(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2010-537952
(P2010-537952A)
(43)公表日　平成22年12月9日(2010.12.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47	ZNA	4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B063
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4C084
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4H045
A61P 37/08	(2006.01)	A61P	37/08		

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 65 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-521269 (P2010-521269)
(86)(22)出願日　平成20年8月25日 (2008.8.25)
(85)翻訳文提出日　平成22年4月8日 (2010.4.8)
(86)国際出願番号　PCT/AU2008/001250
(87)国際公開番号　WO2009/026622
(87)国際公開日　平成21年3月5日 (2009.3.5)
(31)優先権主張番号　2007904591
(32)優先日　平成19年8月24日 (2007.8.24)
(33)優先権主張国　オーストラリア(AU)

(71)出願人　510048646
マイレクサ　ピーティーワイ　リミテッド
ＭＹＬＥＸＡ　ＰＴＹ　ＬＩＭＩＴＥＤ
オーストラリア国　オーストラリアンキャピタルテリトリー２６００　キャンベラ　ロンドンサーキット１５　レベル８　スイート１
(74)代理人　100107984
弁理士　廣田　雅紀
(72)発明者　シルバ　ディエゴ
オーストラリア国　オーストラリアンキャピタルテリトリー２６０４　キングストン　ドーズストリート３９－５１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】過敏症反応の調節因子

(57)【要約】
本発明は、免疫応答を調節するためのペプチドであって、Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、又はプレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインの１つの少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチドに関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
マスト細胞活性化を調節するためのペプチドであって、
（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチド。
【請求項２】
配列番号７に示されているアミノ酸を含む、請求項１に記載のペプチド。
【請求項３】
配列番号８、又は配列番号１４～２７３のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む、請求項１に記載のペプチド。
【請求項４】
配列番号１１又は配列番号１２に示されているアミノ酸を含む、請求項１に記載のペプチド。
【請求項５】
配列番号１０、又は配列番号２７４～４８８のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む、請求項１に記載のペプチド。
【請求項６】
対象のマスト細胞活性化を阻害又は防止する方法であって、
（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び
（iv）請求項１～５のいずれかに記載のペプチド
のうち少なくとも１つを含む治療有効量のタンパク質を前記対象に投与するステップを含む方法。
【請求項７】
マスト細胞活性化がＩｇＥ媒介性である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
マスト細胞活性化が非ＩｇＥ媒介性である、請求項６に記載の方法。
【請求項９】
対象の過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防する方法であって、
（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び
（iv）請求項１～５のいずれかに記載のペプチド
のうち少なくとも１つを含む治療有効量のタンパク質を前記対象に投与することを含む方法。
【請求項１０】
過敏性疾患又は過敏性障害が、マスト細胞活性化を含む、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
過敏性疾患又は過敏性障害が、炎症反応を含む、請求項９又は１０に記載の方法。
【請求項１２】
過敏性疾患又は過敏性障害が、アナフィラキシー、薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、並びに呼吸器疾患及び呼吸器障害からなる群から選択される、請求項９～１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１３】
呼吸器疾患又は過敏性障害が、ぜん息、アレルギー性ぜん息、内因性ぜん息、職業性ぜん息、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、及び慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）からなる群から選択される、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】
対象の免疫応答を調節する方法であって、
（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び
（iv）請求項１～５のいずれかに記載のペプチド
のうち少なくとも１つを含む治療有効量のタンパク質を前記対象に投与することを含む方法。
【請求項１５】
タンパク質がＮＥＤＤ９である、請求項６～１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１６】
タンパク質がＰＨＬＤＡ１である、請求項６～１４のいずれかに記載の方法。
【請求項１７】
対象のマスト細胞活性化を阻害又は防止する方法であって、前記対象に治療有効量のペプチドを投与するステップを含み、前記ペプチドが
（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含む方法。
【請求項１８】
対象の過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防する方法であって、前記対象に治療有効量のペプチドを投与することを含み、前記ペプチドが
（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含む方法。
【請求項１９】
過敏性疾患又は過敏性障害がマスト細胞活性化を含む、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
過敏性疾患又は過敏性障害が炎症反応を含む、請求項１８又は１９に記載の方法。
【請求項２１】
過敏性疾患又は過敏性障害が、アナフィラキシー、薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、並びに呼吸器疾患及び呼吸器障害からなる群から選択される、請求項１８～２０のいずれかに記載の方法。
【請求項２２】
呼吸器疾患又は過敏性障害が、ぜん息、アレルギー性ぜん息、内因性ぜん息、職業性ぜん息、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、及び慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）からなる群から選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
対象の免疫応答を調節する方法であって、前記対象に治療有効量のペプチドを投与することを含み、前記ペプチドが
（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含む方法。
【請求項２４】
ペプチドが、配列番号７に示されているアミノ酸配列を含む、請求項１７～２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２５】
ペプチドが、配列番号８に示されているアミノ酸配列を含む、請求項１７～２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２６】

ペプチドが、配列番号１１に示されているアミノ酸配列を含む、請求項１７～２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２７】
ペプチドが、配列番号１２に示されているアミノ酸配列を含む、請求項１７～２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２８】
マスト細胞活性化を阻害する方法であって、
（ｉ）ＮＥＤＤ９タンパク質Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（ii）ＰＨＬＤＡ１タンパク質プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
の両方又はいずれかの、マスト細胞受容体との結合を阻害することを含む方法。
【請求項２９】
対象の過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防する方法であって、
（ｉ）ＮＥＤＤ９タンパク質Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（ii）ＰＨＬＤＡ１タンパク質プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
の両方又はいずれかの、マスト細胞受容体との結合を阻害するステップを含む方法。
【請求項３０】
阻害することが、ＮＥＤＤ９タンパク質Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン又はＰＨＬＤＡ１タンパク質プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインの少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチドの投与を含む、請求項２８又は２９に記載の方法。
【請求項３１】
ＮＥＤＤ９タンパク質Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメインの少なくとも一部分に対応するペプチドが、配列番号７又は配列番号８に示されているアミノ酸配列を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
ＰＨＬＤＡ１タンパク質プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインの少なくとも一部分に対応するペプチドが、配列番号１０、配列番号１１、及び配列番号１２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３３】
過敏性疾患又は過敏性障害の治療用薬剤を製造するための、
（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び
（iv）請求項１～５のいずれかに記載のペプチド
のうち少なくとも１つを含むタンパク質の使用。
【請求項３４】
タンパク質がＮＥＤＤ９である、請求項３３に記載の使用。
【請求項３５】
タンパク質がＰＨＬＤＡ１である、請求項３３に記載の使用。
【請求項３６】
過敏性疾患又は過敏性障害の治療用薬剤を製造するための、
（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチドの使用。
【請求項３７】
ペプチドが、配列番号７、配列番号８、配列番号１１、及び配列番号１２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３６に記載の使用。
【請求項３８】
過敏性疾患又は過敏性障害が、アナフィラキシー、薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、並びに呼吸器疾患及び呼吸器障害か

らなる群から選択される、請求項３３～３７のいずれかに記載の使用。
【請求項３９】
呼吸器疾患又は過敏性障害が、ぜん息、アレルギー性ぜん息、内因性ぜん息、職業性ぜん息、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、及び慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）からなる群から選択される、請求項３８に記載の使用。
【請求項４０】
Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、及びプレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインのうち少なくとも１つを含むタンパク質の活性を調節する物質を同定する方法であって、
（ａ）候補物質と前記タンパク質の相互作用を可能にするのに適した条件下で、前記候補物質を前記タンパク質と接触させるステップと、
（ｂ）前記タンパク質の活性をアッセイするステップと
を含む方法。
【請求項４１】
複数の候補物質をスクリーニングして、Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、及びプレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインのうち少なくとも１つを含むタンパク質の活性を調節する物質を同定するための方法であって、
（ａ）候補物質と前記タンパク質の相互作用を可能にするのに適した条件下で、前記複数の候補物質を前記タンパク質と接触させるステップと、
（ｂ）前記タンパク質の活性をアッセイするステップと
を含む方法。
【請求項４２】
タンパク質がＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１である、請求項４０又は４１に記載の方法。
【請求項４３】
タンパク質の活性をアッセイするステップが、マスト細胞活性化のレベルを測定するステップを含む、請求項４０～４２のいずれかに記載の方法。
【請求項４４】
候補物質がタンパク質のアゴニストである、請求項４０～４３のいずれかに記載の方法。
【請求項４５】
候補物質がタンパク質のアゴニストである、請求項４０～４３のいずれかに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、マスト細胞活性化の調節因子に関し、特に過敏性疾患及び障害の治療及び予防におけるその使用に関する。より具体的には、本発明は、マスト細胞活性化を阻害及び／又は防止することが可能なタンパク質及びペプチドに関する。
【背景技術】
【０００２】
先進国における過敏症関連障害の罹患率は、この数十年で劇的に増加した。特に、最も一般的なタイプの過敏症関連障害、ＩｇＥ媒介性過敏症は、既に開発途上国の人口の２５％超に影響を与えている。
【０００３】
過敏症反応は、不適切に作用する免疫応答の結果であり、多数の抗原によって引き起こされ得る。それらは、いくつかの細胞タイプが放出する炎症性メディエーターの組合せによってもたらされる。過敏症の１つの形態は、ＩｇＥ応答が、花粉又はイエダニなどの無害な環境抗原に対するものである場合に生じる。その結果として薬理学的メディエーターがＩｇＥ感作マスト細胞によって放出され、ぜん息又は鼻炎などの症状を有する急性炎症反応がもたらされる。気道炎症は、ぜん息の病因の中核をなし、肺組織及び気管支肺胞空

間へのマスト細胞、好酸球、好中球、及びリンパ球の動員及び活性化を伴う。

【０００４】

マスト細胞は、過敏症反応の重要なエフェクターの１つであると考えられている。これらの細胞は、血管、神経、粘膜表面、及び皮膚のすぐ近くにあり、体内全体にわたって分布している。それらの部位で、これらの細胞は、アレルゲンを検出して、いくつかの炎症性メディエーターを放出するそれらの能力によりアレルギー反応の最も初期の局面を開始するための良い位置にいる。なかでも、マスト細胞は、アレルギー反応及びぜん息の発症の原因となる免疫グロブリンであるＩｇＥに特異的な受容体を発現する体内唯一の細胞である。

【０００５】

マスト細胞は、種々の刺激によって活性化され得るが、最も特異的なのは、細胞表面でその高親和性受容体（ＦｃεＲＩ）と結合しているＩｇＥと、抗原との相互作用によるものある。ＦｃεＲＩ－α結合ＩｇＥによる抗原検出は、受容体架橋、及びその後には同じ受容体のβ及びγサブユニットのＩＴＡＭモチーフにあるチロシン残基のリン酸化に結びつく。結果的に、ＦｃεＲＩ受容体の凝集は、最終的には、事前に形成されていた果粒剤の放出、並びにエイコサノイド、サイトカイン、及びケモカインの分泌に結びつく、数多くのタンパク質相互作用を伴う複雑な細胞内経路の活性化を誘導する。マスト細胞活性化は、アレルギー及びアナフィラキシー反応で典型的に観察される全身性及び／又は局所的効果を引き起こす一連の生化学的事象に結びつく。

【０００６】

過敏症関連障害の治療に使用される現行のプロトコールは、主にグルココルチコイド及び他の症状緩和薬物の組合せを含む。これらの治療は、マスト細胞を直接的に標的とするのではなく、下流の炎症性メディエーターの効果を妨げることを目的としている。コルチコイドなどの抗炎症薬は、非選択的な様式で、種々の細胞機能に影響を及ぼす。したがって、長期的なステロイド治療で生じる合併症により、その臨床使用には制限が課されている。

【０００７】

過敏症関連疾患及び障害を治療するための新しい治療手法の必要性が存在する。特に、アレルギー反応に関連する炎症性メディエーターの放出を調節するために、マスト細胞を標的とする新しい治療手法の必要性が存在する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

本明細書中では、マスト細胞活性化及び過敏症反応の開始に関与することが以前に知られていなかった遺伝子が記述されている。それらの遺伝子によってコードされたタンパク質は、プレクストリン相同性（ＰＨ、pleckstrin homology）、Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２、Src homology 2）、又はＳｒｃ相同性３（ＳＨ３、Src homology 3）ドメインの少なくとも１つを含む。これらのドメインは、マスト細胞表面に存在する受容体との特異的な相互作用により、マスト細胞活性化を調節すると考えられる。したがって、本発明のある態様及び実施形態は、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の投与によるマスト細胞活性化の調節に関する。また本明細書中では、マスト細胞活性化を調節可能なＳＨ３及び／又はＰＨドメイン配列に対応するペプチドが記述されている。本明細書中に記述されているペプチドは、過敏性疾患及び障害を治療及び予防する手段を提供する。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

第１の態様では、本発明は、マスト細胞活性化を調節するためのペプチドであって、

（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は

（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン

の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。

【００１０】

第１の態様の１つの実施形態では、ペプチドは、配列番号７に示されているアミノ酸を含む。

【００１１】

第１の態様の別の実施形態では、ペプチドは、配列番号８、又は配列番号１４～２７３のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む。

【００１２】

第１の態様の別の実施形態では、ペプチドは、配列番号１１又は配列番号１２に示されているアミノ酸を含む。

【００１３】

第１の態様の１つの実施形態では、ペプチドは、配列番号１０、又は配列番号２７４～４８８のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む。

【００１４】

第１の態様の別の実施形態では、前記調節は、マスト細胞活性化を阻害する。

【００１５】

第２の態様では、本発明は、対象のマスト細胞活性化を阻害又は防止する方法であって、

（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、
（iv）請求項１～５のいずれかに記載のペプチド

の少なくとも１つを含む治療有効量のタンパク質を対象に投与するステップを含む方法を提供する。

【００１６】

第２の態様の１つの実施形態では、マスト細胞活性化は、ＩｇＥ媒介性である。

【００１７】

第２の態様の別の実施形態では、マスト細胞活性化は、非ＩｇＥ媒介性である。

【００１８】

第３の態様では、本発明は、対象の過敏性疾患及び障害を治療又は予防する方法であって、

（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び
（iv）請求項１～５のいずれかに記載のペプチド

のうち少なくとも１つを含む治療有効量のタンパク質を対象に投与するステップを含む方法を提供する。

【００１９】

第３の態様の１つの実施形態では、過敏性疾患又は過敏性障害は、マスト細胞活性化を含む。

【００２０】

第３の態様の別の実施形態では、過敏性疾患又は過敏性障害は、炎症反応を含む。

【００２１】

第３の態様の別の実施形態では、過敏性疾患又は過敏性障害は、アナフィラキシー、薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、並びに呼吸器疾患及び呼吸器障害であってもよい。呼吸器疾患又は障害は、ぜん息、アレルギー性ぜん息、内因性ぜん息、職業性ぜん息、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ、acute respiratory distress syndrome）及び慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ、chronic obstructive pulmonary disease）であってもよい。

【００２２】

第４の態様では、本発明は、対象の免疫応答を調節する方法であって、

（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び
（iv）請求項１～５のいずれかに記載のペプチド
のうち少なくとも１つを含む治療有効量のタンパク質を対象に投与することを含む方法を提供する。

【００２３】
第４の態様の１つの実施形態では、タンパク質はＮＥＤＤ９である。

【００２４】
第４の態様の１つの実施形態では、タンパク質はＰＨＬＤＡ１である。

【００２５】
第５の態様では、本発明は、対象のマスト細胞活性化を阻害又は防止する方法であって、
（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含む治療有効量のタンパク質を対象に投与することを含む方法を提供する。

【００２６】
第６の態様では、本発明は、対象の過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防する方法であって、
（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含む治療有効量のタンパク質を対象に投与することを含む方法を提供する。

【００２７】
第６の態様の１つの実施形態では、過敏性疾患又は過敏性障害は、マスト細胞活性化を含む。

【００２８】
第６の態様の別の実施形態では、過敏性疾患又は過敏性障害は、炎症反応を含む。

【００２９】
第６の態様の追加の実施形態では、過敏性疾患又は過敏性障害は、アナフィラキシー、薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、並びに呼吸器疾患及び呼吸器障害からなる群から選択される。呼吸器疾患又は障害は、ぜん息、アレルギー性ぜん息、内因性ぜん息、職業性ぜん息、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）及び慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）であってもよい。

【００３０】
第７の態様では、本発明は、対象の免疫応答を調節する方法であって、
（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含む治療有効量のタンパク質を対象に投与することを含む方法を提供する。

【００３１】
第５、第６、及び第７の態様の１つの実施形態では、ペプチドは、配列番号７に示されているアミノ酸配列又は変異体を含む。

【００３２】
第５、第６、及び第７の態様の追加の実施形態では、ペプチドは、配列番号８に示されているアミノ酸配列又は変異体を含む。

【００３３】
第５、第６、及び第７の態様の別の実施形態では、ペプチドは、配列番号１１に示され

ているアミノ酸配列又は変異体を含む。

【００３４】

第５、第６、及び第７の態様のさらに別の実施形態では、ペプチドは、配列番号１２に示されているアミノ酸配列又は変異体を含む。

【００３５】

第８の態様では、本発明は、マスト細胞活性化を阻害する方法であって、

（ｉ）ＮＥＤＤ９タンパク質Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、及び

（ii）ＰＨＬＤＡ１タンパク質プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン

の両方又はいずれかの、マスト細胞受容体との結合を阻害することを含む方法を提供する。

【００３６】

第９の態様では、本発明は、対象の過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防する方法であって、

（ｉ）ＮＥＤＤ９タンパク質Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、及び

（ii）ＰＨＬＤＡ１タンパク質プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン

の両方又はいずれかの、マスト細胞受容体との結合を阻害することを含む方法を提供する。

【００３７】

第８及び第９の態様の１つの実施形態では、阻害するステップは、ＮＥＤＤ９タンパク質Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン又はＰＨＬＤＡ１タンパク質プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインの少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチドの投与を含む。ペプチドは、配列番号７又は配列番号８に示されているアミノ酸配列を含んでいてもよい。ペプチドは、配列番号１０、配列番号１１、及び配列番号１２からなる群から選択されるアミノ酸を含んでいてもよい。

【００３８】

第１０の態様では、本発明は、過敏性疾患又は過敏性障害の治療用薬剤を製造するための、

（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、

（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、

（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び

（iv）請求項１～５のいずれかに記載のペプチド

のうち少なくとも１つを含むタンパク質の使用を提供する。

【００３９】

第１０の態様の１つの実施形態では、タンパク質はＮＥＤＤ９である。

【００４０】

第１０の態様の別の実施形態では、タンパク質はＰＨＬＤＡ１である。

【００４１】

第１１の態様では、本発明は、過敏性疾患又は過敏性障害の治療用薬剤を製造するための、

（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は

（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン

の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチドの使用を提供する。

【００４２】

第１１の態様の１つの実施形態では、ペプチドは、配列番号７、配列番号８、配列番号１１、及び配列番号１２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００４３】

第１０及び第１１の態様の１つの実施形態では、過敏性疾患又は過敏性障害は、アナフィラキシー、薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、並びに呼吸器疾患及び呼吸器障害からなる群から選択される。呼吸器疾患又

は障害は、ぜん息、アレルギー性ぜん息、内因性ぜん息、職業性ぜん息、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）及び慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）であってもよい。

【００４４】

第１２の態様では、本発明は、過敏性疾患又は過敏性障害を治療するための、

（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、

（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、

（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び

（iv）請求項１～５のいずれかに記載のペプチド

のうち少なくとも１つを含むタンパク質を提供する。

【００４５】

第１３の態様では、本発明は、過敏性疾患又は過敏性障害を治療するための、

（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は

（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン

の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチドを提供する。

【００４６】

第１４の態様では、本発明は、Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又はプレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインの少なくとも１つを含むタンパク質の活性を調節する物質を同定する方法であって、

（ａ）候補物質とタンパク質の相互作用を可能にするのに適した条件下で、候補物質をタンパク質と接触させるステップと、

（ｂ）タンパク質の活性をアッセイするステップと

を含む方法を提供する。

【００４７】

第１５の態様では、本発明は、複数の候補物質をスクリーニングして、Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又はプレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインの少なくとも１つを含むタンパク質の活性を調節する物質を同定するための方法であって、

（ａ）候補物質とタンパク質の相互作用を可能にするのに適した条件下で、複数の候補物質をタンパク質と接触させるステップと、

（ｂ）タンパク質の活性をアッセイするステップと

を含む方法を提供する。

【００４８】

第１４及び第１５の態様の１つの実施形態では、タンパク質は、ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１である。

【００４９】

第１４及び第１５の態様の別の実施形態では、タンパク質の活性をアッセイするステップは、マスト細胞活性化のレベルを測定するステップを含む。

【００５０】

第１４及び第１５の態様の追加の実施形態では、候補物質は、タンパク質のアゴニストである。

【００５１】

第１４及び第１５の態様のさらなる実施形態では、候補物質は、タンパク質のアゴニストである。

略語

ＢＭＭＣ	骨髄由来マスト細胞
ＤＥＡＥデキストラン	ジエチルアミノエチルデキストラン
ＤＮＡ	デオキシリボ核酸
ＤＮＰ－ＩｇＥ	抗ジニトロフェノール免疫グロブリンＥ
ｄｓＲＮＡ	２本鎖ＲＮＡ
Ｆｃ	定常断片

ＦｃεＲＩ	Ｆｃイプシロン受容体Ｉ、高親和性ＩｇＥ受容体
ＦｃεＲＩα	高親和性ＩｇＥ受容体のαサブユニット
ＦｃγＲ	Ｆｃガンマ受容体
Ｆｙｎ	チロシン－タンパク質キナーゼＦｙｎ
ＩｇＥ	免疫グロブリンＥ
ＩｇＧ	免疫グロブリンＧ
ＩＬ－１０	インターロイキン１０
ＩＴＡＭ	免疫受容体チロシン活性化モチーフ
ｋｇ	キログラム
ＬＡＭＰ－１	リソソーム関連膜タンパク質１
ＬＡＭＰ－２	リソソーム関連膜タンパク質２
Ｌｃｋ	リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ
Ｆｙｎ	チロシン－タンパク質キナーゼＦｙｎ
ｍ	メートル
ｍｇ	ミリグラム
ｍＲＮＡ	メッセンジャーリボ核酸
ＮＥＤＤ９	神経前駆細胞で発現される発生的に下方制御された遺伝子９
ＰＨ	プレクストリン相同性
ＰＨＬＤＡ１	プレクストリン相同性様ドメインファミリーＡメンバー１
ＰＨＲＩＰ	プロリン及びヒスチジン豊富なタンパク質
ＲＢＬ－２Ｈ３細胞	ラット好塩基性白血病２Ｈ３細胞
ＲＮＡ	リボ核酸
ＳＤＳ－ＰＡＧＥ	ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動法
ＳＨ２	Ｓｒｃ相同性２ドメイン
ＳＨ３	Ｓｒｃ相同性３ドメイン
ｓｉＲＮＡ	低分子阻害性ＲＮＡ
ＴＤＡＧ５１	Ｔ細胞死関連遺伝子５１

【００５２】

定義

以下は、本発明の記述を理解するにあたって有用であり得るいくつかの定義である。これらは、一般的な定義として意図されており、本発明の範囲は、いかなる点においてもそれらの用語だけに限定されるべきではないが、以下の記述をより良好に理解するために提示されている。

【００５３】

文脈上異なる解釈を要しない限り、又は特に反対のことを述べない限り、単数形の整数、ステップ、又は要素として本明細書中に列挙されている本発明の整数、ステップ、又は要素は、列挙された整数、ステップ、又は要素の単数形態及び複数形態の両方を明らかに包含する。

【００５４】

本明細書の全体にわたって、文脈上異なる解釈を要しない限り、「含む（comprise）」という単語、又は「含む（comprises）」若しくは「含む（comprising）」などの変異形は、記述されたステップ、要素若しくは整数、又はステップ、要素若しくは整数の群を包含することを意味するが、任意の他のステップ、要素若しくは整数、又は要素若しくは整数を排除することを意味しないことが理解されよう。したがって、本明細書の文脈では、「含む（comprising）」という用語は、「基本的に含むがそれのみではない」ことを意味する。

【００５５】

本明細書中で使用される場合、「物質(agent)」には、任意の天然又は人工の元素又は化合物がその範囲内に含まれる。したがって、この用語には、いずれにも限定されないが、化学元素及び化学化合物、核酸、アミノ酸、ポリペプチド、タンパク質、抗体、及び抗

体の断片、並びに本発明の文脈において適切であり得る他の物質が含まれる。

【００５６】

本明細書中で使用される場合、「調節する（modulating）」、「調節する（modulates）」という用語、及びその変異形は、本発明の特定の調節分子又は物質の存在下における分子の活性、産生、分泌、又は機能のレベルを、調節分子又は物質の非存在下におけるその活性、産生、分泌、又は他の機能のレベルと比較して、増加又は減少させることを指す。これらの用語は、増加又は減少の定量化を意味しない。調節は、所望の結果をもたらすのに十分であればいかなる強度であってもよく、直接的であってもよく、又は間接的であってもよい。

【００５７】

本明細書中で使用される場合、「免疫調節因子」という用語は、１又は複数の細胞タイプによって分泌され、免疫応答の活性化、維持、成熟、阻害、抑制、又は増強に役割を果たす分子メディエーターを指す。

【００５８】

本明細書中で使用される場合、「ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質」という用語は、以下の１又は複数を含有するタンパク質を指す：

（ａ）少なくとも１つのＳｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、

（ｂ）少なくとも１つのＳｒｃ相同性３（ＳＨ２）ドメイン、及び

（ｃ）少なくとも１つのプレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン。

したがって、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質は、１若しくは複数のＳＨ２ドメインのみを有するタンパク質、１若しくは複数のＳＨ３ドメインのみを有するタンパク質、１若しくは複数のＰＨドメインのみを有するタンパク質、１若しくは複数のＳＨ２ドメイン及び１若しくは複数のＳＨ３ドメインを有するタンパク質、１若しくは複数のＳＨ３ドメイン及び１若しくは複数のＰＨドメインを有するタンパク質、又は１若しくは複数のＳＨ２及び１若しくは複数のＳＨ３ドメイン及び１若しくは複数のＰＨドメインを有するタンパク質を包含する。

【００５９】

本明細書中で使用される場合、「マスト細胞活性化経路」という用語は、その範囲内に、その活性化に結びつくマスト細胞内又はマスト細胞表面で生じる生物学的プロセスにおけるすべての構成要素及びステップを含む。一般的に、マスト細胞の活性化は、外部刺激によって開始されてもよく、一連の細胞タンパク質、例えばホスファターゼ、キナーゼ、及びアダプター／調節因子が関係する細胞内シグナル伝達カスケードに結びつき、マスト細胞の活性化を引き起こす。

【００６０】

本明細書中で使用される場合、「投与する（administering）」という用語、及び「投与する（administer）」及び「投与（administration）」を含むその用語の変異形は、任意の適切な手段によって、本発明の化合物又は組成物を生物に接触、塗布、送達、又は提供するステップを含む。

【００６１】

本明細書中で使用される場合、「抗体（antibody）」及び「抗体（antibodies）」という用語には、ＩｇＧ（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４を含む）、ＩｇＡ（ＩｇＡ１及びＩｇＡ２を含む）、ＩｇＤ、ＩｇＥ、又はＩｇＭ、及びＩｇＹ、単鎖全抗体含む全抗体、及びそれらの抗原結合性断片が含まれる。抗原結合性抗体断片には、これらに限定されないが、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、及びＦ（ａｂ’）２、Ｆｄ、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ、single-chain Fv）、単鎖抗体、ジスルフィド結合Ｆｖ（ｓｄＦｖ）、及びＶＬ又はＶＨドメインのいずれかを含む断片が含まれる。抗体は、任意の動物由来であってよい。単鎖抗体を含む抗原結合性抗体断片は、可変領域（複数可）を単独で、又はヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３ドメインの全体又は一部との組合せで含んでいてもよい。また、可変領域（複数可）、並びにヒンジ領域、ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３ドメインのあらゆる組合せが含まれる。抗体は、生体分子に特異的に結合するモノクローナル抗体、ポリ

クローナル抗体、キメラ抗体、多特異的抗体、ヒト化抗体、並びにヒトモノクローナル及びポリクローナル抗体であってもよい。

【００６２】

本明細書中で使用される場合、「核酸」という用語は、一本鎖又は二本鎖形態のいずれかであるデオキシリボヌクレオチドポリマー又はリボヌクレオチドポリマーを指し、そうではないと限定されていない限り、天然に存在するヌクレオチドと類似した様式で核酸にハイブリダイズする、天然ヌクレオチドの公知な類似体を包含する。

【００６３】

本明細書中で使用される場合、「ポリペプチド」又は「ペプチド」という用語は、ペプチド結合によって共に結合されたアミノ酸で作られているポリマーを意味する。「ポリペプチド」及び「ペプチド」という用語は、本明細書中では同義的に使用されるが、本発明の目的では、「ポリペプチド」は、全長タンパク質の一部分を構成していてもよい。

【００６４】

本明細書中で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチド塩基、リボヌクレオチド塩基、又は公知の類似体若しくは天然ヌクレオチド、又はそれらの混合物の一本鎖又は二本鎖ポリマーを指す。

【００６５】

本明細書中で使用される場合、本明細書の全体にわたって使用される「突然変異」という用語は、ありとあらゆるタイプの機能的及び／又は非機能的核酸変化を包含することが意図されており、野生型変異体の同一の核酸領域又は対立遺伝子又は試料に存在するより一般的な核酸分子と比較した際の、標的核酸分子における突然変異及び多型を含む。そのような変化には、これらに限定されないが、１又は複数のヌクレオチドの欠失、挿入、転座、逆位、及び塩基置換が含まれる。

【００６６】

本明細書中で使用される場合、「多型」という用語は、対立遺伝子変異及び発生又は観察される他の変異などの、個体群中のゲノムの遺伝子配列における変異を指す。遺伝子多型は、ヌクレオチド塩基対の違い、選択的ｍＲＮＡスプライシング、又は例えばグリコシル化を含む翻訳後修飾の結果として起こり得る遺伝子配列の変異形態を指す。したがって、多型は、２つ以上の遺伝学的に決定された選択的配列又は対立遺伝子が個体群中に出現することを指す。これらの違いは、ゲノムのコード部分及び非コード部分で生じてもよく、核酸配列、例えば転写を含む遺伝子発現、プロセシング、翻訳、輸送、タンパク質プロセシング、トラフィッキング、ＤＮＡ合成、タンパク質発現、他の遺伝子産物、又は生化学経路若しくは翻訳後修飾の産物における違いとして、及び任意の他の顕在化した違いとして顕在化又は検出することができる。

【００６７】

本明細書中で使用される場合、「治療」という用語は、疾患状態又は症状を治癒するか、そうでなければ、疾患の進行又は他の望ましくない症状をいかなる方法を使ってでも防止、妨害、遅延、又は反転させるありとあらゆる使用を指す。

【００６８】

本明細書中で使用される場合、「対象」という用語は、ヒト、及び社会的、経済的、又は学術的に重要な任意の哺乳類種の個体を含み、それらには、ヒツジ属、ウシ属、ウマ属、ブタ属、ネコ属、イヌ属、霊長類、及びげっ歯類のメンバーが含まれるが、それらに限定されない。１つの実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【００６９】

本明細書中で使用される場合、「有効量」及び「治療有効量」という用語には、それらの意味の中に、毒性は示さないが所望の治療効果を提供するためには十分である物質又は化合物の量が含まれる。必要とされる正確な量は、対象によって異なり、治療が施される種、対象の年齢及び一般的状態、治療する状態の重症度、投与する特定の物質、並びに投与方法などの要素に依存するであろう。したがって、正確な「有効量」を指定することは可能ではない。しかしながら、任意の所与の場合について、当業者であれば、単なる日常

的な実験作業を使用して適切な「有効量」を決定することができる。

【００７０】

当業者であれば、本明細書中に記述されている本発明には、具体的に記述されたもの以外の変異及び改変の余地があることを認識するであろう。本発明はそのような変異及び改変をすべて含むことを理解されたい。本発明は、本明細書中で個々に又はまとめて言及し又は示したすべてのステップ、特徴、組成物、及び化合物、並びに前記ステップ若しくは特徴のありとあらゆる組合せ又はそれらの任意の２つ以上をさらに含む。

【００７１】

本明細書に含まれている文書、行為、物質、デバイス、物品などに関するあらゆる論述は、もっぱら本発明の状況を提供するためのものにすぎない。これらのもののいずれか又はすべてが、従来技術の基礎の一部を形成しているということ、又は本出願の優先日前に本発明に関する分野においてありふれた一般的知識だったということを承認しているとは受け取られるべきでない。説明のために本明細書中に引用された文書はすべて、参照によって組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【００７２】

【図１】図１Ａは、ＩｇＥ刺激に応答したヒトマスト細胞におけるＮＥＤＤ９の相対的遺伝子発現の時間的経過を例示するグラフである。図１Ｂは、ＩｇＥ刺激に応答したヒトマスト細胞におけるＰＨＬＤＡ１の相対的遺伝子発現の時間的経過を例示するグラフである。図１Ｃは、ＩｇＥ刺激に応答したマウスマスト細胞におけるＮＥＤＤ９の相対的遺伝子発現の時間的経過を例示するグラフである。図１Ｄは、ＩｇＥ刺激に応答したマウスマスト細胞におけるＰＨＬＤＡ１の相対的遺伝子発現の時間的経過を例示するグラフである。

【図２Ａ】ＩｇＥ刺激に応答したＲＢＬ－２Ｈ３細胞における相対的ＮＥＤＤ９　ｍＲＮＡ発現を例示するグラフである。結果は、未処理試料の値に対する相対的な倍数の変化として表されている。

【図２Ｂ】イオノマイシン刺激に応答したＲＢＬ－２Ｈ３細胞における相対的ＮＥＤＤ９　ｍＲＮＡ発現を例示するグラフである。結果は、未処理試料の値に対する相対的な倍数の変化として表されている。

【図２Ｃ】ＩｇＥ刺激に応答したＲＢＬ－２Ｈ３細胞における相対的ＰＨＬＤＡ１　ｍＲＮＡ発現を例示するグラフである。結果は、未処理試料の値に対する相対的な倍数の変化として表されている。

【図２Ｄ】イオノマイシン刺激に応答したＲＢＬ－２Ｈ３細胞における相対的ＰＨＬＤＡ１　ｍＲＮＡ発現を例示するグラフである。結果は、未処理試料の値に対する相対的な倍数の変化として表されている。

【図３】ＮＥＤＤ９遺伝子発現を標的とする３つの異なるｓｉＲＮＡの存在下で、３０分間ＩｇＥと共にインキュベートされたＲＢＬ－２Ｈ３細胞のマスト細胞脱顆粒のパーセンテージを例示するグラフである。どの遺伝子も標的としない追加のｓｉＲＮＡを、対照として使用した。

【図４Ａ】陰性のｓｉＲＮＡ／ＤＮＰ－ＩｇＥ対照と比較して、ＮＥＤＤ９に対するｓｉＲＮＡとＤＮＰ－ＩｇＥとの組合せを投与した後のLewisラットにおけるエバンスブルー回収によって測定される、マスト細胞脱顆粒の程度を例示するグラフである。

【図４Ｂ】陰性のｓｉＲＮＡ／ＤＮＰ－ＩｇＥ対照と比較して、ＰＨＬＤＡ１に対するｓｉＲＮＡとＤＮＰ－ＩｇＥとの組合せを投与した後のLewisラットにおけるエバンスブルー回収によって測定される、マスト細胞脱顆粒の程度を例示するグラフである。

【図５】ホモサピエンス（ＨＳ、Homo sapiens）、マウス（ＭＭ、Mus musculus）、ラット（ＲＮ、Rattus norvegicus）、チンパンジー（ＰＴ、Pan troglodytes）、ウシ（ＢＴ、Bos taurus）、イヌ（ＣＦ、Canis familiaris）、及びニワトリ（ＧＧ、gallus gallus）のＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメインのアミノ酸配列アラインメントを示す図である。強調された残基は、推定活性部位（ＨＳ、ＭＭ、ＲＮ、ＰＴ、及びＢＴでは、アミノ酸９～２８；ＣＦでは、アミノ酸残基４１～６０；ＧＧでは、アミノ酸残基４１～５９）を示す。

【図６】ストレプトアビジン－ＡＰＣを用いて細胞内染色した後で、ＦＡＣＳにより検出されたＲＢＬ－２Ｈ３生細胞のビオチン化ＭＤＤ１取り込みを示すヒストグラムである。ビオチン化ＭＤＤ１は、０．００１ｍＭ　ＭＤＤ１（２）、０．０１ｍＭ　ＭＤＤ１（３）又は０．１ｍＭ　ＭＤＤ１（４）の濃度で細胞に投与された。対照細胞にはＰＢＳのみ（１）を投与した。

【図７】ＩｇＥ受容体架橋後のＲＢＬ－２Ｈ３細胞脱顆粒に対する、ＭＤＤ１ペプチドの効果を示すグラフである。（１）ＩｇＥコーティングのみ（２）ＩｇＥコーティング＋ＩｇＥ受容体架橋（３）ＭＤＤ１ペプチド（０．０１ｍＭ）前処理＋ＩｇＥコーティング＋ＩｇＥ受容体架橋（４）ＳＣＲペプチド０．０１ｍＭ前処理＋ＩｇＥコーティング＋ＩｇＥ受容体架橋。

【図８】オボアルブミン抗原（ＯＶＡ、ovalbumin antigen）で感作されたマウスの肺機能に対する、ＭＤＤ１ペプチドの効果を示すグラフである。ぜん息を誘導するためにＯＶＡで鼻腔内曝露したマウスには、ＭＤＤ１ペプチドを、（Ａ）８ｍｇ／ｋｇで静脈内に、又は（Ｂ）１ｍｇ／ｍｌで噴霧によって鼻腔内に同時投与した。肺耐性を容積変動記録法により測定した。ＲＬ：肺耐性。

【図９】ぜん息の誘導時にＯＶＡで感作したマウスの炎症反応レベルを示すグラフである。β－メタコリンで曝露することにより、生理食塩水、ＳＣＲ対照ペプチド、又はＭＤＤ１ペプチドのいずれかで前処理されたＯＶＡ感作マウスにぜん息を誘導した。（Ａ）％血中好酸球、（Ｂ）気管支洗浄液中の総細胞、（Ｃ）炎症病巣におけるＴＮＦ発現、及び（Ｄ）血清中の抗原特異性ＩｇＥレベル。

【図１０】ＭＤＤ１ペプチドの局所投与が、ＩｇＥ受容体架橋後のＩｇＥ感作マウスの耳生検に由来した皮膚マスト細胞を安定させることを例示するグラフである。マウスの左（Ｌ）耳をＤＭＳＯのみで処理した。右（Ｒ）耳を、ＭＤＤ１ペプチド／ＤＭＳＯ又はデキサメタゾン／ＤＭＳＯのいずれかの混合物で処理した。

【図１１】ＩｇＥ受容体架橋後のＲＢＬ－２Ｈ３細胞脱顆粒に対する、ＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２ペプチドの効果を示すグラフである。（１）ＩｇＥコーティングのみ、（２）ＩｇＥコーティング＋ＩｇＥ受容体架橋、（３）ＭＰＸ７４１ペプチド（０．０１Ｍ）前処理＋ＩｇＥコーティング＋ＩｇＥ受容体架橋、（４）ＭＰＸ７４２ペプチド０．０１ｍＭ前処理＋ＩｇＥコーティング＋ＩｇＥ受容体架橋。

【発明を実施するための形態】

【００７３】

細胞内シグナル伝達は、細胞活性化に帰着する事象の組織化されたカスケードである。ほとんどの真核細胞では、細胞内シグナル伝達は、主としてホスファターゼ、キナーゼ、及びアダプター／制御因子で構成される複合タンパク質ネットワークによって促進される。アダプター分子は、重要なシグナル伝達分子の相互作用を容易にすることにより、細胞内シグナル伝達経路に不可欠の役割を果たす。タンパク質相互作用を容易にする要因は、アダプター分子内の特定のドメインである。それらには、Ｓｒｃ相同性（ＳＨ）ドメイン（例えば、Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）及びＳｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン）、及びプレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインが含まれる。細胞内シグナル伝達事象中に、Ｓｒｃ相同性ドメインは、ホスホチロシン含有タンパク質に結合し、プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン含有タンパク質の動員に結びつく一連の事象を引き起こす。次いで、ＰＨドメイン含有タンパク質の動員は、シグナル伝達カスケードの継続を容易にする二次伝達物質の産生を触媒する。

【００７４】

本明細書中に記述したように、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードする多数の異なる遺伝子の発現は、マスト細胞活性化中に変化する。マスト細胞活性化中に発現が変化すると判明している遺伝子には、ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１があり、それらの各々は、活性化骨髄由来のヒトマスト細胞において、静止細胞と比較して上方制御されている。

【００７５】

ヒトＮＥＤＤ９遺伝子（神経前駆細胞で発現される発生的に下方制御された遺伝子９、neural precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 9）（ＧｅｎＢａｎｋ　ＩＤ：ＮＭ＿００６４０３．２及びＮＭ＿１８２９６６．２、Ｅｎｓｅｍｂｌ　ＩＤ：ＥＮＳＧ００００００１１１８５９、Ｅｎｔｒｅｚ　ｇｅｎｅ　ＩＤ　４７３９、及びＵｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ　Ｑ１４５１１）は、ＣａｓＬ（Ｃｒｋ関連基質リンパ球タイプ、Crk-associated substrate lymphocyte type）及びＨＥＦ１（ヒト繊維化エンハンサー１、human enhancer of filamentation 1）としても知れており、８３４個のアミノ酸の未プロセシング前駆体タンパク質の発現をコードする。ＮＥＤＤ９は、細胞内シグナルの伝達に関与する多機能ドッキングタンパク質であり、核、細胞質、並びにゴルジ及びラメリポディアなどの構造の多種多様な組織で発現される。ＮＥＤＤ９は、ＳＨ３ドメイン、及びＳＨ２結合部位の豊富なドメインを含有する。これらのドメインは、Ｔ細胞受容体、Ｂ細胞受容体、及びＦｃ受容体を含む表面受容体、並びに他の細胞内パートナーの下流に位置する３つの重要な細胞内プレーヤーであるＬｃｋ、Ｌｙｎ、及びＦｙｎとの高度に選択的な相互作用を容易にする。

【００７６】

ＰＨＬＤＡ１（プレクストリン相同性様ドメイン、ファミリーＡ、メンバー１、Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1）（ＧｅｎＢａｎｋ　ＩＤ：ＮＭ＿００７３５０、Ｅｎｓｅｍｂｌ　ｇｅｎｅ　ＩＤ：ＥＮＳＧ００００００１３９２８９、Ｅｎｔｒｅｚ　ｇｅｎｅ　ＩＤ：２２８２２）は、ＰＨＬＡ１、ＴＤＡＧ５１（Ｔ細胞死関連遺伝子５１、T-cell death associated gene 51）、及びＰＨＲＩＰ（プロリン及びヒスチジン豊富なタンパク質、proline and histidine rich protein）としても知られているタンパク質ＰＨＬＤＡ１（Ｕｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ：Ｑ８ＷＶ２４）をコードする。ＰＨＬＤＡ１は、プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインを含有している。ＰＨドメインは、細胞膜に隔離されているホスホイノシチド（ホスファチジルイノシトールのリン酸化誘導体）に高親和性で結合する。一般的に、ＰＨドメイン含有タンパク質は、ホスホイノシチドに結合することによって細胞膜に動員され、その後、そこで細胞シグナル伝達にそれらの機能を発揮することができる。

【００７７】

ある態様及び実施形態では、本発明は、マスト細胞の活性化を調節可能なペプチドを提供する。このペプチドは、ＳＨ３ドメイン配列及び／又はＰＨドメイン配列の少なくとも一部分に対応する配列を含む。好ましくは、ＳＨ３ドメインは、ＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメインである。好ましくは、ＰＨドメインは、ＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインである。本発明の他の態様及び実施形態では、マスト細胞活性化も調節可能なＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質が提供される。

【００７８】

特定の機序に制限されないが、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質（ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１など）は、それらのＳＨ２ドメイン、ＳＨ３ドメイン、及び／又はＰＨドメインが、マスト細胞内部の対応する結合ドメインを有する特定の標的タンパク質に結合することによって、マスト細胞活性を調節する。したがって、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドは、Ｌｃｋ、Ｌｙｎ、及びＦｙｎなどのマスト細胞表面受容体の下流に位置する重要な細胞内プレーヤーと、ＳＨ２ドメイン、ＳＨ３ドメイン、又はＰＨドメインとの相互作用を低減、増強、防止、又はその他の形で改変することができる。したがって、本発明のペプチド及びＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質は、マスト細胞活性化を調節するために投与され、過敏性疾患及び障害を治療及び／又は予防するための手段を提供することができる。

【００７９】

ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及び競合ペプチド

本明細書中では、マスト細胞活性化を調節可能なＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質が記述されている。本発明の態様及び実施形態によるマスト細胞活性化を調節可能なタンパク質は、ＳＨ２、ＳＨ３、又はＰＨドメインの少なくとも１つを含む。好適な

ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の例には、これらに限定されないが、ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１が含まれる。

【００８０】

本明細書の文脈では、ＮＥＤＤ９タンパク質は、ＳＨ３ドメインを含むそのタンパク質の変異体及びアイソフォームをすべて包含することが理解されよう。ＮＥＤＤ９タンパク質のアイソフォームには、例えば、アイソフォーム１（Ｑ１４５１１）（ＲＥＦＳＥＱ受託番号ＮＭ＿００６４０３．２）、アイソフォーム２（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｑ５ＸＫＩ０）、アイソフォームＣＲＡ＿ａ（ＵｎｉＰｒｏｔ識別番号Ｑ５Ｔ９Ｒ４）、及びアイソフォームＣＲＡ＿ｃ（ＲＥＦＳＥＱ：ＥＡＷ５５３０２．１）が含まれる。他のＮＥＤＤ９タンパク質変異体は、例えば、ＵｎｉＰｒｏｔデータベースに列挙されており、タンパク質（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｑ５ＴＩ５９）が含まれる。アイソフォーム１タンパク質ｐ１１５、ｐ１０５、ｐ６５、及びｐ５５などの翻訳後修飾から生じるＮＥＤＤ９タンパク質も企図される。

【００８１】

同様に、本明細書の文脈では、ＰＨＬＤＡ１タンパク質は、ＰＨドメインを含むそのタンパク質の変異体及びアイソフォームをすべて包含することが理解されよう。したがって、ＰＨＬＤＡ１タンパク質は、その発現が、５９１３個のヌクレオチド（ＮＣＢＩ　ＲＥＦＳＥＱ受託番号ＮＭ＿００７３５０を参照）の転写に帰着し、例えば、ＲＥＦＳＥＱ：ＮＰ＿０３１３７６、ＲＥＦＳＥＱ：ＥＡＷ９７３１２．１、又はＵｎｉＰｒｏｔ識別番号Ｑ８ＷＶ２４により示されているタンパク質に翻訳され得る、Ｅｎｔｒｅｚ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ　２２８２２（プレクストリン相同性様ドメインファミリーＡメンバー１）により記述されているＰＨＬＤＡ１遺伝子によってコードされていてもよい。Ｅｎｔｒｅｚデータベースにある変異体ＰＨＬＤＡ１　ＣＲＡ＿ａによりコードされたＰＨＬＤＡ１タンパク質（例えば、ＲＥＦＳＥＱ：ＡＡＨ１８９２９．３、ＡＡＩ１０８２１．１、及びＡＩ２６４２６．２）も企図される。

【００８２】

本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質は、これらに限定されないが、配列番号２又は配列番号４に示されているポリペプチド配列を有していてもよい。本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号１又は配列番号３に示されているようであってもよく、又は配列番号１又は配列番号３に示されている配列にハイブリダイズするのに十分な、それに対する配列同一性を示していてもよい。代替的な実施形態では、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号１及び／又は配列番号３に示されている配列と、少なくとも４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有していてもよい。

【００８３】

他の態様及び実施形態によると、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質は、これらに限定されないが、配列番号６に示されているポリペプチド配列を有していてもよい。本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号５に示されているようであってもよく、又は配列番号５の配列にハイブリダイズするのに十分な、それに対する配列同一性を示していてもよい。代替的な実施形態では、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号５に示されている配列と、少なくとも４０％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を共有していてもよい。

【００８４】

本明細書中では、ＳＨ３ドメインの少なくとも一部分に対応する配列を含むペプチドが記述されている。好ましくは、ＳＨ３ドメインは、ＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメインである。本明細書中では、ＰＨＬＤＡ１タンパク質ＰＨドメインの少なくとも一部分に対応する配

列を含むペプチドも記述されている。本発明のペプチドは、それらの配列が、ＮＥＤＤ９ＳＨ３ドメインのある部分若しくは全体、又はＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインのある部分若しくは全体に、少なくとも部分的に対応しているという点で「競合ペプチド」であると考えることができる。ある態様及び実施形態によると、本発明のペプチドは、配列番号７、配列番号８、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、及び配列番号１３に示されている配列を有していてもよい。

【００８５】

他の態様及び実施形態によると、本発明のペプチドは、配列番号１４～２７３のいずれか１つに示されている配列を有していてもよい。

【００８６】

他の態様及び実施形態によると、本発明のペプチドは、配列番号２７４～４８８のいずれか１つに示されている配列を有していてもよい。

【００８７】

一般的に、本発明のタンパク質は、単離又は精製された形態である。

【００８８】

本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドの範囲内には、その変異体及び断片が含まれることが理解されよう。「変異体」という用語は、本明細書中で使用される場合、実質的に類似している配列を指す。一般的に、２つの配列が、指定された領域にわたって、又は指定されていない場合は配列全体にわたって、同一であるアミノ酸残基又はヌクレオチドの指定されたパーセンテージ（「配列同一性」のパーセンテージ）を有する場合、その２つの配列は、「実質的に類似している」。したがって、本明細書中に開示されているポリヌクレオチド及びポリペプチド配列の「変異体」は、参照配列と、少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８３％、８５％、８８％、９０％、９３％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の配列同一性を有していてもよい。

【００８９】

一般的に、配列変異体は、定性的な生物活性を共有する。一般的に、ポリヌクレオチド配列変異体は、一般的に定性的な生物活性を共有するポリペプチドをコードする。「変異体」という用語の意味には、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及び競合ペプチドの相同体も含まれる。相同体は、典型的には、本明細書中に開示されている対応するＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又は競合ペプチドと同じ生物学的機能又は活性を実質的に共有する異なる族、属、又は種に由来する。例えば、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又は競合ペプチド相同体には、これらに限定されないが、哺乳動物の他の異なる種に由来したものが含まれる。

【００９０】

さらに、「変異体」という用語の意味には、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドの類似体も含まれる。ポリペプチド「類似体」は、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の誘導体、又は本発明のペプチドの誘導体であるポリペプチドであり、誘導体は、タンパク質／ペプチドが同じ機能を実質的に保持するような、１又は複数のアミノ酸の付加、欠失、置換を含む。「保存的なアミノ酸置換」という用語は、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドのポリペプチド鎖内で、１つのアミノ酸を、類似した特性を有する別のアミノ酸に置換又は交換することを指す。

【００９１】

例えば、荷電アミノ酸グルタミン酸（Ｇｌｕ）を、類似した荷電アミノ酸アスパラギン酸（Ａｓｐ）に置換することは、保存的なアミノ酸置換になるだろう。アミノ酸付加は、ポリヒスチジンタグ、マルトース結合タンパク質融合体、グルタチオンＳトランスフェラーゼ融合体、緑色蛍光タンパク質融合体などの第２のポリペプチド又はペプチドを、本発明のポリペプチドに融合することに起因していてもよく、又はＦＬＡＧ若しくはｃ－ｍｙｃなどのエピトープタグを付加したことに起因していてもよい。

【００９２】
一般的に、本明細書中に記述されているタンパク質及びペプチドの特性及び特徴は、特定の治療応用に対する適合性の向上を試みるために改変することができる。向上させ得るそのような特性及び特徴の非限定的な例には、これらに限定されないが、溶解度、化学的及び生化学的安定性、細胞取り込み、毒性、免疫原性、並びに分解産物の排泄が含まれる。本明細書中に記述されているペプチドの特徴及び特性を向上することができる方法及び手法は、当技術分野で周知である。例えば、１つの手法は、特定の特性に対してネガティブな決定基又はポジティブな決定基のいずれかである特定のアミノ酸残基を探索及び同定することである。これは、例えば、ペプチドの配列に沿って一度に１つずつアミノ酸を、原型残基であるＬ－アラニンに置換する側鎖切断技術の使用により達成することができる。重要な決定基部位を確認することにより、同定された部位における天然アミノ酸置換及び非天然アミノ酸置換の両方を有する変異体を産生及び試験するための基盤が提供される。望ましい特徴を示すリードペプチドは、安定性プロファイル及び薬物動態特性が向上したペプチド模倣分子を設計するためのテンプレートとして使用することができる。この手法では、合理的設計及び分子モデリングによって導かれる構造改変が使用される。これらには、立体配座的に制限された構成単位及びペプチド結合同配体が含まれるが、それらに限定されない（例えば、Vagner et al, 2008, "Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discover", Current Opinion in Chemical Biology, 12: 292-296を参照）。

【００９３】
２つの配列間の配列同一性のパーセンテージは、比較するウインドウ（comparing window）で最適にアラインされた２つの配列を比較することにより決定することができる。比較するウインドウの配列部分は、２つの配列を最適にアラインメントするために、例えば、欠失又は付加を含まない参照配列（例えば、本明細書中に開示されているＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列）と比較して、欠失又は付加（つまりギャップ）を含んでいてもよい。その後、配列同一性のパーセンテージは、同一の核酸塩基又はアミノ酸残基が両方の配列で生じている位置の数を決定して一致位置の数を算出し、比較窓にある位置の全個数で一致位置の数を除算し、その結果に１００を掛けることにより、配列同一性のパーセンテージを算出することができる。

【００９４】
２つ以上の核酸又はポリペプチド配列の文脈では、配列同一性のパーセンテージは、以下の配列比較アルゴリズムの１つ、又は手作業でのアラインメント及び目視検査を使用して測定される、比較窓又は指定領域において対応が最大になるように比較及びアラインした際の、指定された領域において（又は、指定のない場合は配列全体において）同一であるアミノ酸残基又はヌクレオチドの特定のパーセンテージを指す。

【００９５】
配列比較の場合、典型的には、１つの配列は、試験配列が比較される参照配列として機能する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列及び参照配列はコンピューターに入力され、サブシーケンス座標が指定され、必要に応じて、配列アルゴリズムのプログラムパラメーターが指定される。初期設定のプログラムパラメーターを使用してもよく、又は別のパラメーターを指定してもよい。その後、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列のパーセンテージ配列同一性を算出する。比較用に配列をアラインメントする方法は、当技術分野で周知である。比較用に最適な配列アラインメントは、これらに限定されないが、ＰＣ／ＧｅｎｅプログラムのＣＬＵＳＴＡＬ（Intelligenetics社、マウンテンビュー、米国カリフォルニア州から入手可能）；ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）、並びにＧＣＧ Wisconsin遺伝子ソフトウェアパッケージ、バージョン１０のＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＢＬＡＳＴ、ＦＡＳＴＡ、及びＴＦＡＳＴＡ（Accelrys Inc.社から入手可能、9685 Scranton Road、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国）を含む公知のコンピュータープログラムを使用して、従来通りに決定することができる。ＢＥＳＴＦＩＴプログラム（Wisconsin配列分析パッ

ケージ、ｕｎｉｘ用バージョン８、遺伝子コンピューターグループ、University Research Park、575 Science Drive、マディソン、米国ウィスコンシン州、５３７１１）。ＢＥＳＴＦＩＴでは、２つの配列間で相同性が最良であるセグメントを見出すために、Smith及びWatermanの局所相同性アルゴリズムが使用される（Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)）。ＢＥＳＴＦＩＴ、又は配列間の相同性の程度を決定する任意の他の配列アラインメントプログラムを使用する場合、同一性のパーセンテージが参照配列の全長で計算され、参照配列のヌクレオチド又はアミノ酸残基の総数の５％までの相同性でギャップが許容されるように、パラメーターを設定することができる。

【００９６】

ＧＡＰでは、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol.48:443-453に記述されているアルゴリズムを使用して、一致数を最大にしギャップ数を最少にする２つの完全配列のアラインメントを見出す。ＧＡＰでは、考え得るすべてのアラインメント及びギャップ位置が考慮され、最大数の一致塩基及び最小数のギャップを有するアラインメントが作り出される。ＧＡＰでは、一致塩基の単位で、ギャップ生成ペナルティ及びギャップ伸長ペナルティを課すことが可能である。ＧＡＰは、最良アラインメントのファミリーの１つのメンバーを提示する。

【００９７】

クエリー配列と対象配列との間で最良の全体的一致を決定するための別の方法は、グローバル配列アラインメントとも呼ばれ、Brutlag及び共同研究者ら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することができる（Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)）。配列アラインメントでは、クエリー及び対象配列は両方ともＤＮＡ配列である。ＲＮＡ配列は、ＵをＴに変換することにより比較することができる。前記グローバル配列アラインメントの結果は、パーセンテージ同一性である。

【００９８】

ＢＬＡＳＴ及びＢＬＡＳＴ２．０アルゴリズムは、パーセント配列同一性及び配列類似性を決定するために使用することができる。これらは、それぞれ、Altschul et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402、及びAltschul et al (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記述されている。ＢＬＡＳＴ解析を実施するためのソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）から公的に入手可能である。まず、このアルゴリズムは、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインした際に、ある正の値をとる閾値スコアＴと一致するか又はそれを満たすかのいずれかである、クエリー配列中の長さＷの短ワードを同定することにより、高スコア配列対（ＨＳＰ、high scoring sequence pair）を同定する。Ｔは、隣接ワードスコア閾値（Altschul et al、上記）と呼ばれる。それら初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いＨＳＰを見出すために検索を開始するシードとして機能する。ワードヒットは、累積アラインメントスコアを増加させることができる限り、各配列に沿って両方向に伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列の場合、パラメーターＭ（１対の一致残基のリワードスコア；常に０より大きい）及びＮ（不一致残基のペナルティスコア；常に０より小さい）を使用して計算される。アミノ酸配列の場合、スコアリングマトリックスを使用して累積スコアを計算する。各方向へのワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアが、その最大達成値からＸ量だけ減少する時；累積スコアが、１又は複数の負スコア残基アラインメントの累積のため０以下になる時；又は一方の配列の末端に到達する時に停止される。ＢＬＡＳＴアルゴリズムのパラメーターＷ、Ｔ、及びＸは、アラインメントの感度及び速度を決定する。ＢＬＡＳＴＮプログラム（ヌクレオチド配列用）では、ワード長（Ｗ）が１１、期待値（Ｅ）が１０、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、及び両鎖比較が、初期設定として使用される。アミノ酸配列の場合、ＢＬＡＳＴＰプログラムでは、ワード長が３、期待値（Ｅ）が１０、及びＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリックス（Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl, Acad. Sci. USA 89:10915を参照）アラインメント（Ｂ）が５０、期待値（Ｅ）が１０、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、及び両鎖比較が、初期設定として使用される。

【００９９】
ＢＬＡＳＴアルゴリズムは、２つの配列間の類似性の統計分析も実施する（例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sd. USA 90:5873-5787を参照）。ＢＬＡＳＴアルゴリズムによって提供される類似性の１つの尺度は、５、最小合計確率（Ｐ（Ｎ））であり、これは、２つのヌクレオチド配列間又はアミノ酸配列間の一致が偶然に生じるであろう確率の表示を提供する。例えば、試験核酸と参照核酸との比較における最小合計確率が、約０．２未満、より好ましくは約０．０１未満、及び最も好ましくは約０．００１未満である場合、核酸は参照配列と類似しているとみなされる。
【０１００】
本発明は、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドの断片も企図する。「断片」は、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及び／又はペプチド又はその変異体の構成要素をコードするか、又は構成要素であるポリペプチド分子である。典型的には、断片は、それが構成要素となっているＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及び／又はペプチドと定性的な生物活性を共有する。ペプチド断片は、約３～約２０００個のアミノ酸の長さ、約３～約１７５０個の長さ、約３～約１５００個のアミノ酸の長さ、約３～約１２５０個のアミノ酸の長さ、約３～約１０００個のアミノ酸の長さ、約３～約９５０個のアミノ酸の長さ、約３～約９００個のアミノ酸の長さ、約３～約８５０個のアミノ酸の長さ、約３～約８００個のアミノ酸の長さ、約３～約７５０個のアミノ酸の長さ、約３～約７００個のアミノ酸の長さ、約３～約６５０個のアミノ酸の長さ、約３～約６００個のアミノ酸の長さ、約３～約５５０個のアミノ酸の長さ、約３～約５００個のアミノ酸の長さ、約３～約４５０個のアミノ酸の長さ、約３～約４００個のアミノ酸の長さ、約３～約３５０個のアミノ酸の長さ、約３～約３００個のアミノ酸の長さ、約３～約２５０個のアミノ酸の長さ、約３～約２００個のアミノ酸の長さ、約３～約１５０個のアミノ酸の長さ、約３～約１２５個のアミノ酸の長さ、約３～約１００個のアミノ酸の長さ、約３～約７５個のアミノ酸の長さ、約３～約５０個のアミノ酸の長さ、約３～約４０個のアミノ酸の長さ、約３～約３５個のアミノ酸の長さ、約３～約３０個のアミノ酸の長さ、約３～約２５個のアミノ酸の長さ、約３～約２０個のアミノ酸の長さ、約３～約１５個のアミノ酸の長さ、約３～約１０個のアミノ酸の長さ、約３～約７個のアミノ酸の長さ、約５～約１０個のアミノ酸の長さ、約５～約１５個のアミノ酸の長さ、約５～約２０個のアミノ酸の長さ、約５～約２５個のアミノ酸の長さ、約５～約３０個のアミノ酸の長さ、約５～約３５個のアミノ酸の長さ、約８～約１２個のアミノ酸の長さ、約８～約１５個のアミノ酸の長さ、約８～約２０個のアミノ酸の長さ、約８～約２５個のアミノ酸の長さ、又は約８～約３０個のアミノ酸の長さであってもよい。
【０１０１】
本明細書中に開示されているポリヌクレオチドの断片も企図される。ポリヌクレオチド「断片」は、本発明のポリヌクレオチド又はその変異体の構成要素をコードするか、又は構成要素であるポリヌクレオチド分子である。ポリヌクレオチドの断片は、生物活性を保持するＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドをコードしていてもよく、又はコードしていなくてもよい。本発明により使用されるＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドの生物学的活性断片は、典型的には、対応する全長タンパク質の免疫調節活性の少なくとも約５０％、より典型的にはそのような活性の少なくとも約６０％、より典型的にはそのような活性の少なくとも約７０％、より典型的にはそのような活性の少なくとも約８０％、より典型的にはそのような活性の少なくとも約９０％、及びより典型的にはそのような活性の少なくとも約９５％を有する。断片は、例えば、ハイブリダイゼーションプローブ又はＰＣＲプライマーとして有用であり得る。断片は、本発明のポリヌクレオチドに由来してもよく、又はその代わりに他のいくつかの手段、例えば化学合成によって合成されてもよい。
【０１０２】
本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドの変異体は、突然変異誘発によって産生することができる。突然変異誘発は、当業者に周知の方法を使用し

て、ランダム突然変異誘発又は指定部位突然変異誘発などにより、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質若しくはペプチド、又はコード核酸を対象とし得る。そのような方法は、例えば、Current Protocols In Molecular Biology (Chapter 9), Ausubel et al., 1994, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに記述されており、その開示は、参照により本明細書中に組み込まれる。本明細書中に記述されている変異体及び類似体は、他の化学的部分、融合タンパク質と複合体化したポリペプチド、又はその他の形でポスト過渡的に修飾されたポリペプチドも包含する。さらに、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質、ペプチド、及びその断片又は変異体は、例えば、アセチル化、アミジン化、カルバモイル化、還元的アルキル化、及び当業者に公知な他の修飾などの側鎖修飾を含む、他の翻訳後修飾を有してもよい。

【０１０３】

ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質、ペプチド、及びその変異体又は断片は、当技術分野で公知な任意の好適な方法を使用して取得することができる。例えば、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質、ペプチド、及びその変異体又は断片は、標準的組換え核酸技術を使用して取得してもよく、又は例えば、従来の液相又は固相合成技術を使用して合成してもよい。本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドは、例えば、ｅｎｄｏＬｙｓ－Ｃ、ｅｎｄｏＡｒｇ－Ｃ、ｅｎｄｏＧｌｕ－Ｃ、及びブドウ球菌Ｖ８プロテアーゼなどの１又は複数のプロテイナーゼを用いてポリペプチドを消化することによって産生してもよい。消化されたペプチド断片は、例えば、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ、high performance liquid chromatographic）技術により精製することができる。組換えタンパク質産生技術は、典型的には、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードする遺伝子配列又は本明細書中に記述されているペプチドをコードする配列を、その後好適な微生物で過剰発現させるためのプラスミドにクローニングすることを伴うであろう。

【０１０４】

発現ベクター又はプラスミドの構築に好適な方法は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989、及びAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, copyright 2007などの標準的なテキストに詳細に記述されている。本発明の組換えＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びポリペプチドを産生するための方法は、例えば、Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, (Chapter 5), John Wiley and Sons, Inc., copyright 2007、及びPharmacia Biotech., The Recombinant Protein Handbook 1994, Pharmacia Biotechなどの標準的なテキストに詳細に記述されている。

【０１０５】

本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドの産生に使用することができる、一般に用いられている発現系には、例えば、細菌性（例えば大腸菌（E. coli））、酵母（例えば、サッカロマイセス・セレビシエ・アスペルギルス（Saccharomyces cerevisiae Aspergillus）、ピキア・パストリシス（Pichia pastorisis））、ウイルス性（例えば、バキュロウイルス及びワクシニア）、細胞性（例えば、哺乳動物及び昆虫）、及び無細胞系が含まれる。真核生物ウサギ網状赤血球、小麦麦芽抽出物系、及び原核生物大腸菌無細胞系を含む無細胞系も、例えば、Madin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97:559-564 (2000)、Pelham and Jackson, Eur. J. Biochem., 67: 247-256 (1976)、Roberts and Paterson, Proc. Natl. Acad. Sci., 70: 2330-2334 (1973)、Zubay, Ann. Rev. Genet., 7: 267 (1973)、Gold and Schweiger, Meth. Enzymol., 20: 537 (1971)、Lesley et al., J. Biol. Chem., 266(4): 2632-2638 (1991)、Baranov et al., Gene, 84: 463-466 (1989)、及びKudlicki et al., Analyt. Biochem., 206: 389-393 (1992)に記述されている方法を用いて、使用することができる。

【０１０６】

本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及び競合ペプチド（各々の断片及び変異体に加えて）は、当技術分野で周知の液相又は固相化学の標準的方法を使用して

合成することができる（例えば、Hackeng et al., Proc Natl Acad Sci USA. 96(18): 10068-73 (1999)、及びSteward and Young, Solid Phase Peptide Synthesis (2nd Edn.), Pierce Chemical Co., Illinois, USA (1984)を参照）。一般的に、この合成方法は、１又は複数のアミノ酸又は適切な保護アミノ酸を、伸長していくペプチド鎖に逐次付加すること含む。典型的には、最初のアミノ酸のアミノ基又はカルボキシル基のいずれかは、好適な保護基によって保護されている。その後、保護アミノ酸は、不活性固体支持体に結合されるか、又はアミド結合を形成するのに適した条件下で、適切に保護された補完的な（アミノ又はカルボキシル）基を有する配列上の次のアミノ酸を付加することにより溶液中で使用されるかのいずれかである。その後、この新しく付加されたアミノ酸残基から保護基を取り除き、次の（保護）アミノ酸を付加し、それを繰り返す。所望のアミノ酸がすべて結合された後、残りのあらゆる保護基及び必要に応じてあらゆる固体支持体を、逐次又は同時に取り除いて、最終ポリペプチドを生成する。

【０１０７】

本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドのアミノ酸配列に対する変化は、当技術分野において標準的な技術によりもたらすことができる。例えば、アミノ酸変化は、正しいリーディングフレームが維持されるという条件下でのヌクレオチドの付加、欠失、又は置換（保存的及び／又は非保存的）を含むヌクレオチド置換技術により達成することができる。典型的な技術には、ランダム突然変異誘発、指定部位突然変異誘発、オリゴヌクレオチド媒介性又はポリヌクレオチド媒介性の突然変異誘発、既存の又は設計された制限酵素部位の使用による選択領域（複数可）の欠失、及びポリメラーゼ連鎖反応が含まれる。本発明の目的での免疫調節活性の試験は、当業者に公知である多数の技術のいずれか１つによるものでもよい。

【０１０８】

本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチド（各々の断片及び変異体に加えて）の精製は、Coligan et al., Current Protocols in Protein Science, (Chapter 6), John Wiley and Sons, Inc., copyright 2007に記述されている技術などの、当技術分野で標準的な技術を使用して達成することができる。例えば、タンパク質又はペプチドが、溶解状態である場合は、カラムクロマトグラフイーなどの標準的方法を使用して単離することができる。本明細書中に記述されているＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドは、精製を支援する種々のアフィニティータグ又は担体タンパク質を含有するように遺伝子操作することができる。例えば、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及び／又はペプチドを含有する発現ベクターに設計されたヒスチジン及びタンパク質タグを使用すると、例えば、天然条件又は変性条件下のいずれかにおける金属キレートクロマトグラフィー（ＭＣＡＣ、metal-chelate chromatography）によって、精製を容易にすることができる。精製は、大規模生産用にスケールアップすることができる。

【０１０９】

当業者であれば、本発明は、使用された産生方法又は精製方法によって限定されず、上述の方法及び技術は、例証のみの目的で提供されていることを理解するであろう。

【０１１０】

マスト細胞活性化の免疫応答調節及び阻害

本明細書中には、対象の免疫応答を調節する方法が記述されている。この方法は、以下の少なくとも１つを含む治療有効量のタンパク質を対象に投与するステップを含む：

（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、

（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、

（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び

（iv）本発明のペプチド。

【０１１１】

１つの実施形態では、タンパク質は、ＮＥＤＤ９又はその断片若しくは変異体である。１つの実施形態では、タンパク質は、ＰＨＬＤＡ１又はその断片若しくは変異体である。

【０１１２】
免疫応答は、本発明の方法によって増強されてもよく、又は阻害されてもよい。例えば、マスト細胞活性化経路を負に制御する、本明細書中に記述されているＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドを有効量で投与することは、マスト細胞活性化の抑制に帰着してもよい。結果的に、対象内の過敏症応答を、投与後に低減又は防止することができる。
【０１１３】
或いは、マスト細胞活性化を正に制御する、本明細書中に記述されているＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドを有効量で投与することは、マスト細胞活性化の増強に帰着してもよい。結果的に、対象内の過敏症応答を、投与後に増加させることができる。
【０１１４】
本明細書中では、マスト細胞活性化を阻害又は防止する方法も提供されている。本発明のある態様では、マスト細胞活性化を阻害又は防止する方法は、以下の少なくとも１つを含むタンパク質の投与を含む：
（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び
（iv）本発明のペプチド。
【０１１５】
好ましくは、タンパク質はＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１である。
【０１１６】
本発明の他の態様では、マスト細胞活性化を阻害又は防止する方法は、治療有効量のペプチドを投与するステップを含み、このペプチドは、以下の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含む：
（ｉ）Ｓｒｃ相同３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン。
【０１１７】
好ましくは、ペプチドの配列は、少なくとも一部がＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメインに対応している。好ましくは、ペプチドの配列は、少なくとも一部がＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性３（ＰＨ）ドメインに対応している。
【０１１８】
本発明のある実施形態では、少なくとも一部がＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメインに対応するペプチドは、配列番号７又は配列番号８に示されているアミノ酸配列を有していてもよい。本発明の他の実施形態では、少なくとも一部がＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメインに対応するペプチドは、配列番号１４～２７３のいずれか１つに示されているアミノ酸配列を有していてもよい。
【０１１９】
本発明のある実施形態では、少なくとも一部がＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインに対応するペプチドは、配列番号１０、配列番号１１、又は配列番号１２に示されているアミノ酸配列を有していてもよい。本発明の他の実施形態では、少なくとも一部がＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインに対応するペプチドは、配列番号１３、又は配列番号２７４～４８８のいずれか１つに示されているアミノ酸配列を有していてもよい。
【０１２０】
マスト細胞活性化は、マスト細胞表面でのＩｇＥ架橋によるなどのＩｇＥ依存的機序により生じてもよい。それに加えて又は代替的に、マスト細胞活性化は、ＩｇＥ非依存的機序から生じてもよい。
【０１２１】
本明細書中に記述されているＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチ

ドを投与した、又は投与していないマスト細胞における活性化レベルの測定及び比較は、当技術分野で公知の方法を使用して実施することができる。例えば、マスト細胞活性化のレベルは、活性化マスト細胞の脱顆粒時に放出される因子を検出する標準的アッセイによって測定することができる。これらの因子には、例えば、ヒスタミン、トリプターゼ、セリンプロテアーゼトリプターゼ、β－ヘキソサミニダーゼ、ヘパリン、コンドロイチン硫酸Ｅ、プロスタグランジンＤ２、ロイコトリエンＢ４及びＣ４、血小板活性化因子、又はＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ、ＣＣＬ２、ＣＣＬ３、及びＣＣＬ５を含むサイトカイン放出が含まれていてよい。それに加えて又は代替的には、マスト細胞活性化の程度は、例えば、フローサイトメトリー法又は免疫細胞化学法によって、マスト細胞活性化の特異的マーカーの発現における変化で測定することができる。マスト細胞は、そのような技術を使用して、マスト細胞により発現されることが当技術分野で知られている種々の表面受容体の発現によって特定することができ、それらには、ＣＤ９、ＣＤ２９、ＣＤ３３、ＣＤ４３、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４６、ＣＤ５１、ＣＤ５４、ＣＤ５５、ＣＤ５８、ＣＤ５９、ＣＤ６１、及びＣＤ１１７、ＣＤ４７、ＣＤ４８、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ５３、ＣＤ６０、ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ８４、ＣＤ８７、ＣＤ９２、ＣＤ９７、ＣＤ９８、及びＣＤ９９、ＣＤ１４７、ＣＤ１４９、ＣＤ１５１、及びＣＤ１５７が含まれるが、それらに限定されない。そのようにして特定されたマスト細胞の活性化レベルは、例えば、マスト細胞活性化マーカー、例えばＣＤ１０７Ａ（ＬＡＭＰ－１）、ＣＤ１０７Ｂ（ＬＡＭＰ－２）、トリプターゼ、及びＰＧＤ２の発現によって測定することができる。

【０１２２】

本明細書中で添付の実施例に記載したように、配列がＮＥＤＤ９　ＳＨ３又はＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメイン内の特定領域に対応する「競合ペプチド」の投与は、マスト細胞を脱感作し、ＩｇＥ架橋時のそれらの活性化を阻害する効果を示すことが決定された。特定の機序に制限されることは望まないが、ＮＥＤＤ９　ＳＨ３に対応するペプチドは、マスト細胞内部にある標的タンパク質のＳＨ３結合ドメインと、ＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメインとの通常の結合を妨害することにより、マスト細胞活性化に対してこの効果を示すと推測される。これは、これらのマスト細胞表面受容体の下流に位置する３つの重要な細胞内プレーヤーであるＬｃｋ、Ｌｙｎ、及びＦｙｎとの高度に選択的な相互作用を変化させ、それにより活性化経路を遮断すると考えられる。同様に、ＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインに対応するペプチドは、マスト細胞内の標的タンパク質に存在するＰＨ結合ドメインと、ＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインとの通常の結合を妨害することにより、マスト細胞活性化を阻害すると推測される。

【０１２３】

本発明者らは、マスト細胞の標的タンパク質に対するＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメイン及び／又はＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインの結合を妨害することが、マスト細胞活性化を調節する手段を提供することを実証した。例証されたペプチドに加えて、ＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメイン又はＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインの配列に基づく多数のペプチドを設計し、使用することができ、それらは、本発明の範囲内に含まれることを理解されたい。

【０１２４】

本発明は、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の発現を変化させることにより、それらの調節効果を対象の免疫応答に及ぼすことができる物質も企図する。この場合、そのような物質は、候補物質の存在下でのＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の発現を、候補物質の非存在下でのＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の発現レベルと比較することにより同定することができる。ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードする遺伝子の発現は、物質によって、例えば遺伝子の制御配列と接触させ、それによりその転写を増加させることにより、増加させることができる。或いは、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードする遺伝子の発現は、物質によって、例えば、遺伝子の転写機構に関与するタンパク質の接近が妨害又は防止されて機能しないような方法又は様式で遺伝子に結合することにより、低減又は阻害することができ

る。

【０１２５】

それに加えて、免疫応答及びマスト細胞活性化に対する調節効果は、相同性アンチセンス核酸の投与によって、ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１などのＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の産生を低減又は阻害することにより達成することができる。ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質（ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１など）をコードする相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）遺伝子に対するアンチセンスである、少なくとも５個のヌクレオチド、一般的には約２００個までのヌクレオチドのそのような核酸の治療的又は予防的な使用も、本明細書中で提供される。そのようなアンチセンス核酸は、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質のＲＮＡ前駆体（一般的にはｍＲＮＡ）の一部分に、ある程度の配列相補性により、一般的には高度にストリンジェントな条件下で、ハイブリダイズ可能であってもよい。アンチセンス核酸は、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質のＲＮＡ前駆体のコード領域及び／又は非コード領域に相補的であってもよい。全長ＲＮＡ前駆体に対して完全に相補的である必要はない。この形態のアンチセンス核酸は、マスト細胞活性化を低減又は阻害する治療薬としての有用性を有し、本明細書中に記述されている疾患状態の治療又は予防に使用することができる。

【０１２６】

ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１などのＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質のＲＮＡ前駆体に相補的なアンチセンス核酸は、少なくとも５個のヌクレオチドであってもよく、一般的には、長さが５～約２００個までのヌクレオチドに及ぶオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくとも１０個のヌクレオチド、少なくとも１５個のヌクレオチド、少なくとも１００個のヌクレオチド、少なくとも１２５個のヌクレオチド、少なくとも１５０個のヌクレオチド、又は少なくとも１７５個のヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、ＤＮＡ若しくはＲＮＡ、又はキメラ混合物若しくは誘導体、又はその修飾型であってもよく、一本鎖若しくは二本鎖であってもよい。

【０１２７】

ＲＮＡ前駆体に相補的なアンチセンス核酸は、当技術分野で一般的に知られている置換基を使用して、その構造の任意の位置で修飾することができる。アンチセンス核酸は、これらに限定されないが、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、ベーターＤ－ガラクトシルクエオシン（beta-D-galactosylqueosine）、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、ベーターＤ－マンノシルクエオシン（beta-D-mannosylqueosine）、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、プソイドウラシル、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）、クエオシン（queosine）、ワイブトキソシン、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、及び２，６－ジアミノプリンを含む群から選択される少なくとも１つの修飾塩基部分を含んでいてよい。

【０１２８】

ＲＮＡ前駆体に相補的なアンチセンス核酸は、アラビノース、２－フルオロアラビノース、キシルロース、及びヘキソースなどの、少なくとも１つの修飾糖部分を含んでいてもよい。アンチセンス核酸は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、メチルホスホン酸、アルキルホスホトリエステル、及びそのホルムアセタール又は類似体から選択される、少なくとも１つの修飾リン酸骨格も含んでいてもよい。アンチセンス核酸は、ペプチド、ハイブリ

ダイゼーション誘発性架橋剤、輸送剤、又はハイブリダイゼーション誘発性切断剤などの別の分子にコンジュゲートすることができる。

【０１２９】

ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質（例えばＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１）のＲＮＡ前駆体に相補的なアンチセンス核酸をコードする配列は、ヒトを含む哺乳動物細胞で作用する当技術分野で公知な任意のプロモーターにより発現することができ、誘導可能な又は構成的なプロモーターを含んでいてもよい。

【０１３０】

ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ、RNA interference）（例えば、Chuang et al., Proc Natl Acad Sci USA 97: 4985-4990 (2000)を参照）を使用して、ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１などのＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードする遺伝子の発現を阻害することができる。干渉ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）断片、特に二本鎖ＲＮＡｉを使用して、タンパク質の欠損を引き起こすことができる。ＲＮＡｉを使用した生物における遺伝子の発現停止に関する方法は公知であり、例えば、Fire et al., Nature 391: 806-811 (1998)；Hammond et al., Nature Rev, Genet. 2: 110-1119 (2001)；Hammond et al., Nature 404: 293-296 (2000)；Bernstein et al., Nature 409: 363-366 (2001)；Elbashir et al., Nature 411: 494-498 (2001)；国際ＰＣＴ出願第０１／２９０５８号パンフレット；及び国際ＰＣＴ出願第９９／３２６１９号パンフレットがあり、それらの開示は、参照により本明細書中に組み込まれる。

【０１３１】

二本鎖ＲＮＡを発現する構築体は、エピゾームのままであるか又はゲノムに組み込まれる複製可能なベクターを使用して宿主に導入される。適切な配列を選択することによって、ｄｓＲＮＡの発現は、ＩＬ－１０相同体をコードする内因性ｍＲＮＡの蓄積を妨害することができる。

【０１３２】

過敏症の治療及び／又は予防

１つの態様では、本発明は、過敏性疾患又は過敏性障害を阻害又は防止するための方法に関する。この方法は、以下の少なくとも１つを含む治療有効量のタンパク質を対象に投与するステップを含む：

（ｉ）Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、

（ii）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、

（iii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び

（iv）本発明のペプチド。

【０１３３】

好ましくは、タンパク質は、ＮＥＤＤ９又はその断片若しくは変異体である。好ましくは、タンパク質は、ＰＨＬＤＡ１又はその断片若しくは変異体である。

【０１３４】

本明細書中では、以下の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含む治療有効量のペプチドを投与するステップを含む、過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防する方法も記述されている：

（ｉ）Ｓｒｃ相同３（ＳＨ３）ドメイン、又は

（ii）プレクストリン相同（ＰＨ）ドメイン。

【０１３５】

好ましくは、タンパク質は、ＮＥＤＤ９又はその断片若しくは変異体である。好ましくは、タンパク質は、ＰＨＬＤＡ１又はその断片若しくは変異体である。

【０１３６】

好ましくは、ペプチドは、配列番号７、配列番号８、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、並びにそれらの変異体及び断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１３７】

１つの実施形態では、ペプチドは、配列番号１４～２７３に示されているアミノ酸を含む。

【０１３８】

別の実施形態では、ペプチドは、配列番号２７４～４８８のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む。

【０１３９】

本明細書中では、

（ｉ）ＮＥＤＤ９タンパク質Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン

（ii）ＰＨＬＤＡ１タンパク質プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン

の両方のどちらかの、マスト細胞受容体との結合を阻害するステップを含む、過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防する方法も提供される。

【０１４０】

結合の阻害は、ＮＥＤＤ９タンパク質Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン又はＰＨＬＤＡ１タンパク質プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインの少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチドの投与を含んでいてもよい。

【０１４１】

好ましくは、ペプチドは、配列番号７、配列番号８、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、並びにそれらの変異体及び断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１４２】

１つの実施形態では、ペプチドは、配列番号１４～２７３に示されているアミノ酸を含む。

【０１４３】

別の実施形態では、ペプチドは、配列番号２７４～４８８のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む。

【０１４４】

過敏性疾患又は過敏性障害は、全面的にマスト細胞活性化から生じてもよく、又は部分的にマスト細胞活性化から生じてもよい。マスト細胞活性化は、ＩｇＥ依存的機序により生じてもよく、又はＩｇＥ非依存的機序により生じてもよい。過敏性疾患又は過敏性障害は、炎症反応を含んでいてもよい。

【０１４５】

本明細書中に記述されている方法により予防又は治療することができる過敏性疾患又は過敏性障害の例には、これらに限定されないが、アナフィラキシー、薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、並びにぜん息、アレルギー性ぜん息、内因性ぜん息、職業性ぜん息、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、及び慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）などの呼吸器疾患及び呼吸器障害が含まれる。

【０１４６】

過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防する方法は、少なくとも１つの追加の物質の投与をさらに含んでいてもよい。追加の物質は、免疫調節因子であってもよく、それは、本発明の文脈では、１又は複数の細胞タイプによって分泌される分子メディエーターであり、免疫応答の活性化、維持、成熟、阻害、抑制、又は増強に役割を果たす。別の実施形態では、免疫調節因子は、Ｉ型インターフェロンであってもよい。

【０１４７】

本発明の態様及び実施形態によると、治療を必要とする対象には、ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１などの有効量のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質、又はペプチド（例えば、配列番号７、配列番号８、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２）を投与してもよい。当業者であれば、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質は、このタンパク質が治療される種に由来し得るような、種特異的な様式で投与できることを認識するであろう。

【０１４８】
本発明のタンパク質及びペプチドは、組成物の形態で対象に投与されてもよい。一般的に、本発明の方法による使用に好適な組成物は、当業者に公知な方法に従って調製することができ、したがって薬学的に許容される担体、希釈剤、及び／又はアジュバントを含んでいてもよい。本発明の組成物は、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドのみを含んで調製されていてもよく、異なるＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の混合物、ペプチドの混合物、並びにＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドの組合せも企図される。そのような組成物は、薬学的に許容される担体、アジュバント、及び／又は希釈剤を含む医薬組成物に含まれていてもよい。或いは、本発明の組成物は、免疫抑制物質も含むことができる。

【０１４９】
本発明の実施形態は、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質（ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１など）、及び／又はＳＨ３ドメイン若しくはＰＨドメインの少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチドをコードするポリヌクレオチドの投与も企図する。そのような状況では、ポリヌクレオチドは、典型的には、対象にポリヌクレオチドを投与した後に適切なポリペプチド配列が産生されるように、プロモーターに作用可能に連結される。ポリヌクレオチドは、ベクターで対象に投与されてもよい。ベクターは、プラスミドベクター、ウイルスベクター、又は外来性配列の挿入、真核細胞へのそれらの導入、及び導入された配列の発現に適した任意の他の好適な媒体であってよい。投与される核酸構築体は、裸のＤＮＡで構成されていてもよく、又は１若しくは複数の薬学的に許容される担体と共に組成物の形態であってもよい。

【０１５０】
典型的には、ベクターは真核生物発現ベクターであり、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル、及び転写終結配列などの発現制御配列及びプロセシング配列を含んでいてもよい。ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１などのＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又は本発明のペプチドをコードする遺伝子の発現は、当技術分野で公知である遺伝子送達の種々の方法を使用して、対象のマスト細胞中で増加させることができる。例えば、誘導可能なプロモーターなどの発現制御配列に作用可能に結合された、マスト細胞活性化経路のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質制御因子をコードする核酸配列を含む発現ベクターを対象に投与して、マスト細胞中の前記タンパク質の産生を増加させることができる。或いは、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及び／又はペプチドをコードする核酸配列を含有するウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター及びアデノウイルスベクター）を、前記タンパク質の産生を誘発するために対象に投与してもよい。本明細書中に記述されているＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドをコードする遺伝子の送達は、対象から細胞を抽出し、所望の遺伝子を含有するベクターを投与し、その後対象にその細胞を再導入することによっても達成することができる。遺伝子送達技術による、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドをコードする遺伝子の発現は、対象のマスト細胞の活性化を調節する手段として使用することができる。したがって、そのような方法は、対象の過敏性疾患又は過敏性障害の治療及び予防にも好適であり得る。

【０１５１】
調節因子のスクリーニング
本発明は、対象の免疫応答を調節するための、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質のアゴニスト及びアンタゴニストの使用も企図しており、そのようなアゴニスト及びアンタゴニストを同定する方法を提供する。本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質のアゴニスト及びアンタゴニストは、特異的に設計してもよく、又はマスト細胞活性化に対するそれらの効果によりスクリーニングしてもよい。

【０１５２】
１つの態様では、本発明は、Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、Ｓｒｃ相同３性（ＳＨ３）ドメイン、又はプレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインの少なくとも１つを含むタ

ンパク質の活性を調節する物質を同定する方法に関する。この方法は、候補物質とタンパク質の相互作用を可能にするのに適した条件下で、候補物質をタンパク質と接触させるステップと、その後タンパク質の活性をアッセイするステップとを含む。

【０１５３】

別の態様では、本発明は、Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又はプレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインの少なくとも１つを含むタンパク質の活性を調節する物質を同定するために、複数の候補物質をスクリーニングするための方法に関する。この方法は、候補物質とタンパク質の相互作用を可能にするのに適した条件下で、複数の候補物質をタンパク質と接触させるステップと、タンパク質の活性をアッセイするステップとを含む。

【０１５４】

さらなる態様では、本発明は、マスト細胞活性化経路のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質制御因子の活性を調節する物質を同定するために、複数の候補物質をスクリーニングするための方法に関する。この方法は、マスト細胞活性化経路のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質制御因子と候補物質との相互作用を可能にするのに適した条件下で、マスト細胞活性化経路のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質制御因子に、複数の候補物質を接触させるステップと、マスト細胞活性化経路の前記ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質制御因子の活性をアッセイするステップとを含む。

【０１５５】

好ましくは、上記で列挙されている方法において言及されたＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質は、ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１である。

【０１５６】

種々の好適な方法を使用して、候補物質又は複数の候補物質が、ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１などのＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質と相互作用又は結合するかどうかを決定することができる。非限定的な方法には、ツーハイブリッド法、共免疫沈降法、アフィニティー精製法、質量分析法、タンデムアフィニティー精製法、ファージディスプレイ法、標識トランスファー法、ＤＮＡマイクロアレイ／遺伝子共発現法、及びタンパク質マイクロアレイ法が含まれる。

【０１５７】

例えば、ツーハイブリッド法を使用して、候補物質又は複数の候補物質が、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質と相互作用又は結合するかどうかを決定することができる。酵母ツーハイブリッドアッセイ系とは、典型的にはタンパク質間相互作用を検出するために使用される、酵母に基づく遺伝子アッセイである（Fields and Song., Nature 340: 245-246 (1989)）。このアッセイは、転写活性化因子が多ドメインであるという性質を利用する。例えば、既知の転写活性化因子のＤＮＡ結合ドメインは、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質に融合されていてもよく、転写活性化因子の活性化ドメインは、候補物質に融合されていてもよい。候補物質とＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質とが相互作用することにより、転写活性化因子のＤＮＡ結合ドメインと活性化ドメインとの緊密な接近がもたらされることになる。転写活性化因子により活性化された特異的レポーター遺伝子がその後転写されることにより、相互作用の検出が可能になる。

【０１５８】

上記の技術の改良型では、融合タンパク質は、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質を、検出可能なタグ、例えばアルカリホスファターゼと融合させ、Flanagan及びLeder（Flanagan and Leder, Cell 63:185-194 (1990)）により記述されている免疫沈降の改良形態を使用することによって構築されていてもよい。

【０１５９】

或いは、共免疫沈降法を使用して、候補物質又は複数の候補物質が、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質と相互作用又は結合するかどうかを決定することができる。この技術を使用して、タンパク質間相互作用の保存に適した非変性条件下で、活

性化マスト細胞を溶解することができる。その後、その結果生じた溶液を、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質に特異的な抗体と共にインキュベートし、例えば、固体支持体に結合された抗体結合タンパク質で捕捉することにより、バルク溶液から免疫沈降することができる。この方法によるＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の免疫沈降は、そのタンパク質に結合している物質の共免疫沈降を容易にする。結合している物質の同定は、これらに限定されないが、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ウエスタンブロッティング、及び質量分析法を含む、当技術分野で公知の多数の方法を使用して確立することができる。

【０１６０】

或いは、ファージディスプレイ法を使用して、候補物質又は複数の候補物質が、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質と相互作用又は結合するかどうかを決定することができる。ファージディスプレイとは、遺伝子バンクからの複数遺伝子をファージに組み込むことにより、タンパク質相互作用をスクリーニングする試験である。この方法では、組換えＤＮＡ技術を使用して、多数の遺伝子を、各遺伝子のペプチド産物又はタンパク質産物がウイルス粒子の表面に提示されるように、バクテリオファージの外殻タンパク質との融合物として発現させる。ファージディスプレイされた所望のペプチド産物又はタンパク質産物の全ライブラリーを、このようにして生成することができる。その後、ファージディスプレイされたペプチド産物又はタンパク質産物のその結果生じたライブラリーを、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質に対する結合能についてスクリーニングすることができる。相互作用するファージから抽出されたＤＮＡは、相互作用するタンパク質の配列を含有する。

【０１６１】

或いは、アフィニティークロマトグラフィーを使用して、候補物質又は複数の候補物質が、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質と相互作用又は結合するかどうかを決定することができる。例えば、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質を支持体（セファロースなど）に固定化し、細胞溶解産物をカラムに通してもよい。その後、固定化されたＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質に結合したタンパク質をカラムから溶出し、例えば、Ｎ末端アミノ酸配列決定によって同定することができる。

【０１６２】

候補物質と、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質との相互作用又は結合が、前記タンパク質の活性を調節するかどうかを決定するための方法は、刺激後にマスト細胞活性化の程度を測定することによって決定することができる。例えば、候補物質を投与したマスト細胞の活性化レベルを測定し、候補物質を投与しなかったマスト細胞の活性化レベルと比較することができる。

【０１６３】

候補物質のマスト細胞への取り込みは、自然拡散によって生じてもよく、又はこれらに限定されないが、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、１又は複数のウイルス性タンパク質形質導入ドメイン（ＰＴＤ、protein transduction domain）を有するタンパク質融合体、及び陽イオン性脂質送達を含む、当技術分野で公知な種々の方法によって誘導されてもよい。或いは、候補物質の産生は、例えば、候補物質をコードする遺伝子を含有するプラスミド発現ベクター又はウイルスをマスト細胞に導入することにより、マスト細胞内で誘導されてもよい。細胞をプラスミドで形質移入する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、リン酸カルシウム共沈、ＤＥＡＥデキストラン促進形質移入、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、及び陽イオン性リポソームが含まれる。

【０１６４】

その後、マスト細胞活性化は、種々の方法によって、例えば、ＩｇＥと共にインキュベーションし、その後ＤＮＰ／アルブミンと架橋させることによって誘導されてもよい。種々の他のＩｇＥ非依存性マスト細胞活性化トリガーも使用することができ、例えば、活性化はＦｃγＲ、トール様受容体（ＴＬＲ、Toll-like receptor）を介して誘導されてもよ

く、又はイオノマイシン（ionomycyin）の投与によって誘導されてもよい。

【０１６５】

候補物質を投与されたマスト細胞又は投与されていないマスト細胞の活性化レベルの測定及び比較は、当技術分野で公知の方法によって達成することができる。マスト細胞活性化のレベルは、活性化マスト細胞の脱顆粒時に放出される因子、例えば、ヒスタミン、トリプターゼ、セリンプロテアーゼトリプターゼ、β－ヘキソサミニダーゼ、ヘパリン、コンドロイチン硫酸Ｅ、プロスタグランジンＤ２、ロイコトリエンＢ４及びＣ４、血小板活性化因子、又はＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ、ＣＣＬ２、ＣＣＬ３、及びＣＣＬ５を含むサイトカイン放出を検出する標準的アッセイによって測定することができる。或いは、マスト細胞活性化の程度は、例えば、フローサイトメトリー法又は免疫細胞化学法によって、マスト細胞活性化の特異的マーカーの発現における変化で測定することができる。マスト細胞は、そのような技術を使用して、マスト細胞により発現されることが当技術分野で知られている種々の表面受容体の発現により同定することができ、それらには、ＣＤ９、ＣＤ２９、ＣＤ３３、ＣＤ４３、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４６、ＣＤ５１、ＣＤ５４、ＣＤ５５、ＣＤ５８、ＣＤ５９、ＣＤ６１、及びＣＤ１１７、ＣＤ４７、ＣＤ４８、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ５３、ＣＤ６０、ＣＤ６３、ＣＤ８１、ＣＤ８２、ＣＤ８４、ＣＤ８７、ＣＤ９２、ＣＤ９７、ＣＤ９８、及びＣＤ９９、ＣＤ１４７、ＣＤ１４９、ＣＤ１５１、及びＣＤ１５７が含まれるが、これらに限定されない。例えば、そのようにして特定されたマスト細胞の活性化レベルは、マスト細胞活性化マーカー、例えばＣＤ１０７Ａ（ＬＡＭＰ－１）、ＣＤ１０７Ｂ（ＬＡＭＰ－２）、トリプターゼ、及びＰＧＤ２の発現によって測定することができる。

【０１６６】

上述の方法は、本明細書中に記述されている本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質（ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１など）と相互作用可能か、又はその活性を調節可能な物質を同定するために使用できる方法の例示的なタイプにすぎないことが認識されよう。他の好適な方法は、当業者に公知であり、本発明の範囲内であろう。

【０１６７】

上述の方法を使用して、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメインのアゴニストである物質を同定することができる。アゴニストである物質は、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の生物活性の１又は複数を増強する。或いは、上述の方法は、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質のアンタゴニストである物質を同定することができる。アンタゴニストである物質は、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の生物活性の１又は複数を妨害する。

【０１６８】

ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１などのＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質活性の潜在的調節因子は、当業者に公知の多数の技術により上記の方法によって、スクリーニング用に産生されてもよい。例えば、Ｘ線結晶法及び核磁気共鳴法などの方法を使用して、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の構造をモデリングしてもよく、したがって、コンピューターに基づくモデリングを使用した潜在的な調節物質の設計が容易になる。種々の形態のコンビナトリアルケミストリーも、推定調節因子を産生するために使用することができる。

【０１６９】

抗体は、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質のアゴニストとして作用してもよく、又はアンタゴニストとして作用してもよい。好ましくは、好適な抗体は、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質ポリペプチドの別々の領域又は断片から調製される。抗原性ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有ポリペプチドは、少なくとも約５個のアミノ酸、好ましくは少なくとも約１０個のアミノ酸を含有する。

【０１７０】

当業者であれば、好適な抗体の産生方法を容易に理解するであろう。例えば、本発明の

ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドに特異的モノクローナル抗体は、典型的にはＦａｂ部分を含有しており、Antibodies-A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1988)に記述されているハイブリドーマ技術を使用して調製することができる。

【０１７１】

基本的には、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドに対するモノクローナル抗体の調製には、連続した細胞系の培養によって抗体分子の産生がもたらされる任意の技術を使用することができる。これらには、Kohler et al., Nature, 256:495-497 (1975)によって最初に開発されたハイブリドーマ技術だけでなく、トリオーマ技術、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor et al., Immunology Today, 4:72 (1983)）、及びヒトモノクローナル抗体を産生するＥＢＶハイブリドーマ技術（Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., (1985)）が含まれる。不死の抗体産生細胞系は、発癌性ＤＮＡを用いたＢリンパ球の直接的形質転換、又はエプスタイン－バーウイルスを用いた形質移入などの、融合以外の技術によって生成することができる。例えば、M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques" Cold Spring Harbor Laboratory, (1980)；Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas" Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam (1981)；Kennett et al., "Monoclonal Antibodies", Plenum Press (1980)を参照されたい。

【０１７２】

要約すると、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、骨髄腫、又は他の永続可能な細胞系統を産生する手段は、その認識因子結合部分、認識因子、又はその由来特異的なＤＮＡ結合部分で過剰免疫された哺乳動物の脾臓から得られるリンパ球と融合される。本発明の実施に有用なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、提示認識因子と免疫反応するそれらの能力、及び標的細胞の特定の転写活性を阻害するそれらの能力によって同定される。

【０１７３】

本発明の実施に有用なモノクローナル抗体は、適切な抗原特異性を持つ抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培地を含むモノクローナルハイブリドーマ培養を開始することにより産生することができる。培養は、ハイブリドーマが抗体分子を培地に分泌する条件下で十分な期間、維持される。その後、抗体含有培地を収集する。その後、周知の技術によって抗体分子をさらに単離することができる。

【０１７４】

同様に、ポリクローナル抗体の産生に使用することができる、当技術分野において公知な種々の手順が存在する。ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１などの本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又は本発明のペプチドに対するポリクローナル抗体を産生する場合は、これらに限定されないが、ウサギ、ニワトリ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどを含む種々の宿主動物を、このタンパク質の注射によって免疫することができる。さらに、ポリペプチド又はその断片若しくは類似体は、免疫原性担体、例えばウシ血清アルブミン（ＢＳＡ、bovine serum albumin）、キーホールリンペットヘモシニアン（ＫＬＨ、keyhole limpet hemocyanin）にコンジュゲートすることができる。また、種々のアジュバントを使用して免疫学的応答を増加させることができ、それらには、フロインド（完全及び不完全）、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、リゾレシチン（rysolecithin）などの界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシニアン、ジニトロフェノール、及びＢＣＧ（カルメット・ゲラン桿菌、bacille Calmette-Guerin）、及びコリネバクテリウム・パルブム（Corynebacterium parvum）などの潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれるが、これらに限定されない。

【０１７５】

所望の抗体のスクリーニングも、当技術分野で公知である種々の技術によって達成することができる。抗体の免疫特異的結合のアッセイには、これらに限定されないが、ラジオ

イムノアッセイ、ＥＬＩＳＡ（酵素結合抗体免疫吸着測定法、enzyme-linked immunosorbent assay）、サンドイ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、ウエスタンブロット、沈降反応、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、及び免疫電気泳動アッセイなどが含まれる（例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1, John Wiley & Sons, Inc., New York(1994)を参照）。抗体結合は、一次抗体上の検出可能な標識によって検出することができる。或いは、抗体は、適切に標識化された二次抗体又は試薬とそれが結合することによって検出することができる。イムノアッセイにおいて結合を検出するための種々の方法は、当技術分野で公知であり、本発明の範囲に含まれる。

【０１７６】

本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質又はペプチドに対して産生された抗体（又はその断片）は、そのタンパク質に対する結合親和性を有する。好ましくは、抗体（又はその断片）は、約$10^5 M^{-1}$を超える、より好ましくは約$10^6 M^{-1}$を超える、より好ましくはさらに約$10^7 M^{-1}$を超える、最も好ましくは約$10^8 M^{-1}$を超える結合親和性又は結合活性を有する。

【０１７７】

本発明による好適量の抗体を取得するという観点では、無血清培地を用いたバッチ発酵を使用して抗体（複数可）を製造してもよい。発酵させた後、クロマトグラフィーステップ及びウイルス不活化／除去ステップが組み込まれている多段階手順によって、抗体を精製することができる。例えば、プロテインＡアフィニティークロマトグラフィーによって抗体をまず分離し、その後、溶媒／界面活性剤で処理して、あらゆる脂質エンベロープウイルスを不活化することができる。典型的には陰イオン及び陽イオン交換クロマトグラフィーによる、さらなる精製を使用して、残留タンパク質、溶媒／界面活性剤、及び核酸を除去することができる。精製された抗体を、ゲルろ過カラムを使用してさらに精製し、０．９％生理食塩水中に配合してもよい。その後、配合されたバルク調製物を滅菌し、ウイルスろ過し、分注してもよい。

【０１７８】

過敏症素因の診断

さらなる態様では、本発明は、対象の過敏症関連疾患又は障害の発症素因を診断する方法に関する。この方法は、対象に由来する核酸試料を取得するステップと、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードする核酸中の少なくとも１つの突然変異の存在又は非存在について核酸サンプルを分析するステップとを含む。好ましくは、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質は、ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１である。

【０１７９】

本発明の方法によって診断することができる過敏症関連疾患又は障害には、これらに限定されないが、アナフィラキシー、薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、並びに気道炎症を伴う呼吸器疾患及び呼吸器障害が含まれる。

【０１８０】

気道炎症を伴う呼吸器疾患には、これらに限定されないが、ぜん息、アレルギー性ぜん息、内因性ぜん息、職業性ぜん息、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、及び慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）が含まれていてもよい。

【０１８１】

診断用の核酸は、これらに限定されないが、血液、尿、唾液、組織生検、及び剖検材料を含む対象の種々の供給源に由来する細胞から取得することができる。核酸の配列変異を同定するために、種々の技術が使用されている。例えば、高分解能メルティング法（Hi-Res Melting）、均一な突然変異走査及び遺伝子型決定のためのポストＰＣＲ技術（Hi-Res LightScanner）、核酸配列の突然変異又は変更によって生成された制限部位を検出する

制限断片長多型（ＲＦＬＰ、Restriction Fragment Length Polymorphism）分析（Kan et al., Lancet 2(8096):910, (1978)を参照）、電気泳動ゲルのバンドの移動度の変化によってヌクレオチド配列の違いを同定する変性勾配ゲル電気泳動法及び一本鎖ＤＮＡ電気泳動度研究（Myers et al., Nature 313:495, (1985)；Orita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766, (1989)を参照）、ヘテロ二本鎖ＤＮＡの不一致部位を同定する化学切断分析（Cotton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397, (1988)を参照）、及びＲＮＡ－ＤＮＡ又はＲＮＡ－ＲＮＡヘテロ二本鎖の不一致部位を同定するＲＮａｓｅ切断分析（Myers et al., Science 230:1242, (1985)；Maniatisら、米国特許第４，９４６，７７３号明細書を参照）。

【０１８２】

突然変異は、当技術分野で公知の種々の技術を使用して、ＤＮＡレベルで検出することができる。ゲノムＤＮＡを検出に直接使用してもよく、又は分析に先立ってポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ、polymerase chain reaction）（Saiki et al., Nature 324:163-166 (1986)）を使用して酵素的に増幅してもよい。ＲＮＡ又はｃＤＮＡも、この目的に使用することができる。一例として、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードする核酸に相補的なＰＣＲプライマーを使用して、突然変異を同定及び分析することができる。例えば、野生型遺伝子型のサイズと比較した増幅産物のサイズの違いによって、欠失及び挿入を検出してもよい。増幅されたＤＮＡを、ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質をコードする放射性標識ＲＮＡと、又は代替的には、放射性標識アンチセンスＤＮＡ配列とハイブリダイズさせることにより、点突然変異を同定してもよい。ＲＮａｓｅＡ消化又は融解温度の違いによって、完全一致配列と不一致二本鎖を区別することができる。

【０１８３】

変性剤を有するゲル又は変性剤を有しないゲルにおける、核酸断片又はタンパク質の電気泳動移動度の変化によっても、突然変異を検出することができる。小さな配列欠失及び挿入は、高分解能ゲル電気泳動法によって視覚化することができる。異なる配列の核酸断片は、異なる断片の移動度が、それらの特異的な融解温度又は部分的融解温度に従ってゲルの異なる位置に遅れて移動する変性ホルムアミド勾配ゲルで区別することができる（例えば、Myers et al., Science 230:1242 (1985)を参照）。

【０１８４】

特定位置における配列変化は、ＲＮａｓｅ及びＳ１保護又は化学切断法などのヌクレアーゼ保護アッセイによっても明らかにすることができる（例えば、Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85:4397-4401 (1985)を参照）。

【０１８５】

したがって、特定のＤＮＡ塩基配列の検出は、ハイブリダイゼーション、ＲＮａｓｅ保護、化学切断、直接ＤＮＡ配列決定、又は制限酵素の使用（例えば、制限断片長多型（ＲＦＬＰ））などの方法、及びゲノムＤＮＡのサザンブロッティングによって達成されてもよい。より従来的なゲル電気泳動及びＤＮＡ配列決定に加えて、インサイチュ分析によっても突然変異を検出することができる。

【０１８６】

本発明によると、対象から核酸試料を取得するための手段と、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の活性を調節する少なくとも１つの突然変異の存在又は非存在について、核酸試料を分析するための手段とを含有するキットを準備することができる。

【０１８７】

そのようなキットを使用して、例えば、対象のアレルギー性疾患又は状態の発症素因を診断することができる。本発明のキットは、対象の細胞から核酸試料を取得するための１又は複数の手段を含む。細胞は、これらに限定されないが、血液、尿、唾液、組織生検、及び剖検材料を含む対象の種々の供給源に由来していてよい。それに加えて、本発明のキットは、本発明のＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質（ＮＥＤＤ９又はＰＨＬ

ＤＡ１）の活性を調節する少なくとも１つの突然変異の存在又は非存在について、核酸試料を分析するための手段を含む。そのような突然変異の例には、これらに限定されないが、１又は複数のヌクレオチドの欠失、挿入、転座、逆位、及び塩基置換が含まれる。

【０１８８】

本発明によるキットは、緩衝液及び／又は希釈剤などの、本発明の方法を実施するために必要な他の構成要素も含むことができる。キットは、典型的には、本発明の方法の種々の構成要素及びキット構成要素を使用するための説明書を収容するための容器を含む。

【０１８９】

組成物及び投与経路

本発明は、ＮＥＤＤ９又はＰＨＬＤＡ１などのＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質、本発明のペプチド、異なるＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の混合物、ペプチドの混合物、並びにＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質及びペプチドの組合せを含む組成物の使用を企図する。組成物は、薬学的に許容される担体、アジュバント、及び／又は希釈剤を含む医薬組成物に含まれていてもよい。それに加えて又は代替的に、本発明の組成物は、免疫抑制剤、例えば抗炎症化合物又は気管支拡張性化合物を含んでもよい。

【０１９０】

他の実施形態では、免疫抑制剤は、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、メトトレキサート、クロモグリカレート（chromoglycalate）、テオフィリン、ロイコトリエンアンタゴニスト、及び抗ヒスタミン剤、又はそれらの組合せであってもよい。

【０１９１】

また、免疫抑制剤は、免疫抑制剤薬、或いはＢリンパ球若しくはＴリンパ球又はそれらの活性化を媒介する表面受容体に対する特異的抗体であってもよい。例えば、免疫抑制薬は、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、ミコフェノール酸モフェチル、メトトレキサート、クロモグリカレート、テオフィリン、ロイコトリエンアンタゴニスト、及び抗ヒスタミン剤、又はそれらの組合せであってもよい。

【０１９２】

それに加えて、本発明に従って使用するための医薬組成物は、コルチコステロイドなどのステロイドをさらにまた含んでいてもよい。

【０１９３】

別の実施形態では、組成物はステロイドをさらに含む。

【０１９４】

本発明は、有効量の組成物を投与するステップを含む、対象の過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防するための方法にも関する。

【０１９５】

本発明のさらなる実施形態は、過敏性疾患又は過敏性障害の治療用薬剤を製造するための、Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又はプレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインの少なくとも１つを含むタンパク質の使用を提供する。好ましくは、タンパク質は、ＮＥＤＤ９又はその断片若しくは変異体である。好ましくは、タンパク質は、ＰＨＬＤＡ１又はその断片若しくは変異体である。

【０１９６】

本明細書中では、過敏性疾患又は過敏性障害の治療用薬剤を製造するための、

（ｉ）Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は

（ii）プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン

の少なくとも一部分に対応するアミノ酸配列を含むペプチドの使用も記述されている。好ましくは、ペプチドは、配列番号７、配列番号８、配列番号１０、配列番号１１、配列番号１２、並びにそれらの変異体及び断片からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１９７】

１つの実施形態では、ペプチドは、配列番号１４～２７３に示されているアミノ酸を含む。

【０１９８】

別の実施形態では、ペプチドは、配列番号２７４～４８８のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む。

【０１９９】

組成物は標準的な経路で投与することができる。一般的に、組成物は、非経口（例えば、静脈内、脊髄内、皮下、又は筋肉内）で投与することができる。より好ましくは、組成物は、局所的、経口的、又は鼻腔内に投与することができる。投与は、全身的、領域的、又は局所的であってよい。任意の所与の時点で使用される特定の投与経路は、治療する状態の性質、状態の重症度及び範囲、送達する特定の組成物の必要用量、並びに組成物の潜在的な副作用を含む多くの要素に依存するであろう。

【０２００】

担体、希釈剤、及びアジュバントは、組成物の他の成分と適合性を持ち、その受容個体に有害でないという点で、「許容される」ものでなければならない薬学的に許容される担体又は希釈剤の例は、脱塩水又は蒸留水；食塩水；ピーナッツ油、サフラワー油、オリーブ油、綿実油、トウモロコシ油、ピーナッツ油などの胡麻油、サフラワー油、オリーブ油、綿実油、トウモロコシ油、胡麻油、ラッカセイ油、又はヤシ油などの植物性油；メチルポリシロキサン、フェニルポリシロキサン、及びメチルフェニルポリソルポキサン（methylphenyl polysolpoxane）などのポリシロキサンを含むシリコン油；揮発性シリコン；流動パラフィン、軟パラフィン、又はスクアランなどの鉱油；メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、又はヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース誘導体；低級アルカノール、例えばエタノール又はイソプロパノール；低級アラルカノール（aralkanol）；低級ポリアルキレングリコール又は低級アルキレングリコール、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、１，３－ブチレングリコール、又はグリセリン；イソプロピルパルミタート、イソプロピルミリステート、又はオレイン酸エチルなどの脂肪酸エステル；ポリビニルピロリドン；寒天；トラガカントゴム又はアラビアゴム、及びワセリンである。典型的には、担体（１又は複数）は、組成物の１０重量％から９９．９重量％までを形成するであろう。

【０２０１】

本発明の組成物は、注射による投与に好適な形態で、経口摂取に好適な製剤（例えば、カプセル剤、錠剤、カプレット剤、エリキシル剤など）の形態で、局所投与に好適な軟膏剤、クリーム剤、又はローション剤の形態で、点眼薬として送達するのに好適な形態で、鼻腔内吸入又は経口吸入などによる吸入による投与に好適なエアロゾル形態で、非経口投与、すなわち皮下注射、筋肉内注射、又は静脈注射に好適な形態であってもよい。

【０２０２】

注射剤又は懸濁剤としての投与の場合、無毒な非経口的に許容される希釈剤又は担体には、リンゲル液、等張性生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、エタノール、及び１，２プロピレングリコールが含まれ得る。

【０２０３】

経口的使用に好適な担体、希釈剤、賦形剤、及びアジュバントのいくつかの例には、ピーナッツ油、流動パラフィン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム、トラガカントゴム、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、ゼラチン、及びレシチンが含まれる。加えて、これらの経口製剤は、好適な香味料及び着色料を含有していてもよい。カプセル形態で使用される場合、カプセル剤は、崩壊を遅らせるモノステアリン酸グリセリン又はステアリン酸グリセリルなどの化合物でコーティングされていてもよい。

【０２０４】

アジュバントには、典型的には、皮膚軟化薬、エマルジョン、増粘剤、保存剤、殺菌剤

、及び緩衝剤が含まれる。

【０２０５】

経口投与用の固体形態は、ヒト及び獣医学的薬務において許容される結合剤、甘味料、崩壊剤、希釈剤、香味料、コーティング剤、保存剤、潤滑剤、及び／又は時間遅延剤を含有していてもよい。好適な結合剤には、アラビアゴム、ゼラチン、コーンスターチ、トラガカントゴム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、又はポリエチレングリコールが含まれる。好適な甘味料には、スクロース、ラクトース、グルコース、アスパルテーム、又はサッカリンが含まれる。好適な崩壊剤には、コーンスターチ、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、グアーガム、キサンタンガム、ベントナイト、アルギン酸、又は寒天が含まれる。好適な希釈剤には、ラクトース、ソルビトール、マンニトール、デキストロース、カオリン、セルロース、炭酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、又はリン酸二カルシウムが含まれる。好適な香味料には、ハッカ油、ウィンターグリーン油、サクランボ香味料、オレンジ香味料、又はラズベリー香味料が含まれる。好適なコーティング剤には、アクリル酸及び／又はメタクリル酸及び／又はそれらのエステルのポリマー又はコポリマー、ワックス、脂肪アルコール、ゼイン、セラック、又はグルテンが含まれる。好適な保存剤には、安息香酸ナトリウム、ビタミンＥ、アルファトコフェロール、アスコルビン酸、メチルパラベン、プロピルパラベン、又は亜硫酸水素ナトリウムが含まれる。好適な潤滑剤には、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、オレイン酸ナトリウム、塩化ナトリウム、又はタルクが含まれる。好適な時間遅延剤には、モノステアリン酸グリセリン又はジステアリン酸グリセリルが含まれる。

【０２０６】

経口投与用の液体形態は、上記の物質に加えて、液体担体を含有していてもよい。好適な液体担体には、水、オリーブ油、ピーナッツ油、胡麻油、サンフラワー油、サフラワー油、ラッカセイ油、ヤシ油などの油類、流動パラフィン、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、グリセロール、脂肪アルコール、トリグリセリド、又はそれらの混合物が含まれる。

【０２０７】

経口投与用の懸濁剤は、分散剤及び／又は懸濁化剤をさらに含んでいてもよい。好適な懸濁化剤には、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム、又はアセチルアルコールが含まれる。好適な分散剤には、レシチン、ステアリン酸などの脂肪酸のポリオキシエチレンエステル、ポリオキシエチレンソルビトールモノ若しくはジオレアート、－ステアレート、又は－ラウレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノ若しくはジオレアート、－ステアレート、又は－ラウレートなどが含まれる。

【０２０８】

経口投与用のエマルジョンは、１又は複数のエマルジョンをさらに含んでいてもよい。好適なエマルジョンには、上記で例示したような分散剤、又はグアーガム、アラビアゴム、若しくはトラガカントゴムなどの天然ゴムが含まれる。

【０２０９】

非経口的に投与可能な組成物を調製する方法は、当業者であれば明白であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa.に詳細に記述されており、これによって参照により本明細書中に組み込まれる。

【０２１０】

本発明の局所製剤は、活性成分と一緒に、１又は複数の許容される担体を含み、任意の他の治療成分を含んでいてもよい。局所投与に好適な製剤には、リニメント剤、ローション剤、クリーム剤、軟膏剤、又はペースト剤などの、治療が必要な部位に皮膚を介して浸透するのに好適な液体又は半液体製剤、及び目、耳、又は鼻への投与に好適な液滴剤が含まれる。

【０２１１】

本発明による液滴剤は、無菌の水性又は油性の溶液又は懸濁液を含んでいてもよい。こ

れらは、殺菌剤及び／又は殺真菌剤及び／又は任意の他の好適な保存剤の水溶液に活性成分を溶解させることにより調製することができ、界面活性剤を含んでいてもよい。その後、その結果生じた溶液をろ過により清澄化し、好適な容器に移し、滅菌してもよい。滅菌は、オートクレーブするか、若しくは３０分間９０℃～１００℃を維持するか、又はろ過して、その後無菌技術で容器に移すことにより達成することができる。液滴剤に含有させるのに好適な殺菌剤及び殺真菌剤の例には、硝酸フェニル水銀又は酢酸フェニル水銀（０．００２％）、塩化ベンザルコニウム（０．０１％）、及び酢酸クロルヘキシジン（０．０１％）である。油性溶液を調製するのに好適な溶媒には、グリセロール、希釈アルコール、及びプロピレングリコールが含まれる。

【０２１２】

本発明によるローション剤には、皮膚又は目に塗布するのに好適なものが含まれる。点眼薬は、殺菌剤を含有していてもよい無菌水溶液を含み、液滴剤の調製に関して上述したものに類似した方法によって調製することができる。皮膚に塗布するためのローション剤又はリニメント剤には、アルコール又はアセトンなどの、皮膚の乾燥を促進させ皮膚を冷却する物質、及び／又はグリセロールなどのモイスチャライザー、又はヒマシ油若しくはラッカセイ油などの油も含まれていてよい。

【０２１３】

本発明によるクリーム剤、軟膏剤、又はペースト剤は、外部塗布用の活性成分の半固形製剤である。それらは、グリース状又は非グリース状の主成分と共に、細かく分割されているか又は粉末形態の活性成分を、単独で、又は水性若しくは非水性液体の溶液若しくは懸濁液中で、混合することにより作製することができる。主成分は、硬質パラフィン、軟質パラフィン、又は流動パラフィンなどの炭化水素、グリセロール、蜜ろう、金属せっけん；粘液；アーモンド油、トウモロコシ油、ラッカセイ油、ヒマシ油、又はオリーブ油などの天然由来の油、羊毛脂若しくはその誘導体、又はプロピレングリコール若しくはマクロゴールなどのアルコールと一緒にステアリン酸若しくはオレイン酸などの脂肪酸を含んでいてもよい。

【０２１４】

組成物は、陰イオン性、陽イオン性、又はソルビタンエステル又はそのポリオキシエチレン誘導体などの非イオン性界面活性剤などの任意の好適な界面活性剤を組み込んでいてもよい。天然ゴム、セルロース誘導体、又はケイ素シリカ（silicaceous silica）などの無機物質などの懸濁化剤、及びラノリンなどの他の成分も含まれていてよい。

【０２１５】

組成物は、リポソームの形態でも投与することができる。リポソームは、一般的に、リン脂質又は他の脂肪物質に由来しており、水性媒質中で分散する単層状又は多層状の水和液晶により形成される。無毒であり、生理学上許容され、代謝可能であり、リポソームを形成可能であれば、任意の脂質を使用することができる。リポソーム形態の組成物は、安定剤、保存剤、及び賦形剤などを含有していてもよい。好ましい脂質は、リン脂質及びホスファチジルコリン（レシチン）であり、天然でも合成でもよい。リポソームを形成する方法は、当技術分野で公知であり、この特定の場合に関しては、Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p.33 et seq.が参照され、その内容は参照により本明細書中に組み込まれる。

【０２１６】

用量

本発明の方法による使用に好適な組成物は、治療的又は予防的どちらの組成物として投与されてもよい。治療的応用では、組成物を、既に疾患又は状態に苦しんでいる疾患に、その疾患又は状態及びその合併症を治癒するか又は少なくとも部分的に阻止するのに十分な量で投与する。組成物は、効果的に患者を治療するのに十分な量の物質を提供するべきである。

【０２１７】

任意の特定患者の治療有効量のレベルは、治療する障害及び障害の重症度；使用する化

合物又は物質の活性；使用する組成物；患者の年齢、体重、一般的健康、性別、及び食事；投与の時間；投与経路；物質又は化合物の排出速度；治療期間；治療と組み合わせて又は同時に使用する薬物、それに加えて医学で周知されている他の関連要因を含む種々の要因に依存するであろう。

【０２１８】

当業者であれば、日常的な実験作業によって、適用可能な疾患の治療に必要とされるであろう有効で無毒な量の物質又は化合物を決定することができるであろう。

【０２１９】

一般的に、有効量は、２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり０．０００１ｍｇ～約１０００ｍｇ；典型的には、２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約０．００１ｍｇ～約７５０ｍｇ；２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約０．０１ｍｇ～約５００ｍｇ；２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約０．１ｍｇ～約５００ｍｇ；２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約０．１ｍｇ～約２５０ｍｇ；２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約１．０ｍｇ～約２５０ｍｇの範囲にあると予測される。より典型的には、有効量は、２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約１．０ｍｇ～約２００ｍｇ；２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約１．０ｍｇ～約１００ｍｇ；２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約１．０ｍｇ～約５０ｍｇ；２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約１．０ｍｇ～約２５ｍｇ；２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約５．０ｍｇ～約５０ｍｇ；２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約５．０ｍｇ～約２０ｍｇ；２４時間ごとに体重１ｋｇ当たり約５．０ｍｇ～約１５ｍｇの範囲にあると予測される。

【０２２０】

或いは、有効用量は、約５００ｍｇ／ｍ^{2}までであってもよい。一般的に、有効用量は、約２５～約５００ｍｇ／ｍ^2、好ましくは約２５～約３５０ｍｇ／ｍ^2、より好ましくは約２５～約３００ｍｇ／ｍ^2、さらにより好ましくは約２５～約２５０ｍｇ／ｍ^2、なおより好ましくは約５０～約２５０ｍｇ／ｍ^2、さらになお好ましくは約７５～約１５０ｍｇ／ｍ^{2}の範囲にあると予測される。

【０２２１】

典型的には、治療的応用では、治療は、疾患状態又は状態のある間に行われるだろう。さらに、当業者であれば、個々の投与の最適量及び間隔は、治療する病状又は状態の性質及び程度、投与の形態、経路、及び部位、並びに治療する特定個体の性質によって決定されることになるのは明白であろう。また、そのような最適条件は、従来技術によって決定することができる。

【０２２２】

当業者であれば、所定の日数の間１日当たりに与えられる組成物の投与数などの、最適な治療コースは、従来の治療コースを決定する検査を使用して当業者が確認できることも明白であろう。

【０２２３】

これから具体的な例との関連で本発明を記述するが、それらは、いかなる点においても本発明の範囲を制限すると解釈されるべきでない。

［実施例］

【実施例１】

【０２２４】

マスト細胞活性化に関与する推定ＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質の同定

コンピューターに基づく手法を使用して、細胞内シグナル伝達産物をコードする、活性化マスト細胞中の新規遺伝子を同定した。これは、休止骨髄由来ヒトマスト細胞及び活性化骨髄由来ヒトマスト細胞から得られた遺伝子発現データを、ＳＨ２ドメイン及び／又はＳＨ３ドメイン及び／又はＰＨドメインをコードする遺伝子についてスクリーニングすることにより達成された。

【０２２５】

Liu et al（J Allergy Clin Immunol 118:496-503, (2006)）に記述されているように骨髄由来マスト細胞（ＢＭＭＣ、Bone marrow derived mast cell）を産生し、休止ＢＭＭ

Ｃ及びＩｇＥ架橋刺激ＢＭＭＣからｍＲＮＡを単離し、Lui et al（J Allergy Clin Immunol 118:496- 503, (2006)）に説明されているアフィメトリックス標準プロトコールに従って、遺伝子発現アレイを実施した。

【０２２６】

遺伝子配列走査用のＬＩＮＵＸベースのプラットフォームを使用してドメイン配列探索を実施し、ＢＭＭＣにより発現されたＳＨ２／ＳＨ３／ＰＨドメイン含有タンパク質を同定した。マスト細胞で発現することが見出されたほぼ１５０００個のアフィメトリックスプローブのうち、２０７個の遺伝子が、ＳＨ２ドメイン、ＳＨ３ドメイン、及び／又はＰＨドメインを有するタンパク質をコードしており、それらの２３個（１１％）は、ＦｃεＲ１架橋時に上方制御又は下方制御されるかのいずれかであることが見出された。

【０２２７】

マスト細胞ＩｇＥシグナル伝達経路のメンバーとしてこれまでに同定されていない分子をコードする多数の遺伝子を、それらの既報の遺伝子配列特徴及び他の細胞タイプにおける生物学的機能に基づき、マスト細胞活性化プロセスに役割を果たしている可能性があるとみなした。それらの中でも、ＮＥＤＤ９（神経前駆細胞で発現される発生的に下方制御された遺伝子９）及びＰＨＬＤＡ１を選択して、それらの構造的特徴及び生物活性の基盤をさらに研究した。

【実施例２】

【０２２８】

マスト細胞活性化におけるＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１の役割

（ｉ）ＮＥＤＤ９、シグナル伝達に関与する高度に選択的なドッキングタンパク質

ヒトＮＥＤＤ９遺伝子（神経前駆細胞で発現される発生的に下方制御された遺伝子９）（ＧｅｎＢａｎｋ　ＩＤ：ＮＭ＿００６４０３．２及びＮＭ＿１８２９６６．２、Ｅｎｓｅｍｂｌ　ＩＤ：ＥＮＳＧ００００００１１１８５９、Ｅｎｔｒｅｚ　ｇｅｎｅ　ＩＤ　４７３９、及びＵｎｉｐｒｏｔ　ＩＤ　Ｑ１４５１１）は、ＣａｓＬ（Ｃｒｋ関連基質リンパ球タイプ）及びＨＥＦ１（ヒト線維化エンハンサー１）としても知れており、８３４個のアミノ酸の未プロセシング前駆体タンパク質の発現をコードする。ＮＥＤＤ９は、ＳＨ３ドメイン、及びＳＨ２結合部位の豊富なドメインを含有する。

【０２２９】

ＮＥＤＤ９アイソフォーム１は、ＵｎｉＰｒｏｔ識別番号Ｑ１４５１１を有しており、アイソフォームＣＲＡ＿ｂ（ＵｎｉＰｒｏｔ識別番号Ｑ５Ｔ９Ｒ４）と同一である。ＮＥＤＤ９アイソフォーム１は、１０～６４位にＳＨ３ドメイン、６３３～６５６位にＣＣモチーフ、９２位、１６６位、１７７位、及び１８９位に３つのリン酸化部位、及び３６３位に切断部位を有する。

【０２３０】

アイソフォームＣＲＡ＿ａ（ＵｎｉＰｒｏｔ認識番号Ｑ５Ｔ９Ｒ４）も、２、３、及び４位の配列がアイソフォーム１と異なる８３４個のアミノ酸のタンパク質である。このアイソフォームは、Ｃａｓファミリーに属しており、ファミリーメンバーのすべてがそうであるように、アイソフォーム１（Ｑ１４５１１）であるＲＥＦＳＥＱ受託番号ＮＭ＿００６４０３．２により定義された配列の残基７～６６に対応する６０個のアミノ酸を含むＮ末端ＳＨ３ドメインを特色とする。このアイソフォームは、複数の潜在的ＳＨ２結合部位を組み込んでいる中央ドメイン、及び多様なヘリックス－ループ－ヘリックス（ＨＬＨ、helix-loop-helix）モチーフを有するＣ末端ドメインも含有している。ＳＨ２結合部位は、ＣＲＫ、ＮＣＫ、及びＡＢＬ　ＳＨ２ドメインに結合すると推定される。ＨＬＨモチーフは、ＨＬＨタンパク質ＩＤ２、Ｅ１２、及びＥ４７との特異的相互作用を付与する。細胞周期制御プロセシングから生じる翻訳後修飾により、４つのタンパク質：ｐ１１５、ｐ１０５、ｐ６５、及びｐ５５がアイソフォーム１から産生される。タンパク質アイソフォーム１　ｐ１１５は、アイソフォーム１　ｐ１０５リン酸化から生じ、後に細胞周期に出現する。アイソフォーム１　ｐ５５は、カスパーゼ切断関連部位での切断の結果としてアイソフォーム１　ｐ１０５から生じ、有糸分裂時に特異的に現れる。

【０２３１】
ヒトＮＥＤＤ９遺伝子の転写におけるスプライシングが変動することにより、タンパク質アイソフォーム２（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｑ５ＸＫＩ０）、アイソフォームＣＲＡ＿ｃ（ＲＥＦＳＥＱ：ＥＡＷ５５３０２．１）、及びアイソフォームＣＲＡ＿ｄ（ＲＥＦＳＥＱ：ＥＡＷ５５３０３．１）が生じる場合がある。ＨＥＦ１タンパク質アイソフォームＣＲＡ＿ｃは、８００個のアミノ酸を含み、アイソフォーム１及びＣＲＡ＿ａに類似しており、中央のＳＨ２モチーフ豊富なドメインにある少数の潜在的リガンドモチーフが欠損していることで異なっている。ＣＲＡ＿ｄの転写物は、Ｎ末端ＳＨ３ドメインを欠如している６８８個のアミノ酸のタンパク質をコードする。対照的に、アイソフォーム２は、ＨＥＦ１アイソフォーム１のＮ末端残基１～１５４と同一であり、本質的にＳＨ３ドメイン及び徹底的に縮小されたＳＨ２リガンドドメインにすぎない１７４個のアミノ酸のタンパク質にすぎない。追加のヒトＮＥＤＤ９コードタンパク質変異体は、ＵｎｉＰｒｏｔデータベースに列挙されており、本質的にアイソフォーム２よりわずかに小さな型である、Ｐｒｏ１４８残基の後で切断されたタンパク質（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｑ５ＴＩ５９）を含む。

【０２３２】
ＣＲＡ＿ｄアイソフォームは例外として、上記で言及されたＮＥＤＤ９アイソフォームの各々に、Ｎ末端ＳＨ３ドメインが存在している。

【０２３３】
ＮＥＤＤ９は、細胞内シグナルの伝達に関与する多機能ドッキングタンパク質であり、核、細胞質、並びにゴルジ及びラメリポディアなどの構造にある多種多様な組織で発現される。ＮＥＤＤ９のＳＨ３ドメイン（アミノ酸２～６４）及びコイルドコイルドメイン（アミノ酸６３３～６５６）により、細胞表面受容体の下流にある３つのシグナル伝達分子であるＬｃｋ、Ｌｙｎ、及びＦｙｎと高度に選択的に相互作用する可能性が付与される。他のタンパク質相互作用モチーフは、セリン豊富なドメイン（アミノ酸４００～５５８）及びヘリックス－ループ－ヘリックス（ＨＬＨ、helix-loop-helix）モチーフを含有する保存されたＣ末端ドメイン（アミノ酸７１０～７６０）である。ＮＥＤＤ９のＳＨ３折り畳みは、互いの直角に位置する２つの逆平行ベータシートで構成されている。折り畳み内には、ＲＴ及びｎ－Ｓｒｃループと呼ばれる２つの可変ループがある。ＳＨ３がそのリガンドに結合する際に、プロリン豊富なリガンドは、ポリ－Ｌ－プロリンII型ヘリックスコンフォメーションを取り、このＰＰIIヘリックス構造は、ヘリックスのターンに結合するＳＨ３ドメイン表面の１対の溝により認識される。ＳＨ３の溝は、一連のほとんど平行な良く保存された芳香族残基によって形成されている。

【０２３４】
ＮＥＤＤ９は、細胞シグナル伝達に関与するいくつかの細胞内タンパク質と相互作用することが特定されている。表１では、相互作用タンパク質、相互作用のタイプ、及び同定に使用された実験方法のタイプが記述されている。

【０２３５】

【表１】

表1

相互作用体の名称	実験のタイプ	タイプ
ABL	インビボ;インビトロ	直接
乳癌抗エストロゲン耐性 3	インビボ	直接
CRK	インビボ;インビトロ	直接
CRK 関連基質	インビボ;酵母ツーハイブリッド	直接
CRKL	インビボ;インビトロ	直接
カドヘリン 1	インビトロ	直接
CasL 相互作用分子	インビボ;インビトロ	直接
コリンアセチルトランスフェラーゼ	インビボ	直接
FAK	インビボ;インビトロ;酵母ツーハイブリッド	直接
DNA 結合阻害剤 2	インビボ;酵母ツーハイブリッド	直接
Itchy 相同体 E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ	インビボ;インビトロ;酵母ツーハイブリッド	直接
Lck	インビトロ	直接
Lyn	インビボ	直接
NCK1	インビボ;インビトロ	直接
PTK2B タンパク質チロシンキナーゼ 2 ベータ	インビボ	直接
パキシリン	インビボ	直接
タンパク質チロシンホスファターゼ非受容体タイプ 12	インビトロ	直接
SH2D3C	インビボ;インビトロ	直接
SHP2	インビボ;インビトロ	直接
SMAD、DPP に対するマザー相同体 2(mothers against DPP homolog 2)(ショウジョウバエ)	インビボ	直接
SMAD3	インビボ;インビトロ;酵母ツーハイブリッド	直接
Sma 及び Mad 関連タンパク質 1	インビボ;酵母ツーハイブリッド	直接
甲状腺ホルモン受容体相互作用体 6	酵母ツーハイブリッド	直接
転写因子 3	酵母ツーハイブリッド	直接
ザイキシン	インビボ;インビトロ;酵母ツーハイブリッド	直接
線維化エンハンサー1	インビボ;インビトロ;酵母ツーハイブリッド	直接
精巣上体精子結合タンパク質 1	酵母ツーハイブリッド	直接
HSA9761	酵母ツーハイブリッド	直接
Fyn	インビボ;インビトロ	直接
グアニンヌクレオチド放出因子 2	インビボ;インビトロ	直接

【０２３６】

（ｉｉ）ＰＨＬＤＡ１、細胞内シグナル伝達下流受容体の結合に関与する分子

ヒトＰＨＬＤＡ１遺伝子（Ｅｎｔｒｅｚ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ　２２８２２；プレクストリン相同性様ドメインファミリーＡメンバー１）は、ＴＤＡＧ５１（Ｔ細胞死関連遺伝子５１）としても知られており、５９１３個のヌクレオチド、ＮＣＢＩ　ＲＥＦＳＥＱ受入番号ＮＭ＿００７３５０の転写物の発現をコードし、ｃＤＮＡ配列は、４０１個（ＲＥＦＳ

ＥＱ：ＮＰ＿０３１３７６）又は４００個（ＲＥＦＳＥＱ：ＥＡＷ９７３１２．１）のアミノ酸のタンパク質に翻訳され得ることが報告されている。ＰＨＬＤＡ１遺伝子によってコードされたタンパク質の好ましい名称は、プレクストリン相同性様ドメインファミリーＡメンバー１（ＰＨＬＤＡ１）であり、ＵｎｉＰｒｏｔ識別番号Ｑ８ＷＶ２４を有する。ＰＨＬＤＡ１は、細胞質、細胞質小胞膜、核、及び核小体の多種多様な組織で発現され、ＲＥＦＳＥＱ受入番号ＮＰ＿０３１３７６によって定義された配列の残基９～１４１に対応する１３３個のアミノ酸を含むＮ末端プレクストリン相同性ドメイン又はＰＨドメインを特色とする。ＰＨＬＤＡ１には、１４（プロリルヒスチジル）の反復配列がその後Ｃ末端に向かって続く１５（プロリルグルタミニル）の反復配列も組み込まれている。ＰＨドメインそれ自体は、１５残基（ＮＰ＿０３１３７６）又は１４残基（ＥＡＷ９７３１２．１）のポリ（グルタミン）エレメントのいずれかを含んでいる。

【０２３７】

ＵｎｉＰｒｏｔ知識ベースに列挙されているタンパク質に翻訳後修飾はない。ＵｎｉＰｒｏｔ知識ベースでは、Ｅｎｔｒｅｚデータベースにおいて、変異体ＰＨＬＤＡ１　ＣＲＡ＿ａ（例えば、ＲＥＦＳＥＱ：ＡＡＨ１８９２９．３、ＡＡＩ１０８２１．１、及びＡＩ２６４２６．２）として定められている２５９個のアミノ酸のタンパク質（Ｑ８ＷＶ２４）のみが記述されている。このタンパク質は、予測されたより長い形態のＮ末端に由来する１４１残基の配列を欠如しており、長さがこの形態では１４残基であるＰＨドメインのポリ（グルタミン）反復配列の開始部の単一グルタミン残基を有することにより、ＮＰ＿０３１３７６と異なる。タンパク質名ＰＨＬＤＡ１は、一般的に、この２５９残基のより短い形態を指す。ｃＤＮＡ配列（ＲＥＦＳＥＱ：ＡＡＩ３０４２８）は、ＰＨドメインが残基６２～１９４により包含されている３１２残基のタンパク質をコードすると予測されている。

【０２３８】

ＰＨドメインは、上述のアイソフォームのすべてに存在しており、典型的には、約１００個のアミノ酸を含んでいる。ＰＨドメインは、その後にＣ末端両親媒性ヘリックスが続く２つの直角に交わる逆平行ベータシートで構成される共通構造を有する。ベータストランドを結ぶループは長さが非常に異なっており、ＰＨドメインの検出を比較的困難にしている。プレクストリン相同性様ドメインファミリーＡには、ＰＨＬＤＡ１～ＰＨＬＤＡ３の３つのメンバーが存在し、その各々は、構成ＰＨドメインのアミノ酸配列が著しく異なっている。ＰＨＬＤＡ１は、ポリ（グルタミン）エレメントを含むループに、追加の４３個のアミノ酸の挿入を組み込んでいるという点で他のＡファミリーと異なっている。

【０２３９】

ＰＨＬＤＡ１遺伝子産物ＰＨＬＤＡ１と相互作用することが知られている分子にいくつかを、相互作用のタイプ及び同定に使用された実験方法と共に、下記の表２に列挙する。

【０２４０】

【表２】

表2

相互作用体の名称	実験のタイプ	タイプ
EIF3S7	インビボ;インビトロ;酵母ツーハイブリッド	直接
ケラチン関連タンパク質4～12	酵母ツーハイブリッド	直接
MyoDファミリー阻害剤	酵母ツーハイブリッド	直接
リン脂質スクランブラーゼ1	酵母ツーハイブリッド	直接
ポリ(A)結合タンパク質4	インビボ;インビトロ;酵母ツーハイブリッド	直接
リボソームタンパク質L14	インビボ;インビトロ;酵母ツーハイブリッド	直接

【実施例３】
【０２４１】
ヒトマスト細胞及びマウスマスト細胞のＩｇＥ刺激後のＮＥＤＤ９発現動態
ＮＥＤＤ９の発現動態を、ヒトマスト細胞及びマウスマスト細胞（ヒト又はマウスの骨髄幹細胞に由来した）のＩｇＥ刺激後に評価した。細胞を、抗ＤＮＰ／ＩｇＥ　ｍａｂ（１０～５００ｎｇ／ｍｌ）と共に２時間インキュベートし、ＤＮＰ／アルブミン溶液（１００ｎｇ／ｍｌ）を用いた架橋によるＦｃεＲＩ活性化を所定の時間（０～４時間）行った。遺伝子発現を、両種のＮＥＤＤ９に特異的なプライマー使用して定量リアルタイムＰＣＲにより測定し、相対定量比較Ｃｔ法（relative quantification comparative Ct method）を使用して分析を実施した（Livak and Schmittgen, Methods 25:402-408, (2001)を参照）。ＮＥＤＤ９は、ヒトマスト細胞ＩｇＥ架橋後の初期に上方制御され、２．５時間でピークに達し、５時間後に減少して、基線発現を少し越えた安定的発現に達した（図１Ａ）。ＮＥＤＤ９は、ヒトマスト細胞ＩｇＥ架橋後の初期に上方制御され、２．５時間でピークに達し、５時間後に減少して、基線発現を少し越えた安定的発現に達した（図１Ａ）。ＰＨＬＤＡ１の発現レベルも、ヒトマスト細胞のＩｇＥ架橋に応答して上方制御され、ＩｇＥ刺激の５時間後にピークに達したことが見出された（図１Ｂ）。同様に、ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１発現の初期上方制御は、マウスマスト細胞のＩｇＥ刺激後すぐに観察され、ＮＥＤＤ９の場合はＩｇＥ刺激後１時間で、ＰＨＬＤＡ１の場合はＩｇＥ刺激後３０分でピークに達し、どちらの場合も６時間で基線にまで減少した（図１Ｃ及び１Ｄ）。

【実施例４】
【０２４２】
ＲＢＬ－２Ｈ３細胞における、ＦｃεＲＩ架橋及びイオノマイシン刺激に応答したＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１発現動態
ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１の発現動態を、ＦｃεＲＩを発現するＲＢＬ－２Ｈ３細胞、ラットマスト細胞系で評価した。遺伝子発現を、各遺伝子に特異的なプライマーを使用してSYBR-Greenに基づく定量リアルタイムＰＣＲにより測定した。内部標準として使用されたβ－アクチン特異的プライマーを含んでいた各実験試料を、各プライマーにつき３回の反復測定を使用してアッセイした。ｃＤＮＡテンプレートを欠如する陰性対照をすべてのアッセイで実行して、特異性を評価した。Primer Expressソフトウェア（Applied Biosystems社製）をプライマー設計に使用した。閾値サイクル（Ｃｔ、threshold cycle）を、各試料ごとに決定した。エンドポイントにおいて非特異的産物を示すＰＣＲアッセイは、さらなるデータ分析から除外された。比較Ｃｔ法を使用した相対的定量化を使用して、結果を分析した（Livak and Schmittgen, Methods 25:402-408, (2001)を参照）。ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１の発現は、ＦｃεＲＩ架橋による細胞活性化に応答して著しく上方制御された（図２Ａ及び２Ｃ）。手短かに言えば、5×10^{6}個のＲＢＬ－２Ｈ３細胞を、５％ウシ胎仔血清、Ｌ－グルタミン、ペニシリン／ストレプトマイシンで補完されたＦ１５組織培養培地中で、抗ＤＮＰ／ＩｇＥ　ｍａｂ（１００ｎｇ／ｍｌ）と共に２時間インキュベートした。その後、ＦｃεＲＩを、ＤＮＰ／アルブミン溶液（１００ｎｇ／ｍｌ）を用いて所定の期間架橋させた。ＦｃεＲＩ架橋後の発現動態の分析により、両遺伝子が刺激後の初期に作用することが示され、マスト細胞活性化に結びつく事象のカスケードの調節にそれが関与していることを示唆した。

【０２４３】
最も特異的なマスト細胞活性化経路は、細胞表面におけるＦｃεＲＩ結合ＩｇＥの凝集を伴うが、マスト細胞は、ＦｃγＲ、トール様受容体（ＴＬＲ）、及び他のＩｇＥ非依存性トリガーを含む種々の手段によっても活性化することができる。したがって、ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１が、ＦｃεＲＩ架橋に起因するものとは別に、他の細胞内シグナル伝達カスケードに関与しているかどうかを評価した。イオノマイシンは、細胞外から細胞内空間にカルシウムを移動させるイオノフォアであり、細胞内の遊離カルシウムの上昇をもたらし、その後、既に形成されている顆粒の内容物を放出するステップを含むマスト細胞

エフェクター機能の刺激に結びつく。マスト細胞を、１μＭイオノマイシンと共にインキュベートし、ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１の発現レベルを、ＱＲＴ－ＰＣＲにより様々な時点で分析した。どちらの場合でも、遺伝子発現レベルは、分析したすべての時点（３０、６０、及び１２０分）で、イオノマイシンに応答して上方制御されたことが見出された（図２Ｂ及び２Ｄ）。ＦｃεＲＩ架橋による活性化と類似して、イオノマイシンに応答した発現動態の分析により、ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１が刺激後の初期に作用すると考えられることが示され、マスト細胞活性化に結びつく事象のカスケードの調節にそれらが関与していることをさらに支持した。

【実施例５】

【０２４４】

インビトロ及びインビボにおけるＮＥＤＤ９発現の発現停止後のマスト細胞脱顆粒の増加

マスト細胞脱顆粒アッセイを使用して、ＮＥＤＤ９発現の発現停止が、インビトロでマスト細胞のエフェクター機能に影響を及ぼし得るかどうかを評価した。ＲＢＬ－２Ｈ３ラットマスト細胞を、ＮＥＤＤ９発現に干渉するように特異的に設計したＮＥＤＤ９遺伝子発現を標的とする３つの異なるｓｉＲＮＡの存在下で、ＤＮＰ－ＩｇＥと共に３０分間インキュベートした。ｓｉＲＮＡは、AMBION社製のSilencer Validated siRNAを購入し、推奨プロトコール（www.ambion.com）を使用して形質移入を実施した。どの遺伝子も標的としない追加のｓｉＲＮＡを対照として使用した。ＩｇＥ／ＤＮＰと共に終夜インキュベーションした後、ＤＮＰ／アルブミンコンジュゲートとの架橋によって、ＦｃεＲＩを活性化した。その後、マスト細胞脱顆粒をβ－ヘキソサミニダーゼ放出により計算し、ＦｃεＲＩ架橋に応答したマスト細胞エフェクター機能の指標として使用した。図３に示されているように、ｓｉＲＮＡによるＮＥＤＤ９タンパク質発現の抑制は、ｓｉＲＮＡ陰性対照と比較して、マスト細胞脱顆粒のパーセンテージの増加に帰着した。

【０２４５】

その後、ＮＥＤＤ９及びＰＨＬＤＡ１発現を減少させる効果を、受動皮膚アナフィラキシー（ＰＣＡ、passive cutaneous anaphylaxis）反応を使用して、インビボで評価した。Lewisラットの耳の基部に、ＮＥＤＤ９　ｓｉＲＮＡｓ又はＰＨＬＤＡ１　ｓｉＲＮＡ（AMBION社製のsilencer validated siRNA）及びＩｇＥ－ＤＮＰの組合せを皮下注射した。対照ｓｉＲＮＡ／ＤＮＰ－ＩｇＥを左耳に注射した。２４時間後にＤＮＰ／アルブミンを静脈内に曝露することにより、ＦｃεＲＩ架橋を誘導した。耳マスト細胞脱顆粒を、３０分後にエバンスブルー回収によって測定した。ＮＥＤＤ９　ｓｉＲＮＡ又はＰＨＬＤＡ１　ｓｉＲＮＡの右耳への局所投与は、ｓｉＲＮＡ対照で処理された左耳と比較して、脱顆粒の増加に帰着した（図４Ａ及び４Ｂ）。

【実施例６】

【０２４６】

ＮＥＤＤ９のＳＨ３ドメインを標的とするペプチドは、インビトロ及びインビボでマスト細胞活性化を中和する

物質及び方法

（ｉ）ペプチド設計

ＳＨ３ドメインは、細胞内シグナル伝達複合体の組み立てと、シグナル伝達及び細胞活性化の調節プロセスとに関与するプロリン豊富な直線的モチーフ認識する。ＮＥＤＤ９のＳＨ３ドメインは、ヒトからハエまでの種にわたって保存されており（Ｈｏｍｏｌｏｇｅｎｅ　ＮＣＢＩ及び図５）、シグナル伝達活性におけるその重要性が示唆されている。Ｎ末端ＳＨ３ドメインの配列は、ＲＥＦＳＥＱ受託番号ＮＭ＿００６４０３．２（ＨＥＦ１アイソフォーム１　ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｑ１４５１１）によって定義された配列の残基７～６６に対応する。

ＨＥＦ１アイソフォーム１の残基７～６６（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｑ１４５１１．１）、ヒトＮＥＤＤ９（Ｅｎｔｒｅｚ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ　４７３９）によりコードされたＮ末端ＳＨ３ドメイン

MARALYDNVP$_{10}$ ECAEELAFRK$_{20}$ GDILTVIEQN$_{30}$ TGGLEGWWLC$_{40}$
SLHGRQGIVP$_{50}$ GNRVKLLIGP$_{60}$
（配列番号７）

【０２４７】

ＮＥＤＤ９競合ペプチドを、ＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメインと標的リガンドとの結合を特異的に妨害するように構築した。ペプチドは、Australian National University Australian Cancer Research Foundation Biomolecular Resource Facilityで化学的に合成された。Ｒｉｎｋレジン、４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃ－アミノエチル）－フェノキシポリスチレンでの固相合成を、標準的なＦｍｏｃ（９－フルオレニルメチルオキシカルボニル）プロトコールを使用して、シンフォニーペプチドシンセサイザー（Rainin Instrument Company社製、オークランド、米国カリフォルニア州）で実施し、逆相ＨＰＬＣで精製した。精製した産物の同一性は、質量分析法により確認した。

【０２４８】

２０アミノ酸長のペプチド（ＭＤＤ１）を、図５に描かれているＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメインのヒト配列（ＨＳ、human sequence）の残基３～２２に対応するように構築した。ペプチドＭＤＤ１は、ＳＨ３ドメインのＲＴ（可変）ループに負荷電残基のクラスターを含んでいるため、最初にペプチドＭＤＤ１を活性試験に選んだ。ＭＤＤ１ペプチドは、すべての種に対するペプチドｂｌａｓｔによって確認されるように、ＮＥＤＤ９に特有である。ＭＤＤ１の配列は、ホモサピエンス、マウス、ラット、チンパンジー、ウシ、イヌ、並びにニワトリを含む哺乳動物で保存されている（図５－強調されている配列を参照）。

【０２４９】

スクランブル配列（ＭＤＤ１$_{ｓｃｒａｍ}$）にある同じアミノ酸を含有するペプチドも、天然配列を保存する必要性を決定するために合成した。末端のイオン化及びエキソペプチダーゼによる分解の両方を抑制するために、Ｎ－アセチルα－カルボキサミドの形態で、それらを合成した。ビオチン化形態も生成された。

ペプチド配列を下記に詳述する：
ＭＤＤ１ペプチド：RALYDNVPECAEELAFRKGD（配列番号８）
ＭＤＤ１$_{ｓｃｒａｍ}$　EALPGEDCAFRKDANRLVEY（配列番号９）

【０２５０】

両方とも１０位のシステイン残基を欠如する２つのさらなる類似体、ＭＤＤ１Ｓ１０及びＭＤＤ１Ａ１０も合成した：

【０２５１】

（ii）ＲＢＬ－２Ｈ３によるＭＤＤ１取り込み

ＲＢＬ－２Ｈ３細胞を、１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ、fetal calf serum）及び抗生物質で補完されたＦ１５培地中で増殖させた。細胞を細胞スクレーパーで培養フラスコから注意深く引き離し、５×１０^{5}細胞／ウエルの濃度で９６ウエルマイクロタイタープレートにプレーティングした。細胞を、種々の濃度のビオチン化ＭＤＤ１（０．１、０．０１、及び０．００１ｍＭ）と共に終夜インキュベートした。生細胞によるビオチン化ＭＤＤ１取り込みを、製造業者の説明書（Becton Dickinson、BD社製）に従って、混合cytofix/cytoperm固定化及び透過化溶液キットで事前処理された単個細胞浮遊液中でストレプトアビジン－ＡＰＣを使用して検出した。その後、細胞を、BD社製FACscanフローサイトメーターを使用して分析した。

【０２５２】

（iii）ＲＢＬ－２Ｈ３脱顆粒アッセイ

マスト細胞脱顆粒を、β－ヘキソサミニダーゼ放出法を使用して測定した。ＲＢＬ－２Ｈ３細胞を、１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）及び抗生物質で補完されたＦ１５培地中で増殖させた。細胞を細胞スクレーパーで培養フラスコから注意深く引き離し、５×１０^{5}細胞／ウエルの濃度で９６ウエルマイクロタイタープレートにプレーティングし、ＭＤＤ１及びＳＣＲペプチドの存在下で終夜インキュベートした。その後、ＲＢＬ－２Ｈ３細胞を、５００ｎｇ／ｍｌの抗ＤＮＰ　ＩｇＥ　ｍｂ（SIGMA社製）と共に、３７℃で２時間イ

ンキュベートした。洗浄後、細胞を１００ｎｇ／ｍｌのＤＮＰ／アルブミンで３０分間刺激した。非ＩｇＥ特異的刺激の場合、培養物に１ｎＭのイオノマイシンのみを３０分間添加した。その後、上清を収集し、０．１％トリトンＸ－１００を使用して細胞溶解産物を調製した。溶解産物試料及び上清試料（１０μｌ）を９６ウエルプレートに移し、５０ｍＭクエン酸緩衝液中１ｍＭのｐ－ニトロフェニル－Ｎ－アセチル－β－Ｄ－グルコピラノシドを５０μｌ、各ウエルに添加し、暗所で１時間３７℃でインキュベートした。１００μｌの０．１Ｍ　$NaHCO_3$／０．１Ｍ　Na_2CO_3を各ウエルに添加することにより反応を停止させ、吸光度を４０５ｎｍで測定した。パーセンテージ脱顆粒を、下記式により算出した：ＯＤ上清／（ＯＤ上清＋ＯＤ溶解産物）×１００。

【０２５３】

（ｉｉｉ）ＯＶＡ誘導性ぜん息モデル

生理食塩水中の１０μｇオボアルブミン抗原（ＯＶＡ、ovalbumin antigen）を腹腔内に隔日で７回与えて、Ｃ５７ＢＬ／６マウスを感作した。最初の感作投与の４０日後、マウスを、鼻腔内ＯＶＡ（生理食塩水中５ｍｇ／ｍｌのＯＶＡ溶液を各鼻孔中に２０μｌ）で曝露した。マウスは、ＯＶＡによる最初の曝露後の３日目及び６日目に、鼻腔内ＯＶＡの追加曝露を２回受容した。対照マウスをＯＶＡで感作したが、生理食塩水で鼻腔内曝露した。非経口ＭＤＤ１処理を受容したマウス群に、８ｍｇ／ｋｇのＭＤＤ１を、各ＯＶＡ曝露の６時間前に３回静脈注射した。霧状ＭＤＤ１又はMDD_{scram}（ＳＣＲ）ペプチドを、各ＯＶＡ曝露の６時間前に、１つのケージ当たり５匹のマウスに８ｍｌの１ｍｇ／ｍｌ　ＭＤＤ１又は対照ペプチドを噴霧することにより与えた。

【０２５４】

最終ＯＶＡ曝露の１日後に、機能的肺研究及び器官収集を実施した。β－メタコリンの用量を増加させた後に、麻酔をかけたマウス中で肺耐性を測定した。気管を外科的に露出させ、カニューレを挿入し、げっ歯動物人工呼吸器（flexivent；Scireq社製）に接続した。マウスを安定させ、生理食塩水エアロゾルで曝露し、その後メタコリンの濃度を増加させた。肺耐性は、Buxco社により供給された装置及びソフトウェアを使用して、容積変動記録法により測定した。肺耐性値は、各メタコリン用量ごとに、マウス各群の平均として表されている。各マウスごとに、個々の値を、各メタコリン用量ごとに収集したデータ（５分間で５秒ごと）を平均することにより計算した。

【０２５５】

免疫染色、サイトカイン発現

血液塗抹標本を調製し、好酸球のパーセンテージを、メイ－グルンワルド－ギムザ染色後に形態論的基準により計算した。気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ、bronchoalveolar lavage）を、胸部を穏やかにマッサージしている間に気管カニューレにより１ｍｌのハンクス液を用いて気道を２回洗浄することにより回収した。肺下左葉を収集し、ホモジナイズした。細胞を細胞ストレーナーでろ過し、細胞懸濁液を染色培地中（１％ＦＣＳを有するＰＢＳ）に調製した。ＢＡＬ試料及び肺試料を、CellQuestソフトウェアを備えたFACScanを使用するフローサイトメトリー分析用に、抗ＣＤ１１ｂ、抗ＣＣＲ３、抗ＣＤ４、及び抗Ｂ２２０　ｍａｂマーカーと共にインキュベートした。

【０２５６】

肺上右葉を収集し、氷上でホモジナイズした。トリゾール（GIBCO、Invitrogen社製）を使用して、全ＲＮＡを調製した。ＲＮＡの純度は、Ａ２６０／Ａ２８０により決定した。各試料について５μｇのＲＮＡを、Omniscript　ＲＴキット（Qiagen社製）を使用して、ｃＤＮＡに逆転写した。サイトカイン特異的な事前設計されたTaqMan遺伝子発現アッセイ（Applied Biosystems社製）を使用し、製造業者の説明書（Applied Biosystems社製）に従って、サイトカイン相対的遺伝子発現を測定した。各実験試料を３回反復測定でアッセイし、β－アクチン特異的プライマーを内部標準として使用した。ブランクｃＤＮＡテンプレートを有する陰性対照を、すべてのアッセイで実行して特異性を評価した。サイクル条件は以下の通りだった：９５℃で１０分間の１サイクル、その後４０サイクルのＰＣＲ増幅、その各々は９５℃で１５秒間及び６０℃で４５秒間で構成されていた。配列検出

ソフトウェア（ＳＤＳ、Sequence Detection Software ｖ１．２．２、Applied Biosystems社製）を使用して、結果を分析した。閾値サイクル（Ｃｔ）を、各試料ごとに決定した。エンドポイントにおいて非特異的産物を示すＰＣＲアッセイは、さらなるデータ分析から除外された。比較Ｃｔ法を使用した相対的定量化を使用して結果を分析した。結果は、非アレルギー性マウスの値に対する相対的倍数変化として表された。

【０２５７】

血清Ｉｇレベル

ＯＶＡ特異的ＩｇＥ検出：９６ウエルmaxisorpプレートを、４℃で終夜、抗マウスＩｇＥでコーティングした。２％スキムミルクを使用して非特異的結合をブロックした。あらかじめ希釈した血清試料を終夜インキュベートし、ＯＶＡビオチンをプレートに１．５時間添加し、製造業者の説明書に従ってＡＢＴＳを使用し、比色反応を発生させた。ＯＶＡ特異的ＩｇＧの場合、９６ウエルmaxisorpマイクロタイタープレートを、０．２％グルタルアルデヒドで前処理し、１０ｍＭ炭酸塩緩衝液（ｐＨ９．６）中の１０μｇ／ｍｌＯＶＡを用いて、３時間３７℃でコーティングした。ウエルを加湿チャンバー内で、１０ｍＭ炭酸塩緩衝液（ｐＨ９．６）中の２％ＢＳＡで終夜４℃でブロックした。血清試料を１時間３７℃でインキュベートした。ペルオキシダーゼコンジュゲート抗ラットＩｇＧ、その後にＡＢＴＳを使用して、比色反応を発生させた。光学密度を、４０５ｎｍフィルターを使用してマイクロプレートリーダで読み込んだ。ＩｇＥ及びＩｇＧのレベルは、ＯＤ単位として表された。

【０２５８】

マウスの受動皮膚アナフィラキシーアッセイ（ＰＣＡ）

左耳をＤＭＳＯで、右耳をＤＭＳＯ中の０．２％ＭＤＤ１又は０．１％デキサメタゾンで、４日間１日２回処理した。その後、インスリン用注射器を使用した皮内注射により、抗ＤＮＰ－２０μｌ　ＩｇＥ抗体を耳に投与してマウスを感作した。局所的マスト細胞活性化を、注射２４時間後ＦｃεＲＩ架橋に応答した色素回収により測定した：ＰＢＳ中の１００μｇＤＮＰ－アルブミン／１％エバンスブルーを静脈内注射し、３０分後に採取した耳生検を、１ｍｌホルムアミド中で２時間８０℃でインキュベートした。上清吸光度を６２０ｎｍで測定した。

【０２５９】

結果

（ｉ）ＭＤＤ１ペプチドはインビトロで生物学的に活性である

ＭＤＤ１ペプチドは、細胞性膜を透過することが見出された。ＭＤＤ１ペプチドをビオチンに直接コンジュゲートし、ＲＢＬ－２Ｈ３マスト細胞に投与した。ＭＤＤ１ペプチド取り込みを、ストレプトアビジンＡＰＣを螢光色素として使用して細胞内ＦＡＣＳ染色により検出した。すべて細胞がＭＤＤ１ペプチドに陽性であり、そのレベルはペプチド濃度と共に増加することが観察された（図６）。

【０２６０】

（ii）ＭＤＤ１ペプチドは、ＩｇＥ受容体架橋後のＲＢＬ－２Ｈ３細胞の脱顆粒を阻害する

ＭＤＤ１ペプチド（配列番号８）は、ＩｇＥ受容体架橋後並びに非特異的刺激後のマスト細胞活性化を阻害することが観察された（データ非表示）。ＭＤＤ１ペプチドで前処理されなかったＲＢＬ－２Ｈ３細胞は、ＩｇＥ受容体架橋後に脱顆粒した（図７）。しかしながら、ＭＤＤ１ペプチドを用いたＲＢＬ－２Ｈ３細胞の前処理により、ＩｇＥ受容体架橋時の脱顆粒が阻害されることが観察された（図７）。スクランブルペプチドＭＤＤ１$_{scram}$（配列番号９）を用いたＲＢＬ－２Ｈ３細胞の前処理は、ＩｇＥ受容体架橋後の脱顆粒にほんのわずかの阻害効果しか示さなかった（図７）。

【０２６１】

（iii）ＭＤＤ１ペプチドは、β－メタコリン曝露後のＯＶＡ感作マウスの肺機能を改善する

ぜん息性応答の制御におけるＭＤＤ１ペプチドの効能を、マスト細胞活性化によって推

進されるぜん息のマウスモデルで試験した。マスト細胞を欠如するマウスはこの疾患を発症しないため、このモデルの肺炎症及びぜん息性応答はマスト細胞活性化に依存している。

【０２６２】

抗原にさらした時にＭＤＤ１で処理したＯＶＡ感作マウスでは、対照ペプチドで処理したマウスと比較して、β－メタコリン曝露後に肺機能が改善された（図８）。ＭＤＤ１ペプチド又は対照ペプチド（ＳＲＣ）のいずれかで処理したＯＶＡ感作マウスの肺耐性を、β－メタコリンの用量を増加させた後で測定した。肺耐性（ＲＬ、lung resistance）は、対照ペプチドで処理したマウスと比較して、ＭＤＤ１ペプチドで処理したマウスで低下した。この効果は、ペプチドが静脈内投与された場合（図８Ａ）、又は噴霧鼻腔内経路を使用して肺に局所投与された場合（図８Ｂ）に観察された。

【０２６３】

（iv）ＭＤＤ１ペプチドは、β－メタコリン曝露後のＯＶＡ感作マウスにおいて、ぜん息性反応中の炎症反応を低減する

ＭＤＤ１ペプチドは、対照処理マウスと比較して、アレルギーマウスの血中好酸球増加の減少（図９Ａ）、気管支肺胞洗浄液中の細胞充実性（図９Ｂ）、炎症病巣におけるサイトカイン産生（図９Ｃ）、血清中の抗原特異的ＩｇＥのレベル（図９Ｄ）により実証されたように、ぜん息性反応の全体的な炎症反応を低減した。ＭＤＤ１ペプチドは、試験したパラメーターのいくつかにおいて、デキサメタゾン処理（２ｍｇ／ｋｇ　腹腔内）より優れていた。（図９）。

【０２６４】

（ｖ）ＭＤＤ１ペプチドの局所投与はアレルギー反応を低減する

アトピー性皮膚炎及び他のアレルギー性皮膚状態は、マスト細胞応答によって推進されると考えられている。ＭＤＤ１ペプチドの局所投与が、皮膚マスト細胞を安定させることを実証した。０．２％ＭＤＤ１ペプチド／ＤＭＳＯ調製物を、抗ＤＮＰ　ＩｇＥ抗体でのＩｇＥ局所感作に先立って、各マウスの一方の耳に局所塗布した。ＭＤＤ１ペプチド／ＤＭＳＯで処理された耳に由来する生検中のマスト細胞は、ＤＭＳＯのみで処理された反対側の耳と比較した染料管外遊出により決定されたように、ＩｇＥ受容体架橋後の活性化レベルを低下させたことが見出された（図１０）。ＭＤＤ１ペプチドは、最小限の全身性効果で局所的作用したが、局所的デキサメタゾン処理は全身性の免疫抑制に帰着した。

【実施例７】

【０２６５】

ＰＨＬＤＡ１遺伝子産物のＰＨドメインのペプチド競合体は、マスト細胞活性化を中和する

物質及び方法

（ｉ）ペプチド設計

ＰＨＬＤＡ１のＰＨドメインは、１３３個のアミノ酸を含み、ＲＥＦＳＥＱ受託番号ＮＭ＿００６４０３．２により定義された配列のアミノ酸残基９～１４１に及ぶ。この配列は、哺乳類で高度に保存されている。ＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインは、以下に示したような大型ループ挿入を含む（太字イタリック体の配列を参照：残基３７～７９）。

ＰＨＬＤＡ１の残基９～１４１（ＵｎｉＰｒｏｔ：Ｑ８ＷＶ２４．１）、ヒトＰＨＬＤＡ１（Ｅｎｔｒｅｚ　Ｇｅｎｅ　ＩＤ　２２８２２）によりコードされているＰＨドメイン

ALKEGVLEKR$_{10}$ SDGLLQLWKK$_{20}$ KCCILTEEGL$_{30}$ LLIPPKQLQH$_{40}$
QQQQQQQQQQ$_{50}$ QQQQPGQGPA$_{60}$ EPSQPSGPAV$_{70}$ ASLEPPVKLK$_{80}$
ELHFSNMKTV$_{90}$ DCVERKGKYM$_{100}$ YFTVVMAEGK$_{110}$ EIDFRCPQDQ$_{120}$
GWNAEITLQM$_{130}$ VQY

（配列番号１０）

両ヒトアイソフォームにおける配列変異及び哺乳動物種間の配列変異は、ポリ（グルタミン）エレメントを隣接し、そのホモポリマー配列の長さも可変である。

【０２６６】
ＰＨＬＤＡ１のＰＨドメインの活性に特異的に干渉するように、２つの競合ペプチド配列を設計及び合成した（ＭＰＸ７４１、ＭＰＸ７４２、及びＭＰＸ７４３）。競合ペプチドの設計は、ポリ（グルタミン）反復エレメントの上流（つまりＮ末端）及び下流（つまりＣ末端）にある配列に基づいていた。ＭＰＸ７４１は、ポリ（グルタミン）エレメントのＮ末端側にある配列（ホスファチジルイノシトール脂質の予測結合部位）に対応し、ＭＰＸ７４２は、ＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインのほぼ中央にある配列に対応し、その一方でＭＰＸ７４３は、ポリ（グルタミン）エレメントのＣ末端側にある配列に対応している。末端のイオン化及びエキソペプチダーゼによる分解を抑制するために、Ｎ－アセチルα－カルボキサミドの形態で、ペプチドを合成した。ペプチド配列を下記に詳述する：
ＭＰＸ７４１　KRSDGLLQLWKKKCCILTEEGLLLIPPK（配列番号１１）
ＭＰＸ７４２　LEPPVKLKELHFSNMKTVD（配列番号１２）
ＭＰＸ７４３　PQDQGWNAEITLQMVQY（配列番号１３）

【０２６７】
ＭＰＸ７４１は、配列番号１１に示されているＰＨドメインの残基９～３６に対応し、その構成アミノ酸のうち１５個が他のＰＨＬＤＡファミリーメンバーのＰＨドメインと異なっている。ＭＰＸ７４２は、配列番号１２に示されているＰＨドメインの残基７３～９１に対応し、その構成アミノ酸のうち４個を他のＰＨＬＤＡファミリーメンバーのＰＨドメインと共有しているにすぎない。ＭＰＸ７４２のＮ末端の５個のアミノ酸は、固有のＰＨＬＤＡ１ループ挿入（それはＰＨＬＤＡ１のＰＨドメインに固有である）のＣ末端に対応する。ＭＰＸ７４３は、配列番号１３に示されているＰＨドメインの残基１１７～１３０に対応し、その構成アミノ酸のうち１１個が他のＰＨＬＤＡファミリーメンバーのＰＨドメインと異なっている。

【０２６８】
ペプチドは、Australian National University Australian Cancer Research Foundation Biomolecular Resource Facilityで化学的に合成された。Ｒｉｎｋレジン、４－（２’，４’－ジメトキシフェニル－Ｆｍｏｃ－アミノエチル）－フェノキシポリスチレンでの固相合成を、標準的なＦｍｏｃ（９－フルオレニルメチルオキシカルボニル）プロトコールを使用して、シンフォニーペプチドシンセサイザー（Rainin Instrument Company社製、オークランド、米国カリフォルニア州）で実施し、逆相ＨＰＬＣで精製した。精製した産物の同一性は、質量分析法により確認した。

【０２６９】
（ii）ＲＢＬ－２Ｈ３脱顆粒アッセイ
マスト細胞脱顆粒を、β－ヘキソサミニダーゼ放出法を使用して測定した。ＲＢＬ－２Ｈ３細胞を、１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）及び抗生物質で補完されたＦ１５培地中で増殖させた。細胞を細胞スクレーパーで培養フラスコから注意深く引き離し、5×10^{5}細胞／ウエルの濃度で９６ウエルマイクロタイタープレートにプレーティングし、ＭＰＸ７４１又はＭＰＸ７４２ペプチドの存在下で終夜インキュベートした。その後、ＲＢＬ－２Ｈ３細胞を、５００ｎｇ／ｍｌの抗ＤＮＰ　ＩｇＥ　ｍｂ（SIGMA社製）と共に、３７℃で２時間インキュベートした。洗浄後、細胞を１００ｎｇ／ｍｌのＤＮＰ／アルブミンで３０分間刺激した。非ＩｇＥ特異的刺激の場合、培養物に１ｎＭのイオノマイシンのみを３０分間添加した。その後、上清を収集し、０．１％トリトンＸ－１００を使用して細胞溶解産物を調製した。溶解産物試料及び上清試料（１０μｌ）を９６ウエルプレートに移し、５０ｍＭクエン酸緩衝液中１ｍＭのｐ－ニトロフェニル－Ｎ－アセチル－β－Ｄ－グルコピラノシドを５０μｌ、各ウエルに添加し、暗所で１時間３７℃でインキュベートした。１００μｌの０．１Ｍ　$NaHCO_3$／０．１Ｍ　Na_2CO_3を各ウエルに添加することにより反応を停止させ、吸光度を４０５ｎｍで測定した。パーセンテージ脱顆粒を、下記式により算出した：ＯＤ上清／（ＯＤ上清＋ＯＤ溶解産物）×１００。

【０２７０】
結果

（ｉ）ＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２はマスト細胞活性化を中和する
ＭＰＸ７４３（配列番号１３）は、可溶性が乏しいことが観察され、したがってさらなる試験をする前に改良が必要である。ＭＰＸ７４１（配列番号１１）及びＭＰＸ７４２（配列番号１２）は、ＩｇＥ受容体架橋後の脱顆粒を著しく低減することが実証された（図１１）。したがって、ＭＰＸ７４１又はＭＰＸ７４２のいずれかでＲＢＬ－２Ｈ３細胞を処理することにより、マスト細胞活性化が著しく阻害された。

【実施例８】

【０２７１】

追加のＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメイン競合ペプチド
ペプチドＭＤＤ１は、マスト細胞活性化の阻害剤であることが本明細書中で実証されており、したがって、このペプチドの投与は、過敏症反応を治療及び／又は予防する手段を提供する。上記の実施例６に記述されているように、ＭＤＤ１は、ＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメインのヒト配列の残基３～２２に対応する競合ペプチドである（図５に示されている）。

【０２７２】

ＭＤＤ１ペプチドの１又は複数のアミノ酸残基を修飾することにより生成される変異体は、多くの場合、例えばマスト細胞を脱感作する能力、溶解度、化学的及び生化学的安定性、細胞取り込み、毒性、免疫原性、並びに分解産物の排出などの、ペプチドの１又は複数の特性を模倣又は向上させるであろうということが想起される。類似した又は向上した特性を有するＭＤＤ１ペプチドの変異体を、所望の特定の特性（複数可）の陰性決定基又は陽性決定基のいずれかであり得るＭＤＤ１ペプチド配列の特定のアミノ酸残基（複数可）を同定することにより設計した。それらのＭＤＤ１ペプチド変異体の機能的活性を、上記の実施例６に記述されているものに類似した方法、及び当技術分野で一般的に公知な他の方法を使用して試験することになる。

【０２７３】

例えば、側鎖切断を駆使して、ＭＤＤ１ペプチドの配列に沿って１度に１個のアミノ酸をアラニンに置換することになる（例えば、Gautam et al. 1995, "Binding of an invariant-chain peptide, CLIP, to I-A major histocompatibility complex class II molecules" Proc Natl Acad Sci USA, 92: 335-9に記述されているように）。この方法により試験されるＭＤＤ１ペプチド変異体には、配列番号３３～４９に示されているものが含まれる。さらに、ＭＤＤ１ペプチドに沿った複数の残基において、特に負荷電残基が存在する位置において、アラニンを置換することになる（配列番号を参照２４～２６）。

【０２７４】

ＭＤＤ１ペプチドの長さを増加又は低減することにより、多くの場合、ペプチドの１又は複数の特性も模倣又は向上されるであろうことも想起される。したがって、長さが低減されたＭＤＤ１変異体を、本明細書中に記述されている方法及び／又は当技術分野で一般的に公知な他の方法を使用して、マスト細胞活性化及び過敏症に対するそれらの効果について試験することになる。そのようなＭＤＤ１ペプチド変異体の典型的な配列は、配列番号１８～１９及び１２２～１４４に示されている。

【０２７５】

追加のＭＤＤ１ペプチド変異体は設計されており、今後試験することになっている。それらには、ＭＤＤ１ペプチド配列の１０位のシステイン残基を、セリンに（配列番号１６）又はアラニンに（配列番号１７）置換したものが含まれる。残基１０におけるセリン又はアラニン置換を含むＭＤＤ１ペプチドの鎖長変異体（つまり、配列番号１６及び配列番号１７の鎖長変異体）も、配列番号２０～２３及び１４５～１８４に示されている配列を使用して試験することになる。加えて、配列番号９０～１２１に示されている配列により、鎖に沿った他の残基（複数可）での単一／複数のアラニン置換と共に、１０位のシステイン残基が置換されたさらなる一連のＭＤＤ１変異体ペプチドを（配列番号１６又は配列番号１７におけるように）、試験することになる。

【０２７６】

全長ＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメイン（配列番号７）及びＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメインの他の特定領域に対応する競合ペプチドは、マスト細胞活性化を調節し、それにより過敏症反応に影響を与えることが可能であろうことも想起される。一連のオーバーラップしている２０アミノ酸長のペプチド（配列番号１４、１５、及び１８５～２２５）及び１２アミノ酸長のペプチド（配列番号２２６～２７３）を、上記の実施例６に記述されているものに類似した方法及び／又は当技術分野で一般的に公知な他の追加の方法を使用して試験することになる。鎖に沿って単一／複数のアラニン置換を有するそれらのペプチドの変異体は、配列番号５０～８９に示されている配列を有する変異体を含む。

【０２７７】

合成されて、マスト細胞活性化に対する効果／過敏症に対する影響に関して試験されることになる、ＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメイン（及びその変異体）の少なくとも一部分に対応する典型的なペプチド配列は、配列番号１４～２７３に示されている。

【実施例９】

【０２７８】

ＮＥＤＤ９　ＳＨ３ドメインに由来する追加の競合ペプチド

ペプチドＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２は、マスト細胞活性化の阻害剤であることが本明細書中で実証されており、したがって、これらのペプチドの投与は、過敏症反応を治療及び／又は予防する手段を提供する。上記の実施例７に記述されているように、ＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２は、ＰＨドメイン、ＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインのヒト配列の残基９～３６及び残基７３～９１にそれぞれ対応する競合ペプチドである。

【０２７９】

ＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２ペプチドのいずれかの１又は複数のアミノ酸残基を修飾することにより生成された変異体は、多くの場合、例えばマスト細胞を脱感作する能力、溶解度、化学的及び生化学的安定性、細胞取り込み、毒性、免疫原性、及び分解産物の排出などの、ペプチドの１又は複数の特性を模倣又は向上させるであろうということが想起される。類似した又は向上した特性を有するＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２ペプチドの変異体を、所望の特定の特性（複数可）の陰性決定基又は陽性決定基のいずれかであり得るそれらの配列の特定のアミノ酸残基（複数可）を同定することにより設計した。そのようなＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２ペプチド変異体の機能的活性を、上記の実施例６に記述されているものに類似した方法、及び当技術分野で一般的に公知な他の方法を使用して試験することになる。

【０２８０】

例えば、側鎖切断を駆使して、ＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２ペプチドの配列に沿って１度に１個のアミノ酸をアラニンに置換することになる（例えば、Gautam et al. 1995, "Binding of an invariant-chain peptide, CLIP, to I-A major histocompatibility complex class II molecules" Proc Natl Acad Sci USA, 92: 335-9に記述されているように）。この方法により試験されるＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２ペプチド変異体には、配列番号２７４～３２０に示されているものが含まれる。さらに、ＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２ペプチドに沿った複数の残基において、特に負荷電残基が存在する位置において、アラニンを置換することになる。

【０２８１】

ＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２ペプチドの長さを増加又は低減することにより、多くの場合、ペプチドの１又は複数の特性も模倣又は向上されるであろうことも想起される。したがって、長さが低減されたＭＰＸ７４１及びＭＰＸ７４２変異体を、本明細書中に記述されている方法及び／又は当技術分野で一般的に公知な他の方法を使用して、マスト細胞活性化及び過敏症に対するそれらの効果について試験することになる。そのようなＭＤＤ１ペプチド変異体の典型的な配列は、配列番号３２１～３７４に示されている。

【０２８２】

全長ＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメイン（配列番号１０）及びＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインの他の特定領域に対応する競合ペプチドは、マスト細胞活性化を調節し、それにより過敏症

反応に影響を与えることが可能であろうことも想起される。一連のオーバーラップしている２０アミノ酸長のペプチド（配列番号１４、１５、及び１８５～２２５）及び１２アミノ酸長のペプチド（配列番号３７５～４８８）を、上記の実施例６に記述されているものに類似した方法及び／又は当技術分野で一般的に公知な他の追加の方法を使用して試験することになる。鎖に沿って単一／複数のアラニン置換を有するそれらのペプチドの変異体も試験することになる。

【０２８３】

合成されて、マスト細胞活性化／過敏症に対するそれらの効果に関して試験されるＰＨＬＤＡ１　ＰＨドメインに対応する典型的なペプチド配列（及びその変異体）は、配列番号２７４～４８８に示されている。

【実施例１０】

【０２８４】

組成物

（ｉ）注射可能な非経口組成物

注射による投与に好適な形態の本発明の医薬組成物は、１０容積％プロピレングリコール及び水中に、０．００５ｍｇ～５ｇの本発明のもう１つの好適な物質又は化合物を混合することにより調製することができる。

【０２８５】

（ii）経口投与用の組成物

カプセル剤の形態をしている本発明のもう１つの好適な物質又は化合物の組成物は、０．００５ｍｇ～５ｇの粉末形態の物質又は化合物、１００ｍｇのラクトース、３５ｍｇのタルク、及び１０ｍｇのステアリン酸マグネシウムを、標準的なツーピースの硬カプセルに充填することにより調製することができる。

【０２８６】

（iii）吸入投与用の組成物

２０～３０ｍＬの容量を有するエアゾル容器の場合：０．００５ｍｇ～５ｇの本発明のもう１つの好適な物質又は化合物の混合物、ポリソルベート８５又はオレイン酸などの０．５～０．８重量％の潤滑剤を、フロンなどの噴霧剤に分散させ、鼻腔内吸入投与又は経口吸入投与のいずれかに適切なエアゾル容器に入れる。

【図１】

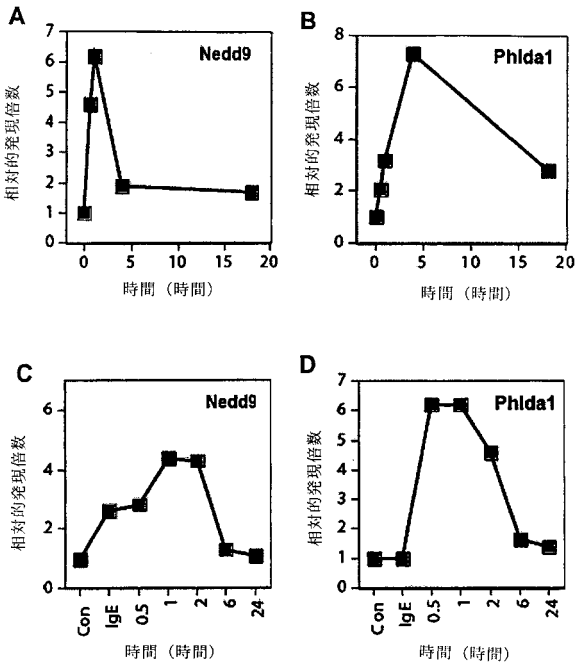


図１

【図２Ａ】

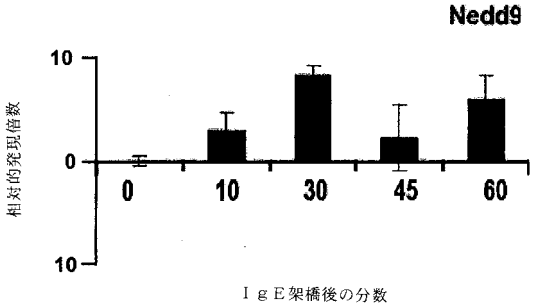


図２Ａ

【図２Ｂ】

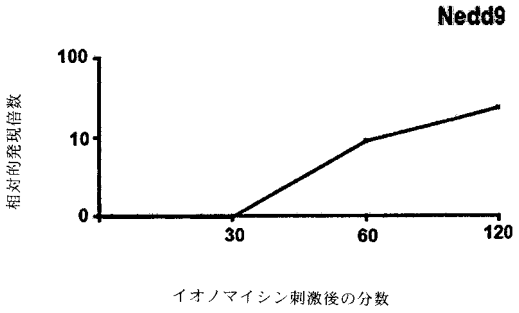


図２Ｂ

【図２Ｃ】

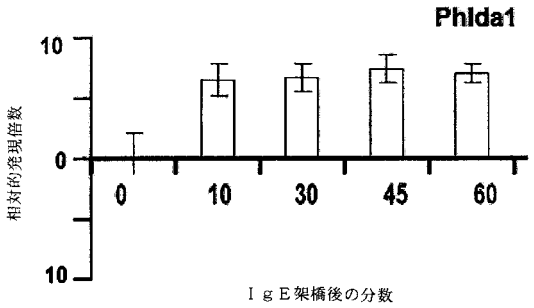


図２Ｃ

【図２Ｄ】

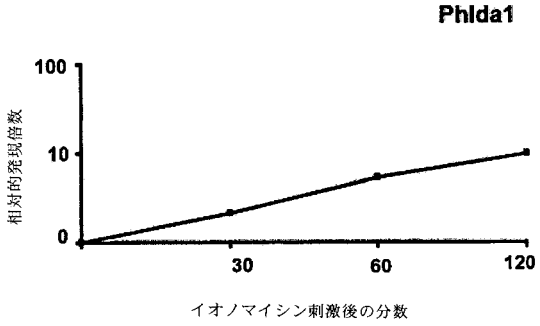


図２Ｄ

【図３】

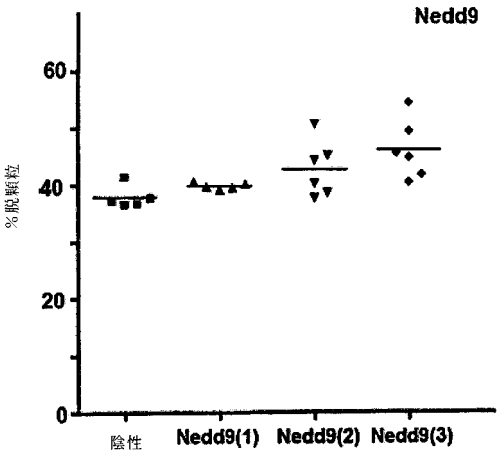


図３

【図４Ａ】

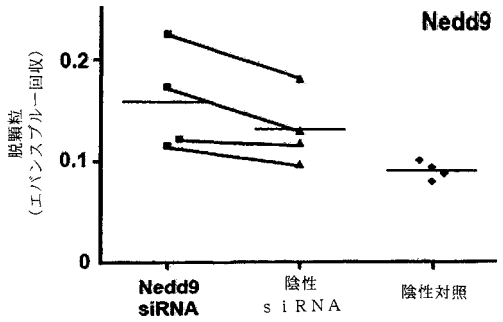


図４Ａ

【図４Ｂ】

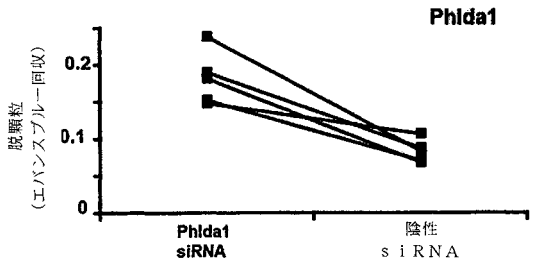


図４Ｂ

【図５】

```
HS  7   MARALYDNVPECAEELAFRKGDILTVIEQNTGGLEGWWLCSLHG      50
MM  7   MARALYDNVPECAEELAFRKGDILTVIEQNTGGLEGWWLCSLHG      50
RN  7   MARALYDNVPECAEELAFRKGDILTVIEQNTGGLEGWWLCSLHG      50
PT  7   MARALYDNVPECAEELAFRKGDILTVIEQNTGGLEGWWLCSLHG      50
BT  7   MARALYDNVPECAEELAFRKGDILTVIEQNTGGLEGWWLCSLHG      50
CF 39   MARALYDNVPECAEELAFRKGDILTVIEQNTGGLEGWWLCSLHG      82
GG 38   MARALYDNVPECAEELAFRKGDILTVIEQNTEGLEGWWLCSLHG      81

HS 51   RQGIVPGNRVKLLIGP 66
MM 51   RQGIVPGNRVKLLIGP 66
RN 51   RQGIVPGNRVKLLIGP 66
PT 51   RQGIVPGNRVKLLIGP 66
BT 51   RQGIVPGNRVKLLIGP 66
CF 83   RQGIVPGNRVKLLIGP 97
GG 82   RQGIVPGNRVKLLIGP 96
```

図５

【図６】

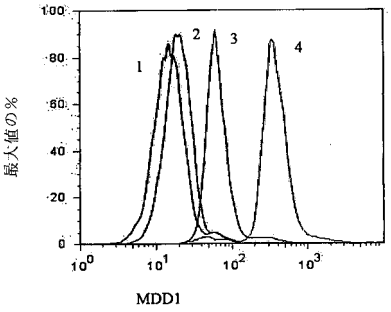


図６

【図７】

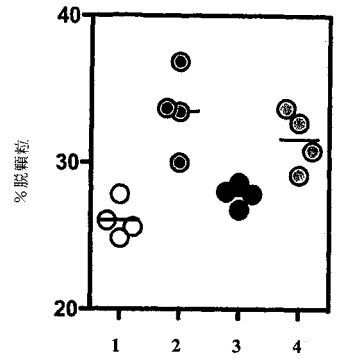


図７

【図８】

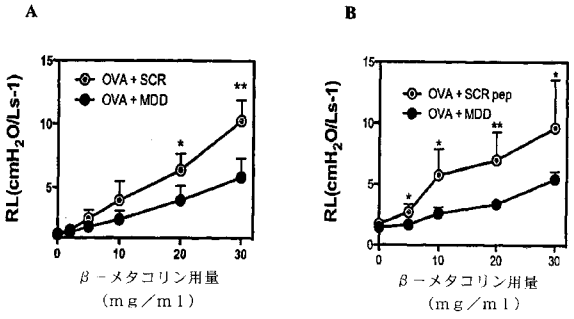


図８

【図９】

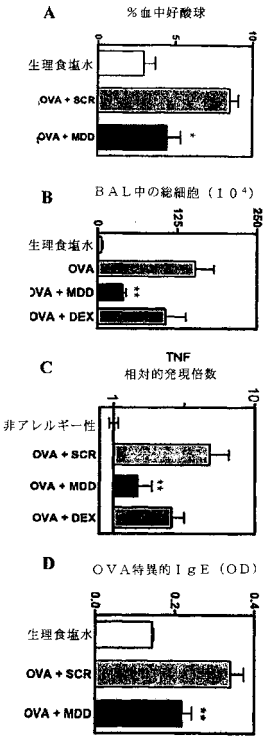


図９

【図１０】

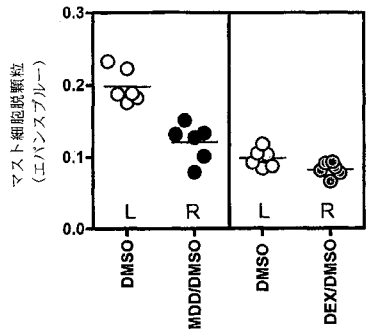


図１０

【図１１】

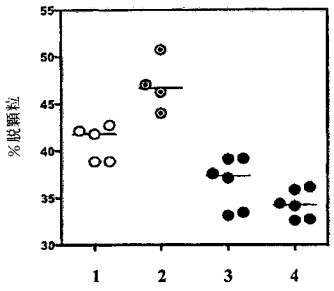


図１１

【配列表】
2010537952000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成21年6月24日(2009.6.24)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
マスト細胞活性化を調節するためのポリペプチドであって、
（ｉ）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）ＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
を含むポリペプチド。
【請求項２】
配列番号７に示されているアミノ酸を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項３】
配列番号１４～１５、１８～１９、１２２～１４４、又は１８５～２７３のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項４】
配列番号１６～１７、２０～１２１、又は１４５～１８４のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項５】

配列番号８に示されているアミノ酸からなる、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項６】
配列番号１０に示されているアミノ酸を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項７】
配列番号３２０～４８８に示されているアミノ酸を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項８】
配列番号２７４～３１９のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項９】
配列番号１１又は配列番号１２に示されているアミノ酸からなる、請求項１に記載のポリペプチド。
【請求項１０】
対象のマスト細胞活性化を阻害又は防止する方法であって、
（ｉ）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）ＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び
（iv）請求項１～１０のいずれかに記載のポリペプチド
のうち少なくとも１つを含む治療有効量のポリペプチドを前記対象に投与するステップを含む方法。
【請求項１１】
マスト細胞活性化がＩｇＥ媒介性である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
マスト細胞活性化が非ＩｇＥ媒介性である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１３】
対象のマスト細胞活性化から生じる過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防するための方法であって、
（ｉ）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）ＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び
（iv）請求項１～１０のいずれかに記載のポリペプチド
のうち少なくとも１つを含む治療有効量のポリペプチドを前記対象に投与するステップを含む方法。
【請求項１４】
対象のアレルギー性疾患又はアレルギー状態を治療するための方法であって、
（ｉ）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、
（iii）ＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン、及び
（iv）請求項１～１０のいずれかに記載のポリペプチド
のうち少なくとも１つを含む治療有効量のポリペプチドを前記対象に投与するステップを含む方法。
【請求項１５】
対象のマスト細胞活性化を阻害又は防止する方法であって、
（ｉ）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）ＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
を含む治療有効量のポリペプチドを前記対象に投与することを含む方法。
【請求項１６】
対象のマスト細胞活性化から生じる過敏性疾患又は過敏性障害を治療又は予防するための方法であって、

（ｉ）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）ＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
を含む治療有効量のポリペプチドを前記対象に投与することを含む方法。
【請求項１７】
過敏性疾患又は過敏性障害が炎症反応を含む、請求項１３又は１６に記載の方法。
【請求項１８】
過敏性疾患又は過敏性障害が、アナフィラキシー、薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、並びに呼吸器疾患及び障害からなる群から選択される、請求項１３、１６又は１７のいずれかに記載の方法。
【請求項１９】
呼吸器疾患又は障害が、ぜん息、アレルギー性ぜん息、内因性ぜん息、職業性ぜん息、急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）、及び慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）からなる群から選択される、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
対象のアレルギー性疾患又はアレルギー状態を治療するための方法であって、
（ｉ）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（ii）ＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
を含む治療有効量のポリペプチドを前記対象に投与することを含む方法。
【請求項２１】
アレルギー性疾患又はアレルギー状態が、アナフィラキシー、アレルギー性薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、及びアレルギー性呼吸器疾患又は呼吸器障害からなる群から選択される、請求項１４又は２０に記載の方法。
【請求項２２】
アレルギー性呼吸器疾患又は呼吸器障害がアレルギー性ぜん息である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
ポリペプチドが、配列番号７に示されているアミノ酸を含む、請求項１４～２２のいずれかに記載の方法。
【請求項２４】
ポリペプチドが、配列番号１４～１５、１８～１９、１２２～１４４、又は１８５～２７３のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む、請求項１４～２２のいずれかに記載の方法。
【請求項２５】
ポリペプチドが、配列番号１６～１７、２０～１２１、又は１４５～１８４のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む、請求項１４～２２のいずれかに記載の方法。
【請求項２６】
ポリペプチドが、配列番号８に示されているアミノ酸からなる、請求項１４～２２のいずれかに記載の方法。
【請求項２７】
ポリペプチドが、配列番号１０に示されているアミノ酸を含む、請求項１４～２２のいずれかに記載の方法。
【請求項２８】
ポリペプチドが、配列番号３２０～４８８に示されているアミノ酸を含む、請求項１４～２２のいずれかに記載の方法。
【請求項２９】
ポリペプチドが、配列番号２７４～３１９のいずれか１つに示されているアミノ酸を含

む、請求項１４～２２のいずれかに記載の方法。
【請求項３０】
ポリペプチドが、配列番号１１又は配列番号１２に示されているアミノ酸からなる、請求項１４～２２のいずれかに記載の方法。
【請求項３１】
マスト細胞活性化から生じる過敏性疾患又は過敏性障害の治療用薬剤を製造するための、
（ｉ）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、及び
（iii）ＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
のうち少なくとも１つを含むポリペプチドの使用。
【請求項３２】
過敏性疾患又は過敏性障害が、アナフィラキシー、薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、並びに呼吸器疾患及び呼吸器障害からなる群から選択される、請求項３１に記載の使用。
【請求項３３】
アレルギー性疾患又はアレルギー性障害が、アナフィラキシー、アレルギー性薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、及びアレルギー性呼吸器疾患又は呼吸器障害からなる群から選択される、請求項３２に記載の使用。
【請求項３４】
アレルギー性疾患又はアレルギー性障害の治療用薬剤を製造するための、
（ｉ）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、又は
（iii）ＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
を含むポリペプチドの使用。
【請求項３５】
アレルギー性疾患又はアレルギー性障害が、アナフィラキシー、アレルギー性薬物反応、皮膚アレルギー、湿疹、アレルギー性鼻炎、じんま疹、アトピー性皮膚炎、接触アレルギー、食物アレルギー、アレルギー性結膜炎、昆虫毒アレルギー、及びアレルギー性呼吸器疾患又は呼吸器障害からなる群から選択される、請求項３４に記載の使用。
【請求項３６】
アレルギー性呼吸器疾患又は呼吸器障害がアレルギー性ぜん息である、請求項３５に記載の使用。
【請求項３７】
ポリペプチドが、配列番号７に示されているアミノ酸を含む、請求項３１～３６のいずれかに記載の使用。
【請求項３８】
ポリペプチドが、配列番号１４～１５、１８～１９、１２２～１４４、又は１８５～２７３のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む、請求項３１～３６のいずれかに記載の使用。
【請求項３９】
ポリペプチドが、配列番号１６～１７、２０～１２１、又は１４５～１８４のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む、請求項３１～３６のいずれかに記載の使用。
【請求項４０】
ポリペプチドが、配列番号８に示されているアミノ酸からなる、請求項３１～３６のいずれかに記載の使用。
【請求項４１】
ポリペプチドが、配列番号１０に示されているアミノ酸を含む、請求項３１～３６のい

ずれかに記載の使用。
【請求項４２】
ポリペプチドが、配列番号３２０～４８８に示されているアミノ酸を含む、請求項３１～３６のいずれかに記載の使用。
【請求項４３】
ポリペプチドが、配列番号２７４～３１９のいずれか１つに示されているアミノ酸を含む、請求項３１～３６のいずれかに記載の使用。
【請求項４４】
ポリペプチドが、配列番号１１又は配列番号１２に示されているアミノ酸からなる、請求項３１～３６のいずれかに記載の使用。
【請求項４５】
マスト細胞の活性化を調節する物質を同定する方法であって、
候補物質とポリペプチドの相互作用を可能にするのに適した条件下で、前記候補物質を
（ｉ）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性２（ＳＨ２）ドメイン、
（ii）ＮＥＤＤ９　Ｓｒｃ相同性３（ＳＨ３）ドメイン、及び
（iii）ＰＨＬＤＡ１プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメイン
のうち少なくとも１つを含む前記ポリペプチドと接触させるステップと、
前記候補物質に結合した前記ポリペプチドの存在下で、前記マスト細胞の活性をアッセイするステップと
を含む方法。
【請求項４６】
マスト細胞の活性をアッセイするステップが、マスト細胞活性化のレベルを測定することを含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
候補作用物質がマスト細胞活性のアゴニストである、請求項４５又は４６に記載の方法。
【請求項４８】
候補作用物質がマスト細胞活性のアンタゴニストである、請求項４５又は４６に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2008/001250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.

C07K 14/435 (2006.01) *A61K 38/57* (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01) *C07K 2/00* (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

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)

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)
WPIDS, EPODOC, Medline, Biosis, CA, with keywords: mast cell, activate, NEDD9, PHLDA1, SH2, SH3 & PH domains, hypersensitivity, anaphylaxis, inflammatory reaction, eczema, asthma, allergy, ARDS, COPD and synonyms.
GenomeQuest: Sequence search: SEQ ID NOs: 1-488

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007010434 A1 (CHIU, H. ET AL.) 11 January 2007 See SEQ ID NO: 399, the Abstract, description paras 0007-0010, 0023-0028, 0616, 0698 and claims 18, 21, 23-24, 27 and 28	1-3, 6-15, 17-25, 28-31, 33, 34, 36-38, 40-42, 44, 45
X	US 2006263774 A1 (CLARK, H. ET AL.) 23 November 2006 See SEQ ID NO: 2042, paras 0015, 0118, 0037, 0061, 0096, 0207, 0208, 0279, 0292 and claims 7, 16, 17	1, 4-14, 16-23, 26-30, 32, 33, 35-40, 42-45

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] 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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
8 October 2008

Date of mailing of the international search report **16 OCT 2008**

Name and mailing address of the ISA/AU
AUSTRALIAN PATENT OFFICE
PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA
E-mail address: pct@ipaustralia.gov.au
Facsimile No. +61 2 6283 7999

Authorized officer
BARBARA AKHURST
AUSTRALIAN PATENT OFFICE
(ISO 9001 Quality Certified Service)
Telephone No : +61262832343

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2008)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2008/001250

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NARULA, S. S. ET AL. 'Solution structure of the C-terminal SH2 domain of the human tyrosine kinase Syk complexed with a phosphotyrosine pentapeptide' Structure (1995) Volume 3, pages 1061-1073 See the Abstract, and section 'Biological implications' first and last paras on pages 1069 and 1070	1, 6, 7, 9-14, 33, 38
X	YU, M. ET AL. 'Scaffolding adapter Grb2-associated binder 2 requires Syk to transmit signals from FcεRI' The Journal of Immunology (2006) Volume 176, pages 2421-2429 See the Abstract, Introduction and Figure 7	1
X	NAHM, D-H. ET AL. 'Identification of fyn-binding proteins in MC/9 mast cells using mass spectrometry' Biochemical and Biophysical Research Communications (2003) Volume 310, pages 202-208 See the Abstract	1
X	IGARASHI, Y. ET AL. 'Ceramide kinase is required for degranulation pathway in mast cell and regulated by Calmodulin/Ca^{2+} and PIP2 through specific interaction with their recognition domains' FEBS Journal (2005) Volume 272, Supplement, page 245, Abstract C5-002 See the whole abstract,	1
X	SILVERMAN, M. A. ET AL. 'Disruption of SLP-76 interaction with Gads inhibits dynamic clustering of SLP-76 and FcεRI signalling in mast cells' Molecular and Cellular Biology (2006) Volume 26, number 5, pages 1826-1838 See the Abstract, 'Materials and Methods' section and page 1832 right column to page 1834, right column, line 1.	40, 43
A	WU, J. N. ET AL. 'Differential requirement for adapter proteins Src Homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa and adhesion- and degranulation-promoting adapter protein in FcεRI signalling and mast cell function' The Journal of Immunology (2004) Volume 172, pages 6768-6774	
A	HAN, M. Y. ET AL. 'FcεRI-ligation induces association of tyrosine phosphorylated proteins with Src homology 2 domains of phospholipase Cγ1 in RBL-2H3 rat basophilic leukemia cells' (1997) Biochemistry and Molecular Biology International Volume 41, Number 5, pages 895-904	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/AU2008/001250

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
US	2007010434	AU	2003291625	CA	2498274	EP	1578364
		WO	2004024097				
US	2006263774	AU	2003284357	CA	2503390	EP	1578367
		WO	2004041170				

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	
Ａ６１Ｐ　17/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00	
Ａ６１Ｐ　27/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/16	
Ａ６１Ｐ　27/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/14	
Ａ６１Ｐ　11/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/00	
Ａ６１Ｐ　11/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06	

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．Ｌｉｎｕｘ

(72)発明者　バンディン　デイビッド　リナレス
オーストラリア国　オーストラリアンキャピタルテリトリー２６０６　ライオンズ　デニスプレイス１４
(72)発明者　ミルバーン　ピーター　ジェイ
オーストラリア国　オーストラリアンキャピタルテリトリー２６０２　オコナー　ミラーストリート８

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA02
4B063 QA18 QQ79 QQ96 QR16 QR58 QR72 QS28 QS36 QX01
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA02 BA22 BA23 NA14 ZA332 ZA342
ZA592 ZA892 ZB112 ZB132
4H045 AA10 BA09 BA20 CA40 EA22 FA34 GA25