４－５０３Ｆ　Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ）／1×Ｐｅｎｓｔｒｅｐ（１７－６０２Ｅ　Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ）中にプレートする。細胞を一晩増殖させる。

【０９４７】

翌日、滅菌溶液容器（ｂａｓｉｎ）中で、３００μｌＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（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２μｇ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、５０μｌ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１５０μｌ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。

【０９４８】

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０．５～１ｍｌ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、２００μｌ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。

【０９４９】

細胞をインキュベートする間に、１×ペンストレップ（ｐｅｎｓｔｒｅｐ）を有するDMEM中の１％ＢＳＡか、またはＨＧＳ　ＣＨＯ－５培地（１１６．６ｍｇ／Ｌの$CaCl_2$（無水物）；０．００１３０ｍｇ／Ｌ　$CuSO_4-5H_2O$；０．０５０ｍｇ／Ｌの$Fe(NO_3)_3-9H_2O$；０．４１７ｍｇ／Ｌの$FeSO_4-7H_2O$；３１１．８０ｍｇ／ＬのＫＣｌ；２８．６４ｍｇ／Ｌの$MgCl_2$；４８．８４ｍｇ／Ｌの$MgSO_4$；６９９５．５０ｍｇ／ＬのＮａＣｌ；２４００．０ｍｇ／Ｌの$NaHCO_3$；６２．５０ｍｇ／Ｌの$NaH_2PO_4-H_2O$；７１．０２ｍｇ／ＬのNa_2HPO_4；０．４３２０ｍｇ／Ｌの$ZnSO_4-7H_2O$；０．００２ｍｇ／Ｌのアラキドン酸；１．０２２ｍｇ／Ｌのコレステロール；０．０７０ｍｇ／ＬのＤＬ－α－酢酸トコフェロール；０．０５２０ｍｇ／Ｌのリノール酸；０．０１０ｍｇ／Ｌのリノレン酸；０．０１０ｍｇ／Ｌのミリスチン酸；０．０１０ｍｇ／Ｌのオレイン酸；０．０１０ｍｇ／Ｌのパルミトレイン酸（ｐａｌｍｉｔｒｉｃ　ａｃｉｄ）；０．０１０ｍｇ

／Ｌのパルミチン酸；１００mg／ＬのＰｌｕｒｏｎｉｃ　Ｆ－６８；０．０１０mg／Ｌのステアリン酸；２．２０mg／ＬのＴｗｅｅｎ８０；４５５１mg／ＬのＤ－グルコース；１３０．８５mg／mｌのＬ－アラニン；１４７．５０mg／mｌのＬ－アルギニン－ＨＣｌ；７．５０mg／mｌのＬ－アスパラギン－H_2O；６．６５mg／mｌのＬ－アスパラギン酸；２９．５６mg／mｌのＬ－シスチン－２ＨＣｌ－H_2O；３１．２９mg／mｌのＬ－シスチン－２ＨＣｌ；７．３５mg／mｌのＬ－グルタミン酸；３６５．０mg／mｌのＬ－グルタミン；１８．７５mg／mｌのグリシン；５２．４８mg／mｌのＬ－ヒスチジン－ＨＣｌ－H_2O；１０６．９７mg／mｌのＬ－イソロイシン；１１１．４５mg／mｌのＬ－ロイシン；１６３．７５mg／mｌのＬ－リジンＨＣｌ；３２．３４mg／mｌのＬ－メチオニン；６８．４８mg／mｌのＬ－フェニルアラニン；４０．０mg／mｌのＬ－プロリン；２６．２５mg／mｌのＬ－セリン；１０１．０５mg／mｌのＬ－スレオニン；１９．２２mg／mｌのＬ－トリプトファン；９１．７９mg／mｌのＬ－チロシン（Ｔｒｙｒｏｓｉｎｅ）－２Ｎａ－２H_2O；および９９．６５mg／mｌのＬ－バリン；０．００３５mg／Ｌのビオチン；３．２４mg／ＬのＤ－Ｃａパントテネート；１１．７８mg／Ｌの塩化コリン；４．６５mg／Ｌの葉酸；１５．６０mg／Ｌのｉ－イノシトール；３．０２mg／Ｌのナイアシンアミド；３．００mg／Ｌのピリドキサール塩酸塩；０．０３１mg／Ｌのピリドキシン塩酸塩；０．３１９mg／Ｌのリボフラビン；３．１７mg／Ｌのチアミン塩酸塩；０．３６５mg／Ｌのチミジン；０．６８０mg／ＬのビタミンB_{12}；２５mMのＨＥＰＥＳ緩衝剤；２．３９mg／ＬのＮａヒポキサンチン；０．１０５mg／Ｌのリポ酸；０．０８１mg／Ｌのプトレシンナトリウム－２ＨＣｌ；５５．０mg／Ｌのピルビン酸ナトリウム；０．００６７mg／Ｌの亜セレン酸ナトリウム；２０μＭのエタノールアミン；０．１２２mg／Ｌのクエン酸鉄；リノール酸と複合体化した４１．７０mg／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３３．３３mg／Ｌのメチル－Ｂ－シクロデキストリン；レチナールアセテートと複合体化した１０mg／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。２mmグルタミンおよび１×ペンストレップ（ｐ

ｅｎｓｔｒｅｐ）を用いて、浸透圧モル濃度を３２７ｍＯｓｍに調整する（１０％ＢＳＡストック溶液のために、１Ｌ　DMEM中にＢＳＡ（８１－０６８－３　Ｂａｙｅｒ）１００ｇを溶解した）。培地を濾過し、そして５０μｌを内毒素アッセイのために１５ｍｌポリスチレンコニカル中に収集する。

【０９５０】

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、１．５ｍｌ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。

【０９５１】

４日目に、３００μｌのマルチチャンネルピペッターを使用して、６００μｌを１ｍｌ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２ｍｌ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。

【０９５２】

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。

【０９５３】

（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与する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、γ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。

【０９５４】

ＧＡＳエレメントおよびＩＳＲＥエレメントは、Ｓｉｇｎａｌ Ｔｒａｎｓｄｕｃｅｒｓ 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（ＩＦＮα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。

【０９５５】

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。

【０９５６】

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のセット）、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。

【０９５７】

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。

【０９５８】

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関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。

【０９５９】

【表3】

表３

リガンド		JAKs tyk2	Jak1	Jak2	STATS Jak3	GAS(エレメント) またはISRE
IFNファミリー						
IFN-a/B	+	+	-	-	1,2,3	ISRE
IFN-g		+	+	-	1	GAS (IRF1>Lys6>IFP)
Il-10	+	?	?	-	1,3	
gp130ファミリー						
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	
g-Cファミリー						
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
gp140ファミリー						
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
成長ホルモンファミリー						
GH	?	-	+	-	5	
PRL	?	+/-	+	-	1,3,5	
EPO	?	-	+	-	5	GAS(B-CAS>IRF1=IFP>>Ly6)
レセプターチロンシンキナーゼ						
EGF	?	+	+	-	1,3	GAS (IRF1)
PDGF	?	+	+	-	1,3	
CSF-1	?	+	+	-	1,3	GAS (IRF1ではない)

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エレメントまたはＩＳＲＥエレメント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：

【０９６０】

【化１】

5':GCGCCTCGAGATTTCCCCGAAATCTAGATTTCCCCGAAATGATTTCCCC
GAAATGATTTCCCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAG: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’：ＧＣＧＧＣＡＡＧＣＴＴＴＴＴＧＣＡＡＡＧＣＣＴＡＧＧＣ：３’（配列番号１３）。

【０９６１】

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）にサブクローニングする。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：

【０９６２】

【化２】

5':CTCGAGATTTCCCCGAAATCTAGATTTCCCCGAAATGATTTCCCCGAAA
TGATTTCCCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCG
CCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCT
CCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCC
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：ＳＥＡＰ２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、β－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。

【０９６３】

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、ＨｉｎｄＩＩＩ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ーニングする。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。

【０９６４】

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、マルチクロー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得る。

【０９６５】

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、ＮＦＫ－ＢおよびＥＧＲ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／ＮＦ－ＫＢ／ＥＧＲ、ＧＡＳ／ＮＦ－ＫＢ、Ｉｌ－２／ＮＦＡＴ、またはＮＦ－ＫＢ／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。

【０９６６】

（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。

【０９６７】

Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞は、リンパ芽球性ＣＤ４＋　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（ｇｅｎｔｉｃｉｎ）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γ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。

【０９６８】

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。

【０９６９】

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）をスピンダウンし、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1×10^7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。

【０９７０】

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に記載のプロトコー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）誘導ポリペプチドを含む上清で処理される。

【０９７１】

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。

【０９７２】

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、三角のリザーバーボートに細胞を移す。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）。

【０９７３】

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γ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。

【０９７４】

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。

【０９７５】

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γ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。

【０９７６】

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。

【０９７７】

（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。

【０９７８】

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、２×１０ｅ^{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。

【０９７９】

次に、０．５ｍｇ／ｍｌ　ＤＥＡＥ－Ｄｅｘｔｒａｎ、８ｕｇのＧＡＳ－ＳＥＡＰ２プラスミドＤＮＡ、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、５ｍＭ　ＫＣｌ、３７５ｕＭ　$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$、１ｍＭ　$MgCl_2$、および６７５ｕＭ　$CaCl_2$を含む１ｍｌの２０ｍＭ　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。

【０９８０】

１０％　ＦＢＳを含むＲＰＭＩ　１６４０培地で細胞を洗浄し、次いで、１０ｍｌ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。

【０９８１】

ＧＡＳ－ＳＥＡＰ／Ｕ９３７安定細胞を、４００ｕｇ／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、４００ｕｇ／ｍｌ　Ｇ４１８中で再増殖させるべきである。

【０９８２】

これらの細胞を１×１０^{8}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２００ｍｌの増殖培地中に、５×１０^{5}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２００ｕｌの細胞（すなわち、１×１０^{5}細胞／ウェル）をプレートする。

【０９８３】

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５０ｕｌ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γ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。

【０９８４】

（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。

【０９８５】

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ールアセテート）、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。

【０９８６】

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’ＧＣＧＡＡＧＣＴＴＣＧＣＧＡＣＴＣＣＣＣＧＧＡＴＣＣＧＣＣＴＣ－３’（配列番号１６）。

【０９８７】

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。

【０９８８】

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５０μｌ添加し、そして２時間風乾させる。

【０９８９】

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（１００μｇ／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－１６４

０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。細胞を掻き取ること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ッティングして再懸濁する。

【０９９０】

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、３００μｇ／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、３００μｇ／ｍｌのＧ４１８中で再増殖させるべきである。

【０９９１】

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）中で一晩、飢餓させる。

【０９９２】

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、5×10^{5}細胞／ｍｌの最終細胞密度に到達させる。

【０９９３】

２００μｌ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（1×10^{5}細胞／ウェルに等しい）。実施例１２により産生された５０μｌの上清を、３７℃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／μｌ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。

【０９９４】

（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－κＢ（核因子κＢ）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－αおよびリンホトキシン－βを含む）により、ＬＰＳまたはトロンビンへの曝露により、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－κＢは免疫細胞の活性化に関与する遺伝子の発現、アポトーシスの制御（ＮＦ－κＢは、アポトーシス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。

【０９９５】

刺激されない条件において、ＮＦ－κＢは、Ｉ－κＢ（インヒビターκＢ）を有する細胞質に保持される。しかし、刺激の際に、Ｉ－κＢはリン酸化され、そして分解（ｄｅｇｒａｄｅｄ）され、ＮＦ－κＢ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－κＢ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。

【０９９６】

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－κＢ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－κＢ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－κＢのインヒビターを、急性または慢性的なＮＦ－κＢ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。

【０９９７】

ＮＦ－κＢ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－κＢ結合部位（ＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＣ）（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’：ＧＣＧＧＣＣＴＣＧＡＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＣＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＧＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＧＧＧＡＣＴＴＴＣＣＡＴＣＣＴＧＣＣＡＴＣＴＣＡＡＴＴＡＧ：３’（配列番号１８）。

【０９９８】

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’：ＧＣＧＧＣＡＡＧＣＴＴＴＴＴＧＣＡＡＡＧＣＣＴＡＧＧＣ：３’（配列番号１９）。

【０９９９】

ＰＣＲ増幅を、Ｃｌｏｎｔｅｃｈから入手したｐβ－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：

【１０００】

【化３】

5':CTCGAGGGGACTTTCCCGGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGACTTTCC
ATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCC
ATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGA
CTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTA
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－κＢ／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。

【１００１】

安定な哺乳動物細胞株を作製するために、ＮＦ－κＢ／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－κＢ／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－κＢ／ＳＶ４０／ＳＥＡＰカセットをｐＧＦＰ－１（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）に挿入し、ＧＦＰ遺伝子を置換した。

【１００２】

一旦、ＮＦ－κＢ／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ＴＮＦα（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。

【１００３】

（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。

【１００４】

ディスペンサーに２．５×希釈緩衝液を満たし、そして１５μｌの２．５×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。プラスチックシーラーでプレートをシールし、そして６５℃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。

【１００５】

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。

【１００６】

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。ブランクとして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。

【１００７】

【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

（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。

【１００８】

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。

【１００９】

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_2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。

【１０１０】

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_2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。

【１０１１】

非接着細胞については、細胞を培養培地からスピンダウンする。細胞を、５０ｍｌのコニカルチューブ内でＨＢＳＳを用いて２～５×10^6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３０～６

０分間置く。細胞をＨＢＳＳで二回洗浄し、１×１０^{6}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　ＣｅｌｌＷａｓｈ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。

【１０１２】

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。

【１０１３】

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$^{++}$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。

【１０１４】

（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。

【１０１５】

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。

【１０１６】

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。

【１０１７】

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Ｌｏｐｒｏｄｙｎｅ　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、一晩乾燥させる。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、ａｌａ

ｍａｒＢｌｕｅ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、Ｌｏｐｒｏｄｙｎｅ 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。

【１０１８】

抽出物を調製するため、Ａ４３１細胞をＬｏｐｒｏｄｙｎｅ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晩培養する。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_3VO_4，2mM $Na_4P_2O_7$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、そしてハウスバキュー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。抽出物をバキュー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。

【１０１９】

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。

【１０２０】

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。

【１０２１】

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、５μＭビオチン化ペプチド１０μｌを添加した後、順に、ＡＴＰ／Mg^{2+}（5mM　ＡＴＰ／５０mM　$MgCl_2$）１０μｌ、５×アッセイ緩衝液（４０mM塩酸イミダゾール、ｐＨ７．３、４０mM　β－グリセロリン酸塩、１ｍＭ　ＥＧＴＡ、１００mM　$MgCl_2$、5mM　$MnCl_2$、０．５ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ）１０μｌ、バナジン酸ナトリウム（１mM）５μｌ、最後に水５μｌ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１０μｌを加えて反応を開始させる。

【１０２２】

次に、１２０mM　ＥＤＴＡ　１０μｌ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。

【１０２３】

反応混合物の５０μｌのアリコートを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（ｓｔｒｅｐｔａｖａｄｉｎ）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３００μｌ／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（ｐｈｏｓｐｏｔｙｒｏｓｉｎｅ）抗体（抗Ｐ－Ｔｙｒ－ＰＯＤ（０．５ｕ／ｍｌ））７５μｌ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。

【１０２４】

次に、ペルオキシダーゼ基質溶液（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ　Ｍａｎｎｈｅｉｍ）１００μｌ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、４０５ｎｍ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。

【１０２５】

（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（ｃｏｍｐｌｉｍｅｎｔ）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、ｐ３８ＭＡＰ、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。

【１０２６】

詳細には、９６ウェルＥＬＩＳＡプレートのウェルをプロテインＧ（１μｇ／ｍｌ）０．１ｍｌ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（１００ｎｇ／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。

【１０２７】

Ａ４３１細胞を２０，０００／ウェルで９６ウェルＬｏｐｒｏｄｙｎｅフィル

タープレートに播種し、増殖培地中で一晩培養する。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。

【１０２８】

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。

【１０２９】

（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。

【１０３０】

次に、ＰＣＲ産物を、ＳｅｑｕｉＴｈｅｒｍ　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。

【１０３１】

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。

【１０３２】

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 Ｍａｎｈｅｉｍ）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。

【１０３３】

染色体を、４，６－ジアミノ－２－フェニリ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ら、Ｇｅｎｅｔ．Ａｎａｌ．Ｔｅｃｈ．Ａｐｐｌ．，８：７５

（１９９１））とを組み合わせて用いて得る。ＩＳｅｅ　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。

【１０３４】

（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。

【１０３５】

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０．２～１０μｇ／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。

【１０３６】

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（ＣＣＲ

５）を除去する。

【１０３７】

次に、特異的抗体－アルカリホスファターゼ結合体５０μｌを２５～４００ｎｇ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。

【１０３８】

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７５μｌ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。

【１０３９】

（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。

【１０４０】

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。

【１０４１】

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１μｇ／ｋｇ／日～１０ｍｇ／ｋｇ／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０．０１ｍｇ／ｋｇ／日、最も好ましくはヒトに対して約０．０１ｍｇ／ｋｇ／日と約１ｍｇ／ｋｇ／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１μｇ／ｋｇ／時間～約５０μｇ／ｋｇ／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ようである。

【１０４２】

治療剤を、経口的、直腸内、非経口的、槽内（ｉｎｔｒａｃｉｓｔｅｍａｌｌｙ）、膣内、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。

【１０４３】

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、膣内、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。

【１０４４】

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。

【１０４５】

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、ＥＰ５８，４８１）、Ｌ－グルタミン酸およびγ－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（ＥＰ１３３，９８８）が挙げられる。

【１０４６】

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）；Ｔｒｅａｔら，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２００～８００Å）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。

【１０４７】

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）。

【１０４８】

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。

【１０４９】

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。

【１０５０】

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ース溶液が挙げられる。不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。

【１０５１】

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。

【１０５２】

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。

【１０５３】

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。

【１０５４】

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。

【１０５５】

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。

【１０５６】

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、ＡｄｊｕＶａｘ　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（ｐｅｒｔｕｓｉｓ）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、組み合わさ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。

【１０５７】

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、組み合わされた薬剤が、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。

【１０５８】

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て投与される。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－α、リンホトキシン－α、（ＬＴ－α、ＴＮＦ－βとしても公知）、ＬＴ－β（複合ヘテロ三量体ＬＴ－α２－βの状態で見出される）、ＯＰＧＬ、ＦａｓＬ、ＣＤ２７Ｌ、ＣＤ３０Ｌ、ＣＤ４０Ｌ、４－１ＢＢＬ、ＤｃＲ３、ＯＸ４０Ｌ、ＴＮＦ－γ（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）－α（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（ｎｅｕｔｒｏｋｉｎｅ）－α（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－ＩＢＢ、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。

【１０５９】

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）と組み合わせて投与される。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得る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™（ジドブジン／ＡＺＴ）、ＶＩＤＥＸ™（ジダノシン／ｄｄＩ）、ＨＩＶＩＤ™（ザルシタビン／ｄｄＣ）、ＺＥＲＩＴ™（スタブジン／ｄ４Ｔ）、ＥＰＩＶＩＲ™（ラミブジン／３ＴＣ）、およびＣＯＭＢＩＶＩＲ™（ジドブジン／ラミブジン）。本発明の治療剤と組み合わせて投与され得る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™（ネビラピン）、ＲＥＳＣＲＩＰＴＯＲ™（デラビルジン）、およびＳＵＳＴＩＶＡ™（エファビレンズ）。本発明の治療剤と組み合わせて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™（インディナビル（ｉｎｄｉｎａｖｉｒ））、ＮＯＲＶＩＲ™（リトナビル（ｒｉｔｏｎａｖｉｒ））、ＩＮＶＩＲＡＳＥ™（サキナビル（ｓａｑｕｉｎａｖｉｒ））、およびＶＩＲＡＣＥＰＴ™（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。

【１０６０】

さらなるＮＲＴＩとしては、以下が挙げられる：ＬＯＤＥＮＯＳＩＮＥ™（Ｆ－ｄｄＡ；酸安定性アデノシンＮＲＴＩ；Ｔｒｉａｎｇｌｅ／Ａｂｂｏｔｔ；ＣＯＶＩＲＡＣＩＬ™（エムトリシタビン（ｅｍｔｒｉｃｉｔａｂｉｎｅ）／ＦＴＣ；ラミブジン（ｌａｍｉｖｕｄｉｎｅ）（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）；ＴＥＮＯＦＯＶＩＲ™（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™（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、β－Ｌ－ＦＤ４Ｃおよびβ－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）。

【１０６１】

さらなるＮＮＲＴＩとしては、以下が挙げられる：ＣＯＡＣＴＩＮＯＮ™（Ｅｍｉｖｉｒｉｎｅ／ＭＫＣ－４４２，ＨＥＰＴクラスの強力なＮＮＲＴＩ；Ｔｒｉａｎｇｌｅ／Ａｂｂｏｔｔ）；ＣＡＰＲＡＶＩＲＩＮＥ™（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）。

【１０６２】

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™（ＡＢＴ３７８／ｒ；Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）；ＢＭＳ－２３２６３２（アザペプチド；Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｒｅｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）；ＴＩＰＲＡＮＡＶＩＲ™（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（アンプレナビル（ａｍｐｒｅｎａｖｉｒ）のホスフェートプロドラッグ；Ｖｅｒｔｅｘ　＆　Ｇｌａｘｏ　Ｗｅｌｃｏｍｅ）；ＣＧＰ６１７５５（Ｃｉｂａ）；およびＡＧＥＮＥＲＡＳＥ™（アンプレナビル（ａｍｐｒｅｎａｖｉｒ）；Ｇｌａｘｏ　Ｗｅｌｌｃｏｍｅ　Ｉｎｃ．）。

【１０６３】

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；Ｔｒｉｍｅｒｉｓ）が挙げられる。

【１０６４】

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（バイサイクラム（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－１α，ＭＩＰ－１βなど）もまた融合を阻害し得る。

【１０６５】

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（ｑｕｉｎａｌｉｚａｒｉｎ；ＱＬＣ）および関連のアントラキノン；ＺＩＮＴＥＶＩＲ™（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。

【１０６６】

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™（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）。

【１０６７】

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）。

【１０６８】

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－１α，ＭＩＰ－１β，ＳＤＦ－１α，ＩＬ－２，PROLEUKIN™（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－α２ａ）；ＴＮＦ，ＮＦκＢ，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™（ＨＩＶ免疫原），ＡＰＬ　４００－００３（Ａｐｏｌｌｏｎ），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　ｒｇｐ１２０，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（１９

９７））；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－α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α－ナフトフラボン（ＷＯ　９８／３０２１３）；ならびに、抗酸化剤、例えば、γ－Ｌ－グルタミル－Ｌ－システインエチルエステル（γ－ＧＣＥ；ＷＯ　９９／５６７６４）。

【１０６９】

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－γ、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。

【１０７０】

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。

【１０７１】

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。

【１０７２】

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

。

【１０７３】

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™，ＤＡＰＳＯＮＥ™，ＰＥＮＴＡＭＩＤＩＮＥ™，ＡＴＯＶＡＱＵＯＮＥ™，ＩＳＯＮＩＡＺＩＤ™，ＲＩＦＡＭＰＩＮ™，ＰＹＲＡＺＩＮＡＭＩＤＥ™，ＥＴＨＡＭＢＵＴＯＬ™，ＲＩＦＡＢＵＴＩＮ™，ＣＬＡＲＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ™，ＡＺＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ™，ＧＡＮＣＩＣＬＯＶＩＲ™，ＦＯＳＣＡＲＮＥＴ™，ＣＩＤＯＦＯＶＩＲ™，ＦＬＵＣＯＮＡＺＯＬＥ™，ＩＴＲＡＣＯＮＡＺＯＬＥ™，ＫＥＴＯＣＯＮＡＺＯＬＥ™，ＡＣＹＣＬＯＶＩＲ™，ＦＡＭＣＩＣＯＬＶＩＲ™，ＰＹＲＩＭＥＴＨＡＭＩＮＥ™，ＬＥＵＣＯＶＯＲＩＮ™，ＮＥＵＰＯＧＥＮ™（フィルグラスチム（ｆｉｌｇｒａｓｔｉｍ）／Ｇ－ＣＳＦ），およびＬＥＵＫＩＮＥ™（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™、ＤＡＰＳＯＮＥ™、ＰＥＮＴＡＭＩＤＩＮＥ™、および／またはＡＴＯＶＡＱＵＯＮＥ™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™、ＲＩＦＡＭＰＩＮ™、ＰＹＲＡＺＩＮＡＭＩＤＥ™、および／またはＥＴＨＡＭＢＵＴＯＬ™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™、ＣＬＡＲＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ™、および／またはＡＺＩＴＨＲＯＭＹＣＩＮ™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™、ＦＯＳＣＡＲＮＥＴ™、および／またはＣＩＤＯＦＯＶＩＲ™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™、ＩＴＲＡＣＯＮＡＺＯＬＥ™、および／またはＫＥＴＯＣＯＮＡＺＯＬＥ™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™および／またはＦＡＭＣＩＣＯＬＶＩＲ™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™および／またはＬＥＵＣＯＶＯＲＩＮ™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™および／またはＮＥＵＰＯＧＥＮ™との任意の組み合わせで使用される。

【１０７４】

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。

【１０７５】

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、β－ラクタマーゼ、アミノ配糖体、β－ラクタム（糖ペプチド）、β－ラクタマーゼ、クリンダマイシン、クロラムフェニコール、セファロスポリン、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。

【１０７６】

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、シクロスポリン、シクロスポリンアナログ、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－ｄｅｏｘｙｓｐｅｒｇｕａｌｉｎ）、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。

【１０７７】

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™（ＯＫＴ３）、ＳＡＮＤＩＭＭＵＮＥ™／ＮＥＯＲＡＬ™／ＳＡＮＧＤＹＡ™（シクロスポリン）、ＰＲＯＧＲＡＦ™（タクロリムス）、ＣＥＬＬＣＥＰＴ™（マイコフェノラート（ｍｙｃｏｐｈｅｎｏｌａｔｅ））、アザチオプリン、グルコルチコステロイド（ｇｌｕｃｏｒｔｉｃｏｓｔｅｒｏｉｄ）、およびＲＡＰＡＭＵＮＥ™（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。

【１０７８】

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™、ＩＶＥＥＧＡＭ™、ＳＡＮＤＯＧＬＯＢＵＬＩＮ™、ＧＡＭＭＡＧＡＲＤ　Ｓ／Ｄ™、およびＧＡＭＩＭＵＮＥ™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。

【１０７９】

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、アミノアリールカルボン酸誘導体、アリール酢酸誘導体、アリール酪酸誘導体、アリールカルボン酸、アリー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、ピフオキシム、プロカゾン、プロキサゾール、およびテニダプ。

【１０８０】

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、メトトレキセート、フロクスウリジン、インターフェロン－α－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、および硫酸ビンクリスチン）；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、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンブラスチン、およびエトポシド）。

【１０８１】

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、ビンクリスチン、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。

【１０８２】

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－γおよびＴＮＦ－α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－１α、ＩＬ－１β、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。

【１０８３】

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、Ｇｏｒｗｔｈ　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。

【１０８４】

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™（ＳＡＲＧＲＡＭＯＳＴＩＭ™）およびＮＥＵＰＯＧＥＮ™（ＦＩＬＧＲＡＳＴＩＭ™）が挙げられるがこれらに限定されない。

【１０８５】

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。

【１０８６】

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™およびＮＯＶＯＬＩＮ™）；経口低血糖症薬物（例えば、ＯＲＡＭＩＤＥ™およびＯＲＩＮＡＳＥ™（トルブタミド）、ＤＩＡＢＩＮＥＳＥ™（クロルプロパミド）、ＴＯＬＡＭＩＤＥ™およびＴＯＬＩＮＡＳＥ™（トラザミド）、ＤＹＭＥＬＯＲ™（アセトヘキサミド）、グリベンクラミド（

ｇｌｉｂｅｎｃｌａｍｉｄｅ）、ＭＩＣＲＯＮＡＳＥ™、ＤＩＢＥＴＡ™およびＧＬＹＮＡＳＥ™（グリブリド）、ＧＬＵＣＯＴＲＯＬ™（グリピジド）、およびＤＩＡＭＩＣＲＯＮ™（グリクラジド）、ＧＬＵＣＯＰＨＡＧＥ™（メトホルミン）、ＰＲＥＣＯＳＥ™（アカルボース）、ＡＭＡＲＹＬ™（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™（マレイン酸ロシグリタゾン）、ＡＣＴＯＳ™（ピオグリタゾン（ｐｉｏｇｌｉｔａｚｏｎｅ））、およびトログリタゾン（ｔｒｏｇｌｉｔａｚｏｎｅ））；α－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™（オクテオチド（ｏｃｔｒｅｏｔｉｄｅ））；およびジアゾキシド（例えば、ＰＲＯＧＬＹＣＥＭ™（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：ビ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。

【１０８７】

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。

【１０８８】

（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。

【１０８９】

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０．１～１００μｇ／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。

【１０９０】

（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、本発明のアンタゴニスト（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。

【１０９１】

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。

【１０９２】

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３．０ｍｇ／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。

【１０９３】

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）。

【１０９４】

（実施例３１：遺伝子治療を使用する処置方法－エキソビボ）

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。

【１０９５】

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。

【１０９６】

モロニーマウス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。

【１０９７】

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

ニーマウス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。

【１０９８】

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）。

【１０９９】

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、ミリポアー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。

【１１００】

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マイクロキャリアビ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。　（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。

【１１０１】

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。

【１１０２】

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。

【１１０３】

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。

【１１０４】

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。

【１１０５】

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、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_2HPO_4、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３×10^6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。

【１１０６】

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Ｘｂａ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。

【１１０７】

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１．５×10^6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－Ｐｕｌｓｅｒ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１４～２０ｍＳｅｃが観察されるはずである。

【１１０８】

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、このキュベットの中身を、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、１０ｃｍ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）１０ｍｌ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１０ｍｌ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。

【１１０９】

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。

【１１１０】

（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技術および方法は、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。

【１１１１】

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。

【１１１２】

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。

【１１１３】

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。

【１１１４】

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。

【１１１５】

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。

【１１１６】

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、またはリポ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。

【１１１７】

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。

【１１１８】

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。

【１１１９】

（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。

【１１２０】

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（ｐｌｅｕｒｉｐｏｔｅｎｔ）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。

【１１２１】

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（Ｃａｍｐｅｌｌら、Ｎａｔｕｒｅ　３８０：６４－６６（１９９６）；Ｗｉｌｍｕｔら、Ｎａｔｕｒｅ　３８５：８１０－８１３（１９９７））。

【１１２２】

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、ならびにいくつかの細胞（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。

【１１２３】

手短に言えば、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、Ｓｃｉｅｎｃｅ２６５：１０３－１０６（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。

【１１２４】

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、発達的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。

【１１２５】

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。

【１１２６】

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、以下を含むがそ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を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。

【１１２７】

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。

【１１２８】

（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）

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

不活性な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。

【１１２９】

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。

【１１３０】

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）。

【１１３１】

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。

【１１３２】

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。

【１１３３】

（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て、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。

【１１３４】

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。

【１１３５】

（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。

【１１３６】

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、５×１０$^{-5}$Ｍ　βＭＥ、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、１０μｇ／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１５０μｌ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（１μＣｉ／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。

【１１３７】

（インビボアッセイ）ＢＡＬＢ／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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ）リガンドの２ｍｇ／ｋｇ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（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）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ＣＤ４５Ｒ（Ｂ２２０）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。

【１１３８】

Ｇタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）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（ＣＣＲ５）タンパク質が、ＴｈＢ＋であるＣＤ４５Ｒ（Ｂ２２０）ｄｕｌｌ　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。

【１１３９】

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ＩｇＭおよびＩｇＡ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（ＣＣＲ５）タンパク質処置マウスとの間で比較する。

【１１４０】

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（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。

【１１４１】

（実施例３７）

（Ｔ細胞増殖アッセイ）

ＣＤ３誘導性の増殖アッセイをＰＢＭＣで実行し、そして^{3}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。９６ウェルプレートを、ＣＤ３に対するｍＡｂ（ＨＩＴ３ａ，Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）の１００μｌ／ウェル、またはアイソタイプ適合のコントロールｍＡｂ（Ｂ３３．１）（０．０５Ｍ　炭酸水素塩緩衝液、ｐＨ９．５中、１μｇ／ｍｌ）で４℃で１晩、コートし、次いでＰＢＳで３回洗浄する。ＰＢＭＣ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（ＣＣＲ５）タンパク質の種々の濃度での存在下で、１０％ＦＣＳおよびＰ／Ｓを含有するＲＰＭＩ中、ｍＡｂでコートしたプレートの４通りのウェル（５×１０^{4}／ウェル）に添加する（総量２００μｌ）。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。３７℃での培養の４８時間後、プレートを１０００ｒｐｍで２分間回転させ、そして１００μｌの上清を除去し、そして、増殖への効果が観察される場合、ＩＬ－２（または他のサイトカイン）の測定のために－２０℃で貯蔵した。ウェルに０．５μＣｉの^{3}Ｈ－チミジンを含有する１００μｌの培地を補充し、そして３７℃で１８～２４時間培養する。ウェルを収集し、そして^{3}Ｈ－チミジンの取り込みを増殖の指標として用いた。抗ＣＤ３単独が増殖の

陽性コントロールである。ＩＬ－２（１００Ｕ／ｍｌ）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（ＣＣＲ５）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。

【１１４２】

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。

【１１４３】

（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（５０ｎｇ／ｍｌ）およびＩＬ－４（２０ｎｇ／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－α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、ＦＣγＲＩＩ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。

【１１４４】

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０．０２ｍＭ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ＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）でのフローサイトメトリーにより分析する。

【１１４５】

（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（１００ｎｇ／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ールを用いる。

【１１４６】

（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相関し得る。

【１１４７】

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０．０２ｍＭ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ＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）でのフローサイトメトリーにより分析する。

【１１４８】

（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ｌｅｕｋｏｐａｃｋ（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。

【１１４９】

（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ＴＮＦα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－α（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2×10^{6}／ｍｌの濃度に懸濁し、次いでＦＡＣＳｃａｎ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。

【１１５０】

（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、５×１０^{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－γ（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－α、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。

【１１５１】

（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２～１×１０^{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_2O_2の量を算出するため、既知のモル濃度のH_2O_2溶液の標準曲線をそれぞれの実験について実施する。

【１１５２】

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。

【１１５３】

（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）

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。

【１１５４】

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。

【１１５５】

（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（Ａｌｍａｒ 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ＣｙｔｏＦｌｕｏｒ蛍光リーダーでの読取りにより測定する。PGE_2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－１αとともに、またはそれをともなわずに、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_2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－１αとともに、またはそれをともなわずに、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ＥＬＩＳＡキット（Ｅｎｄｏｇｅｎ，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，ＭＡ）によりＩＬ－６についてアッセイする。

【１１５６】

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１０～２５００ｎｇ／ｍｌの刺激を示すはずである。

【１１５７】

（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^+）に異化され、そして放出される。引き続き、MPP^+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^+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）アデニン二リン酸：ユビキノン酸化還元酵素（ｏｘｉｄｏｒｅｄｕｃｔｉｏｎａｓｅ）（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。

【１１５８】

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．Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ，１９９０）。

【１１５９】

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否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^{2}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変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。

【１１６０】

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関与し得ることを示唆する。

【１１６１】

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。

【１１６２】

（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、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，Ｉｎｃ．）を含有するＭ１９９培地中で、３５mmシャーレあたり２～５×１０^{4}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。

【１１６３】

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。

【１１６４】

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。

【１１６５】

（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（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ　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、$ＶＥＧＦ_{165}$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。

【１１６６】

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。

【１１６７】

（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。

【１１６８】

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ＨＵＶＥＣ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２．５×10^5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％ＣＯ２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（ｐｏｌｉｃｅｍａｎ）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（４０×）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。

【１１６９】

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。

【１１７０】

（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。

【１１７１】

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。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）（０．１～１００ｎｇ／ｍｌ）を含む３００μｇ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。

【１１７２】

市販の（Ｒ＆Ｄ）ＶＥＧＦ（５０ｎｇ／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（１ｎｇ／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。

【１１７３】

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。

【１１７４】

（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。

【１１７５】

Ｗｈｉｔｅ　Ｌｅｇｈｏｒｎニワトリ（Ｇａｌｌｕｓ　ｇａｌｌｕｓ）の受精卵および日本ウズラ（ｑｕａｌ）（Ｃｏｔｕｒｎｉｘ　ｃｏｔｕｒｎｉｘ）を、３７．８℃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。

【１１７６】

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５mm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３．３ｍｇ／５ｍｌ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０．１２Ｍ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。

【１１７７】

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。

【１１７８】

（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。

【１１７９】

４℃で解凍した時、Ｍａｔｒｉｇｅｌ物質は液体である。このＭａｔｒｉｇｅｌを、４℃にて１５０ｎｇ／ｍｌでＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）と混合し、冷３ｍｌ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（０．５ｍｌ／部位）。７日後、このマウスを頚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（１５０ｎｇ／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。

【１１８０】

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。

【１１８１】

（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、５００ｍｇ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、５００ｍｇ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ーラスを、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　Ｓｃ

ｏｒｅ）－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（ｃａｐｉｌｌａｒｙ）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。

【１１８２】

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。

【１１８３】

（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。

【１１８４】

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。

【１１８５】

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。

【１１８６】

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。

【１１８７】

（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マイ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。

【１１８８】

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。

【１１８９】

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。

【１１９０】

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。

【１１９１】

（実施例４９）

（ＴＮＦα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の発現の調節に関与する。

【１１９２】

腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）（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関与し得、しばしば病理学的結果をもたらす。

【１１９３】

ＴＮＦ－α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（ＣＣＲ５）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－α処理ＥＣにおけるＣＡＭ発現の量を測定する。

【１１９４】

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_2を含む３７℃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１×１０^{4}細胞／ウェルの濃度で、９６ウェルプレート中に、３７℃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、１００Ｕ／ｍｌペニシリンおよび１００ｍｇ／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℃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。

【１１９５】

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９０μｌ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（１０μｌ容量）。プレートを、３７℃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１００μｌの０．１％パラホルムアルデヒド－ＰＢＳ（Ｃａ＋＋およびＭｇ＋＋を有する）を各ウェルに添加する。プレートを、４℃にて３０分間保持する。

【１１９６】

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。１０μｌ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、１０μｇ／ｍｌの濃度（０．１ｍｇ／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℃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。

【１１９７】

次いで、２０μｌ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（ｐＨ１０．４）に溶解させる。グリシン緩衝液中のｐＮＰＰ基質１００μｌ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　Ｐｈｏ

ｓｐｈｏｔａｓｅ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。５μｌ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、５．５０ｎｇ、１．７４ｎｇ、０．５５ｎｇ、０．１８ｎｇである。次いで、１００μｌ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時間インキューベートしなければならない。３Ｍ　ＮａＯＨの５０μｌ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４０５ｎｍ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ブランク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［５．５０ｎｇ；１．７４ｎｇ；０．５５ｎｇ；０．１８ｎｇ］。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。

【１１９８】

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。

【１１９９】

（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。

【１２００】

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。

【１２０１】

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そして伸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。

【１２０２】

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。ＲＡＮＴ

ＥＳ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、１μＭ　Ｆｕｒａ－２／ＡＭと共に、CO_2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^{2+}］ｉ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^{2+}］ｉの較正を、１μＭ　Ｆｕｒａを含むCa^{2+}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。

【１２０３】

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。

【１２０４】

（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。

【１２０５】

（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、Ｏｓｂｏｕｒｎ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）。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。

【１２０６】

（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。

【１２０７】

（実施例５４）

（Ｘｅｎｏｍｏｕｓｅ™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／κ抗体のレパートリーを発現するように操作されたＸｅｎｏｍｏｕｓｅ™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。

【１２０８】

（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™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）。

【１２０９】

（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™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）。

【１２１０】

（免疫スケジュール３（ＸＦ７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™マウス（ｎ＝５）の尾の基部に注射した。その後２週間間隔で尾部の基部にさらに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）。

【１２１１】

（免疫スケジュール４（ＸＦ１１融合）：）

２週間間隔で、Ｘｅｎｏｍｏｕｓｅ™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った。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）。

【１２１２】

（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™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）。ハイブリドーマを当該分野で通常公知のプロトコー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ＰＳＸ６３－ＡＧ８．６５３であった。

【１２１３】

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。

【１２１４】

（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、10^8～10^9のＣＣＲ５　ＣＨＯまたはＣＨＯ細胞を４０～５０ミリリットルの冷１２ｍＭ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ７．５，２５０ｍＭ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（スピンアウト）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。

【１２１５】

メンブレンＥＬＩＳＡ。Ｉｍｍｕｌｏｎ４プレート（Ｄｙｎｅｘ）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、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％Ｔｗｅｅｎ２０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）および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。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_2SO_4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。

【１２１６】

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。

【１２１７】

【表５】

表４：CCR5 CHOエンベロープに結合する抗体を分泌するハイブリドーマ

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 E6	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）

(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	

(続きあり)

(続き)

			XF11.6G6	
			XF11.6H11	
			XF11.6H2	
			XF11.6H4	
			XF11.6H7	

（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（０．１％ＮａＮ３および０．１％ＢＳＡ含有ＰＢＳ）で洗浄した。百万の細胞を含有する１００μｌを、ＦＡＣＳチューブ（Ｆａｌｃｏｎ２０５２）に分配した。１０μｌ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１００μｌのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、そして１０μｌのビオチン化ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｖｅｃｔｏｒ）を１μｇ／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、１００μｌのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、そして５μｌ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、２００μｌのＦＡＣＳ緩衝液（０．５μｇ／ｍｌのプロピジウムヨードを含有）に再懸濁し、そしてＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）上で分析した。

【１２１８】

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。

【１２１９】

（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８００ｒｐｍ４℃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。

【１２２０】

１．５～２．５μｇ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、５０μｌ容積（１×ＰＣＲ緩衝液、２ｍＭの各ｄＮＴＰ、０．７単位のＨｉｇｈ　Ｆｉｄｅｌｉｔｙ　Ｔａｑ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ、５’プ

ライマー混合液、３’プライマー混合液、および７．５μｌ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、２２ｐｍｏｌおよび２８ｐｍｏｌｅ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。

【１２２１】

【表６】

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	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
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	TGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
Hu JH6-5'	32	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC
		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 Vlambda1-5'	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	ACGTTTAATCTCCAGTCGTGTCCC
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

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。

【１２２２】

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κまたはヒトλ）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。

【１２２３】

（実施例５６）

（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エックするため、以下の免疫蛍光プロトコールを用い得る。要するに、１０μｇ／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－ＴｅｋＩＩチャンバスライドを４℃で一晩コーティングする。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１２５μｌ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１２５μｌ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、４００μｌの氷冷したブロッキング溶液で５回洗浄する。次に、１２５μｌの１μｇ／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４００μｌ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１２５μｌ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４００μｌ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る。

【１２２４】

（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_4）$_2SO_4$、２０mM　Ｔｒｉｓ－HＣｌ（pH７．５）および1％（w／ｖ）Ｃｙｍａｌ™－５（Ａｎａｔｒａｃｅ　Ｉｎｃ．，Ｍａｕｍｅｅ，OH）、およびプロテアーゼインヒビター混合物（Ｃｏｍｐｌｅｔｅ™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。

【１２２５】

（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。

【１２２６】

（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。

【１２２７】

フローセル表面は、２０μｌの１０ｍＭグリシンー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、ＢＩＡｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　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。

【１２２８】

（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、Ａ

ＩＤＳ　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、２×１０^{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。

【１２２９】

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。

【１２３０】

（実施例６１）

（ＭＩＰ－１β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－β）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。

【１２３１】

以下の^{125}Ｉ－ＭＩＰ１－β結合アッセイは、本発明の抗体が、ＣＣＲ５の天然のリガンド（ＭＩＰ１－β）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。

【１２３２】

２５μキュリーの^{125}Ｉ－ＭＩＰ１－β（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，カタログ番号ＩＭ３１０、２５μキュリー、２０００

Ｃｉ／ｍｍｏｌ）を１ｍｌの蒸留水に溶解して、１２．５ｎＭの保存溶液を作成する。培養細胞（例えば、ＣＣＲ５　ＣＨＯ）の場合、これをこの実験で用い、それをトリプシン処理し、洗浄し、そして結合緩衝液（１ｍＭ　$CaCl_2$、５ｍＭ　$MgCl_2$、５０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ、０．５％ＢＳＡ、０．１％　NaN_3、ｐＨ７．５）中で10×10^6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2×10^6細胞／ｍｌに再懸濁する。

【１２３３】

ＭＩＰ－１β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－β希釈を所望の最終濃度の４倍で行う。（例えば、３ｎＭの最終濃度には、１２ｎＭ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－βは、３ｎＭ～０．０５ｎＭにわたる。さらに、冷（コールド）（非放射性の）ＭＩＰ－１β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－βは２００ｎＭであり、そのため８００ｎＭ溶液を調製する。

【１２３４】

細胞に対する^{125}Ｉ－ＭＩＰ１－βの総結合を測定するため、２５μｌ結合緩衝液、２５μｌのホット^{125}Ｉ－ＭＩＰ１－β、および５０μｌ細胞懸濁液を丸底９６ウェルマイクロプレート（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}Ｉ－ＭＩＰ１－βの結合が非特異的である場合、結合は、コールドＭＩＰ－１β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、２５μｌのコールドＭＩＰ－１β（８００ｎＭ）、２５μｌのホット^{125}Ｉ－ＭＩＰ１－β（種々の希釈）、および５０μｌ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、２００μｌ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１２０００ｒｐｍ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γ線計数器でカウントする。ＭＩＰ－１βの結合が特異的である場合、競合アッセイではγ線計数器において低い放射性活性が測定される。ＭＩＰ－１β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。

【１２３５】

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－１β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}Ｉ－ＭＩＰ１－β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}Ｉ－ＭＩＰ１－βの２ｎＭ溶液（最終濃度０．５ｎＭとなる）を調製する。

【１２３６】

細胞に対する^{125}Ｉ－ＭＩＰ１－βの総結合を測定するため、２５μｌの結合緩衝液、２５μｌのホット^{125}Ｉ－ＭＩＰ１－β（２ｎＭ）、および５０μｌ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－１β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－１β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－１β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－１βを阻害する（放射性標識）か否かを決定するため、２５μｌ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）、２５μｌのホット^{125}Ｉ－ＭＩＰ１－β（２ｎＭ）、および５０μｌ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、２００μｌ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１２０００ｒｐｍ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γ線計数器でカウントする。ＭＩＰ－１βの結合が特異的である場合、競合アッセイでは、γ線計数器において低い放射性活性が測定される。ＭＩＰ－１β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。

【１２３７】

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－β）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、０．２μキュリーの放射標識ＭＩＰ１－β（例えば、１２５Ｉ－ＭＩＰ１－β（ＤｕＰｏｎｔ－ＮＥＮ、Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）を０．１ｎＭ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、Ｇｒａｓｓｉ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％シリコーン（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γ線計数器で測定する。

【１２３８】

（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－β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、または有意に変化しない能力についてアッセイされ得る。γタンパク質ケモイカンレセプター（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。

【１２３９】

ＣＣＲ５発現細胞のＭＩＰ１－β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（1mg／ｍｌ含有ドライDMSO）（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ　カタログ番号：Ｃ－３０９９）

ＰＢＳ、１×、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）。

【１２４０】

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１０×１０^{6}細胞／ｍｌで再懸濁する。５μｌのカルセイン（ｃａｌｃｅｉｎ）ＡＭ（1mg／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１０×１０^{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２９μｌ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ーバルブジェットがないようにする。次に２０μｌ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表面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。ＣｙｔｏＦｌｕｏｒ蛍光リーダーを用いて、４８５ｎｍの励起／５３０ｎｍ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。

【１２４１】

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－１β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。

【１２４２】

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－１β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）

Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ（トランスウェル）プレート（Ｃｏｓｔａｒカタログ番号：３４２１）、直径6．5mm、5．0μm孔径

ＭＩＰ－１β（R&D　Ｓｙｓｔｅｍｓカタログ番号：２７１－BME）

リンパ球分離培地（Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ　Ｍｅｄｉｕｍ）（ＩＣＮ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌカタログ番号：５０４９４）

要するに、ＰＢＭＣを、リンパ球分離培地（Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎ　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２０×１０^{6}細胞／ｍｌで再懸濁する。ＭＩＰ－１βをＲＰＭＩ－１６４０／0．５％　ＢＳＡ中に希釈して、１０、１００および１０００ｎｇ／ｍｌの最終濃度にする。６００μｌのＭＩＰ－１β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１００μｌの細胞懸濁液をこのフィ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。

【１２４３】

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－１β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、Ｌｏｐａｌｃｏら、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、３×１０^{5}の活性化ＰＢＭＣを含有する５０μｌの１６４０ＲＰＭＩ（３％ヒト血清アルブミン含有）を、５μｍの孔径を有するフィルターなし（b

ａｒｅ　ｆｉｌｔｅｒ）トランスウェル（ＣｏＳｔａｒ）の上部チャンバに入れる。１．５μｇのＭＩＰ１－β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－β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。

【１２４４】

（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＋＋インジケーター（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。

【１２４５】

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　$CaCl_2$、1mM　$MgCl_2$、０．０２５％　ＢＳＡ、pH７．４）中に5×10^6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、1×10^6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$^{++}$］$_{i}$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。

【１２４６】

（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））。

【１２４７】

この糖尿病動物は、ＩＩ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、多渇症、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）；Ｄｅｂｒａ

ｙ－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））。

【１２４８】

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））。

【１２４９】

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。

【１２５０】

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（０．０１ｍｇ／ｍＬ）、２，２，２－トリブ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。

【１２５１】

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。

【１２５２】

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には、５０ｍＬのビヒクル溶液を与えた。

【１２５３】

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。

【１２５４】

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）ビヒクルプ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。

【１２５５】

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、６４mm^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日目の開放面積］－［１日目の開放面積］／［１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ミ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。

【１２５６】

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。

【１２５７】

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。

【１２５８】

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。

【１２５９】

（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阻害は、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）；Ｗｅｒｂ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、Ｇｒｏｗｓ 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」：Ａｎｔｉｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ 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 Ｆａｃｔ

ｏｒｓ．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））。

【１２６０】

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。

【１２６１】

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。

【１２６２】

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。

【１２６３】

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。

【１２６４】

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。

【１２６５】

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％中性緩衝化ホルマリン中に置く。

【１２６６】

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。

【１２６７】

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、６４mm^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日目の開放面積］－［１日目の開放面積］／［１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ミ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。

【１２６８】

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。

【１２６９】

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。

【１２７０】

（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。

【１２７１】

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。

【１２７２】

（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。

【１２７３】

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）に基くの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。独立スチューデント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）。

【１２７４】

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。

【１２７５】

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。

【１２７６】

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、学術論文、要約、研究マニュアル、本、または他の開示を含む）の全開示は、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）；および同第６０／２３４，３３６号（２０００年9月２２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。

【１２７７】

【表７】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中40頁27行で言及された微生物に関してなされた。

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（郵便番号および国を含む）

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 ブールバード 10801

寄託日 受託番号 97183

1995年6月1日

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま） この情報は追付の用紙に続く ☐

ＤＮＡプラスミド、563232

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

（下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☒この用紙は国際出願とともに受理された	☐この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官

PCT/RO/134様式（1992年７月）115pc0d.deprecep

【１２７８】

【表８】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

A．表示は明細書中162頁20行で言及された微生物に関してなされた。

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（郵便番号および国を含む）
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 ブールバード 10801

寄託日	受託番号
2001年2月7日	TBA

C．追加の表示（なければ空白のまま）　この情報は追付の用紙に続く ☐

ハイブリドーマ XF11.1D8

D．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

E．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

（下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質，例えば「寄託物の受託番号」の特定）

「寄託物の登録番号」

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☒この用紙は国際出願とともに受理された	☐この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官

PCT/RO/134様式（1992年７月）115pc0d.deprecep1

【１２７９】

【表９】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

A．表示は明細書中162頁21行で言及された微生物に関してなされた。

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（郵便番号および国を含む）

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 ブールバード 10801

寄託日	受託番号
2001年2月7日	TBA

C．追加の表示（なければ空白のまま） この情報は追付の用紙に続く ☐

ハイブリドーマ XF11.4D10

D．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

E．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

（下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

「寄託物の登録番号」

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☒この用紙は国際出願とともに受理された	☐この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官

PCT/RO/134様式（1992年７月）115pc0d.deprecep2

【１２８０】

【表１０】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中162頁23行で言及された微生物に関してなされた。

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（郵便番号および国を含む）

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 ブールバード 10801

寄託日	受託番号
2001年2月7日	TBA

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま）　この情報は追付の用紙に続く ☐

ハイブリドーマ XF11.4C4

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

（下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

「寄託物の登録番号」

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☒この用紙は国際出願とともに受理された	☐この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官

PCT/RO/134様式（1992年７月）115pc0d.deprecep4

【１２８１】

【表１１】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中162頁24行で言及された微生物に関してなされた。

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（郵便番号および国を含む）

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 ブールバード 10801

寄託日	受託番号
2001年2月7日	TBA

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま） この情報は追付の用紙に続く ☐

ハイブリドーマ XF11.5H1

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

（下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

「寄託物の登録番号」

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☒この用紙は国際出願とともに受理された	☐この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官

PCT/RO/134様式（1992年７月）115pc0d.deprecep4

【１２８２】

【表１２】

寄託された微生物に関する表示
（ＰＣＴ規則１３規則の２）

Ａ．表示は明細書中162頁25行で言及された微生物に関してなされた。

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（郵便番号および国を含む）

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 ブールバード 10801

寄託日	受託番号
2001年2月7日	TBA

Ｃ．追加の表示（なければ空白のまま）　　この情報は追付の用紙に続く　□

ハイブリドーマ XF11.1GB

Ｄ．表示がなされた指定締結国（全ての指定締結国に対する表示ではない場合）

Ｅ．別に添付する表示物（なければ空白のまま）

（下記の表示物は、追って国際事務局に提出する（表示物の一般的性質、例えば「寄託物の受託番号」の特定）

「寄託物の登録番号」

受理官庁記入欄	国際事務局記入欄
☒この用紙は国際出願とともに受理された	□この用紙は以下の日付で国際事務局により受理された
認定官	認定官

PCT/RO/134様式（1992年７月）473.6

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な発明の範囲を限定することを意味しない。

【図面の簡単な説明】

【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。α、β、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ー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１Ａおよび１Ｂのアミノ酸残基；「Ｐｏｓｉｔｉｏｎ」：配列番号２ならびに図１Ａおよび１Ｂ中の対応する残基の位置；Ｉ：α、領域－Ｇａｒｎｉｅｒ－Ｒｏｂｓｏｎ；ＩＩ：α、領域－Ｃｈｏｕ－Ｆａｓｍａｎ；ＩＩＩ：β、領域－Ｇａｒｎｉｅｒ－Ｒｏｂｓｏｎ；ＩＶ：β、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：α、両親媒性領域－Ｅｉｓｅｎｂｅｒｇ；ＸＩ：β、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。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Human Genome Sciences, Inc.
Rosen, Craig A.
Roschke, Viktor
Li, Yi
Ruben, Steven, M.

<120> Human G-protein Chemokine Receptor (CCR5) HDGNR10

<130> 1488.115PCOD

<150> US 60/181,258

<151> 2000-02-09

<150> US 60/187,999

<151> 2000-03-09

<150> US 60/234,336

<151> 2000-09-22

<160> 58

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 1414

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (259)..(1314)

<400> 1
gtgagatggt gctttcatga attcccccaa caagagccaa gctctccatc tagtggacag 60

```
ggaagctagc agcaaacctt cccttcacta cgaaacttca ttgcttggcc caaaagagag    120

ttaattcaat gtagacatct atgtaggcaa ttaaaaacct attgatgtat aaaacagttt    180

gcattcatgg agggcaacta aatacattct aggactttat aaaagatcac tttttattta    240

tgcacagggt ggaacaag atg gat tat caa gtg tca agt cca atc tat gac       291
                   Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp
                   1               5                  10

atc aat tat tat aca tcg gag ccc tgc cca aaa atc aat gtg aag caa       339
Ile Asn Tyr Tyr Thr Ser Glu Pro Cys Pro Lys Ile Asn Val Lys Gln
            15                  20                  25

atc gca gcc cgc ctc ctg cct ccg ctc tac tca ctg gtg ttc atc ttt      387
Ile Ala Ala Arg Leu Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe
        30                  35                  40

ggt ttt gtg ggc aac atg ctg gtc atc ctc atc ctg ata aac tgc caa      435
Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Gln
    45                  50                  55

agg ctg gag agc atg act gac atc tac ctg ctc aac ctg gcc atc tct      483
Arg Leu Glu Ser Met Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser
60                  65                  70                  75

gac ctg ttt ttc ctt ctt act gtc ccc ttc tgg gct cac tat gct gcc      531
Asp Leu Phe Phe Leu Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala
                80                  85                  90

gcc cag tgg gac ttt gga aat aca atg tgt caa ctc ttg aca ggg ctc      579
Ala Gln Trp Asp Phe Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu
            95                  100                 105

tat ttt ata ggc ttc ttc tct gga atc ttc ttc atc atc ctc ctg aca      627
Tyr Phe Ile Gly Phe Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr
        110                 115                 120

atc gat agg tac ctg gct atc gtc cat gct gtg ttt gct tta aaa gcc      675
Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala
    125                 130                 135

agg acg gtc acc ttt ggg gtg gtg aca agt gtg atc act tgg gtg gtg      723
Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val
140                 145                 150                 155

gct gtg ttt gcg tct ctc cca gga atc atc ttt acc aga tct caa aaa      771
Ala Val Phe Ala Ser Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys
                160                 165                 170

gaa ggt ctt cat tac acc tgc agc tct cat ttt cca tac agt cag tat      819
Glu Gly Leu His Tyr Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr
            175                 180                 185

caa ttc tgg aag aat ttc cag aca tta aag ata gtc atc ttg ggg ctg      867
Gln Phe Trp Lys Asn Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu
        190                 195                 200

gtc ctg ccg ctg ctt gtc atg gtc atc tgc tac tcg gga atc cta aaa      915
Val Leu Pro Leu Leu Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys
    205                 210                 215
```

```
act ctg ctt cgg tgt cga aat gag aag aag agg cac agg gct gtg agg      963
Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg
220                 225                 230                 235

ctt atc ttc acc atc atg att gtt tat ttt ctc ttc tgg gct ccc tac     1011
Leu Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr
                240                 245                 250

aac att gtc ctt ctc ctg aac acc ttc cag gaa ttc ttt ggc ctg aat     1059
Asn Ile Val Leu Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn
            255                 260                 265

aat tgc agt agc tct aac agg ttg gac caa gct atg cag gtg aca gag     1107
Asn Cys Ser Ser Ser Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu
        270                 275                 280

act ctt ggg atg acg cac tgc tgc atc aac ccc atc atc tat gcc ttt     1155
Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe
    285                 290                 295

gtc ggg gag aag ttc aga aac tac ctc tta gtc ttc ttc caa aag cac     1203
Val Gly Glu Lys Phe Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His
300                 305                 310                 315

att gcc aaa cgc ttc tgc aaa tgc tgt tct att ttc cag caa gag gct     1251
Ile Ala Lys Arg Phe Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala
                320                 325                 330

ccc gag cga gca agc tca gtt tac acc cga tcc act ggg gag cag gaa     1299
Pro Glu Arg Ala Ser Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu
            335                 340                 345

ata tct gtg ggc ttg tgacacggac tcaagtgggc tggtgaccca gtcagagttg     1354
Ile Ser Val Gly Leu
        350

tgcacatggc ttagttttca tacacagcct gggctggggg tggggtggaa gaggtctttt   1414

<210>  2

<211>  352

<212>  PRT

<213>  Homo sapiens


<400>  2

Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
1               5                   10                  15

Ser Glu Pro Cys Pro Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
            20                  25                  30

Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
        35                  40                  45
```

```
Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Gln Arg Leu Glu Ser Met
    50                  55                  60

Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu
65                  70                  75                  80

Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
                85                  90                  95

Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
            100                 105                 110

Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
        115                 120                 125

Ala Ile Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe
    130                 135                 140

Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
145                 150                 155                 160

Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr
                165                 170                 175

Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn
            180                 185                 190

Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu
        195                 200                 205

Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys
    210                 215                 220

Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile
225                 230                 235                 240

Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu
                245                 250                 255

Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser
            260                 265                 270

Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr
        275                 280                 285

His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe
    290                 295                 300
```

Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe
305 310 315 320

Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser
325 330 335

Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Gly Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
340 345 350

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 3
cggaattcct ccatggatta tcaagtgtca 30

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 4
cggaagcttc gtcacaagcc cacagatat 29

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 5
gtccaagctt gccaccatgg attatcaagt gtca 34

<210> 6

<211> 61

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 6
ctagctcgag tcaagcgtag tctgggacgt cgtatgggta gcacaagccc acagatattt 60

c 61

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 7
cgggatccct ccatggatta tcaagtgtca 30

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 8
cgggatcccg ctcacaagcc cacagatat 29

<210> 9

<211> 344

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Glu Val Thr Thr Phe Phe Asp Tyr Asp Tyr Gly Ala Pro Cys His
1 5 10 15

Lys Phe Asp Val Lys Gln Ile Gly Ala Gln Leu Leu Pro Pro Leu Tyr
20 25 30

Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn Met Leu Val Val Leu
35 40 45

Ile Leu Ile Asn Cys Lys Lys Leu Lys Cys Leu Thr Asp Ile Tyr Leu
50 55 60

Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Leu Phe Leu Ile Thr Leu Pro Leu
65 70 75 80

Trp Ala His Ser Ala Ala Asn Glu Trp Val Phe Gly Asn Ala Met Cys
85 90 95

Lys Leu Phe Thr Gly Leu Tyr His Ile Gly Tyr Phe Gly Gly Ile Phe
100 105 110

Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala
115 120 125

Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe Gly Val Val Thr Ser
130 135 140

Val Ile Thr Trp Leu Val Ala Val Phe Ala Ser Val Pro Gly Ile Ile
145 150 155 160

Phe Thr Lys Cys Gln Lys Glu Asp Ser Val Tyr Val Cys Gly Pro Tyr
165 170 175

Phe Pro Arg Gly Trp Asn Asn Phe His Thr Ile Met Arg Asn Ile Leu
180 185 190

Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu Ile Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile
195 200 205

Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala
210 215 220

Val Arg Val Ile Phe Thr Ile Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Thr
225 230 235 240

Pro Tyr Asn Ile Val Ile Leu Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly
245 250 255

Leu Ser Asn Cys Glu Ser Thr Ser Gln Leu Asp Gln Ala Thr Gln Val
260 265 270

Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr
275 280 285

Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe Arg Ser Leu Phe His Ile Ala Leu Gly
290 295 300

Cys Arg Ile Ala Pro Leu Gln Lys Pro Val Cys Gly Gly Pro Gly Val
305 310 315 320

Arg Pro Gly Lys Asn Val Lys Val Thr Thr Gln Gly Leu Leu Asp Gly
325 330 335

Arg Gly Lys Gly Lys Ser Ile Gly
340

<210> 10

<211> 733

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gggatccgga gcccaaatct tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg 60

aattcgaggg tgcaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga 120

tctcccggac cctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt aagccacgaa gaccctgagg 180

tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg 240

aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact 300

ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca acccccatcg 360

agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc 420

catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct 480

atccaagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga 540

ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg 600

acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc 660

acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgc 720

gactctagag gat 733

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Membrane proximal region motif

<220>

<221> UNSURE

<222> (3)..(3)

<223> May be any amino acid.

<400> 11

Trp Ser Xaa Trp Ser
1 5

<210> 12

<211> 86

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 12
gcgcctcgag atttccccga aatctagatt tccccgaaat gatttccccg aaatgatttc 60

cccgaaatat ctgccatctc aattag 86

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 13
gcggcaagct ttttgcaaag cctaggc 27

<210> 14

<211> 271

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14
ctcgagattt ccccgaaatc tagatttccc cgaaatgatt tccccgaaat gatttccccg 60

aaatatctgc catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc cgcccatccc 120

gcccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa ttttttttat 180

ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt 240

ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct t 271

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 15
gcgctcgagg gatgacagcg atagaacccc gg 32

<210> 16

<211> 31

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 16
gcgaagcttc gcgactcccc ggatccgcct c 31

<210> 17

<211> 12

<212> DNA

<213> Primer

<400> 17
ggggactttc cc 12

<210> 18

<211> 73

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 18
gcggcctcga ggggactttc ccggggactt tccggggact ttccgggact ttccatcctg 60

ccatctcaat tag 73

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Oligonucleotide

<400> 19
gcggcaagct ttttgcaaag cctaggc 27

<210> 20

<211> 256

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20
ctcgagggga ctttcccggg gactttccgg ggactttccg ggactttcca tctgccatct 60

caattagtca gcaaccatag tcccgccccc aactccgccc atcccgcccc taactccgcc 120

cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga 180

ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg 240

cttttgcaaa aagctt 256

<210> 21

<211> 1056

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1056)

<400> 21
atg gat tat caa gtg tca agt cca atc tat gac atc aat tat tat aca 48
Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
1 5 10 15

tcg gag ccc tgc caa aaa atc aat gtg aag caa atc gca gcc cgc ctc 96
Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
20 25 30

ctg cct ccg ctc tac tca ctg gtg ttc atc ttt ggt ttt gtg ggc aac 144
Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
35 40 45

atg ctg gtc atc ctc atc ctg ata aac tgc aaa agg ctg aag agc atg 192
Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met
50 55 60

act gac atc tac ctg ctc aac ctg gcc atc tct gac ctg ttt ttc ctt 240
Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu
65 70 75 80

ctt act gtc ccc ttc tgg gct cac tat gct gcc gcc cag tgg gac ttt 288
Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
85 90 95

gga aat aca atg tgt caa ctc ttg aca ggg ctc tat ttt ata ggc ttc 336
Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
100 105 110

ttc tct gga atc ttc ttc atc atc ctc ctg aca atc gat agg tac ctg 384
Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu

```
        115                 120                 125

gct gtc gtc cat gct gtg ttt gct tta aaa gcc agg acg gtc acc ttt      432
Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe
    130                 135                 140

ggg gtg gtg aca agt gtg atc act tgg gtg gtg gct gtg ttt gcg tct      480
Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
145                 150                 155                 160

ctc cca gga atc atc ttt acc aga tct caa aaa gaa ggt ctt cat tac      528
Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr
                165                 170                 175

acc tgc agc tct cat ttt cca tac agt cag tat caa ttc tgg aag aat      576
Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn
            180                 185                 190

ttc cag aca tta aag ata gtc atc ttg ggg ctg gtc ctg ccg ctg ctt      624
Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu
        195                 200                 205

gtc atg gtc atc tgc tac tcg gga atc cta aaa act ctg ctt cgg tgt      672
Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys
    210                 215                 220

cga aat gag aag aag agg cac agg gct gtg agg ctt atc ttc acc atc      720
Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile
225                 230                 235                 240

atg att gtt tat ttt ctc ttc tgg gct ccc tac aac att gtc ctt ctc      768
Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu
                245                 250                 255

ctg aac acc ttc cag gaa ttc ttt ggc ctg aat aat tgc agt agc tct      816
Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser
            260                 265                 270

aac agg ttg gac caa gct atg cag gtg aca gag act ctt ggg atg acg      864
Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr
        275                 280                 285

cac tgc tgc atc aac ccc atc atc tat gcc ttt gtc ggg gag aag ttc      912
His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe
    290                 295                 300

aga aac tac ctc tta gtc ttc ttc caa aag cac att gcc aaa cgc ttc      960
Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe
305                 310                 315                 320

tgc aaa tgc tgt tct att ttc cag caa gag gct ccc gag cga gca agc     1008
Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser
                325                 330                 335

tca gtt tac acc cga tcc act gag gag cag gaa ata tct gtg ggc ttg     1056
Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Glu Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
            340                 345                 350
```

<210> 22

<211> 352

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Asp Tyr Gln Val Ser Ser Pro Ile Tyr Asp Ile Asn Tyr Tyr Thr
1 5 10 15

Ser Glu Pro Cys Gln Lys Ile Asn Val Lys Gln Ile Ala Ala Arg Leu
20 25 30

Leu Pro Pro Leu Tyr Ser Leu Val Phe Ile Phe Gly Phe Val Gly Asn
35 40 45

Met Leu Val Ile Leu Ile Leu Ile Asn Cys Lys Arg Leu Lys Ser Met
50 55 60

Thr Asp Ile Tyr Leu Leu Asn Leu Ala Ile Ser Asp Leu Phe Phe Leu
65 70 75 80

Leu Thr Val Pro Phe Trp Ala His Tyr Ala Ala Ala Gln Trp Asp Phe
85 90 95

Gly Asn Thr Met Cys Gln Leu Leu Thr Gly Leu Tyr Phe Ile Gly Phe
100 105 110

Phe Ser Gly Ile Phe Phe Ile Ile Leu Leu Thr Ile Asp Arg Tyr Leu
115 120 125

Ala Val Val His Ala Val Phe Ala Leu Lys Ala Arg Thr Val Thr Phe
130 135 140

Gly Val Val Thr Ser Val Ile Thr Trp Val Val Ala Val Phe Ala Ser
145 150 155 160

Leu Pro Gly Ile Ile Phe Thr Arg Ser Gln Lys Glu Gly Leu His Tyr
165 170 175

Thr Cys Ser Ser His Phe Pro Tyr Ser Gln Tyr Gln Phe Trp Lys Asn
180 185 190

Phe Gln Thr Leu Lys Ile Val Ile Leu Gly Leu Val Leu Pro Leu Leu
195 200 205

Val Met Val Ile Cys Tyr Ser Gly Ile Leu Lys Thr Leu Leu Arg Cys
210 215 220

Arg Asn Glu Lys Lys Arg His Arg Ala Val Arg Leu Ile Phe Thr Ile
225 230 235 240

Met Ile Val Tyr Phe Leu Phe Trp Ala Pro Tyr Asn Ile Val Leu Leu
245 250 255

Leu Asn Thr Phe Gln Glu Phe Phe Gly Leu Asn Asn Cys Ser Ser Ser
260 265 270

Asn Arg Leu Asp Gln Ala Met Gln Val Thr Glu Thr Leu Gly Met Thr
275 280 285

His Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Lys Phe
290 295 300

Arg Asn Tyr Leu Leu Val Phe Phe Gln Lys His Ile Ala Lys Arg Phe
305 310 315 320

Cys Lys Cys Cys Ser Ile Phe Gln Gln Glu Ala Pro Glu Arg Ala Ser
325 330 335

Ser Val Tyr Thr Arg Ser Thr Glu Glu Gln Glu Ile Ser Val Gly Leu
340 345 350

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 23
caggtgcagc tggtgcagtc tgg 23

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 24
caggtcaact taagggagtc tgg 23

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 25
gaggtgcagc tggtggagtc tgg 23

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 26
caggtgcagc tgcaggagtc ggg 23

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 27
gaggtgcagc tgttgcagtc tgc 23

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 28
caggtacagc tgcagcagtc agg 23

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer

<400> 29
tgaggagacg gtgaccaggg tgcc 24

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer

<400> 30
tgaagagacg gtgaccattg tccc 24

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer

<400> 31
tgaggagacg gtgaccaggg ttcc 24

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer

<400> 32
tgaggagacg gtgaccgtgg tccc 24

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 33
gacatccaga tgacccagtc tcc 23

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 34
gatgttgtga tgactcagtc tcc 23

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 35
gatattgtga tgactcagtc tcc 23

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 36
gaaattgtgt tgacgcagtc tcc 23

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 37
gacatcgtga tgacccagtc tcc 23

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 38
gaaacgacac tcacgcagtc tcc 23

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 39
gaaattgtgc tgactcagtc tcc 23

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 40
cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

<210> 41

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 41
cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

<210> 42

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 42
tcctatgtgc tgactcagcc acc 23

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 43
tcttctgagc tgactcagga ccc 23

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 44
cacgttatac tgactcaacc gcc 23

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 45
caggctgtgc tcactcagcc gtc 23

<210> 46

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 46
aattttatgc tgactcagcc cca 23

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer

<400> 47
acgtttgatt tccaccttgg tccc 24

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer

<400> 48
acgtttgatc tccagcttgg tccc 24

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer

<400> 49
acgtttgata tccactttgg tccc 24

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer

<400> 50
acgtttgatc tccaccttgg tccc 24

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer

<400> 51
acgtttaatc tccagtcgtg tccc 24

<210> 52

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 52
cagtctgtgt tgacgcagcc gcc 23

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 53
cagtctgccc tgactcagcc tgc 23

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 54
tcctatgtgc tgactcagcc acc 23

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 55
tcttctgagc tgactcagga ccc 23

<210> 56

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 56
cacgttatac tgactcaacc gcc 23

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 57
caggctgtgc tcactcagcc gtc 23

<210> 58

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<400> 58
aattttatgc tgactcagcc cca 23

【図１Ａ】

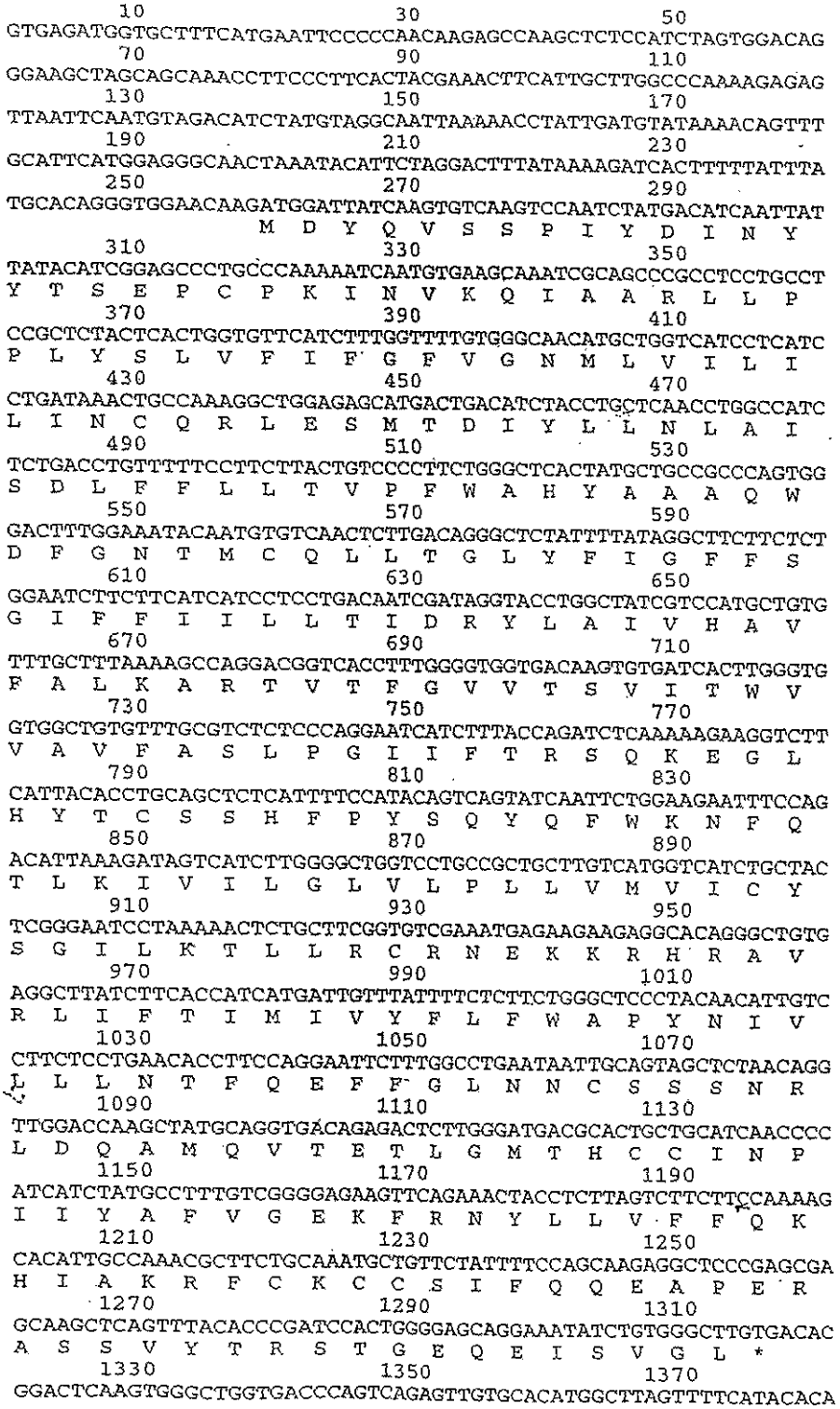


FIGURE 1A

【図１Ｂ】

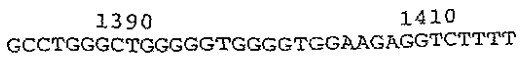


FIGURE 1B

【図２】

相同性比較
HDGNR10タンパク質 対 ヒトMCP-1レセプター

% 類似性 82.991 % 同一性 70.088

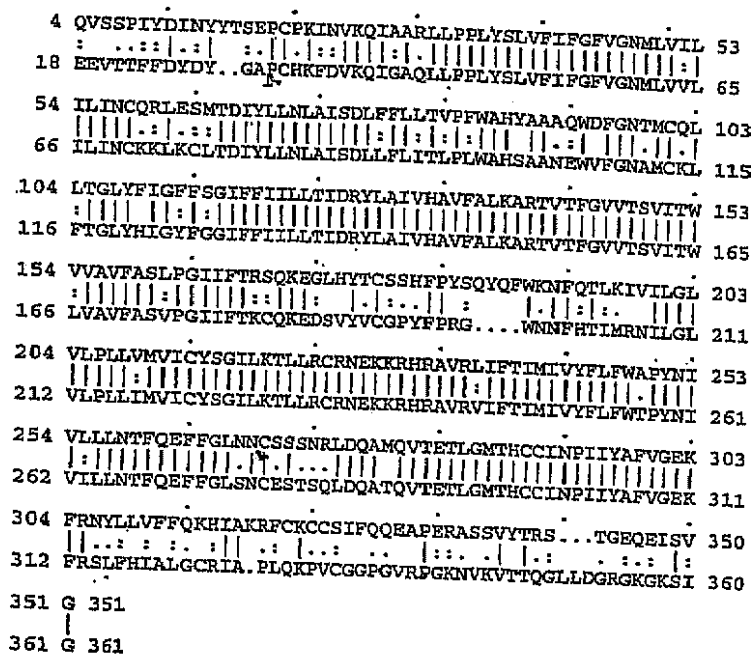
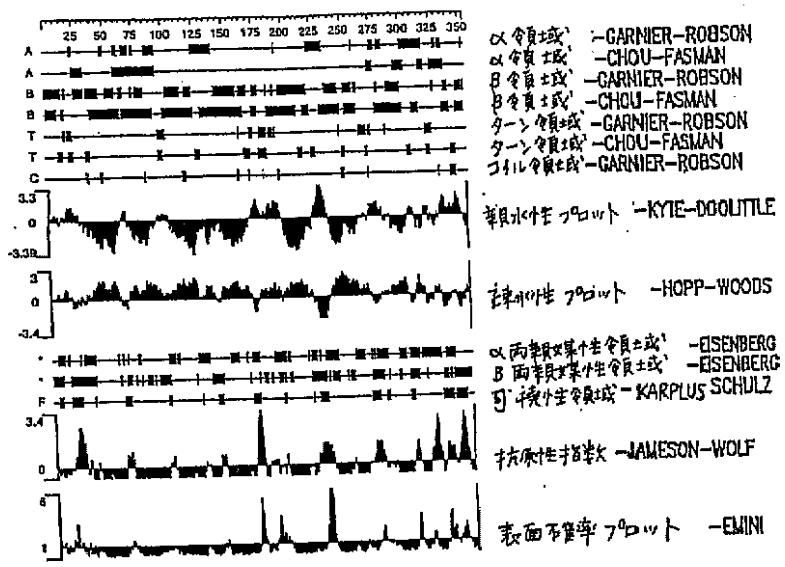


FIGURE 2

【図３】

Figure 3


25 50 75 100 125 150 175 200 225 250 275 300 325 350
A
A
B
B
T
T
C
3.3
0
-3.39
3
0
-3.4
*
*
F
3.4
0
6
1
α領域' -GARNIER-ROBSON
α領域' -CHOU-FASMAN
β領域' -GARNIER-ROBSON
β領域' -CHOU-FASMAN
ターン領域' -GARNIER-ROBSON
ターン領域' -CHOU-FASMAN
コイル領域' -GARNIER-ROBSON
疎水性プロット -KYTE-DOOLITTLE
親水性プロット -HOPP-WOODS
α両親媒性領域' -EISENBERG
β両親媒性領域' -EISENBERG
ターン領域' -KARPLUS SCHULZ
抗原性指数 -JAMESON-WOLF
表面確率プロット -EMINI

【手続補正書】特許協力条約第３４条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成１３年9月１０日（２００１．９．１０）

【手続補正１】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０２９０

【補正方法】変更

【補正の内容】

【０２９０】

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。

【手続補正２】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０３３４

【補正方法】変更

【補正の内容】

【０３３４】

ハイブリドーマ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。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。

【手続補正３】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０３３６

【補正方法】変更

【補正の内容】

【０３３６】

【表２】

ハイブリドーマ	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

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。

【手続補正４】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０３４０

【補正方法】変更

【補正の内容】

【０３４０】

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（ＣＣＲ５）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）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）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（ＣＣＲ５）もしくはＧタンパク質ケモカインレセプター（ＣＣＲ５）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。

【手続補正５】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】０３７９

【補正方法】変更

【補正の内容】

【０３７９】

特定の実施形態において、本発明のＣＣＲ５ポリペプチドおよび／またはＣＣＲ５ＳＶポリペプチドは、^{111}Ｉｎ、^{177}Ｌｕ、^{90}Ｙ、^{166}Ｈｏ、および^{153}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ＣＣＲ５ポリペプチドおよび／またはＣＣＲ５ＳＶ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}Ｉｎである。別の好ましい実施形態において、本発明のＣＣＲ５ポリペプチドおよび／またはＣＣＲ５ＳＶ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}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ＣＣＲ５ポリペプチドおよび／またはＣＣＲ５ＳＶ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。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/04153

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C07K 16/28; A61K 39/395; C07H 21/04
US CL : 530/388.22; 424/143.1; 536/23.53
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 530/388.22; 424/143.1; 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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/39437 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC) 12 December 1996 (12.12.1996), see entire document, especially SEQ ID NO: 1.	102

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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

"B" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 June 2001 (19.06.2001)	30 JUL 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Jessica H. Roark Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/04153

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

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

2. ☒ Claim Nos.: 1-101
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:
Please See Continuation Sheet

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

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/04153

Continuation of Box I Reason 2: Claims 1-101 each either directly or indirectly involve polynucleotides or amino acid sequences that are at least 95, 96, 97, 98, 99 or 100 percent identical to the nucleic acid or amino acid sequence of a second antibody. However, sequence information against which a comparison of percent identity can be made does not appear to have been provided; therefore, no meaningful search of instant claims 1-101 can be made.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3: WEST, MEDLINE, CAPLUS, GenBank® search terms: CCR5, antibod?, CC-CKR5, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2

フロントページの続き

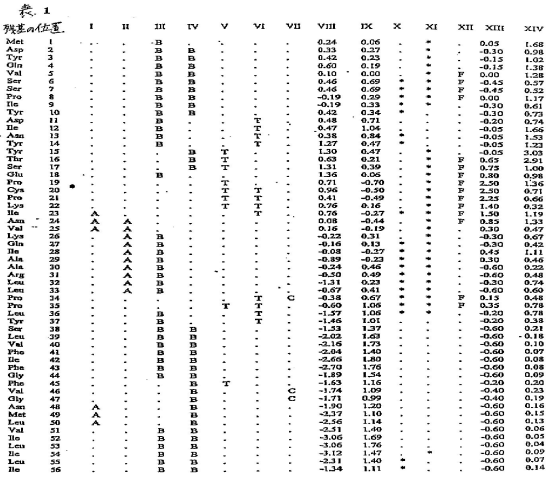
(51)Int.Cl.[7]	識別記号	FI		テーマコード(参考)
Ａ６１Ｋ 48/00		Ａ６１Ｐ 11/00		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ 11/00		19/02		４Ｃ０８６
19/02		25/00		４Ｈ０４５
25/00		29/00	１０１	
29/00	１０１	31/00		
31/00		31/12		
31/12		31/18		
31/18		35/00		
35/00		37/00		
37/00		Ｃ０７Ｋ 16/28		
Ｃ０７Ｋ 16/28		19/00		
19/00		Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/15		1/19		
1/19		1/21		
1/21		Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
5/10		Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｃ１２Ｐ 21/02		33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15		33/53	Ｄ	
33/50		33/566		
33/53		Ｃ１２Ｐ 21/08		
33/566		Ｃ１２Ｎ 15/00	ＺＮＡＡ	
// Ｃ１２Ｐ 21/08		5/00	Ａ	

(31)優先権主張番号　６０／２３４，３３６
(32)優先日　平成12年９月22日(2000．９．22)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）
(81)指定国　ＥＰ(ＡＴ，ＢＥ，ＣＨ，ＣＹ，ＤＥ，ＤＫ，ＥＳ，ＦＩ，ＦＲ，ＧＢ，ＧＲ，ＩＥ，ＩＴ，ＬＵ，ＭＣ，ＮＬ，ＰＴ，ＳＥ，ＴＲ)，ＯＡ(ＢＦ，ＢＪ，ＣＦ，ＣＧ，ＣＩ，ＣＭ，ＧＡ，ＧＮ，ＧＷ，ＭＬ，ＭＲ，ＮＥ，ＳＮ，ＴＤ，ＴＧ)，ＡＰ(ＧＨ，ＧＭ，ＫＥ，ＬＳ，ＭＷ，ＭＺ，ＳＤ，ＳＬ，ＳＺ，ＴＺ，ＵＧ，ＺＷ)，ＥＡ(ＡＭ，ＡＺ，ＢＹ，ＫＧ，ＫＺ，ＭＤ，ＲＵ，ＴＪ，ＴＭ)，ＡＥ，ＡＧ，ＡＬ，ＡＭ，ＡＴ，ＡＵ，ＡＺ，ＢＡ，ＢＢ，ＢＧ，ＢＲ，ＢＹ，ＢＺ，ＣＡ，ＣＨ，ＣＮ，ＣＲ，ＣＵ，ＣＺ，ＤＥ，ＤＫ，ＤＭ，ＤＺ，ＥＥ，ＥＳ，ＦＩ，ＧＢ，ＧＤ，ＧＥ，ＧＨ，ＧＭ，ＨＲ，ＨＵ，ＩＤ，ＩＬ，ＩＮ，ＩＳ，ＪＰ，ＫＥ，ＫＧ，ＫＰ，ＫＲ，ＫＺ，ＬＣ，ＬＫ，ＬＲ，ＬＳ，ＬＴ，ＬＵ，ＬＶ，ＭＡ，ＭＤ，ＭＧ，ＭＫ，ＭＮ，ＭＷ，ＭＸ，ＭＺ，ＮＯ，ＮＺ，ＰＬ，ＰＴ，ＲＯ，ＲＵ，ＳＤ，ＳＥ，ＳＧ，ＳＩ，ＳＫ，ＳＬ，ＴＪ，ＴＭ，ＴＲ，ＴＴ，ＴＺ，ＵＡ，ＵＧ，ＵＳ，ＵＺ，ＶＮ，ＹＵ，ＺＡ，ＺＷ

(72)発明者　ローゼン，　クレイグ　エイ．
アメリカ合衆国　メリーランド　20882，
レイトンズビル，　ローリング　ヒル
ロード　22400
(72)発明者　ロシュケ，　ヴィクトル
アメリカ合衆国　メリーランド　20850，
ロックビル，　ランバーティナ　プレイ
ス　13844
(72)発明者　リ，　イ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　94086，
サニーベイル，　レイクサイド　ドライ
ブ　1247　ナンバー3034
(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　20832，
オルネイ，　ヘリテイジ　ヒルズ　ドラ
イブ　18528

Ｆターム(参考)　2G045 AA40 DA36 FB03 FB07
4B024 AA01 AA11 BA41 BA63 CA04
DA02 DA06 GA03 GA11 HA01
4B064 AG20 AG27 CA01 CA02 CA10
CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA90X AA91X AA92X
AB01 AB05 AC14 CA24 CA25
CA44 CA46
4C084 AA06 AA07 AA13 AA19 BA22
CA53 CA56 DA01 DA58 MA02
MA52 MA55 MA66 NA14 ZA011
ZA161 ZA591 ZB071 ZB111
ZB131 ZB151 ZB261 ZB311
ZB331 ZC781
4C085 AA03 AA13 AA14 BB11 DD22
DD23 DD32 EE01 EE06 FF03
FF11
4C086 AA01 AA02 AA04 MA04 MA52
MA55 MA66 NA14 ZA01 ZA16
ZA59 ZA96 ZB07 ZB11 ZB13
ZB15 ZB26 ZB31 ZB33 ZC78
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40
DA76 EA20 EA52 FA72 FA73
FA74

专利名称(译)	针对CCR5的抗体		
公开(公告)号	JP2003523744A	公开(公告)日	2003-08-12
申请号	JP2001558065	申请日	2001-02-09
[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Jinomu科学公司		
[标]发明人	ローゼンクレイグエイ ロシュケヴィクトル リイ ルーベンスティーブンエム		
发明人	ローゼン, クレイグ エイ. ロシュケ, ヴィクトル リ, イ ルーベン, スティーブン エム.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P11/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 C07K14/715 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A01K2217/075 A61K38/00 A61K48/00 A61P11/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 C07K14/7158 C07K16/2866 C07K2319/00 C12N2799/026		
FI分类号	A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P11/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00.101 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/00 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DA01 4C084/DA58 4C084/MA02 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA161 4C084/ZA591 4C084/ZB071 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C084/ZB311 4C084/ZB331 4C084/ZC781 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/DD32 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF03 4C085/FF11 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA04 4C086/MA04 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA16 4C086/ZA59 4C086/ZA96 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB26 4C086/ZB31 4C086/ZB33 4C086/ZC78 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
优先权	60/181258 2000-02-09 US 60/187999 2000-03-09 US 60/234336 2000-09-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种称为人G蛋白趋化因子受体（CCR5）HDGNDR10的新型人蛋白和编码该蛋白的分离的多核苷酸。 本发明还涉及与人G蛋白趋化因子受体（CCR5）HDGNDR10结合的人抗体，以及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）HDGNDR10和人抗人G蛋白趋化因子受体（CCR5）HDGNDR10抗体的载体，宿主细胞，抗体和重组方法。 本发明进一步涉及可用于诊断和治疗与该新型人蛋白质和这些新型人抗体相关的疾病，病症和/或状况的诊断和治疗方法。