

(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2017-524382
(P2017-524382A)

(43) 公表日 平成29年8月31日(2017.8.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	4B065
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4C084
A61P 37/08 (2006.01)	A61P 37/08	4C086
A61K 31/7105 (2006.01)	A61K 31/7105	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-526479 (P2017-526479)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月31日 (2015.7.31)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年3月27日 (2017.3.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/043116
 (87) 国際公開番号 W02016/019246
 (87) 国際公開日 平成28年2月4日 (2016.2.4)
 (31) 優先権主張番号 62/032, 350
 (32) 優先日 平成26年8月1日 (2014.8.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 398076227
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティー
 アメリカ合衆国、メリーランド州 21218、ボルチモア、ノース・チャールズ・ストリート 3400
 (74) 代理人 100189131
 弁理士 佐伯 拓郎
 (74) 代理人 100182486
 弁理士 中村 正展
 (74) 代理人 100158872
 弁理士 牛山 直子
 (74) 代理人 100147289
 弁理士 佐伯 裕子

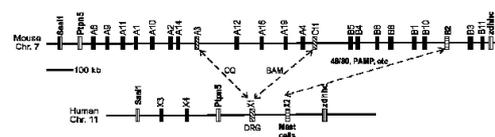
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 偽アレルギー薬物反応を検出するためおよび有害反応を予防する遮断薬を同定するためのMRG PRX2/MRGP RB2発現細胞ベースのアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、偽アレルギー型反応を誘発する化合物を検出するための細胞および方法、ならびに偽アレルギー型反応の重症度を低減させるための方法に関する。

FIG. 1A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

m a s 関連 G タンパク質共役受容体 X 2 (M r g p r X 2) または M r g p r B 2 を発現する組換え核酸を含む、単離細胞。

【請求項 2】

前記組換え核酸が、M r g p r X 2 を発現する、請求項 1 に記載の単離細胞。

【請求項 3】

前記組換え核酸が、M r g p r B 2 を発現する、請求項 1 に記載の単離細胞。

【請求項 4】

G T P 結合タンパク質アルファ 1 5 (G 1 5) を発現する組換え核酸をさらに含む、請求項 1 に記載の単離細胞。

10

【請求項 5】

M r g p r X 2 を発現する前記組換え核酸が、1 つまたは複数の突然変異を含む、請求項 2 に記載の単離細胞。

【請求項 6】

前記 1 つまたは複数の突然変異が、シグナル伝達経路を活性化させることができない M r g p r X 2 タンパク質を産生する、請求項 2 に記載の単離細胞。

【請求項 7】

M r g p r B 2 を発現する前記組換え核酸が、1 つまたは複数の突然変異を含む、請求項 3 に記載の単離細胞。

20

【請求項 8】

前記 1 つまたは複数の突然変異が、シグナル伝達経路を活性化させることができない M r g p r B 2 タンパク質を産生する、請求項 3 に記載の単離細胞。

【請求項 9】

G T P 結合タンパク質アルファ 1 5 (G 1 5) を発現する組換え核酸をさらに含む、請求項 5 に記載の単離細胞。

【請求項 10】

前記単離細胞が、ヒト胎児腎臓 2 9 3 (H E K 2 9 3) 細胞を含む、請求項 1 に記載の単離細胞。

【請求項 11】

化合物を投与することによって誘発された、対象における偽アレルギー型反応の重症度を低減させるための方法であって、

前記化合物を対象に投与するステップと、

M r g p r B 2 または M r g p r X 2 アンタゴニストを前記対象に投与し、それにより、前記対象における偽アレルギー型反応の重症度を低減させるステップとを含む、方法。

30

【請求項 12】

前記アンタゴニストが、抗体およびその断片、結合タンパク質、ポリペプチド、またはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記アンタゴニストが、小分子を含む、請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記アンタゴニストが、核酸分子を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸分子が、二本鎖リボ核酸 (d s R N A)、小ヘアピン R N A もしくは短ヘアピン R N A (s h R N A)、またはアンチセンス R N A、またはそれらの任意の部分を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記アンタゴニストが、前記化合物を前記対象に投与するステップの前に、それと同時に、またはその後投与される、請求項 11 に記載の方法。

50

【請求項 17】

前記アンタゴニストが、局所的に、経口的に、吸入を介して、または注射を介して投与される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 18】

対象における偽アレルギー型反応を治療する方法であって、 $MrgprB2$ または $MrgprX2$ アンタゴニストを前記対象に投与し、それにより、前記対象における前記偽アレルギー型反応を治療するステップを含む、方法。

【請求項 19】

化合物が偽アレルギー型反応を誘発するか否かを決定するための方法であって、請求項 1 に記載の単離細胞を、候補化合物と接触させるステップと、
 $MrgprX2$ または $MrgprB2$ の活性化を検出するステップであって、 $MrgprX2$ または $MrgprB2$ の活性化は、前記候補化合物が偽アレルギー型反応を誘発することを決定するステップとを含む、方法。

10

【請求項 20】

$MrgprX2$ または $MrgprB2$ の活性化が、細胞内カルシウムの増大を同定することによって検出される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記候補化合物が、ロイプロリド、ゴセレリン、ヒストレリン、トリプトレリン、セトロレリクス、ガニレリクス、デガレリクス、オクトレオチド、ランレオチド、パシレオチド、セルモレリン、テサモレリン、イカチバント、酢酸グラチラマー、テリパラチド、プラムリンチド、プレオマイシン、エクセナチド、グルカゴン、リラグルチド、エンフビルチドおよびコリスチメタートからなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記候補化合物が、スクシニルコリン、ツボクラリン、アトラクリウム、ミバクリウムおよびロクロニウムからなる群から選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

$MrgprX2$ または $MrgprB2$ のアンタゴニストを同定するための方法であって、
 請求項 1 に記載の単離細胞を、偽アレルギー型反応を誘発する化合物と接触させるステップと、
 請求項 1 に記載の単離細胞を、候補アンタゴニストと接触させるステップと、
 $MrgprX2$ または $MrgprB2$ の活性化を検出するステップであって、前記化合物の非存在下における $MrgprX2$ または $MrgprB2$ の活性化と比べた $MrgprX2$ または $MrgprB2$ の活性化の減少は、前記候補化合物がアンタゴニストであることを決定するステップとを含む、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

関連出願

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) 項の下で、2014 年 8 月 1 日に提出された米国仮特許出願第 62/032,350 号の優先権を主張するものであり、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、偽アレルギー型反応を誘発する化合物を検出するための細胞および方法、ならびに偽アレルギー型反応の重症度を低減させるための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

多くのアメリカ食品医薬品局 (FDA) 承認薬は、偽アレルギー型反応に、それらの副

50

作用プロフィールの一部として関連する。本明細書において記述されている発明の前に、どの薬物が偽アレルギー型反応を引き起こす可能性が高いかを決定するための細胞株および方法が必要であった。加えて、本明細書において記述されている発明の前に、偽アレルギー型反応の重症度を低減させるための方法およびこれらの応答を遮断するアンタゴニストを発見するためのスクリーニング検査が必要であった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、一部には、mas 関連 G タンパク質共役受容体メンバー X 2 (Mr g p r X 2) または Mr g p r B 2 を発現する組換え核酸を含む単離細胞に基づく。例えば、組換え核酸は、Mr g p r X 2 を発現する。代替として、組換え核酸は、Mr g p r B 2 を発現する。いくつかの場合において、細胞は、GTP 結合タンパク質アルファ 15 (G 15) を発現する組換え核酸をさらに含む。他の場合において、Mr g p r X 2 を発現する組換え核酸は、1 つまたは複数の突然変異を含む。例えば、1 つまたは複数の突然変異は、シグナル伝達経路を活性化させることができない Mr g p r X 2 タンパク質を産生する。代替として、Mr g p r B 2 を発現する組換え核酸は、1 つまたは複数の突然変異を含む。例えば、1 つまたは複数の突然変異は、シグナル伝達経路を活性化させることができない Mr g p r B 2 タンパク質を産生する。いくつかの場合において、この細胞は、GTP 結合タンパク質アルファ 15 (G 15) を発現する組換え核酸をさらに含む。

10

【0005】

好ましくは、単離細胞は、ヒト胎児腎臓 293 (HEK 293) 細胞を含む。

20

【0006】

化合物を投与することによって誘発された、対象における偽アレルギー型反応の重症度を低減させるための方法であって、化合物を対象に投与すること、Mr g p r B 2 または Mr g p r X 2 アンタゴニストを対象に投与し、それにより、対象における偽アレルギー型反応の重症度を低減させることによる方法も提供される。

【0007】

例えば、本明細書において記述されている方法は、偽アレルギー型反応の重症度を、少なくとも 1%、例えば、少なくとも 5%、少なくとも 10%、少なくとも 15%、少なくとも 20%、少なくとも 25%、少なくとも 30%、少なくとも 35%、少なくとも 40%、少なくとも 45%、少なくとも 50%、少なくとも 55%、少なくとも 60%、少なくとも 65%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または少なくとも 99% だけ、低減させる。

30

【0008】

対象は、好ましくは、そのような治療を必要とする哺乳動物、例えば、偽アレルギー型反応またはそれに対する素因があると診断された対象である。哺乳動物は、任意の哺乳動物、例えば、ヒト、霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、ならびに、家畜または食用に育てられた動物、例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ニワトリおよびヤギである。好ましい実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。

40

【0009】

阻害剤またはアンタゴニストは、それらの指定された標的または標的の天然リガンドと結合して生物活性を変調する、核酸、ペプチド、抗体または小分子を包含し得るがこれらに限定されない。

【課題を解決するための手段】

【0010】

一態様において、アンタゴニストは、抗体もしくはその断片、結合タンパク質、ポリペプチド、またはそれらの任意の組み合わせを含む。本明細書において記述されているのは、抗 Mr g p r X 2 抗体である。好適な抗 Mr g p r X 2 抗体は、SAB 2900154 - 50UG (シグマアルドリッチ (登録商標)、ミズーリ州セントルイス)、PA 5 - 3

50

2930 (サーモサイエンティフィック、マサチューセッツ州ウォルサム)、TA317038 (オリジン、メリーランド州ロックビル) および 038585 (ユニテッド・ステイツ・バイオロジカル、マサチューセッツ州ボストン) を包含し、これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。しかしながら、当業者は、本明細書において記述されている方法において使用するためのさらなる抗 Mr g p r X 2 (または抗 Mr g p r B 2) 抗体を容易に同定することができるであろう。いくつかの場合において、本明細書において記述されている抗 Mr g p r X 2 (または抗 Mr g p r B 2) 抗体は、0.1 μg/ml から 500 mg/ml の濃度で投与される。

【0011】

いくつかの場合において、アンタゴニストは、小分子を含む。小分子は、質量が 2000 ダルトン未満の化合物である。小分子の分子質量は、好ましくは 1000 ダルトン未満、より好ましくは 600 ダルトン未満であり、例えば、化合物は、500 ダルトン未満、400 ダルトン未満、300 ダルトン未満、200 ダルトン未満、または 100 ダルトン未満である。

10

【0012】

小分子は、有機または無機である。例示的な有機小分子は、脂肪族炭化水素、アルコール、アルデヒド、ケトン、有機酸、エステル、単糖および二糖、芳香族炭化水素、アミノ酸ならびに脂質を包含するがこれらに限定されない。例示的な無機小分子は、微量ミネラル、イオン、フリーラジカルおよび代謝産物を含む。代替として、小分子は、酵素の結合ポケットを充填するための、断片、または小部分、またはより長いアミノ酸鎖からなるように、合成的に改変され得る。典型的には、小分子は、1 キロダルトン未満である。

20

【0013】

いくつかの場合において、アンタゴニストは、核酸分子を含む。例えば、リボ核酸 (RNA) またはデオキシリボ核酸 (DNA) は、Mr g p r X 2 または Mr g p r B 2 ポリペプチドの発現を阻害し、それにより、Mr g p r X 2 または Mr g p r B 2 の活性を阻害する。いくつかの場合において、核酸は、小分子干渉 RNA (siRNA)、RNA 干渉 (RNAi)、メッセンジャー RNA (mRNA)、小ヘアピン RNA もしくは短ヘアピン RNA (shRNA)、二本鎖リボ核酸 (dsRNA)、アンチセンス RNA もしくはマイクロ RNA、またはそれらの任意の部分を含む。故に、好適な Mr g p r X 2 アンタゴニストは、Mr g p r X 2 siRNA および Mr g p r X 2 shRNA を包含し、そのそれぞれは、例えば、オリジン、メリーランド州ロックビルまたはライフテクノロジーズ、ニューヨーク州グランドアイランドから入手でき、参照により本明細書に組み込まれる。同様に、好適な Mr g p r B 2 アンタゴニストは、Mr g p r B 2 siRNA および Mr g p r B 2 shRNA を包含し、そのそれぞれは、例えば、オリジン、メリーランド州ロックビルまたはライフテクノロジーズ、ニューヨーク州グランドアイランドから入手でき、参照により本明細書に組み込まれる。しかしながら、当業者は、Mr g p r X 2 または Mr g p r B 2 を阻害する / アンタゴナイズするさらなる核酸を容易に同定することができるであろう。

30

【0014】

アンタゴニストは、化合物を対象に投与するステップの前に、それと同時に、またはその後投与される。

40

【0015】

多様な投与経路が利用可能である。例えば、アンタゴニストは、局所的に、経口的に、吸入を介して、または注射を介して、投与される。

【0016】

アンタゴニストの有効量は、0.001 mg/kg から 250 mg/kg 体重、例えば、0.001 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg、75 mg/kg、100 mg/kg、125 mg/kg、150 mg/kg、175 mg/kg、200 mg/kg、225 mg/kg、または 250 mg/kg 体重である。最

50

終的に、主治医または獣医が、適切な量および投薬レジメンを決める。

【0017】

いくつかの場合において、アンタゴニストは、少なくとも1日に1回、少なくとも週に1回、または少なくとも月に1回、投与される。アンタゴニストは、1日、1週間、1か月、2か月、3か月、6か月、9か月、または1年の期間にわたって投与される。いくつかの場合において、アンタゴニストは、毎日、例えば24時間毎に、投与される。または、アンタゴニストは、連続的にまたは1日に数回、例えば、1時間毎に、2時間毎に、3時間毎に、4時間毎に、5時間毎に、6時間毎に、7時間毎に、8時間毎に、9時間毎に、10時間毎に、11時間毎に、または12時間毎に、投与される。

【0018】

対象における偽アレルギー型反応を治療する方法は、Mr g p r B 2またはMr g p r X 2アンタゴニストを対象に投与し、それにより、対象における偽アレルギー型反応を治療することによって行われる。

【0019】

化合物が偽アレルギー型反応を誘発するか否かを決定するための方法は、本明細書において記述されている単離細胞を、候補化合物と接触させること、Mr g p r X 2またはMr g p r B 2の活性化を検出することによって行われ、Mr g p r X 2またはMr g p r B 2の活性化は、候補化合物が偽アレルギー型反応を誘発することを決定する。

【0020】

例えば、Mr g p r X 2またはMr g p r B 2の活性化は、化合物の非存在下における細胞内カルシウムのレベルと比した細胞内カルシウムの増大を同定することによって、検出される。いくつかの場合において、細胞内カルシウムのレベルは、少なくとも1%、例えば、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%だけ、増大する。細胞内カルシウム濃度は、本明細書において記述されている方法または当業者に利用可能なものを利用して決定される。

【0021】

例示的な候補化合物は、ロイプロリド、ゴセリン、ヒストレリン、トリプトレリン、セトロレリクス、ガニレリクス、デガレリクス、オクトレオチド、ランレオチド、パシレオチド、セルモレリン、テサモレリン、イカチバント、酢酸グラチラマー、テリパラチド、プラムリンチド、プレオマイシン、エクセナチド、グルカゴン、リラゲルチド、エンフビルチドおよびコリスチメタートを含む。

【0022】

他の例示的な候補化合物は、スクシニルコリン、ツボクラリン、アトラクリウム、ミバクリウムおよびロクロニウムを含む。

【0023】

候補Mr g p r X 2アンタゴニストは、該アンタゴニストが、Mr g p r X 2ポリペプチドの生物活性を、相殺するもしくは阻害する、減少させる、または抑制することを確認するために、スクリーニングされる。Mr g p r X 2またはMr g p r B 2のアンタゴニストを同定するための方法であって、本明細書において記述されている単離細胞を、偽アレルギー型反応を誘発する化合物と接触させるステップと、本明細書において記述されている単離細胞を、候補アンタゴニストと接触させるステップと、Mr g p r X 2またはMr g p r B 2の活性化を検出するステップであって、候補アンタゴニストの非存在下におけるMr g p r X 2またはMr g p r B 2の活性化と比したMr g p r X 2またはMr g p r B 2の活性化の減少は、候補化合物がアンタゴニストであることを決定するステップと、を含む、方法も提供される。

【0024】

10

20

30

40

50

Mr g p r X 2 または Mr g p r B 2 のアゴニストを同定するための方法であって、本明細書において記述されている単離細胞を、偽アレルギー型反応を誘発する化合物と接触させるステップと、本明細書において記述されている単離細胞を、候補アゴニストと接触させるステップと、Mr g p r X 2 または Mr g p r B 2 の活性化を検出するステップであって、候補アゴニストの非存在下における Mr g p r X 2 または Mr g p r B 2 の活性化と比べた Mr g p r X 2 または Mr g p r B 2 の活性化の増大は、候補化合物がアゴニストであることを決定するステップと、を含む、方法も提供される。

【0025】

定義

特に定義しない限り、本明細書において使用されているすべての技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されている意味を有する。下記の参考文献は、当業者に、本発明において使用されている用語の多くの一般的定義を提供する：The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); および Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)。本明細書において使用される場合、下記の用語は、別段の指定がない限り、以下でそれらに付与される意味を有する。

【0026】

本明細書において記述されている抗体およびその断片は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、dAb (ドメイン抗体)、単鎖、Fab、Fab' および F(ab')₂ 断片、Fv、scFvs を包含するがこれらに限定されない。抗体の断片は、そのそれぞれの抗体の免疫学的活性を保有する。いくつかの実施形態において、抗体の断片は、1500以下、1250以下、1000以下、900以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下、300以下、200以下のアミノ酸を含有する。例えば、タンパク質またはペプチド阻害剤は、1500以下、1250以下、1000以下、900以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下、300以下、200以下、100以下、80以下、70以下、60以下、50以下、40以下、30以下、25以下、20以下、10以下のアミノ酸を含有する。例えば、本発明の核酸阻害剤は、400以下、300以下、200以下、150以下、100以下、90以下、80以下、70以下、60以下、50以下、40以下、35以下、30以下、28以下、26以下、24以下、22以下、20以下、18以下、16以下、14以下、12以下、10以下のヌクレオチドを含有する。

【0027】

用語「抗体」(Ab)は、本明細書において使用される場合、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)および抗体断片を、それらが所望の生物活性を呈する限り、包含する。用語「免疫グロブリン」(Ig)は、本明細書において、「抗体」と交換可能に使用される。

【0028】

「単離された抗体」は、その自然環境の成分から分離されたおよび/または回収されたものである。その自然環境の汚染物質の成分は、抗体への診断的または治療的使用を妨げるであろう材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を包含し得る。好ましい実施形態において、抗体は、(1)ローリー法によって決定される通り、抗体の95重量%を上回る、最も好ましくは99重量%超まで；(2)スピニング・カップ・シークエネーターの使用によってN末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を取得するのに十分な程度まで；または(3)還元または非還元条件下、クマシーブルー、または好ましくは銀染色を使用するSDS-PAGEによって均質性になるまで、精製される。単離された抗体は、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないであろうことから、組換え細胞内にインサイチュで抗体を包含する。しかしなが

10

20

30

40

50

ら、通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製されることになる。

【0029】

基本的な四鎖抗体単位は、2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖から構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である。IgM抗体は、J鎖と呼ばれるさらなるポリペプチドに沿って5つの基本的なヘテロ四量体単位からなり、したがって、10の抗原結合部位を含有し、一方、分泌されたIgA抗体は、重合して、J鎖に沿って2~5つの基本的な4鎖単位を含む多価集合体を形成することができる。IgGの場合、4鎖単位は、概して、約150,000ダルトンである。各L鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖と連結しており、一方、2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに応じて、1つまたは複数のジスルフィド結合によって互いに連結している。各HおよびL鎖は、規則的間隔の鎖間ジスルフィド架橋も有する。各H鎖は、N末端に、可変ドメイン(V_H)、続いて、および鎖のそれぞれについて3つの定常ドメイン(C_H)、ならびに μ およびアイソタイプについて4つの C_H ドメインを有する。各L鎖は、N末端に、可変ドメイン(V_L)、続いて、その他端に定常ドメイン(C_L)を有する。 V_L は V_H と整列しており、 C_L は重鎖の第一の定常ドメイン(C_{H1})と整列している。特定のアミノ酸残基は、軽鎖および重鎖可変ドメインの間に界面を形成すると考えられている。 V_H および V_L の対合は、一緒に単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造および特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, page 71, and Chapter 6を参照されたい。

10

20

【0030】

任意の脊椎動物種由来のL鎖は、それらの定常ドメイン(C_L)のアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)およびラムダ(λ)と呼ばれる2つの明らかに異なる種類のうちの1つに割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。アルファ(α)、デルタ(δ)、イプシロン(ϵ)、ガンマ(γ)およびミュー(μ)と指定された重鎖をそれぞれ有する、5つのクラスの免疫グロブリン: IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがある。およびクラスは、 C_H 配列および機能における比較的わずかな差異に基づいてサブクラスにさらに分割され、例えば、ヒトは、下記のサブクラスを発現する: IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2。

30

【0031】

用語「可変」は、Vドメインのある特定のセグメントが、抗体の間で配列が広く異なるという事実を指す。Vドメインは、抗原結合を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定義する。しかしながら、可変性は、可変ドメインの110アミノ酸スパンの全体にわたって均等に分布していない。代わりに、V領域は、それぞれ9~12アミノ酸長である「超可変領域」と呼ばれる極端な可変性のより短い領域によって分離された、15~30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的不変のストレッチからなる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、シート配置を主に採用しており、シート構造を接続するループを形成し、いくつかの場合において、該構造の一部を形成している、3つの超可変領域によって接続される、4つのFRをそれぞれ含む。各鎖における超可変領域は、FRによって、他の鎖由来の超可変領域とごく近接して一緒に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)を参照)。定常ドメインは、抗体を抗原と結合することに直接的には関わっていないが、抗体依

40

50

存性細胞傷害 (ADCC) における抗体の関与等の種々のエフェクター機能を呈する。

【0032】

用語「超可変領域」は、本明細書において使用される場合、抗原結合を司る抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、概して、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基 (例えば、Kabatナンバリングシステムに従って番号付けした場合、 V_L 内の残基 24 ~ 34 (L1)、50 ~ 56 (L2) および 89 ~ 97 (L3) 前後、ならびに V_H 内の 31 ~ 35 (H1)、50 ~ 65 (H2) および 95 ~ 102 (H3) 前後; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)); および/または「超可変ループ」由来の残基 (例えば、Chothiaナンバリングシステムに従って番号付けした場合、 V_L 内の残基 24 ~ 34 (L1)、50 ~ 56 (L2) および 89 ~ 97 (L3)、ならびに V_H 内の 26 ~ 32 (H1)、52 ~ 56 (H2) および 95 ~ 101 (H3); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987)); および/または「超可変ループ」/CDR由来の残基 (例えば、IMGTナンバリングシステムに従って番号付けした場合、 V_L 内の残基 27 ~ 38 (L1)、56 ~ 65 (L2) および 105 ~ 120 (L3)、ならびに V_H 内の 27 ~ 38 (H1)、56 ~ 65 (H2) および 105 ~ 120 (H3); Lefranc, M. P. et al. Nucl. Acids Res. 27: 209 - 212 (1999), Ruiz, M. et al. Nucl. Acids Res. 28: 219 - 221 (2000)) を含む。場合により、抗体は、Ahoに従って番号付けした場合、下記の点: V_L 内の 28、36 (L1)、63、74 ~ 75 (L2) および 123 (L3)、ならびに V_H 内の 28、36 (H1)、63、74 ~ 75 (H2) および 123 (H3) の1つまたは複数において、対称的挿入を有する; Honneger, A. and Plunkthun, A. J. Mol. Biol. 309: 657 - 670 (2001))。

10

20

【0033】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書において使用される場合、実質的に均質な抗体の集団から取得された抗体を指す、すなわち、該集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る可能な自然発生の突然変異を除き、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一抗原部位に対するものである。さらに、異なる決定因子 (エピトープ) に対する異なる抗体を包含するポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定因子に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されずに合成され得るという点で、有利である。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975) によって最初に記述されたハイブリドーマ方法論によって調製されてもよいし、細菌、真核動物または植物細胞における組換えDNA方法を使用して作製されてもよい (例えば、米国特許第4,816,567号明細書を参照)。「モノクローナル抗体」は、ファージ抗体ライブラリから、例えば、Clackson et al., Nature, 352: 624 - 628 (1991) および Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 - 597 (1991) において記述されている技術を使用して、単離してもよい。

30

40

【0034】

モノクローナル抗体は、重および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一または相同であるのに対し、鎖の残りは、別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一または相同である、「キメラ」抗体、ならびに、それらが所望の生物活性を呈する限り、そのような抗体の断片を包含する (米国特許第4,816,567号明細書; および Morrison et al., Proc. Natl. Acad. S

50

ci. USA, 81:6851-6855 (1984)を参照)。ヒト抗体に由来する可変ドメイン抗原結合配列も提供される。したがって、本明細書における主要な関心対象であるキメラ抗体は、1つまたは複数のヒト抗原結合配列(例えば、CDR)を有し、非ヒト抗体に由来する1つまたは複数の配列、例えば、FRまたはC領域配列を含有する、抗体を包含する。加えて、本明細書における主要な関心対象であるキメラ抗体は、1つの抗体クラスまたはサブクラスおよび別の配列のヒト可変ドメイン抗原結合配列、例えば、別の抗体クラスまたはサブクラスに由来するFRまたはC領域配列を含むものを包含する。本明細書における関心対象であるキメラ抗体は、本明細書において記述されているもの、または非ヒト霊長類(例えば、旧世界ザル、類人猿等)等の異なる種に由来するものに関係する、可変ドメイン抗原結合配列を含有するものも包含する。キメラ抗体は、霊長類化およびヒト化抗体も包含する。

10

【0035】

さらに、キメラ抗体は、レシピエント抗体においてもドナー抗体においても見られない残基を含み得る。これらの変調は、抗体の性能をさらに精緻化するために為される。さらなる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332:323-329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照されたい。

【0036】

「ヒト化抗体」は、概して、非ヒトである供給源からその中に導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有するヒト抗体であるとみなされている。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、「インポート」残基と称され、これらは、典型的には、「インポート」可変ドメインから採取される。ヒト化は、伝統的に、Winterおよび同僚らの方法に準拠して(Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988))、ヒト抗体の対応する配列をインポート超可変領域配列で代用することにより、実施される。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり(米国特許第4,816,567号明細書)、ここでは、実質的にインタクテナヒト可変ドメイン未満が、非ヒト種由来の対応する配列によって代用されている。

20

30

【0037】

「ヒト抗体」は、ヒトによって自然に産生された抗体中に存在する配列のみを含有する抗体である。しかしながら、本明細書において使用される場合、ヒト抗体は、本明細書において記述されている変調および変異体配列を包含する、自然発生のヒト抗体においては見られない残基または変調を含み得る。これらは、典型的には、抗体の性能をさらに精緻化するまたは強化するために為される。

【0038】

「インタクテナ」抗体は、抗原結合部位およびC_L、ならびに少なくとも重鎖定常ドメイン、C_H1、C_H2およびC_H3を含むものである。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)またはそのアミノ酸配列変異体であってよい。好ましくは、インタクテナ抗体は、1つまたは複数のエフェクター機能を有する。

40

【0039】

「抗体断片」は、インタクテナ抗体の一部、好ましくはインタクテナ抗体の抗原結合または可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片; ダイアボディ; 線状抗体(米国特許第5,641,870号明細書; Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]を参照); 一本鎖抗体分子; ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体を包含する。

【0040】

抗体の「機能性断片またはアナログ」という語句は、完全長抗体と共通して定性的な生

50

物活性を有する化合物である。例えば、抗 I g E 抗体の機能性断片またはアナログは、高親和性受容体、F c R I と結合する能力を有することにより、そのような分子の能力を防止するまたは実質的に低減させるような様式で、I g E 免疫グロブリンと結合することができるものである。

【0041】

抗体のパパイン分解は、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一抗原結合断片、および残りの「F c」断片を産生し、呼称は容易に結晶化する能力を反映している。F a b断片は、H鎖の可変領域ドメイン(V_H)に沿ったL鎖全体、および1つの重鎖の第一の定常ドメイン(C_H1)からなる。各F a b断片は、抗原結合に対して一価である、すなわち、単一抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理は、二価抗原結合活性を有する2つのジスルフィド結合F a b断片にほぼ対応し、依然として抗原を架橋させることができる、単一の大きいF(a b')₂断片を産出する。F a b'断片は、C_H1ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインを包含するさらなる少数の残基を有することにより、F a b断片とは異なる。F a b' - S Hは、本明細書において、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持するF a b'を表す呼称である。F(a b')₂抗体断片は、元来、間にヒンジシステインを有するF a b'断片の対として産生されたものである。抗体断片の他の化学的カップリングも公知である。

10

【0042】

「F c」断片は、ジスルフィドによって一緒に保持された両方のH鎖のカルボキシ末端部を含む。抗体のエフェクター機能は、F c領域における配列によって決定され、該領域は、ある特定の種類の細胞において見られるF c受容体(F c R)によって認識される部分でもある。

20

【0043】

「F v」は、完全な抗原認識および結合部位を含有する最小抗体断片である。この断片は、緊密で非共有結合的に会合した、1つの重および1つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。これらの2つのドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する、6つの超可変ループ(それぞれHおよびL鎖に由来する3つのループ)が発する。しかしながら、単一可変ドメイン(または、抗原に特異的な3つのCDRのみを含むF vの半分)であっても、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識し結合する能力を有する。

30

【0044】

「一本鎖F v」は、「s F v」または「s c F v」とも略記され、単一のポリペプチド鎖に接続されたV_HおよびV_L抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、s F vポリペプチドは、V_HおよびV_Lドメインの間に、抗原結合のための所望の構造をs F vに形成させることができるポリペプチドリンカーをさらに含む。s F vの総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and More eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra*を参照されたい。

40

【0045】

用語「ダイアボディ」は、V_HおよびV_Lドメインの間に、Vドメインの鎖内ではなく鎖間対合が実現されるようなショートリンカー(約5~10残基)を持つs F v断片(前段落を参照)を構築して、二価断片、すなわち、2つの抗原結合部位を有する断片をもたらすことによって調製される、小さい抗体断片を指す。二重特異性ダイアボディは、2つの抗体のV_HおよびV_Lドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する2つの「クロスオーバー」s F v断片のヘテロ二量体である。ダイアボディについては、例えば、欧州特許第404,097号明細書;国際公開第93/11161号パンフレット;およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)において、より完全に記述されている。

【0046】

50

本明細書において使用される場合、「内在化する」抗体は、哺乳類細胞（例えば、細胞表面ポリペプチドまたは受容体）上の抗原との結合時に、細胞によって取り込まれる（すなわち、中に入る）ものである。抗体を内在化することは、当然ながら、抗体断片、ヒトまたはキメラ抗体、および抗体コンジュゲートを包含することになる。ある特定の治療応用のために、インビボでの内在化が企図されている。内在化される抗体分子の数は、細胞、とりわけ感染細胞を、死滅させる、またはその成長を阻害するのに十分なまたは妥当なものとなる。抗体または抗体コンジュゲートの効力に応じて、いくつかの場合において、細胞への単一抗体分子の取り込みは、抗体が結合する標的細胞を死滅させるのに十分である。例えば、ある特定の毒素は、抗体にコンジュゲートされた毒素の1分子の内在化が、感染細胞を死滅させるのに十分であるような、死滅させることに高度に強力なものである。

10

【0047】

本明細書において使用される場合、抗体は、検出可能なレベルで、好ましくは、約 10^4 M^{-1} 以上、または約 10^5 M^{-1} 以上、約 10^6 M^{-1} 以上、約 10^7 M^{-1} 以上、または 10^8 M^{-1} 以上の親和定数 K_a で、抗原と反応するならば、「免疫特異性」、抗原「に対して特異的」またはそれと「特異的に結合している」と言われる。抗体の、その同種抗原に対する親和性は、解離定数 K_D としても一般的に表現され、ある特定の実施形態において、Hum2e抗体は、 10^{-4} M 以下、約 10^{-5} M 以下、約 10^{-6} M 以下、 10^{-7} M 以下、または 10^{-8} M 以下の K_D で結合するならば、Meと特異的に結合する。抗体の親和性は、従来技術、例えば、Scatchard et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51: 660 (1949)) によって記述されているものを使用して、容易に決定することができる。

20

【0048】

抗体の、その抗原、細胞または組織に対する結合特性は、概して、例えば、免疫組織化学 (IHC) および/または蛍光活性化細胞分類 (FACS) 等の免疫蛍光ベースのアッセイを包含する免疫検出法を使用して、決定および評価され得る。

【0049】

指定された抗体の「生物学的特徴」を有する抗体は、該抗体を他の抗体から区別する、抗体の生物学的特徴の1つまたは複数を保有するものである。例えば、ある特定の実施形態において、指定された抗体の生物学的特徴を持つ抗体は、指定された抗体によって結合されているものと同じエピトープを結合させるか、かつ/または指定された抗体として一般的なエフェクター機能を有することになる。

30

【0050】

用語「アンタゴニスト抗体」は、最も広い意味で使用され、それが特異的に結合する、エピトープ、ポリペプチドまたは細胞の生物活性を、部分的にまたは完全に遮断する、阻害するまたは中和する抗体を包含する。アンタゴニスト抗体を同定するための方法は、候補アンタゴニスト抗体によって特異的に結合されているポリペプチドまたは細胞を、候補アンタゴニスト抗体と接触させるステップと、ポリペプチドまたは細胞に通常は関連する1つまたは複数の生物学的活性における検出可能な変化を測定するステップと、を含み得る。

40

【0051】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（天然配列Fc領域またはアミノ酸配列変異体Fc領域）に起因する生物学的活性を指し、抗体アイソタイプにより変動する。抗体エフェクター機能の例は、C1q結合および補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC)；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）のダウンレギュレーション；ならびにB細胞活性化を包含する。

【0052】

用語「抗原結合部位」または「結合部」は、免疫グロブリン分子の、抗原結合に關与する部分を指す。抗原結合部位は、重（「H」）および軽（「L」）鎖のN末端可変（「V」）領域のアミノ酸残基によって形成される。「超可変領域」と称される、重および軽鎖

50

のV領域内の3つの高度に分岐するストレッチは、「フレームワーク領域」または「FR」として公知の、より保存されたフランキングストレッチ間に挟まれる。故に、用語「FR」は、免疫グロブリン内の超可変領域間に自然に見られるまたはそれに隣接する、アミノ酸配列を指す。抗体分子において、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域は、三次元空間に互いに対して配置されて、抗原結合表面を形成する。抗原結合表面は、結合抗原の三次元表面と相補的であり、重および軽鎖のそれぞれの3つの超可変領域を、「相補性決定領域」または「CDR」と称する。

【0053】

本明細書において使用される場合、用語「エピトープ」は、免疫グロブリン、scFvまたはT細胞受容体と特異的結合することができる、任意のタンパク質決定因子を包含する。エピトープ決定因子は、アミノ酸または糖側鎖等の分子の化学的に活性な表面分子団からなり、特異的な三次元構造の特徴、および特異的な電荷特徴を有する。例えば、抗体を、タンパク質の、ポリペプチド、線状または非線状ペプチド配列のN末端またはC末端ペプチド、ならびに、第一の抗原のアミノ酸および第二の抗原のアミノ酸を含むエピトープに対して、高めてよい。本明細書において使用される場合、用語「免疫学的結合」および「免疫学的結合特性」は、免疫グロブリン分子と免疫グロブリンが特異的である抗原との間で発生する種類の非共有結合的相互作用を指す。免疫学的結合相互作用の強度または親和性は、相互作用の解離定数(K_d)の観点から表現することができ、ここで、より小さい K_d は、より大きい親和性を表す。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当技術分野において周知の方法を使用して定量化することができる。1つのそのような方法は、抗原結合部位/抗原錯体の形成および解離の速度を測定するステップを伴い、ここで、それらの速度は、錯体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方向において速度に等しく影響を与える幾何学的パラメータによって決まる。故に、「オン速度定数」(K_{on})および「オフ速度定数」(K_{off})の両方を、濃度ならびに会合および解離の実際の速度の計算によって決定することができる(Nature 361:186-87(1993))。 K_{off}/K_{on} の比は、親和性に関係しないすべてのパラメータの取り消しを可能にし、解離定数 K_d と等しい(Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473)。本発明の抗体は、放射性リガンド結合アッセイまたは当業者に公知である同様のアッセイ等のアッセイによって測定した際に、平衡結合定数(K_d)が、 $1\mu\text{M}$ 以下、好ましくは 100nM 以下、より好ましくは 10nM 以下、より好ましくは 1nM 以下、最も好ましくは 100pM から約 1pM 以下である場合に、本明細書において記述されている抗原またはエピトープ(例えば、CTLA、PD1、PDL1、または他の免疫抑制タンパク質および/もしくは腫瘍抗原)と特異的に結合するとされている。

【0054】

本発明は、完全長ポリペプチドおよび核酸の所望の生物活性をそれぞれ呈する(すなわち、MrgprX2またはMrgprB2をアンタゴナイズする)限り、ポリペプチドおよび核酸断片も含む。ほぼすべての長さの核酸断片が用いられる。例えば、長さ約10,000、約5000、約3000、約2,000、約1,000、約500、約200、約100、約50塩基対(すべての中間の長さを包含する)の全長を持つ例証的なポリヌクレオチドセグメントが、本発明の多くの実装に包含される。同様に、ほぼすべての長さのポリペプチド断片が用いられる。例えば、長さで約10,000、約5,000、約3,000、約2,000、約1,000、約500、約1,000、約500、約200、約100、または約50アミノ酸(すべての中間の長さを包含する)の全長を持つ例証的なポリペプチドセグメントが、本発明の多くの実装に包含される。

【0055】

ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは他の作用物質は、精製および/または単離される。具体的には、本明細書において使用される場合、「単離された」または「精製された」核酸分子、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質には、組換え技術によって産生された場合、他の細胞物質もしくは培養培地が、または化学的に合成された場合、

10

20

30

40

50

化学的前駆体もしくは他の化学物質が実質的にない。精製された化合物は、少なくとも60重量%（乾燥重量）の関心対象の化合物である。好ましくは、調製物は、重量で少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも99%の、関心対象の化合物である。例えば、精製された化合物は、重量で、所望化合物の少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、98%、99%、または100%（w/w）のものである。純度は、任意の適切な標準的方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーまたは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析によって測定される。精製されたまたは単離されたポリヌクレオチド（リボ核酸（RNA）またはデオキシリボ核酸（DNA））には、その自然発生の状態では、側面に位置する遺伝子も配列もない。精製されたまたは単離されたポリペプチドには、その自然発生の状態では、側面に位置するアミノ酸も配列もない。「精製された」は、ヒト対象への投与に安全である、例えば、感染性または毒性作用物質を欠いている、滅菌の程度も定義する。

10

【0056】

同様に、「実質的に純粋」が意味するのは、自然にそれに付随する成分から分離されたヌクレオチドまたはポリペプチドである。典型的には、ヌクレオチドおよびポリペプチドは、重量で少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、またはさらには99%であり、それらが自然に結合したタンパク質および自然発生の有機分子がない場合に、実質的に純粋である。

20

【0057】

「単離された核酸」が意味するのは、核酸の由来源である生物の自然発生のゲノムにおいて、側面に位置する遺伝子がない、核酸である。該用語は、例えば、（a）自然発生のゲノムDNA分子の一部であるが、それが自然に発生する生物のゲノムにおいて、分子のその一部の側面に位置する核酸配列の両方が側面に位置していない、DNA；（b）ベクター中に、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA中に、得られる分子がいかなる自然発生のベクターともゲノムDNAとも同一でないような様式で組み込まれた、核酸；（c）合成相補DNA（cDNA）、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって産生された断片、または制限断片等の別個の分子；ならびに（d）雑種遺伝子、すなわち、融合タンパク質をコードする遺伝子の一部である、組換えヌクレオチド配列を網羅する。本発明による単離された核酸分子は、合成的に産生された分子、ならびに化学的に改変されたおよび/または修飾された骨格を有する任意の核酸をさらに包含する。例えば、単離された核酸は、精製されたcDNAまたはRNAポリヌクレオチドである。単離された核酸分子は、メッセンジャーリボ核酸（mRNA）分子も包含する。

30

【0058】

「候補化合物」が意味するのは、それが自然発生するまたは人工的に誘導される化学物質である。候補化合物は、例えば、ペプチド、ポリペプチド、合成有機分子、自然発生の有機分子、核酸分子、ペプチド核酸分子、ならびにそれらの成分および誘導体を包含し得る。

【0059】

用語「医薬組成物」が意味するのは、少なくとも1つの治療的または生物学的活性剤を含有し、患者への投与に好適な、任意の組成物である。これらの製剤のいずれも、当技術分野の周知かつ認められている方法によって調製することができる。例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, (ed. A. R. Gennaro), Mack Publishing Co., Easton, Pa., 2000を参照されたい。

40

【0060】

「分泌促進物質」が意味するのは、別の物質を分泌させる物質である。

【0061】

「Gタンパク質共役受容体（GPCR）」が意味するのは、細胞外の分子を感知し、細胞内で、シグナル伝達経路および最終的に細胞応答を活性化させる、タンパク質受容体で

50

ある。GPCRは、細胞膜を7回通過することから、7回膜貫通型受容体と呼ばれている。

【0062】

「アゴニスト」が意味するのは、受容体と結合し、受容体を活性化させて生物学的応答を産生する、化学物質である。アゴニストが作用を引き起こすのに対し、「アンタゴニスト」はアゴニストの作用を遮断し、逆アゴニストはアゴニストの作用とは逆の作用を引き起こす。本明細書において使用される場合、用語「アンタゴニスト」および「阻害剤」は、その標的分子の生物活性を相殺するもしくは阻害する、減少させる、または抑制する、任意の分子を指すために、交換可能に使用される。好適なMrgrprX2またはMrgrprB2アンタゴニストは、可溶性受容体、ペプチド阻害剤、小分子阻害剤、リガンド融合および抗体を包含する。

10

【0063】

「野生型」または「WT」が意味するのは、それが自然界において発生する場合の、種の典型的な形態の表現型である。あるいは、野生型は、非標準的な「突然変異体」対立遺伝子によって産生されるものとは対照的に、遺伝子座で標準的な「正常な」対立遺伝子の生成物として概念化されている。

【0064】

用語「偽アレルギー」は、真のアレルギーと同様のその提示に因んで命名されたが別の原因によるものである状態を指す。これは、ヒスタミンの代謝における改変によるものであってよい。「偽アレルギー」は、抗体IgE非依存性アレルギー様反応を意味する。換言すれば、偽アレルギーは、IgEがアレルギー様反応を誘発することを必要としない。

20

【0065】

用語「投与すること」は、本明細書において使用される場合、MrgrprB2またはMrgrprX2アンタゴニストを、例えば、偽アレルギー型反応の重症度の低減を必要とする対象に、伝達する、送達する、導入する、または輸送する、任意の方式を指す。そのような方式は、経口、局所、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮内、鼻腔内および皮下投与を包含するがこれらに限定されない。

【0066】

「MrgrprB2またはMrgrprX2アンタゴニスト」が意味するのは、MrgrprB2またはMrgrprX2の能力を、遮断し、防止し、低下させ、改変して、シグナル伝達経路を活性化させることができる、任意の小分子、化学化合物、抗体、核酸分子もしくはポリペプチド、またはそれらの断片である。

30

【0067】

「改変」が意味するのは、本明細書において記述されているもの等の当技術分野において公知である標準的方法によって検出した際の、ポリペプチド、例えばMrgrprB2またはMrgrprX2の活性における変化（増大または減少）である。本明細書において使用される場合、改変は、遺伝子またはポリペプチドの発現レベルまたは活性における10%以上の変化、好ましくはポリペプチドの活性における25%の変化、より好ましくは40%の変化、最も好ましくは50%以上の変化を包含する。

【0068】

本明細書において使用される場合、「改変」は、遺伝子またはポリペプチドの発現レベルまたは活性における2倍以上の、例えば、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、100倍、500倍、1000倍以上の変化も包含する。

40

【0069】

「寛解させる」が意味するのは、例えば、偽アレルギー型反応等の疾患の発病または進行を、減少させる、抑制する、軽減する、和らげる、停止させる、または安定させることである。

【0070】

「増幅する」が意味するのは、分子の複製の数を増大させることである。一例において、核酸を増幅するためにポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が使用される。

50

【0071】

「結合」が意味するのは、分子に対する物理化学的親和性を有することである。結合は、本発明の方法のいずれか、例えば、細胞上に受容体が発現された薬物/化合物によって、測定される。

【0072】

本開示において、「を含む (comprises)」、「を含む (comprising)」、「を含有する」、「を有する」等は、米国特許法においてそれらに与えられている意味を有することができ、「を包含する (includes)」、「を包含する (including)」等を意味することができ、用語「から本質的になる」または「本質的になる」は、同様に、米国特許法において与えられている意味を有し、これらの用語は、オープンエンドであり、列挙されているものの基本的なまたは新規の特徴が、列挙されている以上のものの存在によって変更されない限り、列挙されている以上のものの存在を許可するが、先行技術の実施形態は除外する。

10

【0073】

「検出する」は、検出されるシグナル伝達経路の Mr g p r B 2 または Mr g p r X 2 活性化の、存在、非存在または量を、直接的にまたは間接的にのいずれかで同定することを指す。

【0074】

「有効量」が意味するのは、未治療患者に関連して疾患の症状を寛解させるために必要とされる量である。疾患の治療的処置のために本発明を実践するために使用される活性化化合物の有効量は、投与の様式、対象の年齢、体重および全体的な健康に応じて変動する。最終的に、主治医または獣医が、適切な量および投薬レジメンを決めるであろう。そのような量を、「有効」量と称する。

20

【0075】

用語「治療すること」および「治療」は、本明細書において使用される場合、症状の重症度および/もしくは頻度の低減を達成する、症状および/もしくはそれらの根本原因を排除する、ならびに/または損傷の改良もしくは改善を容易にするように、有害な状態、障害または疾患を患っている臨床症状を示す個体への、作用物質または製剤の投与を指す。

【0076】

本明細書において提供される範囲は、該範囲内の値のすべての省略表現であると理解される。例えば、1から50の範囲は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50からなる群からの、任意の数、数の組み合わせ、またはサブ範囲、ならびに、例えば、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8および1.9等、前述の整数間のすべての介在する十進法の値を包含すると理解される。サブ範囲に対して、範囲のいずれかの端点から伸長する「入れ子になったサブ範囲」が具体的に企図されている。例えば、1から50の例示的な範囲の入れ子になったサブ範囲は、一方向に、1から10、1から20、1から30および1から40、または逆方向に、50から40、50から30、50から20および50から10を含んでよい。

30

40

【0077】

「組換え」が意味するのは、複数の供給源からの遺伝物質を一緒にして、そうでなければ生物有機体においては見られないであろう配列を作成するための、遺伝子組換え(分子クローニング等)の実験室的方法によって形成された核酸分子である。

【0078】

「異種プロモータ」は、遺伝子または核酸配列が自然界において動作可能に結合しているプロモータとは異なるプロモータである。用語「動作可能に結合している」は、核酸発現制御配列(プロモータ、シグナル配列、または転写因子結合部位のアレイ等)と第二の

50

核酸配列との間の機能的結合を指し、ここで、発現制御配列は、第二の配列に対応して核酸の転写および/または翻訳に影響を及ぼす。「異種ポリヌクレオチド」または「異種遺伝子」は、本明細書において使用される場合、外の供給源を起源として特定の宿主細胞へ、または、同じ供給源からであれば、その元の形態から変調されたものである。

【0079】

「低減させる」が意味するのは、少なくとも10%、25%、50%、75%、または100%の負の改変である。

【0080】

「基準」が意味するのは、標準または対照条件である。

【0081】

具体的に記載がない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書において使用される場合、用語「1つの(a)、(an)」および「この(the)」は、単数形または複数形であると理解される。具体的に記載がない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書において使用される場合、用語「または」は、包含的であると理解される。

【0082】

具体的に記載がない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書において使用される場合、用語「約」は、当技術分野における一般公差の範囲内、例えば、平均の2標準偏差内であると理解される。約は、記載されている値の、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、または0.01%以内であると理解することができる。文脈から別段に明らかでない限り、本明細書において提供されるすべての数値は、用語「約」によって修飾されている。

【0083】

本発明の他の特色および利点は、その好ましい実施形態の下記の記述から、および請求項から明らかであろう。別段の定義がない限り、本明細書において使用されるすべての技術および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書において記述されているものと同様のまたは同等の方法および材料を、本発明の実践または試験において使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記述する。本明細書において引用されているすべての公開外国特許および特許出願は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書において引用されている受託番号によって示されるジーンバンクおよびNCBI寄託は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書において引用されているすべての他の公開された参考文献、文書、原稿および科学文献は、参照により本明細書に組み込まれる。矛盾する場合、定義を包含する本明細書が優先するものとする。加えて、材料、方法および例は、例証的なものにすぎず、限定を意図するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】図1Aは、マウスにおける拡大した遺伝子ファミリーならびに同様の発現パターンおよびアゴニスト特異性に基づくそれらの同定されたヒトオルソログを例証する、マウスおよびヒトMrgrpゲノム遺伝子座の図である。マウスMrgrp遺伝子(上部に名称を伴う縦棒として示されている)は、染色体7上でクラスタ化する。マウスMrgrpA3(A3)およびMrgrpC11(C11)は、ヒトMrgrpX1(X1)のオルソログであり、後根神経節(DRG)ニューロンにおいて特異的に発現され、クロロキン(CQ)およびBAM8-22(BAM)に誘発されたかゆみを媒介するかゆみ受容体として機能する。マウスMrgrpB2(B2)、ヒトMrgrpX2(X2)のオルソログの発現およびアゴニスト特異性については、以下で記述する。図1Bは、マウス腹膜肥満細胞におけるMrgrpB2転写産物(矢印)の同定された発現をスクリーニングする、ストリンジェントな逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)からの結果を示す。Mrgrp遺伝子名は、ゲル写真の上部に示されている。逆転写酵素がcDNA合成反応から省かれた場合、バンドは見られなかった(陰性)。図1Cは、MrgrpB2またはMrgrpX2のプラスミド駆動発現を一過性にトランスフェクトし、20μM PAM

10

20

30

40

50

P (9 ~ 2 0) の浴適用 (bath application) (上部に黒色線によって示された持続期間) に暴露した H E K 2 9 3 細胞からの、レシオメトリック F u r a - 2 イメージングによって測定した際の、細胞内カルシウム濃度 $[C a ^ { 2 + }] _ i$ の例示的なトレースを示す。各トレースは、独自の細胞からの応答である。図 1 D は、B A C トランスジェニックマウス組織からの代表的な共焦点画像を示す一連の顕微鏡写真である。M r g p r B 2 オープン・リーディング・フレームにおいて e G F P - C r e を発現している B A C マウスを、R o s a 2 6 - l o x P - S T O P - l o x P - t d T o m a t o レポーターマウスと交尾させた。したがって、t d T o m a t o の発現は、M r g p r B 2 プロモータの制御下にある C r e の発現パターンによって決定される。t d T o m a t o (赤色) 発現を、肥満細胞のマーカであるアビジン染色 (緑色) と比較した。2 つのマーカ一間のほぼ 1 0 0 % の重複は、M r g p r B 2 が肥満細胞において特異的に含有されていることを示唆している。心臓を除くすべての組織について 3 匹のマウスを調査し、心臓については 2 匹のマウスを調査した。t d T o m a t o 陽性でもあったアビジン陽性肥満細胞のパーセンテージ：無毛皮膚、9 7 . 5 % ; 有毛皮膚、9 0 . 1 % ; 気管、9 7 . 2 % ; 心臓、8 7 . 1 % 。アビジン陽性でもあった t d T o m a t o 陽性細胞のパーセンテージ：無毛皮膚、9 9 . 2 % ; 有毛皮膚、1 0 0 % ; 気管、9 8 . 3 % ; 心臓、9 9 % 。各組織において計数された細胞の総数は、1 0 0 超であった心臓を除いて、3 0 0 超であった。心臓肥満細胞は、組織中の他の場所よりも密度がはるかに高いことから、体腔付近で調査し；t d T o m a t o について陰性であったアビジン陽性細胞は、筋肉組織中にごく少数で包埋されていることが観察されたが、それらの同定は不明瞭であった。スケールバーは 2 0 μm である。

【図 2】図 2 A (左) は、抗 I g E (5 $\mu g / m l$) または化合物 4 8 / 8 0 (1 0 $\mu g / m l$) の浴適用によって誘発された F l u o - 4 イメージングによってアッセイした際の、 $[C a ^ { 2 + }] _ i$ の変化を示すマウス腹膜肥満細胞の代表的なヒートマップ画像を示す一連の顕微鏡写真である。図 2 A (中) は、代表的なイメージングトレースを示す。各色の線は、個々の細胞を表す。「抗 I g E」パネルにおける黒色線は、各遺伝子型の平均トレースである。注記： $[C a ^ { 2 + }] _ i$ トレースは、W T および M U T 群の間で同様である。図 2 A (右) は、応答している細胞のパーセンテージの定量化を示す。細胞は、 $[C a ^ { 2 + }] _ i$ が少なくとも 1 0 秒につき少なくとも 5 0 % 上昇したならば応答しているとして同定され、これは、リガンド誘発性応答を無作為なちらつき事象から明らかに区別するものである。これらおよびすべての他の実験についてのグループデータを、平均 \pm 標準誤差として表現する。片側不對スチューデント t 検定を使用して、統計的比較における有意性を決定し、差異を、 $p < 0 . 0 5$ 。* *、 $p < 0 . 0 1$ で有意とみなした (各遺伝子型について $n = 3$; 各条件について 1 5 0 を上回る細胞が計数された)。抗 I g E 応答は、有意に異なっていなかった。スケールバーは 1 0 μm である。図 2 B は、4 8 / 8 0 (3 0 $\mu g / m l$) に 3 7 で 3 0 分間の暴露後の、W T および M r g p r B 2 ^{M U T} マウス由来の気管および腹部皮膚から上清中へのヒスタミン放出を示す棒グラフである。上清中に放出されたヒスタミンの量を定量化し、 ng / mg 組織 (湿重量) で表現した。* *、 $p < 0 . 0 1$ (気管については $n = 5$ 、皮膚については $n = 8$)。図 2 C は、一連のグラフである。図 2 C (上) は、4 8 / 8 0 (3 0 $\mu g / m l$) または卵子 (1 0 $\mu g / m l$; すなわち I g E 依存性) に応答した、W T および M r g p r B 2 ^{M U T} マウスから単離された気管 (事前にオポアルブミン (卵子) に感作されたもの) の収縮を示す代表的なトレースを示す。図 2 C (下) は、実験の終わりに添加された 1 0 μM のカルバミルコリンへの応答として決定された、最大総収縮の平均データを示す。4 8 / 8 0 W T については $n = 5$ 、4 8 / 8 0 M r g p r B 2 ^{M U T} については 3。図 2 D は、一連の写真および 4 8 / 8 0 (右、矢印、1 0 $\mu g / m l$ 、生理食塩水中 5 μl) または生理食塩水 (左) の足底内注射の 1 5 分後のエバンスブルー溢出の代表的な画像を示す棒チャート (左) である。図 2 D (右) は、足へのエバンスブルー漏出の定量化および 1 5 分後の足の厚みの増大を示す。*、 $p < 0 . 0 2$ ($n = 5 / W T$ 、 $n = 6 / M r g p r B 2 ^{M U T}$)。生理食塩水注射後の差異は有意ではなかった。図 2 E は、F l u o - 4 イメージングを使用し

てアッセイした、M r g p r X 2 リガンドおよび塩基性分泌促進物質に対するWTおよびM r g p r B 2 ^{M U T} 肥満細胞応答性の定量化を示す棒チャートである。物質の濃度(単位μM): P A M P (9~20)、20; コルチスタチン-14 (c o r t .)、20; 物質P (s u b P)、200; カリジン、200; マストパン(m a s t o .、スズメバチ毒の成分)、20; スズメバチマストパン、20。n = 3 / 遺伝子型; 150を上回る細胞が計数された / 分泌促進物質。データを、平均±標準誤差(S E M)として提示する。両側不對スチューデントt検定を使用して、統計的比較における有意性を決定し、差異を、注記のない限り、p < 0 . 0 5。*、p < 0 . 0 5。* *、p < 0 . 0 1で有意とみなした。

【図3】図3Aは、M r g p r B 2 が肥満細胞応答性およびペプチド性治療薬の副作用を媒介することを示す棒チャートである。図3Aは、F l u o - 4 イメージングを使用してアッセイした、薬物適用後のWTおよびM r g p r B 2 ^{M U T} 腹膜肥満細胞由来の応答している細胞のパーセンテージを示す。薬物の濃度(単位μg/ml): イカチバント、50; セトロレリクス、20; ロイプロリド、100; オクトレオチド、10; セルモレリン、60; インスリン、80。n = 3 / 遺伝子型; 150を上回る細胞が計数された / 物質、インスリンについて計数された100超の細胞を除く。インスリン応答性の間の差異は、有意ではなかった。図3B(左)は、イカチバント(右、矢印、10mg/ml、生理食塩水中5μl)または生理食塩水(左)の足底内注射の15分後の、エバンスブルー溢出の代表的な画像を示す。図3B(右)は、15分後の足へのエバンスブルー漏出の定量化を示す。* *、p < 0 . 0 1(各遺伝子型についてn = 6)。生理食塩水注射後の差異は、有意ではなかった。図3Cは、名前が挙げられた物質とともにインキュベーション後の、WT(赤色のひし形)およびM r g p r B 2 ^{M U T}(黒色の正方形)マウスからの総ヒスタミン放出を示す一連のドットプロットである。WTおよびM r g p r B 2 ^{M U T}細胞の間には、抗I g E抗体のいずれの用量においても有意差が見られなかった。実験を3回超繰り返し返した。データを、平均±S E Mとして提示する。両側不對スチューデントt検定: *、p < 0 . 0 5。* *、p < 0 . 0 1。

【図4】図4Aは、化合物48/80およびより強力であると報告されている環化バリアントの一連の構造である。テトラヒドロイソキノリン(T H I Q)モチーフは青色で強調表示されている。図4Bは、すべてのN M B Dクラスの代表的なメンバーの一連の構造である。T H I Qモチーフは青色で強調表示されている。スクシニルコリンのみが大きい疎水性基を欠いていることに留意されたい。図4Cは、M r g p r B 2 が、小分子治療薬の肥満細胞応答性および副作用を媒介することを示す棒チャートである。図4Cは、F l u o - 4 イメージングを使用してアッセイした、種々のN M B Dの適用後の、WTおよびM r g p r B 2 ^{M U T}腹膜肥満細胞由来の応答している細胞のパーセンテージを示す。薬物の濃度(単位μg/ml): アトラクリウム、50; ミバクリウム、20; ツボクラリン、30; ロクロニウム、500。n = 3マウス / 遺伝子型; 150を上回る細胞が計数された / 物質。図4Dは、シプロフロキサシンの構造の描写であり、すべてのフルオロキノロンに共通のモチーフは青色で強調表示されている。キノロンモチーフの近くの窒素に留意されたい。図4Eは、F l u o - 4 イメージングを使用してアッセイした、フルオロキノロン適用後の、WTおよびM r g p r B 2 ^{M U T}腹膜肥満細胞由来の応答している細胞のパーセンテージを示す棒チャートである。薬物の濃度(単位μg/ml): シプロフロキサシン、200; レポフロキサシン、500; モキシフロキサシン、160; オフロキサシン、400。n = 3マウス / 遺伝子型; 150を上回る細胞が計数された / 物質。図4Fは、時刻0におけるシプロフロキサシン(125μlの生理食塩水中1.5mg)の静脈注射後の体温の変化を示す折れ線グラフである。n = 4マウス / 遺伝子型。データを、平均±S E Mとして提示する。両側不對スチューデントt検定: *、p < 0 . 0 5。* *、p < 0 . 0 1。

【図5】図5Aは、M r g p r X 1 オルソログが、ナイーブ条件下で肥満細胞において示差的レベルで発現されていないことを示すプロットの写真である。図5Aは、M r g p r X 1 オルソログM r g p r A 3 およびM r g p r C 1 1の発現について、腹膜肥満細胞に

10

20

30

40

50

おける低ストリンジェンシーRT-PCRスクリーニングからの結果を示す。矢印は、予測されるバンドサイズを指し示す。図5Bは、Mr g p r X 1およびMr g p r C 1 1アゴニストウシ副腎髄質由来ペプチド、断片8~22 (B A M 8~22、500nM)に应答する腹膜肥満細胞のパーセンテージを示す棒チャートである。Fluo-4色素のイメージングを使用して、細胞内カルシウムの上昇を測定することにより、活性化をアッセイした。差異は有意ではなかった ($p = 0.39$)。グループデータを、平均±標準誤差として表現する。両側不對スチューデントt検定を使用して、統計的比較における有意性を決定した。図5Cは、Mr g p r X 2、Mr g p r B 2、およびMr g p r B 2と最も密接に関係している他のマウスMr g p r (すなわち、Mr g p r B 1、B 1 0、およびB 1 1)のプラスミド駆動発現を一過性にトランスフェクトしたHEK293細胞による、Mr g p r X 2リガンドおよびMr g p r X 1リガンドクロロキン(CQ)に対する应答をまとめたチャートである。陽性および陰性应答は、それぞれ「チェック」および「バツ印」として示される。トランスフェクト細胞の少なくとも半分が[Ca²⁺]_iの50%増大を示した場合、应答は陽性とみなされた。Mr g p r B 1、B 1 0、およびB 1 1をトランスフェクトした細胞は、いかなる収載されている薬物に対しても应答しなかった。

【図6】図6Aは、HEK293細胞において発現されたマウスMr g p r B 2およびヒトMr g p r X 2を活性化させる偽アレルギー反応を誘発する塩基性分泌促進物質および薬物を示す一連の折れ線グラフである。図6Aは、Mr g p r B 2およびG 1 5を発現しているHEK293細胞から、Fluo-4イメージングによって測定した際の、[Ca²⁺]_iの変化を示すトレース例を示す。図6Bは、Mr g p r X 2およびG 1 5を発現しているHEK293細胞から、Fluo-4イメージングによって測定した際の、[Ca²⁺]_iの変化を示すトレース例である。物質は、シプロフロキサシンを除いて30から90秒の間の期間にわたって灌流させ、シプロフロキサシンは、それが溶解する低pH溶液への暴露を最小化するために、30から60秒の間の期間にわたって灌流させた。インスリンを陰性対照として使用した。図6Cは、Mr g p r B 2およびMr g p r X 2発現HEK293細胞を活性化させる偽アレルギー反応に関連する塩基性分泌促進物質および薬物のEC50の表である。EC50は、3回繰り返した用量应答研究から決定した。データを、平均±SEMとして表現する。

【図7】図7は、BACトランスジェニックマウスの複数の系統が肥満細胞特異的Mr g p r B 2発現を確認することを示す一連の顕微鏡写真である。図7は、2つの他のBACトランスジェニックマウス系統からの代表的な共焦点画像を示す。Mr g p r B 2オープン・リーディング・フレームにおいてeGFP-Creを発現しているBACマウスを、tdTomatoレポーターマウスと交尾させ、tdTomato(赤色)発現を、肥満細胞のマーカであるアビジン染色(緑色)と比較した。スケールバーは20μmである。

【図8】図8A~図8Bは、Mr g p r B 2が、粘膜肥満細胞においても末梢白血球においても発現されないことを示す。図8Aは、粘膜肥満細胞を標識するために抗MCP1(-キマーゼ)抗体で染色されたMr g p r B 2-t d T o m a t oマウス由来の胃の切片の代表的な画像を示す。白色矢印は、陽性細胞を示す。二重標識された細胞はなかった(296のMcp1標識細胞および275のtdTomato陽性細胞が計数された、 $n = 3$ マウス)。スケールバーは40μmである。図8Bは、Mr g p r B 2発現細胞(赤色;左画像)およびHoechst33342核染色(青色;右画像)についてtdTomatoで二重標識されたMr g p r B 2-t d T o m a t oマウス由来の末梢白血球のサイトスピン調製物の代表的な画像を示す。末梢白血球はMr g p r B 2を発現しなかった($n = 3$ マウス; 4000超の細胞を調査した)。スケールバーは40μmである。

【図9】図9A、図9B、図9Cおよび図9Dは、Mr g p r B 2^{MUT}マウスが機能的ノックアウトであることを示す。図9Aは、Mr g p r B 2遺伝子座の中または周囲のゲノム領域の例証である。長い散在要素(LINE)、短い散在要素(SINE)および長いタンデム反復(LTR)を包含する反復配列は、Mr g p r B 2遺伝子の3'側直後に

10

20

30

40

50

開始し、加えて、5'側の2.5 kb以内に存在することに留意されたい。Mr g p r B 2の3'端に隣接する500塩基をクエリーとして使用した2014年3月のBLAST Nサーチはマウスゲノムにおいて269,000超のヒットを発見した。図9Bは、突然変異体における4塩基対欠失の位置を示すWTおよびMUTゲノム配列の比較である。数は、Mr g p r B 2オープン・リーディング・フレームに対応している。図9Cは、突然変異株が確立された後に生後18か月のマウスから試料採取されたWTおよびMUT cDNAのシーケンシング結果である。突然変異体における欠落している塩基は赤色で強調表示されている。図9Dは、欠失が、第一の膜貫通領域の後まもなくフレームシフト突然変異および早期終止コドン(*)を作成することを明らかにする、Mr g p r B 2^{MUT}オープン・リーディング・フレームのアミノ酸翻訳である。Mut-フレームシフト欠失の部位。TM1-膜貫通領域1。

【図10】図10A~図10Bは、肥満細胞数ならびに気管および皮膚組織のヒスタミン含有量が、野生型およびMr g p r B 2^{MUT}動物の間で異なっていなかったことを示す、一連の顕微鏡写真および棒チャートである。図10A(上)は、WTおよびMr g p r B 2^{MUT}マウスにおけるアビジン染色の代表的な写真を示す。スケールバーは40μmである。図10A(下)は、種々の組織における肥満細胞数の定量化を示す。両側不对スチューデントt検定を使用して、差異は有意ではなかった(各遺伝子型についてn=3マウス;有毛および無毛皮膚では各遺伝子型についてそれぞれ3000μm²および1000μm²を上回って計数された;10,000を上回る腹腔細胞が計数された)。図10Bは、気管ヒスタミン含有量がそれぞれ平均5.9±0.9および5.5±1.6ng/mg(各遺伝子型についてn=5)であり、皮膚ヒスタミン含有量がそれぞれ平均30.8±3.2および30.2±4.0ng/mg(各遺伝子型についてn=8)であったことを示す。差異は有意ではなかった。グループデータを、平均±標準誤差として表現する。両側不对スチューデントt検定を使用して、統計的比較における有意性を決定した。

【図11】図11A、図11Bおよび図11Cは、それぞれ、一連の顕微鏡写真、折れ線グラフおよび棒チャートであり、これらは、Mr g p r B 2^{MUT}および野生型肥満細胞におけるETA GPCR1に誘発された同程度の活性化を介して作用するエンドセリンを示す。図11Aは、エンドセリン(1μM)の浴適用によって誘発されたFluo-4イメージングによってアッセイした際の、[Ca²⁺]_iの変化を示すマウス腹膜肥満細胞の代表的なヒートマップ画像を示す。スケールバーは10μmである。図11Bは、WT(赤色線)およびMr g p r B 2^{MUT}(黒色線)について[Ca²⁺]_iイメージングトレースの平均を示す。[Ca²⁺]_iトレースは、WTおよびMUT群間で同様である。トレースを、図2Aについて記述されている通りに平均化した。図11Cは、応答している細胞のパーセンテージの定量化を示す。グループデータを、平均±標準誤差として表現する。両側不对スチューデントt検定を使用して、統計的比較における有意性を決定した(各遺伝子型についてn=3;各遺伝子型について180を上回る細胞が計数された)。エンドセリン誘発性応答は、有意に異なっていなかった。

【図12】図12Aおよび図12Bは、IgE媒介性炎症が、野生型およびMr g p r B 2^{MUT}マウスの間で異なっていないことを示す。図12Aは、抗IgE抗体(右、矢印、100μg/ml、生理食塩水中7μl)または生理食塩水(左)の足底内注射の15分後のエバンスブルー溢出の代表的な画像を示す。図12Bは、15分後の足へのエバンスブルー漏出の定量化を示す(WTについてはn=6、Mr g p r B 2^{MUT}についてはn=7)。抗IgE抗体(p=0.49)および生理食塩水(p=0.23)注射後の差異は、有意ではなかった。グループデータを、平均±標準誤差として表現する。両側不对スチューデントt検定を使用して、統計的比較における有意性を決定した。

【図13】図13A、図13B、図13C、図13Dおよび図13Eは、Mr g p r B 2^{MUT}肥満細胞が、塩基性分泌促進物質および種々の治療薬に対して不応性であることを示す。図13Aは、図2Eからの塩基性分泌促進物質によって誘発されたWTおよびMr g p r B 2^{MUT}腹膜肥満細胞から、Fluo-4イメージングによって測定した際の、[Ca²⁺]_iの変化を示すトレース例を示す。各トレースは、独自の細胞からの応答で

10

20

30

40

50

ある。図13Bは、イカチバント(50 µg/ml)の適用中のWT(上)およびMrgprB2^{MUT}(下)培養腹膜肥満細胞からの代表的なFluo-4画像(左)および蛍光トレース(右)を示す。図9Cは、選択されたFDA承認カチオン性ペプチド作動薬によって誘発された、WTおよびMrgprB2^{MUT}腹膜肥満細胞から、Fluo-4イメージングによって測定された際の、[Ca²⁺]_iの変化を示すトレース例を示す。各トレースは、独自の細胞からの応答である。図13Dは、アトラクリウム(50 µg/ml)の適用中のWT(上)およびMrgprB2^{MUT}(下)培養腹膜肥満細胞からの代表的なFluo-4画像(左)および蛍光トレース(右)を示す一連の顕微鏡写真および折れ線グラフである。図13Eは、シプロフロキサシン(200 µg/ml)の適用中のWT(上)およびMrgprB2^{MUT}(下)培養腹膜肥満細胞からの代表的なFluo-4画像(左)および蛍光トレース(右)を示す一連の顕微鏡写真および折れ線グラフである。

【図14】図14Aおよび図14Bは、ヒト肥満細胞が、MrgprX2依存性様式で偽アレルギー反応に関連する塩基性分泌促進物質および薬物によって活性化されることを示す一連の棒チャートである。図14AのヒトLAD2肥満細胞を、異なる濃度の、化合物48/80、マストパン、イカチバント、アトラクリウムおよびシプロフロキサシンで処理した。これらの物質に応答した肥満細胞の活性化は、 α -ヘキソサミニダーゼ、TNF、PGD₂およびヒスタミンの放出を特徴とする。加えて、ビオチンコンジュゲートヒトIgE感作LAD2細胞の0.1 µg/mlのストレプトアビジン刺激は、未処理細胞(4.1 ± 0.3%放出)と比較して強固な α -ヘキソサミニダーゼの放出(71.3 ± 1.8%放出)を引き起こした。グループデータを、平均 ± 標準誤差として表現する。図14Bは、ヒトMrgprX2のノックダウンが、IgEによってではなく、偽アレルギー反応に関連する塩基性分泌促進物質および薬物によって引き起こされた肥満細胞活性化を、有意に低減させたことを示す。ヒトLAD2肥満細胞に、MrgprX2 siRNAまたは対照siRNAを最初にトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後、細胞を、化合物48/80(0.1 µg/ml)、マストパン(5 µg/ml)、イカチバント(10 µg/ml)、アトラクリウム(25 µg/ml)およびシプロフロキサシン(75 µg/ml)で処理した。 α -ヘキソサミニダーゼの放出を特徴とするこれらの物質に応答した肥満細胞の活性化は、対照群における放出と比較して、MrgprX2 siRNA処理細胞において有意に低減された。IgE媒介性肥満細胞脱顆粒は、MrgprX2 siRNAノックダウンによって影響を受けなかった。グループデータを、平均 ± 標準誤差として表現する。両側対照学生t検定を使用して、統計的比較における有意性を決定し、差異を、* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.005で有意とみなした(実験を3回繰り返した)。

【図15】図15は、50未満のアミノ酸のすべてのFDA承認治療薬の表である。電荷はケムアクソンによって算出した。セトロリクス、ガニレリクスおよびオクトレオチドについてのISRデータは、下記の参考文献からである: 参照により本明細書に組み込まれる、Verschraegen, C. F. et al. *Gynecologic oncology* 90, 552 - 559 (2003); Fluker, M. et al. *Fertility and sterility* 75, 38 - 45 (2001); および Tuvia, S. et al. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97, 2362 - 2369, (2012)。すべての他の情報は、FDAによって供給された。

【図16】図16は、すべてのクラスのFDA承認神経筋遮断薬(NMBD)および代表的なメンバーを収載するチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0085】

本発明は、化合物が偽アレルギー型反応を誘発するか否かを決定するための細胞および方法、ならびに対象において偽アレルギー型反応の重症度を低減させるための方法に主眼を置く。本発明は、少なくとも部分的に、Gタンパク質共役受容体、すなわち、異物に対

10

20

30

40

50

するアレルギー型反応と密接に関わる、肥満細胞と呼ばれる種類の免疫細胞において排他的に発現される、マウスにおけるMr g p r B 2およびヒトにおけるMr g p r X 2の発見に基づく。本発明者らは、この単一の受容体が、それらの副作用プロファイルの一部としてアレルギー型反応に関連する少なくとも13の異なるFDA承認薬によって活性化されることを決定した。

【0086】

本明細書において記述されている発明の前、偽アレルギー薬物反応におけるMr g p r X 2 / Mr g p r B 2の役割は全く不明であった。本明細書において記述されているのは、偽アレルギー薬物反応を誘発する薬物についてスクリーニングするため、およびこれらの反応を遮断するMr g p r X 2のアンタゴニストについてスクリーニングするための、Mr g p r X 2 / Mr g p r B 2発現細胞ベースのアッセイの使用である。アッセイ作業を行うために、本発明者らは、Mr g p r X 2 / Mr g p r B 2発現細胞にGTP結合タンパク質アルファ15 (G 15) を添加して、受容体ベースのシグナルを細胞内カルシウムの増大に変換し、細胞株をハイスループット・スクリーニング・デバイスと適合性にした。偽アレルギー薬物反応におけるMr g p r X 2 / Mr g p r B 2の役割は、本発明の前は不明であった。したがって、Mr g p r X 2 / G 15細胞が報告されていないことは、驚くに当たらない。他の単離細胞株におけるG 15発現は報告されていたが、受容体が細胞内カルシウムの上昇を誘導しない場合にのみ利用されている。Mr g p r X 2は、そのような上昇を誘発し、このことは、単離細胞においてG 15を包含することが不要であると示唆するであろう。しかしながら、本発明者らは、Mr g p r X 2が、通常は、一部のアゴニストに反応してそのような上昇を誘発するが他のアゴニストにはせず、アッセイに必須の共発現を行わせることを見出した。

10

20

【0087】

本発明の単離細胞は、GTP-結合タンパク質G 15の発現とともに、ヒトGタンパク質共役受容体(GPCR) Mr g p r X 2またはマウスGPCR Mr g p r B 2を発現し、これにより、カルシウムベースのスクリーニングアッセイにおける受容体活性化の簡単な可視化を可能にする。これらの細胞株は、FDA承認薬ならびにMr g p r X 2アゴニストおよびアンタゴニスト活性のために開発中の薬物のスクリーニングを可能にする。これは、Mr g p r X 2のオフ標的活性化が、体内で、有意な有害事象をもたらし得るアレルギー型副作用を誘発することから、望ましい。

30

【0088】

薬物スクリーニングのための細胞ベースのアッセイにおいてこれらの細胞を使用して、陽性結果(すなわち、例えばカルシウム放出によって測定した際の、細胞株の活性化)は、薬物が、通常は肥満細胞を活性化させ、潜在的に、患者においてアレルギー型反応を引き起こすことを示すであろう。開発中の薬物のスクリーニングは、それらの副作用プロファイルを予測するであろうし; 現在使用されている薬物のスクリーニングは、これらの薬物の有害作用の原因を同定するであろうし; アンタゴニストのスクリーニングは、アレルギー型反応を誘発する薬物と同時に提供でき、故に、肥満細胞の活性化を遮断しながら、それらの意図された使用を妨げない、新たな治療薬につながるであろう。

40

【0089】

以下で詳細に記述する通り、野生型マウスにおけるこれらの薬物に反応した局所および全身のアレルギー型反応は、ヒトMr g p r X 2のマウスオルソログであるMr g p r B 2を欠いているマウスにおいて消失している。この極めて予想外の所見は、アンタゴニストを広範囲の薬物と共適用してそれらのアレルギー型副作用を遮断できることから、Mr g p r X 2が魅力的な薬物標的であることを実証するものである。

【0090】

本明細書において記述されているのは、この受容体を活性化させるまたはアンタゴナイズするFDA承認薬および治験化合物をスクリーニングするために使用される細胞株である。これらは、薬物がアレルギー型反応を誘発するか否かを決定するため、およびスクリーニングにおいてこれらの反応を遮断するアンタゴニストを開発するために有用となるで

50

あろう。

【0091】

本明細書において記述されているのは、塩基性分泌促進物質が、ヒトGタンパク質共役受容体(GPCR)Mr g p r X 2のオルソログである単一の受容体、Mr g p r B 2を介して、マウス肥満細胞をインビトロおよびインビボで活性化させることを実証する結果である。分泌促進物質誘発性ヒスタミン放出、炎症および気道収縮は、Mr g p r B 2ヌル突然変異マウスにおいて消失している。さらに、以下で詳細に記述する通り、アレルギー型注射部位反応に関連するほとんどのクラスのFDA承認ペプチド作動薬は、Mr g p r B 2およびMr g p r X 2も活性化させ、その注射部位の炎症は、突然変異マウスにおいては存在しない。本明細書において記述されている結果は、Mr g p r B 2およびMr g p r X 2が、全身の偽アレルギーまたはアナフィラキシー様反応に関連する多くの小分子薬物の標的であること；アナフィラキシー様応答の薬剤誘発性の症状が、ノックアウトマウスにおいて有意に低減されていることを実証するものである。他の化合物の副作用を予測するのに役立つこれらの分子のいくつかにおける一般的な化学モチーフの同定も、本明細書において記述されている。塩基性分泌促進物質による肥満細胞活性化を研究するためのマウスモデルの導入および薬剤誘発性の有害作用のサブセットを低減させるための治療標的としてのMr g p r X 2の同定について、以下で詳細に記述する。

10

【0092】

肥満細胞

肥満細胞は、アレルギー反応における一次エフェクターであり、ヒスタミンならびに種々の炎症および免疫調節物質を分泌することにより、疾患において重要な役割を有し得る(Metcalfe, et al., 1997 *Physiological reviews* 77, 1033-1079; Galli et al., 2005 *Nature immunology* 6, 135-142)。古典的に、肥満細胞はIgE抗体によって活性化されるが、肥満細胞の独自の特性は、炎症性ペプチドおよびアレルギー型反応に関連する薬物を包含する、塩基性分泌促進物質と総称される広範なカチオン性物質に対するそれらの抗体非依存性応答性である(Metcalfe, et al., 1997 *Physiological reviews* 77, 1033-1079; Lagunoff et al., 1983 *Annual review of pharmacology and toxicology* 23, 331-351)。病理におけるこれらの物質の役割は、それらの受容体の数十年にわたる探索を促してきた。

20

30

【0093】

肥満細胞(肥満細胞(mastocyte)または肥満細胞(labrocyte)としても公知である)は、骨髄幹細胞に由来する。これは、免疫系の一部であり、ヒスタミンおよびヘパリンが豊富な多くの顆粒を含有する。アレルギーおよびアナフィラキシーにおける役割が最も公知であるが、肥満細胞は、重要な保護的役割も果たし、血管新生を包含する創傷治癒および病原体に対する防御に密接に関連している。肥満細胞は、外観および機能の両方において、別の種類の白血球である好塩基球と非常に類似している。これらの細胞は、肥満細胞が組織常在性であり、例えば粘膜組織内にあり、一方、好塩基球は血液中に見られるという点で、異なっている。いずれの細胞も、ヒスタミンおよびヘパリン、抗凝固剤を含有する顆粒細胞である。いずれの細胞も、免疫グロブリンEとの結合時に、ヒスタミンを放出する。

40

【0094】

肥満細胞は、血管および神経の周囲のほとんどの組織内に特徴的に存在し、とりわけ、皮膚、肺の粘膜および消化管等の外界と内部環境との間の境界、ならびに、口、結膜および鼻の付近に顕著である。

【0095】

肥満細胞は、炎症プロセスにおいて中心的な役割を果たす。活性化されると、肥満細胞は、その特徴的な顆粒および種々のホルモンメディエータを、間質中に迅速に放出する。肥満細胞は、直接的損傷(例えば、物理的または化学的(オピオイド、アルコール、およ

50

びポリミキシン等のある特定の抗生物質等])、免疫グロブリンE (I g E) 受容体の架橋結合、または補体タンパク質によって刺激されて、脱顆粒することができる。

【 0 0 9 6 】

肥満細胞は、抗体の最も豊富でないメンバーである I g E の F c 領域のための高親和性受容体 (F c R I) を発現する。この受容体は I g E 分子の結合が本質的に不可逆的であるような高親和性のものである。結果として、肥満細胞は I g E でコーティングされており、これは、形質細胞 (免疫系の抗体産生細胞) によって産生される。

【 0 0 9 7 】

アレルギー反応において、肥満細胞は、アレルゲンが、細胞を既にコーティングしている I g E と結合するまで、不活性なままである。他の膜活性化事象は、肥満細胞をその後の脱顆粒のために準備するか、または F c R I シグナル伝達との相乗効果で作用するかのいずれかができる。概して、アレルゲンは、タンパク質または多糖である。アレルゲンは、肥満細胞表面と結合した I g E 分子の可変領域に位置している抗原結合部位と結合する。架橋 I g E 分子に関連する細胞結合 F c 受容体の細胞内ドメインのクラスター形成は、その活性化につながる肥満細胞の内側での反応の複合シーケンスを引き起こす。細胞外環境に放出される分子は、予め形成されたメディエータ (顆粒から) (例えば、トリプターゼ、ヒスタミン (2 ~ 5 p g / 細胞) 、セロトニン、プロテオグリカン、ヘパリン (抗凝固剤として活性) 等のセリンプロテアーゼ) 、新たに形成された脂質メディエータ (エイコサノイド) (すなわち、トロンボキサン、プロスタグランジン D 2 、ロイコトリエン C 4 、血小板活性化因子) 、およびサイトカイン (例えば、好酸球走化因子) を包含する。

10

20

【 0 0 9 8 】

ヒスタミンは、後毛細血管細静脈を拡張させ、内皮を活性化させ、血管透過性を増大させる。これは、局所浮腫 (腫脹) 、暖かさ、赤み、および放出部位に他の炎症細胞を引きつけることにつながる。ヒスタミンはまた、神経終末を脱分極する (掻痒または疼痛につながる) 。ヒスタミン放出の皮膚兆候は、「発赤および膨疹」反応を包含する。蚊に刺された直後の隆起および赤みはこの反応の好例であり、これは、アレルゲンによる肥満細胞の負荷の数秒後に発生する。

【 0 0 9 9 】

M r g p r X 2

本明細書において記述されている通り、m a s 関連 G タンパク質共役受容体 X 2 (M r g p r X 2) は、塩基性分泌促進物質、すなわち、カチオン性両親媒性薬物ならびに塩基性頭部基および疎水性コアからなる内因性または外因性ペプチドの、肥満細胞特異的受容体である。参照により本明細書に組み込まれる、M c N e i l B . D . , 2 0 1 5 N a t u r e , 5 1 9 : 2 3 7 - 2 4 1 を参照されたい。以下で詳細に記述する通り、M r g p r X 2 は、ツボクラリンおよびアトラクリウムを包含する非ステロイド性神経筋遮断薬 (N M B D) 等の環化テトラヒドロイソキノリン (T H I Q) を含有する小分子を認識し、結合する。以下で詳細に記述する通り、これらの化合物に応答して、M r g p r X 2 は、ヒスタミン放出、炎症および気道収縮を特徴とする偽アレルギー反応を媒介する。本明細書において記述されている通り、M r g p r X 2 は、コルチスタチン - 1 4 、プロアドレノメデュリン N 末端ペプチド P A M P - 1 2 等のペプチドおよびアルカロイド、なら

30

40

【 0 1 0 0 】

例示的なヒト M r g p r X 2 アミノ酸配列を以下に提供する (N P _ 0 0 1 2 9 0 5 4 4 . 1 (G I : 7 4 6 8 1 6 1 5 3) 、参照により本明細書に組み込まれる (配列番号 : 1)) :

【 0 1 0 1 】

1 mdpttpawgt esttvngndq allllcgket lipvflilfi alvglvgngf vlwllgfrmr
61 rnafsvyvls lagadflflc fqiinclvyl snffcsisin fpsffttvmt caylaglsm1
121 stvstercls vlwpiwyr cr rprhlsavvc vllwalslll silegkfcgf lfsdgdsgwc
181 qtfdfitaa w liflfmvlc g sslallvril cgsrglpltr lyltilltvl vllcglpfg
241 iqwflilwiw kdsdvlfchi hpvsvvlssl nssanpiiyf fvg sfrkqwr lqqpilk1al
301 qralqdiaev dhsegcfrqg tpemsrssl v

【 0 1 0 2 】

例示的なヒトM r g p r X 2 核酸配列を以下に提供する (N M _ 0 0 1 3 0 3 6 1 5 .
1 (G I : 7 4 6 8 1 6 1 5 2) 、参照により本明細書に組み込まれる (配列番号 : 2)
):

10

【 0 1 0 3 】

```

1  tggctacagg aaagggccac caggcagggc tatgtcctta ggtagaaaaa cactgccact
61  gccaaactcac agcccttcag ggcgcagggg gagagccagg aaatTTTTaa aaaatcatcc
121 cccaatctac tgtcaatgtg tccctttggc tgaaaaaaaa agtcaccctc caatctcctg
181 tcaatgtgta ccctttggag cctgagtgaa agacagccca ttgacgaggc acagacatgt
241 ctctcccag gatgcaaagt gtcacttctt tggactagtc tctcactatc atcataaatg
301 ccttgagaat ggaatgtggt tgggaaaaaa agggattggg agtacatagg tactcccagc
361 tataagtaca caggggcacc agtggaggtt ttctgagcat ggatccaacc accccggcct
421 ggggaacaga aagtacaaca gtgaatggaa atgaccaagc cttcttctg ctttgtggca
481 aggagaccct gatcccggc ttcctgatcc ttttcattgc cctggtcggg ctggtaggaa
541 acgggtttgt gctctggctc ctgggcttcc gcatgcgcag gaacgccttc tctgtctacg
601 tcctcagcct ggccggggcc gacttctctt tcctctgctt ccagattata aattgcctgg
661 tgtacctcag taacttcttc tgttccatct ccatcaattt ccctagcttc ttcaccactg
721 tgatgacctg tgccctacctt gcaggcctga gcatgctgag caccgtcagc accgagcgtc
781 gcctgtccgt cctgtggccc atctggatc gctgccgccg cccagacac ctgtcagcgg
841 tcgtgtgtgt cctgctctgg gcctgtccc tactgctgag catcttggaa ggggaagtct
901 gtggcttctt atttagtgat ggtgactctg gttggtgtca gacatttgat tcatcactg
961 cagegtggct gatTTTTTTa ttcattggtc tctgtgggtc cagtctggcc ctgctggtea
1021 ggatcctctg tggctccagg ggtctgccac tgaccaggct gtacctgacc atcctgctca
1081 cagtctgggt gttcctctc tgccgcctgc ctttggcat tcagtggctc ctaatattat
1141 ggatctggaa ggattctgat gtcttatttt gtcataattca tccagtttca gttgtcctgt
1201 catctcttaa cagcagtgcc aaccccatca tttacttctt cgtgggctct tttaggaagc
1261 agtggcggct gcagcagccg atcctcaagc tggctctcca gagggctctg caggacattg
1321 ctgaggtgga tcacagtgaa ggatgcttcc gtcagggcac cccggagatg tcgagaagca
1381 gtctggtgta gagatggaca gcctctactt ccatcagata tatgtggctt tgagaggcaa
1441 ctttgcccct gtctgtctga tttgctgaac tttctcagtc ctgattttaa aacagttaag
1501 agagtccctg tgaggattaa gtgagacagt gcctatgaaa caaacactaa gtgcagtgtc
1561 tctggaactg ccttactcac aggcttcac cacagcccta tgagagcttt gccaaactctg
1621 cggctccatga ctgttcccac ttttaatgaa tcctacctt cgcagaaggc tgaaagcagg
1681 gcagaaaaga tctacatttc tttggacact gcacttgata gggactcaaa gaatgttata
1741 tttttaatta atttctttt ctcttccgta caatttctgt ctcaacaaaa ttagaagaat
1801 taaatTTTaa actagctcca aaagagcagt cgtctttcat tttggcagac cttagaatat
1861 cccctagct taataaatct ttgttgaatg gcttaatgaa tgaataaact ggttaatggt
1921 taagttaaac ctctgaaaag tctccattta ccagatttga gtcactaaat ttattgcttt
1981 cactactttt gaatTTTgca aacatgaaat taagttttat aattagataa atcaatgtca
2041 acacatattt aaagtttgag gtacactgtc ttcctgtggg ttctttcac atgccatccc
2101 ttaaaatccc agctacacgc ctcccatc cttcccctt gcctttgttc taatcttccc
2161 tctctggggg ctctctaatt cgtcctggaa gtttccagtg gtcttataga ctccatgttc
2221 ttggaggaca ggctgtatgt cagatttacc ttttattccg aagaactcgg agcatttatt
2281 ttgttaatta aattgcacat atTTTTaaa gttacgtgtt ccacagaata aaataactaat
2341 tgtaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
2401 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

10

20

30

40

【 0 1 0 4 】

例示的なマウス M r g p r B 2 アミノ酸配列を以下に提供する (N P _ 7 8 0 7 4 0 .

50

2 (G I : 2 2 9 0 9 4 2 4 4) 、参照により本明細書に組み込まれる (配列番号 : 3)) :

【 0 1 0 5 】

```

1 msgdfliknl stsawktnit vlngsyyidt svcvtrnqam illsiislv gmglnaivlw
61 flgirmhtna ftvyilnlam adflylcsqf viclliafyi fysidinipl vlyvvpifay
121 lsglsilsti sierclsviw piwyrckrpr htsaitcfvl wvmslllgll egkacgllfn
181 sfdswcetf dvitniwsvv ffgvlgcssl tllvrifcgs qripmtrlyv titltvlvfl
241 ifglpfgiyw ilyqwisnfy yveicnfyly ilflscvnsc mnpiiyflvg sirhrrfrk
301 tlkillqgram qdtpeeeqsg nksssehpee letvqscs

```

10

【 0 1 0 6 】

例示的なマウス M r g p r B 2 核酸配列を以下に提供する (N M _ 1 7 5 5 3 1 . 4 (G I : 2 2 9 0 9 4 2 4 3) 、参照により本明細書に組み込まれる (配列番号 : 4)) :

【 0 1 0 7 】

```

1 agaggactct tctctttgtc acagaccagt ttaacacttc ccataagaag aatagagcaa
61 aggaacatga gtggagatth cctaatacaag aatctaagca cctcagcctg gaaaacgaac
121 atcacagtgc tgaatggaag ctactacatc gatacttcag tttgtgtcac caggaaccaa
181 gccatgatth tgctttccat catcatttcc ctgggtggga tgggactaaa tgccatagtg
241 ctgtgggtcc tgggcatccg tatgcacacg aatgccttca ctgtctacat tctcaacctg
301 gctatggctg actttcttta cctgtgctct cagttttaa tttgtcttct tattgccttt
361 tatacttctt actcaattga catcaacatc ccttgggttc tttatgttgt gccaatatth
421 gcttatctth caggtctgag cattctcagc accattagca ttgagcgtg cttgtctgta
481 atatggccca tttggtatcg ctgtaaactg ccaagacaca catcagctat cacatgttht
541 gtgctttggg ttatgtcctt attgttgggt ctctggaag ggaaggcatg tggcttactg
601 tttaatagct ttgactctta ttgggtgtaa acatttgatg ttactactaa tatatggtca
661 gttgttttht ttgggtgttct ctgtgggtct agcctcacc tgcttgtcag gatcttctgt
721 ggctcacagc gaattcctat gaccaggctg tatgtgacta ttacactcac agtcttggtc
781 ttcctgatct ttgggtcttcc ctttgggatc tattggatac tctatcagtg gattagcaat
841 ttttattatg ttgaaattht taatthttat cttgagatac tattcctatc ctgtgttaac
901 agctgtatga accccatcat ttatthcctt gttggctcca ttaggcaccg aaggttcagg
961 cggaagactc tcaagctact tctgcagaga gccatgcaag acaccctga ggaggaacaa
1021 agtggaaata agagttcttc agaacaccct gaagaactgg aaactgttca gagctgcagc
1081 tgacaactgc ttgatcagac aaaaatggtt ttgatggaaa tactthttct tatccgtgtg
1141 gaccatthtt acaaccttht ttcagtttgt tatctcatct tcaattgtth aattaggaca
1201 ataattthtt taaaagttga gagaaatggg tcttgtcata ctaatactga atgtagcatt
1261 tctgaagctg tgttacttag ggatttacca tctccttht atgggactcc ttgtaagtat
1321 tctgtggtag agaacttctc ctattgttga caactctcc tttagaaggc aaatggaaat
1381 acaaggaagg gctgtattht tttaccctc gaaatgtata atgagtacac aaatgttaca
1441 tctagcaaat attctthttag aacacccttc tcaatgttht agacttaaat agaaactt
1501 tataatccta gtccttatta atthcttcag gttataaaga atatatgaag tgatagthtt
1561 tttacgtaaa tthtttacta aacaaataaa atthctcaa agaagactgt taaatctctc
1621 ttaaccagc tgagtctca ctgtgaacat caagttcact gtgtctctaa tthttaaaat
1681 ttgaagagtg cacttagatt tggcaatgag atccatcaa atccatgtcc acatgaaggt
1741 gaagagagtc agacttctgt gthtctctc acaatgcctt cthtagcatt ccatggtcga
1801 gtgtthtccc tthactcctt gcctthtctg tgatttctgc tctctctgac tgtctaatc
1861 ttcattgagaa gthtccacta ggtcctctag acaatctgt ctcaaattta aatcaccctc
1921 agataattht ttatgtgaat ttgttacttg cattgataac aatcattgta attgaaatg
1981 aatattthtt gtaacactth ctataaaata atattgtth ttaagctgta ctatgtgata
2041 tthtctagttg aagcataatt aaaagagttc aacaaaaaa aaaaaaaa

```

20

30

40

【 0 1 0 8 】

G 1 5

G T P 結合タンパク質アルファ 1 5 (G 1 5) は、種々の膜貫通シグナル伝達系におけるモジュレーターまたはトランスデューサーである。

【 0 1 0 9 】

例示的なヒト G 1 5 アミノ酸配列を以下に提供する (N P _ 0 0 2 0 5 9 . 3 (G I

50

: 5 9 7 7 0 9 7 7 1)、参照により本明細書に組み込まれる (配列番号 : 5)) :

【 0 1 1 0 】

```

1 marsltwrcc pwcitedeka aarvdqeinr illeqkkqdr gelkl1llgp gesgkstfik
61 qmriihgagy seeerkgfrp lvyqnfivsm ramieamerl qipfsrpesk hhaslvmsqd
121 pykvttfekar yaaamqwlwr dagiracyer rrefhllda vvyllshleri teegyvpdaq
181 dvlrsmptt gineycfsvq ktnlrivdvq gqkserkkwi hcfenviali ylaslseydq
241 cleennqenr mkeslalfgt ilelpwfkst svilflnktd ileekiptsh latyfpsfqg
301 pkqdaeaakr fildmytrmy tgcvdgpegs kkgarsrrlf shytcattdq nirkvfkdv
361 dsvlarylde inll

```

【 0 1 1 1 】

10

例示的なヒト G 1 5 核酸配列を以下に提供する (NM__0 0 2 0 6 8 . 3 (GI : 5 9 7 7 0 9 7 7 0)、参照により本明細書に組み込まれる (配列番号 : 6)) :

【 0 1 1 2 】

```

1  cagaaggagg aagaagggcc ctgctggtca cacaggaccc agtctgcggt ggggggttttc
61  cgcgccaccgc cccgccctcc ctggggcccc cacctcacc tctcctggca cccttcaccg
121 tcaacctgtc gggccgggtc tgagcaggtc tggaggtggg cggggagccc tggcctcccc
181 acctcctccc gtccccaccc tgttcccagc actcaagcct tgccaccgcc gagccgggct
241 tcttgggtgt ttcaggcaag gaagtctagg tccttggggg gtgaccccc aaggaaaaggc
301 agcctccctg cgcaccgggt tgcccggagc cctctccagg gccggctggg ctggggggtg
361 ccttggccag caggggcccc ggggcgatgc caccgggtgc cgactgaggc caccgcacca
421 tggcccgcct gctgacctgg cgctgctgcc cctggtgcct gacggaggat gagaaggccg
481 cgcggggggt ggaccaggag atcaacagga tcctcttggg gcagaagaag caggaccgcg
541 gggagctgaa gctgctgctt ttgggcccag gcgagagcgg gaagagcacc ttcaccaagc
601 agatgcggat catccacggc gccggctact cggaggagga gcgcaagggc ttcggcccc
661 tgggtctacca gaacatcttc gtgtccatgc gggccatgat cgaggccatg gagcggctgc
721 agattccatt cagcaggccc gagagcaagc accacgctag cctggtcatg agccaggacc
781 cctataaagt gaccacgttt gagaagcgtc acgctgcggc catgcagtgg ctgtggaggg
841 atgcccggcat ccgggcctgc tatgagcgtc ggcgggaatt ccacctgctc gattcagccg
901 tgtactacct gtcccacctg gagegcacat ccgaggaggg ctacgtcccc acagctcagg
961 acgtgctccg cagccgcatg cccaccactg gcatcaacga gtactgcttc tccgtgcaga
1021 aaaccaacct gcggatcgtg gacgtcgggg gccagaagtc agagcgtaag aatggatcc
1081 attgtttcga gaacgtgatc gccctcatct acctggcctc actgagtga taccaccagt
1141 gcctggagga gaacaaccag gagaaccgca tgaaggagag cctcgcattg tttgggacta
1201 tcttggaaact accctgggtc aaaagcacat ccgtcatcct ctttctcaac aaaaccgaca
1261 tcttggagga gaaaatcccc acctcccacc tggctaccta tttcccaggt ttcaggggcc
1321 ctaagcagga tgctgaggca gccaaagaggt tcatcctgga catgtacacg aggatgtaca
1381 ccgggtgctg ggacggcccc gagggcagca agaagggcgc acgatcccga cgcctcttca
1441 gccactacac atgtgccaca gacacacaga acatccgcaa ggtcttcaag gacgtgctgg
1501 actcgggtgct cgcggcttac ctggacgaga tcaacctgct gtgaccaggg cccacctgg
1561 ggcaggcggc accggcgggc ggggtggagg tgggagtggt tgcagggacc cctagtgtcc
1621 ctgggtctatc tctccagcct cggcccacac gcaagggagt cgggggacgg acggcccgtc
1681 gctggccgct ctcttctctg cctctcacca ggacagccgc ccccagggt actcctgccc
1741 ttgcttgact cagtttcctt cctttgaaag ggaaggagca aaacggccat ttgggatgcc
1801 aggggtggatg aaaaggtgaa gaaatcaggg gattgaggac ttgggtgggt gggcatctct
1861 caggagcccc atctccgggc gtgtcacctc ctgggcaggg ttctgggacc ctctgtgggt
1921 gacgcacacc ctgggatggg gctagttagg ccttcaggcg ccttcgggag tggactctgg
1981 cgcactctag tggacaggag aaggaacgcc ttccaggaac ctgtggacta ggggtgcagg
2041 gacttccttt tgcaaggggt aacagaccgc tggaaaacac tgtcactttc agagctcgg
2101 ggctcacagc gtgtcctgcc ccggtttgcg gacgagagaa atcgggccc acaagcatcc
2161 ccccatccct tgcaggctgg gggctgggca tgctgcatct taaccttttg tatttatccc
2221 ctcaccttct gcagggtccc gtgcgggctg aaattaaaga tttcttagag gctgcgtcgc
2281 cagcgtcctg tttaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

20

30

40

【 0 1 1 3 】

例示的なマウス G 1 5 アミノ酸配列を以下に提供する (NP__0 3 4 4 3 4 . 1 (GI : 6 7 5 4 0 1 0)、参照により本明細書に組み込まれる (配列番号 : 7)) :

50

【 0 1 1 4 】

```

1 marsltwgcc pwcjteekt aaridqeinr illeqkkqer eelklillgp gesgkstfik
61 qmriihgvgy seedrrafrl liyqnifvsm gamidamdrl qipfsrpdsk qhaslvmtqd
121 pykvstfekp yavamqylwr dagiracyer rrefhllda vvyllshleri sedsyiptaq
181 dvlrsrmppt gineycfsvk ktklrvdvg gqrserkwi hcfenviali ylaslseydq
241 cleendqenr meeslalfst ilelpwfkst svilflnktd iledekihtsh latyfpsfqg
301 prrdaeaaks fildmyarvy ascaepqdg rkgarrff ahftcatdtq svrsvfkdv
361 dsvlarylde inll

```

【 0 1 1 5 】

例示的なマウス G 1 5 アミノ酸配列を以下に提供する (NM__010304.3 (G 10
I : 3 4 3 2 8 4 8 7) 、参照により本明細書に組み込まれる (配列番号 : 8)) :

【 0 1 1 6 】

```

1 gctggagctt ccaccaccga cctgtctggc gggcagggcc aggtctgggc aagttggagg
61 gggcggaag cagcaccag gtccccgcc tgtttccagc acccaggcct ctgaagccc
121 ttgcctgggc tcccacaggc cctaggcagg gacacggagg gccctgggt gacctccacc
181 cccacctcca ctccatccgg agaagaaga gtcccacagt tgggctctgc aggcctgtg
241 atgtcacctg gtggtctgtg aagcgcacc catggccgg tcctgactt ggggctgctg
301 tccctgggtg ctgacagagg aggagaagac tgccgccaga atcgaccagg agatcaacag
361 gattttgttg gaacagaaaa aacaagagcg cgaggaattg aaactcctgc tgttggggcc
421 tgggtgagagc ggggaagagta cgttcatcaa gcagatgcgc atcattcacg gtgtgggcta
481 ctcgaggag gaccgcagag ccttccggct gctcatctac cagaacatct tcttccat
541 gcaggccatg atagatgcga tggaccggct gcagatcccc ttcagcaggc ctgacagcaa
601 gcagcacgcc agcctagtga tgaccaggga cccctataaa gtgagcacat tgcagaagcc
661 atatgcagtg gccatgcagt acctgtggcg ggacgcgggc atccgtgcat gctacgagcg
721 aaggcgtgaa tccaccttc tggactccgc ggtgtattac ctgtcacacc tggagcgc
781 atcagaggac agctacatcc cactgcgca agacgtgctg cgcagtcgca tgcccaccac
841 aggcattcaat gagtactgct tctccgtgaa gaaaaccaa ctgcatcg tggatgttgg
901 tggccagagg tcagagcgta ggaaatggat tcaactgttc gagaacgtga ttgccctcat
961 ctacctggcc tccctgagcg agtatgacca gtgcctagag gagaacgatc aggagaaccg
1021 catggaggag agtctcgctc tgttcagcac gatcctagag ctgccctggt tcaagagcac
1081 ctcggtcatc ctcttctca acaagacgga catcctggaa gataagatte acacctcca
1141 cctggccaca tacttccca gcttccaggg accccggcga gacgcagagg ccgccaagag
1201 ctcatcttg gacatgtatg cgcgctgta cgcgagctgc gcagagcccc aggacggtgg
1261 caggaaaggc tcccgcgcc gccgcttctt cgcacacttc acctgtgcca cggacacgca
1321 aagcgtccgc agcgtgttca aggacgtgcg ggactcgggt ctggcccgggt acctggacga
1381 gatcaacctg ctgtgacgcg ggacagggaa cccaagcgc gacgcggtcg tggcgaggac
1441 atacctcccc ctggtggccg cgcgtggaac tgcaggtcca ggagctgcca agtggggaag
1501 ccagcccaca gggagagagt cctgcttcc tactgggccc ccaagcccag ctcccctgta
1561 atttattccc tcgcccttct tctagtgtt ggagaaagga catgagccgg gtctttaacc
1621 ccagcgtccc ggaggcagag gcaggaggat ttctgtgagt tccaggacca tgttttcaaa
1681 aacaaacaaa accggataga actgtccggg accttgtgac ttcccagggg ccctgttcaac
1741 atcttctctg ggggaccatt tcatcttacc aaaggggaaa ccgaggtcgg caagatggct
1801 ggtgagagtg ccttgccacc aagcctgaca actggacttc aggacctgtt cagtggacag
1861 agagagggag cggagtccca ggagaagtcc tctatctct caggcgtgca tgggtggtgac
1921 acacctacc acacagataa ataaatgtaa tttaaaaaca aaaaaaaaa aaaa

```

【 0 1 1 7 】

H E K 2 9 3 細胞

ヒト胎児腎臓 2 9 3 細胞は、多くの場合、H E K 2 9 3、H E K - 2 9 3、2 9 3 細胞、またはあまり正確ではないが H E K 細胞とも称され、組織培養において成長させたヒト胎児腎臓細胞 (流産したヒト胎児由来) および死産動物に元由来する特定の細胞株である。H E K 2 9 3 細胞は、非常に簡単に成長し、非常にトランスフェクトしやすく、細胞生物学研究において長年にわたって広く使用されてきた。該細胞は、バイオテクノロジー産業により、遺伝子療法のための治療用タンパク質およびウイルスを産生するためにも使用される。

【0118】

本明細書において記述されているのは、G 15およびMr g p r B 2またはMr g p r X 2のいずれかを安定発現しているHEK 293細胞である。

【0119】

下記の例は、本発明のアッセイ、スクリーニングおよび治療方法をどのようにして作製し使用するかの完全な開示および記述を当業者に提供するように提案されるものであり、本発明者らが自らの発明とみなすものの範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例1】

【0120】

材料および方法

10

下記の材料および方法を使用した。

【0121】

動物モデル

WTおよび突然変異体試料ならびに動物における等しい処理を伴うすべての実験は、条件を知らない実験者によって行った。

【0122】

分析

グループデータは、平均±標準誤差として表現した。両側対称学生t検定を使用して、統計的比較における有意性を決定し、差異を、 $p < 0.05$ で有意とみなした。統計的検出力分析を使用して、試料サイズを揃えた。ほとんどの結果値は各群内の平均値前後で対称的に分布していたため、データは正規分布していることが推測された。分散は、F検定によって決定された群の間で同様である。フィブロネクチン付着の視覚的欠如によってまたは異常に高い安静時のカルシウムレベルによってのいずれかで損傷していると考えられる肥満細胞は、分析から除外した。そうでなければ、成功した手順および/または処理に供した試料も動物も分析から除外しなかった。無作為化は、動物研究に適用可能でないため、該研究には使用しなかった。

20

【0123】

ペプチドおよび薬物

化合物48/80、スズメバチマストバラン、ロクロニウム、ツボクラリン、シプロフロキサシン、レボフロキサシン、モキシフロキサシンおよびオフロキサシンは、シグマ製であった。コルチスタチンは、トクリスバイオサイエンス製であった。PAMP(9~20)は、カスタム合成し、ジェンスクリプトによって98%以上まで精製した。ロイプロリドは、ジェンスクリプト製であった。物質P、カリジン、マストバラン、セトロレリクス、オクトレオチド、セルモレリン(成長ホルモン放出因子1-29)、イカチバント(HOE-140)は、アナスペック製であった。アトラクリウムおよびミバクリウムは、サンタクルーズバイオテクノロジー製であった。組換えヒトインスリンは、ロシュ製であった。ヤギ抗マウスIgE(Ab9162)は、アブカム製であった。

30

【0124】

薬物調製および貯蔵

アトラクリウム、ミバクリウム、ツボクラリン、およびすべてのフルオロキノロン溶液は、最初の3つの効力が酸化および/または凍結解凍作用の影響を受けやすいことが分かり、一方、フルオロキノロンの溶解度は新しく調製した際が最良であったため、実験日に調製した。プロプラノロールも実験日に新しく調製して、効力の損失の可能性を最小化した。レボフロキサシンを除くすべてのフルオロキノロンを、pH3.5に調整したCIBに溶解した。すべての他の薬物を100X~1000Xアリコートとして調製し、-80で貯蔵した後、4で解凍し、カルシウムイメージング緩衝液または生理食塩水中に希釈した。

40

【0125】

Mr g p r RT-PCRスクリーニング

リボ核酸(RNA)を、 4×10^4 マウス腹膜肥満細胞から、キアゲンRNEasyマ

50

マイクロカラムを用い、メーカーの提案に従って精製した。RNAをDNase I (ニュー・イングランド・バイオラボ)で20分間処理し、別のRNeasyマイクロカラム上で再精製した。8 ngのRNAを使用し、スーパースクリプトIIIキット(インビトロジェン)をメーカーの説明書に従って使用し、オリゴdTプライマーを使用し、推奨10 µlの反応物を最大60 µlに増量して、第一鎖cDNAを生成した。陰性対照反応は、スーパースクリプトIII逆転写酵素を水によって置きかえたことを除き、同じであった。25 µlのPCR反応物を、12.5 µlのRedTaqレディミックス(シグマ)、0.5 µlのDMSO、0.25 µlずつの50 µM遺伝子特異的なフォワードおよびリバースプライマー、10 µlの水、ならびにcDNAまたは陰性対照合成反応からの2 µlの混合物で実行した。すべての反応で、95 °Cで4分間の最初のステップ、特定温度(後述)で30秒のアニーリング、72 °Cで40秒および95 °Cで25秒の拡張(最後の3ステップを39回繰り返した)、ならびに72 °Cで最後の4分間のステップを使用した。低ストリンジエンシーPCRは、60 °Cのアニーリングに設定し; そうでなければ、アニーリング温度は、Mr g p r A 1、Mr g p r A 10、Mr g p r B 2およびMr g p r B 6については62 °C; Mr g p r A 2、Mr g p r A 3、Mr g p r A 4、Mr g p r A 6、Mr g p r A 16、Mr g p r A 18およびMr g p r B 11については64 °C; Mr g p r A 9、Mr g p r A 19、Mr g p r B 1、Mr g p r B 3、Mr g p r B 5およびMr g p r B 8については65 °C; Mr g p r A 12およびMr g p r B 10については66 °C; Mr g p r B 4については63 °C; Mr g p r A 14については61 °C; ならびにMr g p r C 11については65.5 °Cであった。

10

20

【0126】

プライマーは次の通りであった。Mr g p r A 1 (a t c c a g c a a g a g g a a t g g g g (配列番号: 9))については、rev t g t g a c c t a g g a g g a a g a a g a g a a g (配列番号: 10)); Mr g p r A 2 (c c t c c t a c a c a a g c c a g c a a (配列番号: 11))については、rev a a g c a c a a g t g a a a g a t g a t g c t (配列番号: 12)); Mr g p r A 3 (g c t a c a t c c a g c a a g a g g a a t g (配列番号: 13))については、rev g c a a a a a t t c c t t t g g g t a g g g t (配列番号: 14)); Mr g p r A 4 (c c t g t g t g c t g t g a t c t g g t (配列番号: 15))については、rev t c a c g g t t a a t c c a g g g c a c (配列番号: 16)); Mr g p r A 6 (c a t t t t c c t c c c c a a c a g t (配列番号: 17))については、rev a t g c c t g a a t g a g c c c a c a a (配列番号: 18)); Mr g p r A 9 (c a g t g a t c t a c a t c c a g c a a a a g g (配列番号: 19))については、rev g c g t g g a a g c t a t g a t g c g a (配列番号: 20)); Mr g p r A 10 (c a g t g g t c c a c c a t c t c c a a (配列番号: 21))については、rev a c a g g c a a g a g a g t c a t g g t t (配列番号: 22)); Mr g p r A 12 (t c a g g g a t c g g g t g a a g c a c (配列番号: 23))については、rev g a g c a t t t g a a g g t g t t g t t g g a (配列番号: 24)); Mr g p r A 14 (g g t t g c c c c t g t g t t t c t t c (配列番号: 25))については、rev t a t t g c c a g t c a g t a a g c t g a g (配列番号: 26)); Mr g p r A 16 (g c c c t c t g g t t c c c a t t a c t (配列番号: 27))については、rev g t t t t t g g a c c a c t g a g g c a t t (配列番号: 28)); Mr g p r A 18 (t g c t c t g g t t t t c t c c t t t g c (配列番号: 29))については、rev t g a g g c a t g t c a a g t c a g t c a (配列番号: 30)); Mr g p r A 19 (c a g g a c c c a g a t c a c g a c a c (配列番号: 31))については、t c c t g g g c t t c c g a t t t c a c (配列番号: 32)); Mr g p r B 1 (a t t a g c c t t c a t c a g g c a c c a (配列番号: 33))については、c c a g c c c a a c t a a g g c a a t g (配列番号: 34)); Mr g p r B 2 (g t c a c a g a c c a g t t t a a c a c t t c c (配列番号: 35))については、c a g c c a t a g c c a g g t t g a g a a (配列番号: 36)); Mr g p r B 3 (a c c t g g c t g t g g c t g a t t t t

30

40

50

(配列番号：37)については、rev g c t g a a c c c a c a g a g a a c c a (配列番号：37)；Mr g p r B 4 (t c t g g c t g g t g c t g a t t t c t t (配列番号：38)については、rev a c c a c g a g g c t c a a c a a t a g a (配列番号：39)；Mr g p r B 5 (c t g t g g t t c c t t c t g t g t c c a (配列番号：40)については、rev t t t c c a g t t c c c c a g a c c t t t (配列番号：41)；Mr g p r B 6 (t c t g t c t a c a t c c t c a a c c t g g (配列番号：42)については、rev a t t a t c t c a t g a g g a a g g c t c a a (配列番号：43)；Mr g p r B 8 (a g a g a a t g c a a a g c a t g c g a (配列番号：44)については、rev g a g g a a g t t t g c c c c a g a c a (配列番号：45)；Mr g p r B 1 0 (c a c t g g t c a c a t t g c c a a c c (配列番号：46)については、rev g g g g a t g g a a t c a a t g t c c a a g a (配列番号：47)；Mr g p r B 1 1 (a c c t t c t t g c t a t t t t t c c c t c c a (配列番号：48)については、rev a g g a t g a g a c t g g a c c c a c a (配列番号：49)；Mr g p r C 1 1 (c a g c a c a a g t c a g c t c c t c a a (配列番号：50)については、rev a t g c c c a t g a g a a a g g a c a g a a c c (配列番号：51)。

【0127】

発現構築物

Mr g p r 遺伝子をクローン化し、標準的な技術を使用してp c D N A 3 . 1 哺乳類発現プラスミドに挿入した。すべてのマウス遺伝子は、それらのN末端にコザック配列を有しており、また、アミノ酸リンカーD I I Lによって遺伝子から分離されたC末端F L A G タグをコードしていた。

【0128】

c D N A 構築物

第一鎖c D N AをR T - P C Rスクリーニングについて記述されている通りに調製し、Q 5 ホットスタート・ハイ・フィデリティ・マスター・ミックス(ニュー・イングランド・バイオラボ)を使用して増幅を実施した。野生型および突然変異マウスからそれぞれ調製した少なくとも5つの異なるクローンをシーケンシングして、突然変異体における欠失の存在および野生型または突然変異体由来の任意の他の突然変異の非存在を検証した。

【0129】

HEK 2 9 3 細胞におけるカルシウムイメージング

最初のスクリーニングにおいて、HEK 2 9 3 細胞(マイコプラズマについては試験していないが急速に分裂する)に、C末端F L A G タグを包含する遺伝子構築物を一過性にトランスフェクトし、トランスフェクションの6時間後、100 μ g / m l のポリ-D-リジンコーティングしたガラス・カバー・スリップに載置した。24時間後、細胞に、カルシウムインジケータF u r a - 2 またはF l u o - 4 のA M エステル(モレキュラープローブ)を、0.02%プルロニックF - 1 2 7 (モレキュラープローブ)とともに、37 で45分間装填した。F u r a - 2 装填細胞を、340および380nm励起中にイメージングし、F l u o - 4 装填細胞を、488nm励起中にイメージングした。後の実験では、受容体を安定発現している細胞株を宿主域Gタンパク質G 1 5 の一過性または安定発現とともに利用した。細胞を、カルシウムイメージング緩衝液(C I B ; N a C l 1 2 5 m M , K C l 3 m M , C a C l 2 2 . 5 m M , M g C l 2 0 . 6 m M , H E P E S 1 0 m M , グルコース20mM, N a H C O 3 1 . 2 m M , スクロース20mM, N a O H でpH 7 . 4 にしたもの)中でイメージングした。別段の定めがない限り、薬物をチャンバに45から60秒間灌流させ、応答を5秒間隔でさらに60~90秒間モニターした。

【0130】

E C 5 0 決定

G a l p h a 1 5 およびMr g p r B 2 またはMr g p r X 2 のいずれかを安定発現しているHEK 2 9 3 細胞を、96ウェルプレート中、1ウェル当たり4 × 1 0 4 細胞で平

10

20

30

40

50

板培養し、終夜インキュベートした。翌日、培地を除去し、メーカーの提案に従って、ハックス平衡塩類溶液 (HBS S) に 20 mM HEPES を加えたもの、pH 7.4 中で希釈した、FLIPR カルシウム 5 アッセイキット (モレキュラーデバイス) からのイメージング溶液で置きかえた。細胞を 37 で 60 分間インキュベートし、室温で 15 分間回復させた後、フレックスステーション 3 (モレキュラーデバイス) でイメージングした。ウェルを、メーカーの仕様書に従って 120 秒間イメージングし、イメージングが開始した 30 秒後に、50 μ l の 3 倍濃度の試験物質を添加した。最大シグナルから最小シグナルを減算することにより、応答を決定した。物質を 2 連のウェルで試験し、シグナルを平均化し、EC₅₀ を、その試験における物質へのピーク応答に対して正規化することにより、各試験について決定した。すべての薬物を、溶解度の問題による下記の例外を除いて、HBS S + HEPES 溶液に溶解した：酢酸セトロレリクスは、2.5 mM CaCl₂ および 0.6 mM MgCl₂ を含有する生理食塩水に溶解し、オフロキサシンを除くフルオロキノロンは、pH を HCl で 3.5 に調整したことを除いて同じ溶液に溶解し；オフロキサシンは、完全な溶解度のために 100 μ g/ml の乳酸を必要とした。ペプチドは、凍結解凍サイクル後、時に効力を失ったため、ほとんどのペプチドを凍結乾燥ストックから直接調製した。

10

【0131】

腹膜肥満細胞精製およびイメージング

2 ~ 5 月齢の成体雄および雌マウスを、CO₂ 吸入を介して屠殺した。合計 12 ml の氷冷肥満細胞解離培地 (MCDM; HBS S に 3% ウシ胎仔血清および 10 mM HEPES を加えたもの、pH 7.2) を使用して 2 つの連続腹腔洗浄液を作製し、これを合わせ、細胞を 200 g でスピンドウンさせた。各マウスからのペレットを 2 ml の MCDM に再懸濁し、4 ml の等張 70% パーコール懸濁液 (2.8 ml のパーコール、320 μ l の 10x HBS S、40 μ l の 1M HEPES、830 μ l の MCDM) 上に積層させ、20 分間、500 g、4 でスピンドウンさせた。肥満細胞をペレットで回収した。純度は、アビジン染色によっておよび形態学によってアッセイした際に、95% 超であった。10% ウシ胎仔血清および 25 ng/ml 組換えマウス幹細胞因子を加えた DMEM (シグマ) 中に、肥満細胞を 5 x 10⁵ ~ 1 x 10⁶ 細胞/ml で再懸濁し、30 μ g/ml のフィブロネクチンをコーティングしたガラス・カバー・スリップ (シグマ) に載置した。計数のため、平板培養の代わりに、懸濁肥満細胞を 1/10 に希釈し、1000 rpm で 5 分間、4 にて、サイトスピン (サーモサイエンティフィック) でスピンさせることにより、スライドに貼り付けた。

20

30

【0132】

イメージングのために、37、5% CO₂ で 2 時間のインキュベーション後、肥満細胞に、Fluo-4 を、0.02% プルロニック F-127 とともに室温で 30 分間装填し、CIB 中で 3 回洗浄し、直ちにイメージングに使用した。細胞は、装填 2 時間以内に使用した。細胞は、[Ca²⁺]_i が、少なくとも 50%、少なくとも 10 秒間にわたって上昇した場合に応答しているとして同定されたが、これは、無作為なちらつき事象からリガンド誘発性応答を明らかに区別するものである。平均トレースは、マウスの各細胞からの平均応答を取り、それらを平均化することによって、算出された。

40

【0133】

BAC トランスジェニックマウス生成

BAC クローン RP23-65I23 は、小児病院オークランド研究所から購入した。このクローンは、Mr gpr B2 遺伝子座、約 60 kb の 5' ゲノム配列および 100 kb を上回る 3' ゲノム配列を含有する。細菌における組換え工学 (Recombineering) を使用して、Mr gpr B2 開始コドンの直後に eGFP-Cre およびポリ A シグナルを導入した (Metcalfe, D. D., Baram, D. & Mekori, Y. A. Mast cells. Physiological reviews 77, 1033-1079 (1997))。BAC を NotI (ニュー・イングランド・バイオラボ) で線状化し、単細胞受精 C57Bl/6 卵から前核に注射した。卵を偽妊娠の

50

雌に移植した。3つのBACマウス系統が確立された。マウスは既にC57Bl/6バックグラウンドであったが、少なくとも4世代にわたって交配して、C57Bl/6バックグラウンドのWTおよびtdTomatoレポーターマウスとした後、実験に使用した。BACマウスを、イメージング研究のためにジャクソン研究所から購入したROSA26^{tdtomato}マウスと交尾させた。図1の実験では、tdTomatoシグナルが、多くの場合、異種であり、ヘテロ接合マウスにおいては弱いことから、ROSA26^{tdtomato}についてホモ接合のマウスを使用した。BACマウスについての遺伝子型判定反応は、61 アニーリングで実行し、プライマーは、フォワード、tatattcattggccgacaaagca; リバース、cagaccggcggcctgaagaであった。いずれのプライマーもeGFP-Creリーディングフレーム内にあるが、遺伝子全体およびMrgrpB2遺伝子座における正しい配置を、事前のシーケンシングによって検証した。

【0134】

MrgrpB2突然変異マウス生成

MrgrpB2を標的とするジンク・フィンガー・ヌクレアーゼをコードしているmRNAは、シグマから購入した。結合部位は、MrgrpB2オープン・リーディング・フレームの塩基180~194および196~216とそれぞれ対応する、GTTCCCTGGGCATCCG(配列番号:52)およびTGCAACAGAAATGCCCTTCACTG(配列番号:53)であった。mRNAを、0.25mmのEDTAを加えた1mmのトリス-HCl緩衝液、pH7.4中で2ng/mlに希釈し、C57Bl/6株における単細胞受精卵の前核に注射した。毒性の明白な兆候は観察されなかった。胚を偽妊娠の雌に移植した。結合部位の側面に位置するDNAをファウンダーマウスから増幅し、Cell-1アッセイキット(トランスジェノミック)を使用し、メーカーの提案に従って、突然変異についてスクリーニングした。最初の28匹のマウスのうちの3匹を同定し、小さな突然変異を担持することをDNAシーケンシングによって確認し、それ以上のスクリーニングを実施しなかった。この研究において使用した4bp突然変異に加えて、1bp欠失を担持するマウスおよび2bp欠失を持つ別のマウスを同定した。

【0135】

野生型およびMrgrpB2^{MUT}マウス遺伝子型判定

野生型マウスに使用したプライマーは、GTTCCCTGGGCATCCGTAT(配列番号:54)およびGTTCCCTGGGCATCCGTAT(配列番号:55)であり、反応は、62.8のアニーリング温度で実行した。

【0136】

MrgrpB2^{MUT}マウスのためのプライマーは、GTTCCCTGGGCATCCGCAC(配列番号:56)およびCTTCCGCTGAACCTTTCGGT(配列番号:57)であり、反応は、64.0アニーリング温度で実行した。

【0137】

組織のアビジン標識化

最高8月齢の成体雄および雌マウスに、ペントバルビタールで麻酔をかけ、20mlの0.1M PBS(pH7.4、4)で、続いて、25mlの固定液(4%ホルムアルデヒド(vol/vol)、4)で灌流させた。心臓、気管および皮膚切片を、灌流させたマウスから切断した。組織を、固定液中、4で終夜ポストフィックス(post-fix)した。皮膚切片が唯一の必要な組織であった場合、灌流ステップを排除して、CO₂吸入によるマウスの窒息の直後に該切片を切断し、固定液に入れた。組織を20%スクロース(wt/vol)中で24時間超にわたって凍結保護し、クライオスタットで切片にした(幅20μm)。スライド上の切片を、37で30分間乾燥させ、21~23で10分間、4%パラホルムアルデヒドで固定させた。スライドを、ブロッキング溶液(PBS中10%正常ヤギ血清(vol/vol)、0.2%トリトンX-100(vol/vol)、pH7.4)中、21~23で1または2時間ブレインキュベートし、次いで、1/500 FITC-アビジン(シグマ)またはローダミン-アビジン(ベク

10

20

30

40

50

ターラボラトリーズ)とともに45分間インキュベートした。切片を水またはPBSで3回洗浄し、1滴のフルオロマウントG(サザンバイオテック)を添加した後、カバースリップを上部に載置した。心臓肥満細胞は、組織中の他の場所よりも密度がはるかに高いことから、体腔付近で調査し; tdTomatoについて陰性であったアビジン陽性細胞は、筋肉組織中にごく少数で包埋されていることが観察されたが、それらの同定は不明瞭であった。

【0138】

腹膜肥満細胞のアビジン標識化のために、細胞を、肥満細胞精製の項において記述されている通りに平板培養し、21~23で10分間、4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS中の1/1000アビジンとともに、21~23で30分間インキュベートし、PBSで洗浄した後、直ちにイメージングした。

10

【0139】

胃の切片の免疫細胞化学

最高8月齢の成体雄および雌マウスに、ペントバルビタールで麻酔をかけ、20mlの0.1M PBS(pH7.4, 4)で、続いて、25mlの固定液(4%ホルムアルデヒド(vol/vol)、4)で灌流させた。胃の切片を除去し、徹底的に洗浄し、4%ホルムアルデヒド中で2時間ポストフィックスし、30%スクロース溶液中での48時間にわたるインキュベーションによって切片化のために調製した。組織試料をクライオエンベディング培地(cryoembedding media)に載せて凍結させ、クライオスタット(cryostat)を使用して14μmの切片を作製し、次いで、スライドに固定した。スライドを0.2%トリトンX-100 PBS溶液で洗浄し、10%正常ヤギ血清溶液中で1時間インキュベートし、次いで、0.2%トリトン/1%正常ヤギ血清溶液中、ラットモノクローナル抗マウスMCPT1(モノクローナル抗体RF6.1、イーバイオサイエンス)の1:20希釈液とともに、4で終夜インキュベートした。スライドを0.2%トリトン溶液で洗浄し、トリトン溶液中、ヤギ抗ラットIgGアレクサフルオル488コンジュゲート抗体の1:500希釈液(ライフテクノロジー)とともに、室温で2時間インキュベートした。スライドをPBS中で洗浄した後、カバースリップをイメージングのための抗退色溶液とともに添加した。

20

【0140】

末梢白血球調製

同じ溶液で1:1に希釈した、30単位/mlのヘパリンおよび5mM EDTAを加えたPBSを含有するシリンジを用いる心臓穿刺を介して、Mrp2-tdTomatoマウスから血液を収集し、室温に冷却させた後、15mlの円錐管中の6mlのヒストパック-1119溶液上に積層させた。管を700gで30分間遠心分離し、白血球を、PBSおよびヒストパック溶液の界面で収集した。細胞をPBSで洗浄し、500gで10分間、合計3回スピンドウンさせた。細胞を、サイトスピン4(サーモサイエンティフィック)中、600rpmで3~5分間、ポリ-リジンコーティングしたスライド上にスピンドウンさせ、37加熱ブロック上で終夜乾燥させ、PBS中0.5μg/mlに希釈したヘキスト33342とともに2分間インキュベートした後、カバースリップを抗退色溶液とともに載せた。並行して、細胞を、ヘキスト33342を加えた懸濁液中でも染色し、細胞をスピンドウンさせ、PBS/抗退色溶液中で再懸濁した細胞と直接的に混合した後、スライドに直接載置し、懸濁液にカバースリップを載せた。いずれかの方法を使用したいずれの調製物においても、tdTomato陽性細胞は見られなかった。

30

40

【0141】

組織ヒスタミン放出研究

最高6月齢の剃毛した雄および雌マウス(4~8mg湿重量)の腹部の側面から単離した気管全体または皮膚のセグメントを切断し、結合組織を取り除いた。酸素化したクレブス重炭酸塩緩衝液(37)中でのインキュベーション期間において60分後、組織をビヒクルまたは化合物48/80のいずれかで30分間処理した。上清溶液はヒスタミン分析のために取っておいた。次いで、組織を、37水浴中、8%ペルコリック酸(pe

50

rcholoric acid) に15分間供して、総ヒスタミン含有量を取得した。ヒスタミンを、先に記述した自動蛍光技術²によってアッセイした。

【0142】

気管収縮

気管収縮は、先に記述した通りに行った(Lagunoff, D., Martin, T. W. & Read, G. Agents that release histamine from mast cells. Annual review of pharmacology and toxicology 23, 331-351)。アレルギー(オポアルブミン、OVA)応答のために、Al(OH)₃と混合した0.2mLのOVA溶液(3.75 μg/mL)を2日間隔で3回注射することによって、マウスを能動感作した。実験は、最初の注射の2週間後に開始して、8~12週齢の雄および雌の動物に対して行った。気管から結合組織および気管輪(全体または横方向に半分に分割したものを)を取り除き、クレプスを充填した10mLの臓器チャンバ中の2つのタングステンあぶみ間に懸濁し、これを37℃に加温し、95%O₂~5%CO₂で発泡させて、7.4のpHを維持した。一方のあぶみを歪みゲージ(モデルFT03; グラスインストゥルメンツ、マサチューセッツ州クインシー)と接続し、張力をガラスモデル7ポリグラフ(グラスインストゥルメンツ、マサチューセッツ州クインシー)で記録した。調製物を0.2gの静止張力まで伸ばし、新しいクレプス緩衝液により、60分の平衡期間中、15分間隔で洗浄した。平衡後、気管に、OVA(10 μg/mL)または化合物48/80のいずれかで負荷をかけた。各実験の終わりに、すべての気管をカルバコール(1 μM)で最大限に収縮させた。すべての結果は、最大収縮のパーセンテージとして表現される。

【0143】

後足の腫脹および溢出

最高8月齢の成体雄マウスに、50mg/kgのペントバルビタール(シグマ)の腹腔内注射で麻酔をかけた。麻酔導入の15分後、マウスに、生理食塩水中の50 μlの12.5mg/mlエバンスブルー(シグマ)を静脈内注射した。5分後、5 μlの試験物質(または7 μlの抗IgE)を足底内注射によって一方の足に投与し、生理食塩水を他方の足に投与した。注射直後に、足の厚みをカリパスによって測定した。15分後(抗IgEの30分後)、足の厚みを再度測定し、マウスを断頭術によって屠殺した。足の組織を収集し、50℃で24時間乾燥させ、秤量した。エバンスブルーを、ホルムアミド中、50℃での24時間のインキュベーションによって抽出し、分光光度計を使用してO.D.を620nmで読み取った。ケトチフェンを使用する研究では、マウスに、ペントバルビタールと同時に25 μlのケトチフェンの10mg/ml溶液を腹腔内注射した。

【0144】

全身性アナフィラキシーアッセイ

ストレスを最小化するために、動物を注射の前日に処置エリアへ輸送した。最高8月齢の成体雄および雌マウス(25から35グラム)に、生理食塩水(2mg/mL)中の80 μgのプロプラノロールの腹腔内注射を、ケージから取り出した直後に与え、次いで、静脈注射前の30分間、ケージ内に戻した。静脈注射は、1回に1匹のマウスに対して実施した。各注射について、マウスを輸送箱に入れ、他のマウスがいない部屋に連れて行って、注射中の発声によるストレスを最小化した。次いで、拘束時間が長くなるほど、注射とは無関係に身体コア温度に影響を及ぼすことが観察されたため、マウスを拘束帯に入れ、拘束の4分以内に注射を実施した。尾を繰り返し拭き取ることによって尾静脈を拡張させ、組織を100%エタノールに浸し、続いて、30.5標準規格注射針(BDバイオサイエンス)を用いる0.25mLのハミルトンシリンジフィット中のシプロフロキサシンの注射をした。注射は、基準のすべてが満たされた場合のみ成功したと決定された: 針挿入後のシリンジ内に血液が見られ、すべての尾静脈が注射後に可視であり、マウスは、針抜去後に注射部位からわずかに出血した。血液の流れが停止するまで、注射部位を綿球で拭き、マウスを、その飼育ケージから別個のケージに、ケージあたり1匹のマウスを入れ、連れ出してきた部屋に戻した。少なくとも1匹の野生型および1匹の突然変異マウスを

、各実験セッションに使用した。身体コア温度は直腸検温器で測定した。

【0145】

マウス腹膜肥満細胞ヒスタミン放出アッセイ

肥満細胞を、カルシウムイメージングアッセイと同様に精製し、5% CO₂を用いる37のインキュベーター内、10% FBSおよび25 ng/mlのマウス幹細胞因子を加えたDMEM中で2時間回復させた。次いで、細胞をスピンドウンさせ、CIBに再懸濁し、計数し、20 μg/mlのフィブロネクチンでコーティングした96ウェルプレート(シグマ)中、75 μlのCIB中300細胞/ウェルで平板培養した。該細胞を、アッセイ前に、大気条件(すなわち、CO₂レベルを調整しなかった)において、37で45分間、基質に付着させた。アッセイのために、細胞を除去して室温にし、75 μlの試験物質の2倍濃縮物(シプロフロキサシンを除いてすべてCIB中、シプロフロキサシンは、2.5 mM CaCl₂および0.6 mM MgCl₂を加えた生理食塩水中、pH 3.5)を添加した。5分後、40 μlの上清を吸引し、40 μlのCIBで希釈し、ヒスタミンレベルが決定されるまで-80で凍結させた。抗IgE処理は、抗IgEを添加した後、上清の吸引前に、細胞を37で30分間インキュベートしたことを除き、同様であった。ヒスタミン含有量は、HTRFヒスタミンアッセイキット(シスバイオアッセイズ(Cisbio Assays))を、メーカーの説明書に従って使用することにより、決定された。

10

【0146】

ヒト肥満細胞培養

LAD2(アレルギー疾患の研究室2(Laboratory of Allergic Diseases 2))ヒト肥満細胞を、2 mMのL-グルタミン、100 U/mlのペニシリン、50 μg/mlのストレプトマイシンおよび100 ng/mlの組換えヒト幹細胞因子(ペプロテック)を補充した、ステムプロ-34 SFM培地(ライフテクノロジーズ)中で培養した。細胞懸濁液を0.1 × 10⁶細胞/mlの密度で播種し、37および5% CO₂で維持し、フローサイトメトリーにより、CD117およびFcRIの発現について定期的に試験した。細胞培養培地は、新しい培地を用いて毎週半枯渇させた。

20

【0147】

LAD2脱顆粒アッセイ

LAD2細胞を、0.5 μg/mlのビオチンコンジュゲートヒトIgE(アピオテック)で20時間感作した。細胞を洗浄し、ヘパス緩衝液(10 mM HEPES、137 mM NaCl、2.7 mM KCl、0.38 mM Na₂HPO₄ · 7H₂O、5.6 mM グルコース、1.8 mM CaCl₂ · H₂O、1.3 mM MgSO₄ · 7H₂O、0.4% BSA、pH 7.4)に、ウェル当たり0.025 × 10⁶で再懸濁し、次いで、0.1 μg/mlのストレプトアビジン(ライフテクノロジーズ)または示された濃度の他のアゴニストで、37/5% CO₂にて30分間刺激した。上清中におよび細胞溶解物中で放出された-ヘキソサミニダーゼを、0.1 Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5)中、37で90分間にわたるp-ニトロフェニルN-アセチル-D-グルコサミド(シグマアルドリッチ)の加水分解によって定量化した。-ヘキソサミニダーゼ放出のパーセンテージは、総含有量のパーセントとして算出した。試験したアゴニストは、化合物48/80、マストパラン、イカチバント、ベシル酸アトラクリウムおよびシプロフロキサシン塩酸塩であった。

30

40

【0148】

EIAおよびELISA

LAD2細胞を培地で洗浄し、ウェル当たり0.25 × 10⁶細胞で懸濁し、示された濃度の化合物48/80、マストパラン、イカチバント、アトラクリウムまたはシプロフロキサシンとともに、37/5% CO₂で3~24時間インキュベートした。無細胞上清を収穫し、EIA(ケイマンケミカル)によってPGD₂放出について分析し、一方、TNF含有量を、ELISAキット(イーバイオサイエンス)を使用し、メーカーの説明

50

書に従って定量化した。最小検出限界は、PGD₂については55 pg/ml、TNFについては5.5 pg/mlであった。

【0149】

LAD2細胞からのヒスタミン放出の測定

LAD2細胞を洗浄し、ウェル当たり 0.1×10^6 で無BSAヘブス緩衝液に懸濁し、示された濃度の化合物48/80、マストパン、イカチバント、アトラクリウムまたはシプロフロキサシンとともに、37 / 5% CO₂で30分間インキュベートした。100 μg/mlのヒスタミン(シグマアルドリッチ)ストック溶液を調製し、-20 で貯蔵した。2倍連続希釈を使用して、4000 ng/mlから7.8 ng/mlの作業標準を新しく調製した。O-フタルアルデヒド(OPT;シグマアルドリッチ)を無アセトンメタノール(10 mg/ml)に溶解し、4 の暗所に保った。ヒスタミン標準および無細胞上清(60 μL)を平底96黒色ウェルマイクロプレートに移し、12 μlの1M NaOHおよび3 μlのOPTと混合した。室温で4分後、6 μlの3M HClを添加して、ヒスタミン-OPT反応を停止させた。蛍光強度は、355 nm励起フィルタおよび460 発光フィルタを使用して計測した。

10

【0150】

LAD2細胞のsiRNAトランスフェクション

MrgprX2の発現をMrgprX2およびダーマコン製の対照siRNAに対してON-TARGETプラスSMARTプールsiRNAでダウンレギュレートした。LAD2細胞を培地で洗浄し、ウェル当たり 0.5×10^6 細胞で懸濁し、100 nm MrgprX2 siRNAおよび対照siRNAを、無抗生物質ステムプロ培地中、リポフェクタミン3000(ライフテクノロジーズ)をメーカーの説明書に従って使用して、37 / 5% CO₂でトランスフェクトした。48時間で、逆転写酵素PCRによってノックダウンを確認し、細胞を脱顆粒アッセイに使用した。

20

【実施例2】

【0151】

MrgprB2はヒトMrgprX2のオルソログである

塩基性分泌促進物質に対する応答性は、哺乳動物間で保存されており(Halpern, B.N. & Wood, D.R. The action of promethazine (phenergan) in protecting mice against death due to histamine. British journal of pharmacology and chemotherapy 5, 510-516 (1950))、鳥類においても見られ(Taneike, T., Miyazaki, H., Oikawa, S. & Ohga, A. Compound 48/80 elicits cholinergic contraction through histamine release in the chick oesophagus. General pharmacology 19, 689-695 (1988))、その機序が果たす古代からの基本的役割を示している。多くの塩基性分泌促進物質は内因性ペプチドであり、多くの場合、炎症に関わっているが、高濃度でのみ、かつそれらのカノニカル(canonical)受容体とは無関係に結合組織肥満細胞を活性化させるため、刺激の機序が別に存在するに違いない(Ferry, X., Brehin, S., Kamel, R. & Landry, Y.G. protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. Peptides 23, 1507-1515 (2002))。ポリカチオン性化合物を結合するいくつかの候補が塩基性分泌促進物質受容体として報告されている(Ferry, X., Brehin, S., Kamel, R. & Landry, Y.G. protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. Peptides 23, 1507-1515 (2002); Purcell, W.M., Doyle, K.M., Westgate, C. & Atterwil

30

40

50

l, C. K. Characterisation of a functional polyamine site on rat mast cells: association with a NMDA receptor macrocomplex. *Journal of neuroimmunology* 65, 49 - 53 (1996); Tatemoto, K. et al. Immunoglobulin E - independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochemical and biophysical research communications* 349, 1322 - 1328, (2006); Sick, E., Niederhoffer, N., Takeda, K., Landry, Y. & Gies, J. P. Activation of CD47 receptors causes histamine secretion from mast cells. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 66, 1271 - 1282, (2009)。これらの中でも、MrgprX2は、ほとんどの化合物でスクリーニングされてきており (Tatemoto, K. et al. Immunoglobulin E - independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochemical and biophysical research communications* 349, 1322 - 1328, (2006); Robas, N., Mead, E. & Fidock, M. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *The Journal of biological chemistry* 278, 44400 - 44404, (2003); Subramanian, H., Gupta, K., Guo, Q., Price, R. & Ali, H. Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization. *The Journal of biological chemistry* 286, 44739 - 44749, (2011); Kashem, S. W. et al. G protein coupled receptor specificity for C3a and compound 48/80-induced degranulation in human mast cells: roles of Mas-related genes MrgX1 and MrgX2. *European journal of pharmacology* 668, 299 - 304, (2011); Subramanian, H. et al. beta-Defensins activate human mast cells via Mas-related gene X2. *Journal of immunology* 191, 345 - 352, (2013); Kamohara, M. et al. Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides. *Biochemical and biophysical research communications* 330, 1146 - 1152, (2005)、siRNAノックダウン研究は、非カノニカル塩基性分泌促進物質による活性化において少なくとも部分的にMrgprX2が果たす役割を裏付けるものである (Subramanian, H., Gupta, K., Guo, Q., Price, R. & Ali, H. Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to recepto

r phosphorylation, desensitization, and internalization. The Journal of biological chemistry 286, 44739 - 44749, (2011); Subramanian, H. et al. beta-Defensins activate human mast cells via Mas-related gene X2. Journal of immunology 191, 345 - 352, (2013)。

しかしながら、直接的なインビボ研究もノックアウトモデルも、あらゆる候補に用いられてこなかった。マウスにおけるMr g p r X 2の調査は、4つのヒトMr g p r Xメンバーを含有する遺伝子クラスターがマウスにおいて劇的に拡大しており、該メンバーは22の潜在的なコード遺伝子からなり、多くはMr g p r X 2と同程度の配列同一性を持つことから、複雑である(図1A)。したがって、マウスMr g p r X 2オルソログを、発現パターンおよび薬理学によって決定しなくてはならない。マウス一次肥満細胞におけるストリンジントなRT-PCRスクリーニングは、単一のファミリーメンバー、Mr g p r B 2を表すバンドを見出さず(図1B)、一方、Mr g p r X 1オルソログは、示差的レベルで発現されなかった(図5Aおよび図5B)。

【0152】

機能的に、Mr g p r B 2を異種発現しているHEK293細胞(Mr g p r B 2-HEK)は、Mr g p r X 2アゴニストPAMP(9~20)¹⁴(図1C)および化合物48/80(48/80)、古典的な肥満細胞活性化因子ならびにカノニカル塩基性分泌促進物質(図6A、図6Bおよび図6C)に応答した。Mr g p r B 2-HEK細胞は、塩基性分泌促進物質の物質Pを包含する他のMr g p r X 2リガンドにも応答したが、Mr g p r X 1リガンドクロロキン(CQ)に対しては応答せず(Liu, Q. et al. Sensory neuron-specific GPCR Mr g p r s are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. Cell 139, 1353 - 1365, (2009))；マウスにおける密接に関係しているファミリーメンバーのいずれも、あらゆる化合物に対して応答しなかった(図5C、図6Aおよび図6C)。Mr g p r B 2の発現を決定するために、eGFP-Creリコンビナーゼの発現がMr g p r B 2プロモータの制御下にあるMr g p r B 2 BACトランスジェニックマウスを生成した。Cre発現パターンは、際立って、Mr g p r B 2発現が結合組織肥満細胞に高度に特異的であることを示す(図1D、図7、図8Aおよび図8B)。薬理的および発現データは、一緒に、Mr g p r B 2がMr g p r X 2のマウスオルソログであることを示す。

【実施例3】

【0153】

Mr g p r B 2はマウス肥満細胞塩基性分泌促進物質受容体である

次に、Mr g p r B 2がマウス肥満細胞において塩基性分泌促進物質受容体であるかを決定した。Mr g p r B 2ゲノム遺伝子座は、相同的組換えを介して遺伝子標的化を可能にするには多すぎる反復配列を含有する(図9A)。したがって、ジンク・フィンガー・ヌクレアーゼベースの戦略を使用して、Mr g p r B 2コード領域に4塩基対欠失があるマウス系統(Mr g p r B 2^{MUT}マウス)を生成し、第一の膜貫通ドメインの後まもなくフレームシフト突然変異および早期終止をもたらした(図9B、図9Cおよび図9D)。突然変異は安定かつ遺伝性であった(図9C)ため、Mr g p r B 2^{MUT}を機能的ヌルとみなした。肥満細胞数は、野生型(WT)およびMr g p r B 2^{MUT}マウスの組織において同程度であり、Mr g p r B 2が肥満細胞生存にも組織への標的化にも必須ではないことを示した(図10A)。抗IgE抗体(図2A)およびエンドセリン(図11A、図11Bおよび図11C)に対する腹膜肥満細胞の応答性も同程度であり、Mr g p r B 2突然変異がIgEまたはGPCR媒介性肥満細胞シグナル伝達を全体的に損なうわけではないことを実証した。しかしながら、48/80誘発性肥満細胞活性化(図2A)および組織ヒスタミン放出は、突然変異肥満細胞において本質的に消失した(図2Bおよび図10B)。さらに、48/80が引き起こした気管収縮(図2C)および後足炎症

(溢出および腫脹 ; 図 2 D) は、M r g p r B 2 ^{M U T} バックグラウンドではほぼ完全に存在せず、一方、抗原 (図 2 C) および抗 I g E が引き起こした応答 (図 1 2 A および図 1 2 B) は、W T マウスと同程度であった。最後に、4 つのさらなる塩基性分泌促進物質、ならびに M r g p r X 2 アゴニスト P A M P (9 ~ 2 0) およびコルチスタチン (R o b a s , N . , M e a d , E . & F i d o c k , M . M r g X 2 i s a h i g h p o t e n c y c o r t i s t a t i n r e c e p t o r e x p r e s s e d i n d o r s a l r o o t g a n g l i o n . T h e J o u r n a l o f b i o l o g i c a l c h e m i s t r y 2 7 8 , 4 4 4 0 0 - 4 4 4 0 4 , d o i : 1 0 . 1 0 7 4 / j b c . M 3 0 2 4 5 6 2 0 0 (2 0 0 3)) は、W T を強く活性化させたが、M r g p r B 2 ^{M U T} 肥満細胞はさせなかった (図 2 E ; 図 1 3 A) 。 M r g p r B 2 または M r g p r X 2 を発現している H E K 2 9 3 細胞 (M r g p r X 2 - H E K) も、これらの分泌促進物質に応答した (図 6 A および図 6 B) 。まとめると、M r g p r B 2 はマウス肥満細胞塩基性分泌促進物質受容体であると結論づけられた。M r g p r B 2 を活性化させる小型の塩基性ペプチドのリストは、この研究における数よりも大きい可能性が高く、実際に、数十のそのようなペプチドが肥満細胞を活性化させることが示されている (L a g u n o f f , D . , M a r t i n , T . W . & R e a d , G . A g e n t s t h a t r e l e a s e h i s t a m i n e f r o m m a s t c e l l s . A n n u a l r e v i e w o f p h a r m a c o l o g y a n d t o x i c o l o g y 2 3 , 3 3 1 - 3 5 1 , d o i : 1 0 . 1 1 4 6 / a n n u r e v . p a . 2 3 . 0 4 0 1 8 3 . 0 0 1 5 5 5 (1 9 8 3) ; F e r r y , X . , B r e h i n , S . , K a m e l , R . & L a n d r y , Y . G p r o t e i n - d e p e n d e n t a c t i v a t i o n o f m a s t c e l l b y p e p t i d e s a n d b a s i c s e c r e t a g o g u e s . P e p t i d e s 2 3 , 1 5 0 7 - 1 5 1 5 (2 0 0 2) ; M o u s l i , M . , H u g l i , T . E . , L a n d r y , Y . & B r o n n e r , C . P e p t i d e r g i c p a t h w a y i n h u m a n s k i n a n d r a t p e r i t o n e a l m a s t c e l l a c t i v a t i o n . I m m u n o p h a r m a c o l o g y 2 7 , 1 - 1 1 (1 9 9 4) ; P u n d i r , P . & K u l k a , M . T h e r o l e o f G p r o t e i n - c o u p l e d r e c e p t o r s i n m a s t c e l l a c t i v a t i o n b y a n t i m i c r o b i a l p e p t i d e s : i s t h e r e a c o n n e c t i o n ? I m m u n o l o g y a n d c e l l b i o l o g y 8 8 , 6 3 2 - 6 4 0 , d o i : 1 0 . 1 0 3 8 / i c b . 2 0 1 0 . 2 7 (2 0 1 0)) 。とりわけ、ヒト M r g p r X 2 は、物質 P に対してマウス M r g p r B 2 よりもはるかに感受性であり (図 6 C) 、肥満細胞シグナル伝達において物質 P が果たす潜在的な種特異的役割を示唆している。

【 0 1 5 4 】

これらのペプチドのマイクロモル濃度が M r g p r B 2 活性化に必要とされることを考慮すると、そのようなシグナル伝達事象がどこで発生するかは不明瞭である。しかしながら、肥満細胞は、大量の小型のカチオン性ペプチドを分泌する膵臓および副腎のような臓器に存在し、放出部位の近くの濃度はこれらのレベルに到達することが考えられる。本明細書において記述されているのは、M r g p r B 2 に対する高親和性内因性リガンドである。内因性 M r g p r B 2 および M r g p r X 2 リガンドの同定は、病態において肥満細胞が他の細胞型とどのように相互作用するかを理解することに有意に寄与する。

【 実施例 4 】

【 0 1 5 5 】

M r g p r B 2 はペプチド性治療薬の肥満細胞応答性および副作用を媒介する

アレルギーおよび偽アレルギー (すなわち、I g E 非依存性) 反応における肥満細胞の重大な役割は、M r g p r X 2 がこれらの事象における因子であるか否かを実証する実験の必要性を示唆していた。多くの治療薬がカチオン性であることから、薬剤誘発性反応が取り上げられた。薬剤誘発性有害反応の最大 1 5 % が、アレルギー性の性質であるとみら

れているが、多くはIgE抗体力価と十分に相関性があるわけではなく、抗体非依存性または偽アレルギー機序が関与することを示している (Hausmann, O., Schnyder, B. & Pichler, W. J. Etiology and pathogenesis of adverse drug reactions. *Chemical immunology and allergy* 97, 32 - 46, doi: 10.1159/000335614 (2012))。

【0156】

ペプチド作動薬のほとんどは、カチオン性ペプチドが肥満細胞を活性化させるために十分高いミリモル濃度で皮下にまたは筋肉内に導入されるため、最初にペプチド作動薬を分析した (図15)。これらの薬物のFDAラベルにおいて記述されているほとんどの頻繁に起こるアレルギー型応答は、疼痛または搔痒が付随し得る、注射部位反応 (ISR)、局所腫脹および/または可変サイズの発赤である。FDA承認ペプチド作動薬の調査において、ISRに関連する圧倒的多数がカチオン性である (図15)。これらのカチオン性薬物のすべての一般的な市販のクラスの代表的なメンバーは肥満細胞をMrgprB2依存性様式で活性化させ、一方、無害なタンパク質インスリンは効果をもたらさなかった (図3A、図13Bおよび図13C)。一貫して、インスリンを除くこれらのペプチドのすべては、MrgprB2-HEKおよびMrgprX2-HEK細胞の両方を活性化させる (図6A、図6Bおよび図6C)。薬物イカチバントは、ほぼすべての患者においてISRを誘発することから、さらなる研究のために選択された (Lumry, W. R. et al. Randomized placebo-controlled trial of the bradykinin B(2) receptor antagonist icatibant for the treatment of acute attacks of hereditary angioedema: the FAST-3 trial. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 107, 529 - 537, (2011))。臨床濃度のイカチバントは、WTマウスにおいてはヒトISRと同様の広範囲にわたる溢出版および腫脹を誘発したが、MrgprB2^{MUT}マウスにおいてはしなかった (図3B)。肥満細胞安定剤ケトチフェンで前処理したマウスも、炎症を示さず (ケトチフェンなし: 足の厚みの40.7 ± 2.1%増大; ケトチフェンあり: 3.1 ± 0.6%増大; n = 4ずつ; p = 2.2e-6)、肥満細胞が炎症を媒介することを強く示していた。さらに、イカチバント (ならびに陽性対照48/80およびマストパン) は、WT腹膜肥満細胞からのヒスタミン放出を誘発し、一方、MrgprB2^{MUT}肥満細胞の放出は実質的により少なかった (図3C)。しかしながら、IgE媒介性ヒスタミン放出は、MrgprB2欠失により影響を受けなかった (図3C)。これらのデータは、薬剤誘発性ISRが、MrgprX2を標的化することによって、またはあまり強力でないMrgprX2アゴニスト特性を持つペプチドを使用することによって軽減され得ることを予測するものである。

【実施例5】

【0157】

MrgprB2は小分子治療薬の肥満細胞応答性および副作用を媒介する

次に、小分子によって誘発された偽アレルギー反応をMrgprB2が媒介する可能性を探究した。静脈内に適用される薬物は、多くの場合、迅速にかつ高用量で投与され、故に、他の経路を介して投与される薬物よりも高い血中濃度および迅速な組織分布を実現する可能性が高いことから、静脈内に適用される薬物に焦点を合わせた。静脈内投与後の偽アレルギー反応の症状は、最も重度のものをアナフィラキシー様と呼び、皮膚潮紅または発疹、血圧または心拍数の変化、および気管支けいれんを包含する (Nel, L. & Eren, E. Peri-operative anaphylaxis. *British journal of clinical pharmacology* 71, 647 - 658, doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.03913.

x (2011))。初期研究は、48/80の構造に基づく。MrgprX2アゴニストとしての48/80の構造機能関係は不明であったが、テトラヒドロイソキノリン(THIQ)モチーフを含有する環化バリエーション(図4A)は、肥満細胞脱顆粒剤(degranulator)として、48/80よりも7倍強力であった(Read, G.W. Compound 48-80. Structure-activity relations and poly-THIQ, a new, more potent analog. Journal of medicinal chemistry 16, 1292-1295 (1973))。THIQを含有するFDA承認薬の探索は、ツボクラリンおよびアトラクリウムを包含するニコチン性受容体アンタゴニスト非ステロイド性神経筋遮断薬(NMBD)のメンバーを回復させた(図4B)。NMBDは、手術において、不要な筋肉の動きを低減させ、人工呼吸器のための気管内挿管を可能にするために日常的に使用されている。興味深いことに、NMBD単独で、外科的状況におけるアレルギー反応のほぼ60%の原因となっており(Mertes, P.M., Alla, F., Trecho, P., Auroy, Y. & Jouglan, E. Anaphylaxis during anesthesia in France: an 8-year national survey. J Allergy Clin Immunol 128, 366-373 (2011))、スクシニルコリンを除くすべてが、ヒトにおいてヒスタミン放出を誘発する(Koppert, W. et al. Different patterns of mast cell activation by muscle relaxants in human skin. Anesthesiology 95, 659-667 (2001))。図16に示されている通り、スクシニルコリンを除くすべてのNMBDファミリーのメンバーは、肥満細胞を、MrgprB2依存性様式で、臨床注射濃度の0.5%という低さの濃度にて活性化させた(図4Cおよび図13D)。興味深いことに、ロクロニウムはTHIQを含有しないが、48/80を連想させる、数オングストローム以内の荷電窒素を持つ大きい疎水性基(図4B)を有する。したがって、研究は、アッセイを高い注射濃度の静脈内薬物に限定し、陽性または極性窒素の環化および位置の変化を包含するTHIQモチーフおよび48/80構造の変調を使用して実施した。抗生物質のフルオロキノロンファミリーは、同様のモチーフを有するとして同定された(図4D)。NMBDのように、これらはアレルギー型反応に関連しており(Kelesidis, T., Fleisher, J. & Tsiodras, S. Anaphylactoid reaction considered ciprofloxacin related: a case report and literature review. Clin Ther 32, 515-526 (2010); Blanca-Lopez, N. et al. Hypersensitivity reactions to fluoroquinolones: analysis of the factors involved. Clin Exp Allergy 43, 560-567 (2013))、肥満細胞を活性化させることができる(Mori, K., Maru, C. & Takasuna, K. Characterization of histamine release induced by fluoroquinolone antibacterial agents in vivo and in vitro. The Journal of pharmacy and pharmacology 52, 577-584 (2000); Mori, K., Maru, C., Takasuna, K. & Furuhashi, K. Mechanism of histamine release induced by levofloxacin, a fluoroquinolone antibacterial agent. European journal of pharmacology 394, 51-55 (2000))。静脈内使用のために承認された4つのメンバーは、MrgprB2-HEKおよびMrgprX2-HEK細胞(図6A、図6Bおよび図6C)ならびに肥満細胞をMrgprB2依存性様式で(図4E; 図13C)活性化した。それに対応して、アトラクリウムおよびシプロフロキサシンは、WT腹膜肥満細胞におけるヒスタミン放出を誘発し、Mrgp

Mr gpr B2^{MUT}肥満細胞においては実質的により少なかった(図3C)。シプロフロキサシンは、マウスにおいては、ほとんどの場合、血圧および末梢血管拡張の変化による可能性が高い体温の降下によって測定される、アナフィラキシーのインビボ試験に選択された(Doyle, E., Trosien, J. & Metz, M. Protocols for the induction and evaluation of systemic anaphylaxis in mice. *Methods in molecular biology* 1032, 133-138, doi:10.1007/978-1-62703-496-8_10 (2013))。げっ歯類は、他の実験生物とは対照的に、全身レベルのヒスタミン毒性に対してほぼ免疫がある(Halpern, B. N. & Wood, D. R. The action of promethazine (phenergan) in protecting mice against death due to histamine. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 5, 510-516 (1950))が、肥満細胞活性化因子およびベータ-アドレナリン遮断薬での前処理により分泌された生成物に対して感受性になることができる(Bergman, R. K. & Munoz, J. Efficacy of beta-adrenergic blocking agents in inducing histamine sensitivity in mice. *Nature* 217, 1173-1174 (1968); Matsumura, Y., Tan, E. M. & Vaughan, J. H. Hypersensitivity to histamine and systemic anaphylaxis in mice with pharmacologic beta-adrenergic blockade: protection by nucleotides. *J Allergy Clin Immunol* 58, 387-394 (1976))。これらの条件下で、高用量のシプロフロキサシンは、回復するのが非常に遅い体温の急降下を誘発し、一方、Mr gpr B2^{MUT}マウスは、急速に回復するはるかに小さい降下を示した(図4F)。これらの結果は、Mr gpr B2を介する肥満細胞活性化がフルオロキノロンおよび他の薬物のオフ標的効果であり、ヒトにおける対応するMr gpr X2活性化は、これらの薬物に見られる偽アレルギー応答のほとんどの根底にあるかもしれないことを立証するものである。

【実施例6】

【0158】

偽アレルギーに関連する薬物はMr gpr X2を介してヒト肥満細胞を活性化させる

最後に、偽アレルギーに関連する薬物が、Mr gpr X2を介してヒト肥満細胞を活性化させるか否かを決定した。調査された各薬物クラスの代表的なメンバーは、LAD2細胞からの、ヒスタミン、TNF、PGD₂および-ヘキソサミニダーゼの放出を引き起こした(図14A)。48/80およびマストパンを陽性対照として使用した。重要なことには、Mr gpr X2 siRNA処理LAD2細胞は、対照siRNA処理細胞における応答と比較して有意に低い、これらの物質によって引き起こされた-ヘキソサミニダーゼ放出を呈し、一方、IgE媒介性放出は同程度であった(図14B)。Mr gpr X2 siRNA処理細胞において観察された残りの放出は、不完全なmRNAおよび/またはタンパク質ノックダウンによる可能性が高い。

【0159】

上記で詳細に記述した通り、マウスにおけるMr gpr B2およびヒトにおけるMr gpr X2は、肥満細胞における塩基性分泌促進物質受容体である。IgE非依存性薬剤誘発性偽アレルギーの重大なメディエータとしての、この受容体の最初に分かったインビボでの役割についての証拠も、本明細書において記述されている。故に、薬剤誘発性偽アレルギーにおけるMr gpr X2の役割についての知識は、2つの理由で拡大している。第一に、リガンド結合要件検討は、Mr gpr X2を交差活性化する薬物のための、より特異的なスクリーニングを可能にする。第二に、経口投与される薬物をスクリーニングすることは、経口投与される薬物の一般的な副作用が胃腸の問題および頭痛を包含し、そのい

10

20

30

40

50

ずれも肥満細胞成分を有することから、さらなる MrgprX2 リガンドを見出す。

【 0 1 6 0 】

参考文献

- Bergman, R. K. & Munoz, J. Efficacy of beta-adrenergic blocking agents in inducing histamine sensitivity in mice. *Nature* 217, 1173-1174 (1968).
- Blanca-Lopez, N. et al. Hypersensitivity reactions to fluoroquinolones: analysis of the factors involved. *Clin Exp Allergy* 43, 560-567 (2013).
- Doyle, E., Trosien, J. & Metz, M. Protocols for the induction and evaluation of systemic anaphylaxis in mice. *Methods in molecular biology* 1032, 133-138, (2013).
- Ferry, X., Brehin, S., Kamel, R. & Landry, Y. G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. *Peptides* 23, 1507-1515 (2002).
- Fluker, M. et al. Efficacy and safety of ganirelix acetate versus leuprolide acetate in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertility and sterility* 75, 38-45 (2001).
- Galli, S. J., Nakae, S. & Tsai, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology* 6, 135-142, (2005).
- Halpern, B. N. & Wood, D. R. The action of promethazine (phenergan) in protecting mice against death due to histamine. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 5, 510-516 (1950).
- Han, L. et al. A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nature neuroscience* 16, 174-182, (2013).
- Harper, N. J. et al. Suspected anaphylactic reactions associated with anaesthesia. *Anaesthesia* 64, 199-211, (2009).
- Hausmann, O., Schnyder, B. & Pichler, W. J. Etiology and pathogenesis of adverse drug reactions. *Chemical immunology and allergy* 97, 32-46, (2012).
- Kamohara, M. et al. Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides. *Biochemical and biophysical research communications* 330, 1146-1152, (2005).
- Kashem, S. W. et al. G protein coupled receptor specificity for C3a and compound 48/80-induced degranulation in human mast cells: roles of Mas-related genes MrgX1 and MrgX2. *European journal of pharmacology* 668, 299-304, (2011).
- Kelesidis, T., Fleisher, J. & Tsiodras, S. Anaphylactoid reaction considered ciprofloxacin related: a case report and literature review. *Clin Ther* 32, 515-526 (2010).
- Koppert, W. et al. Different patterns of mast cell activation by muscle relaxants in human skin. *Anesthesiology* 95, 659-667 (2001).
- Lagunoff, D., Martin, T. W. & Read, G. Agents that release histamine from mast cells. *Annual review of pharmacology and toxicology* 23, 331-351
- Liu, Q. et al. Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell* 139, 1353-1365, (2009).
- Lumry, W. R. et al. Randomized placebo-controlled trial of the bradykinin B(2) receptor antagonist icatibant for the treatment of acute attacks of hereditary angioedema: the FAST-3 trial. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 107, 529-537, (2011).
- Matsumura, Y., Tan, E. M. & Vaughan, J. H. Hypersensitivity to histamine and systemic anaphylaxis in mice with pharmacologic beta adrenergic blockade: protection by nucleotides. *J Allergy Clin Immunol* 58, 387-394 (1976).
- Mertes, P. M., Alla, F., Trechot, P., Auroy, Y. & Jouglu, E. Anaphylaxis during

10

20

30

40

50

- anesthesia in France: an 8-year national survey. *J Allergy Clin Immunol* 128, 366-373 (2011).
- Metcalf, D., Baram, D. & Mekori, Y. A. Mast cells. *Physiological reviews* 77, 1033-1079 (1997).
- Mori, K., Maru, C. & Takasuna, K. Characterization of histamine release induced by fluoroquinolone antibacterial agents in-vivo and in-vitro. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 52, 577-584 (2000).
- Mori, K., Maru, C., Takasuna, K. & Furuhashi, K. Mechanism of histamine release induced by levofloxacin, a fluoroquinolone antibacterial agent. *European journal of pharmacology* 394, 51-55 (2000). 10
- Mousli, M., Hugli, T. E., Landry, Y. & Bronner, C. Peptidergic pathway in human skin and rat peritoneal mast cell activation. *Immunopharmacology* 27, 1-11 (1994).
- Nel, L. & Eren, E. Peri-operative anaphylaxis. *British journal of clinical pharmacology* 71, 647-658, (2011).
- Pundir, P. & Kulka, M. The role of G protein-coupled receptors in mast cell activation by antimicrobial peptides: is there a connection? *Immunology and cell biology* 88, 632-640, (2010).
- Purcell, W. M., Doyle, K. M., Westgate, C. & Atterwill, C. K. Characterisation of a functional polyamine site on rat mast cells: association with a NMDA receptor macrocomplex. *Journal of neuroimmunology* 65, 49-53 (1996). 20
- Read, G. W. Compound 48-80. Structure-activity relations and poly-THIQ, a new, more potent analog. *Journal of medicinal chemistry* 16, 1292-1295 (1973).
- Robas, N., Mead, E. & Fidock, M. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *The Journal of biological chemistry* 278, 44400-44404, (2003).
- Sick, E., Niederhoffer, N., Takeda, K., Landry, Y. & Gies, J. P. Activation of CD47 receptors causes histamine secretion from mast cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66, 1271-1282, (2009).
- Siraganian, R. P. An automated continuous-flow system for the extraction and fluorometric analysis of histamine. *Analytical biochemistry* 57, 383-394 (1974). 30
- Subramanian, H. et al. beta-Defensins activate human mast cells via Mas-related gene X2. *Journal of immunology* 191, 345-352, (2013).
- Subramanian, H., Gupta, K., Guo, Q., Price, R. & Ali, H. Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization. *The Journal of biological chemistry* 286, 44739-44749, (2011).
- Taneike, T., Miyazaki, H., Oikawa, S. & Ohga, A. Compound 48/80 elicits cholinergic contraction through histamine release in the chick oesophagus. *General pharmacology* 19, 689-695 (1988). 40
- Tatemoto, K. et al. Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochemical and biophysical research communications* 349, 1322-1328, (2006).
- Tuvia, S. et al. Oral octreotide absorption in human subjects: comparable pharmacokinetics to parenteral octreotide and effective growth hormone suppression. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 97, 2362-2369, (2012).
- Verschraegen, C. F. et al. Phase II study of cetorelix, a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist in patients with platinum-resistant ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 90, 552-559 (2003).
- Weigand, L. A., Myers, A. C., Meeker, S. & Undem, B. J. Mast cell-cholinergic ne 50

rive interaction in mouse airways. The Journal of physiology 587, 3355-3362, (2009).

【0161】

他の実施形態

本発明について、その詳細な記述と併せて記述してきたが、前述の記述は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を例証することを意図するものであり、限定することを意図するものではない。他の態様、利点および修正は、下記の特許請求の範囲内である。

【0162】

本明細書において参照される特許および科学文献は、当業者に利用可能な知識を確立するものである。本明細書において引用されているすべての米国特許および公開または未公開の米国特許出願は、参照により組み込まれる。本明細書において引用されているすべての公開外国特許および特許出願は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書において引用されている受託番号によって示されるジーンバンクおよびNCBI寄託は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書において引用されているすべての他の公開された参考文献、文書、原稿および科学文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

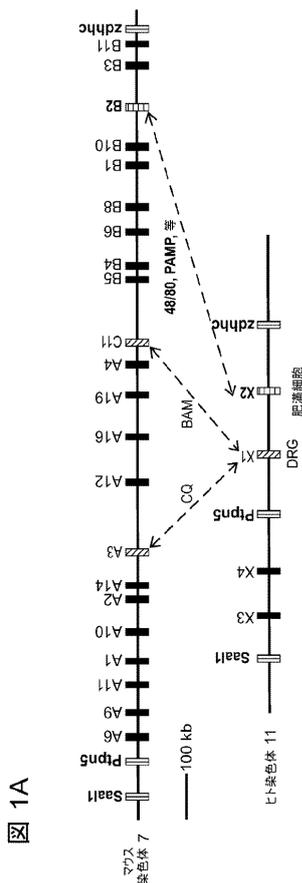
【0163】

本発明について、その好ましい実施形態を参照して特に示し記述してきたが、添付の特許請求の範囲によって包括される本発明の範囲から逸脱することなく、形態および詳細における種々の変更がその中で為され得ることが、当業者には理解されるであろう。

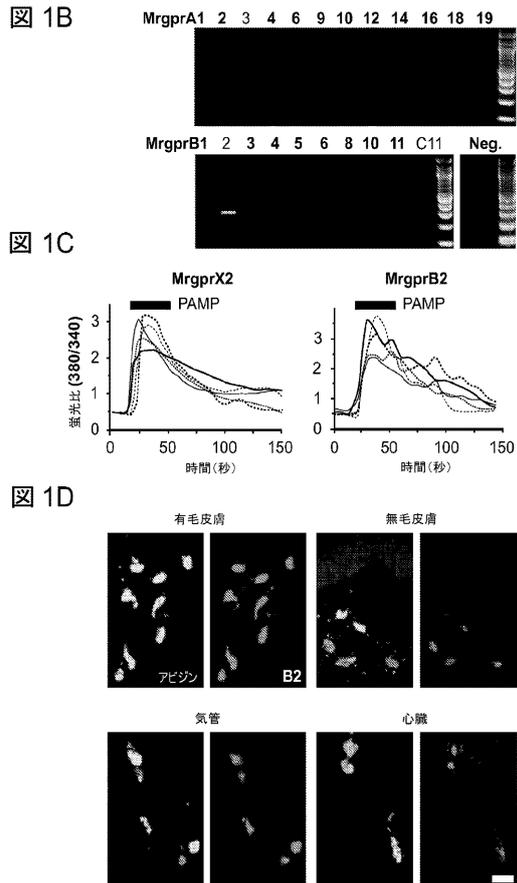
10

20

【図1-1】



【図1-2】



【 図 2 - 1 】

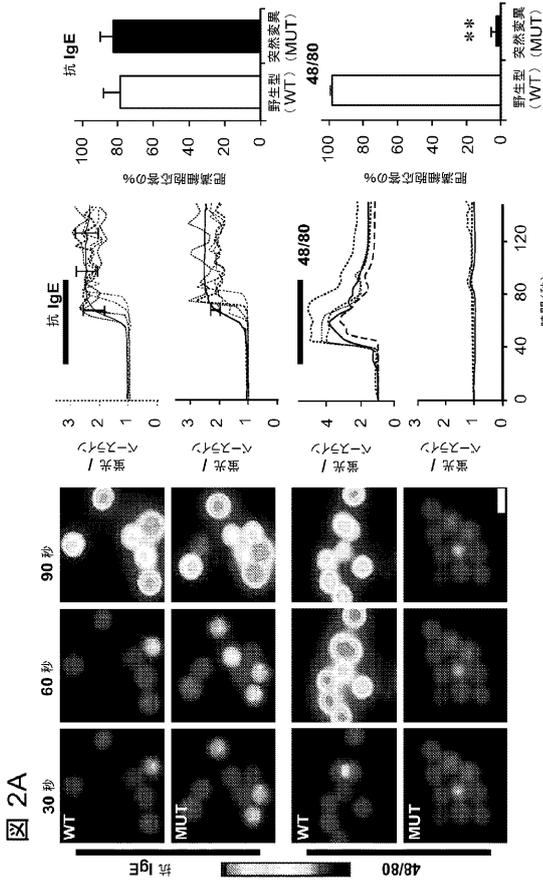


図 2A

【 図 2 - 2 】

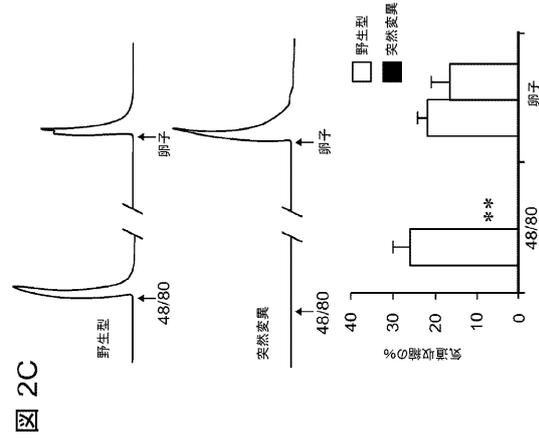


図 2B

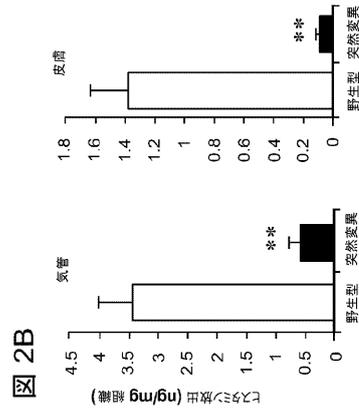


図 2C

【 図 2 - 3 】

図 2D

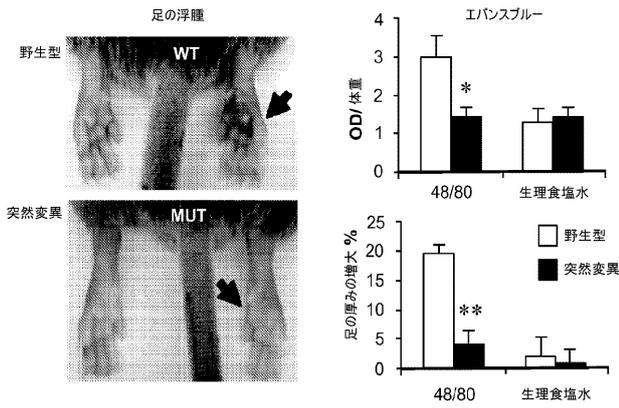
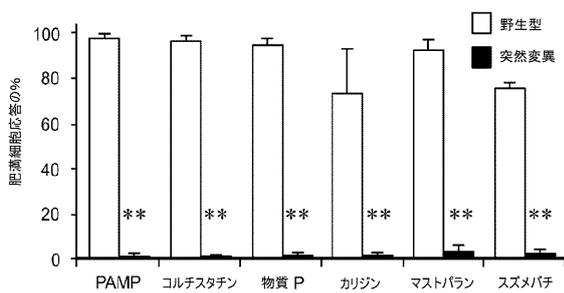


図 2E



【 図 3 - 1 】

図 3A

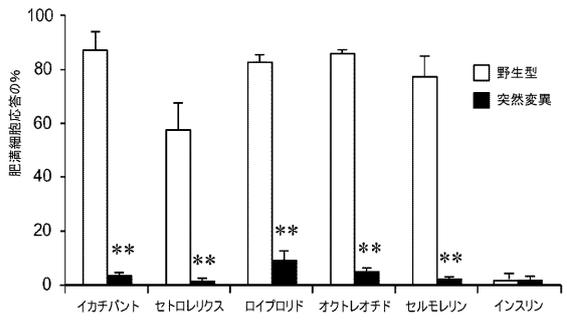
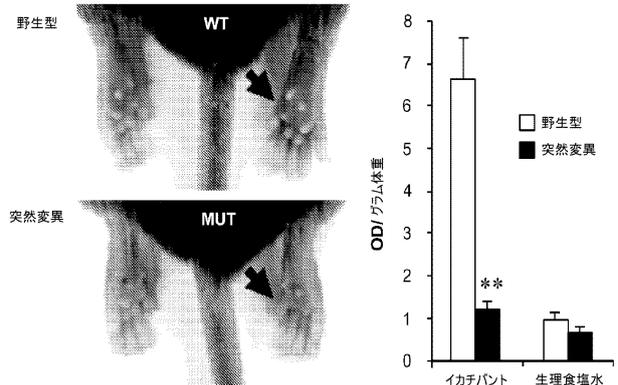
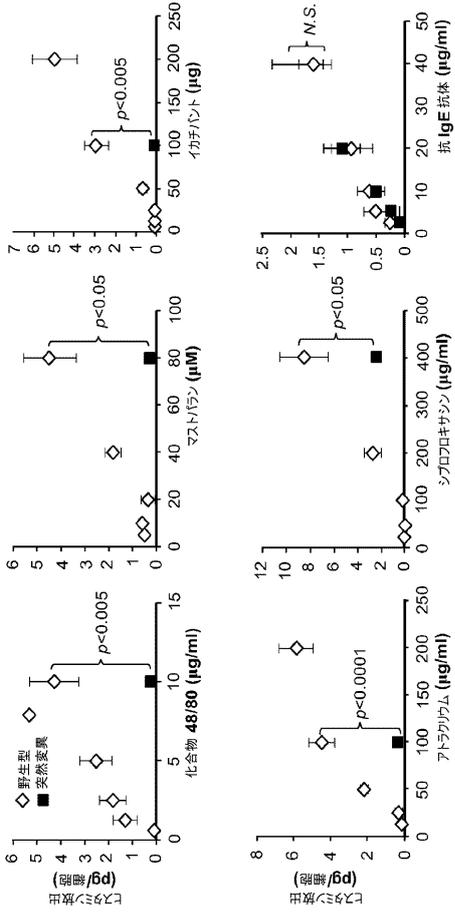


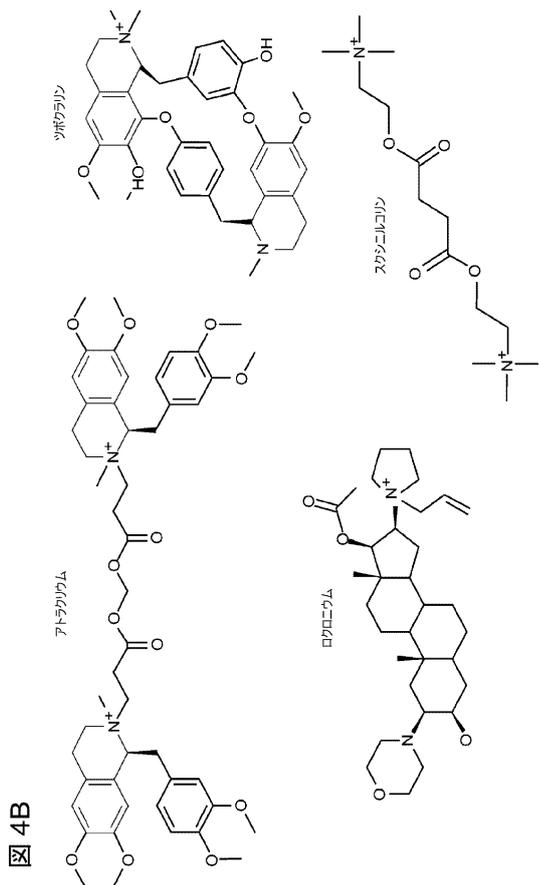
図 3B



【 図 3 - 2 】



【 図 4 - 2 】



【 図 4 - 1 】

図 4A



【 図 4 - 3 】

図 4C

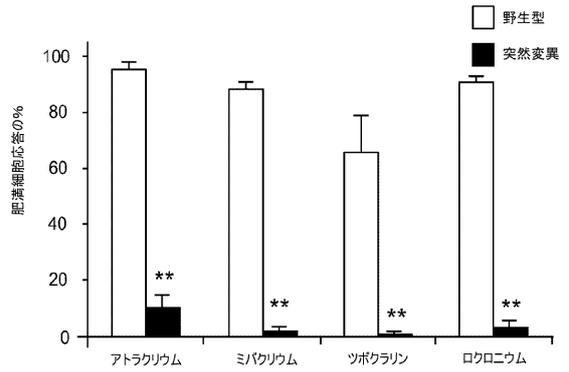
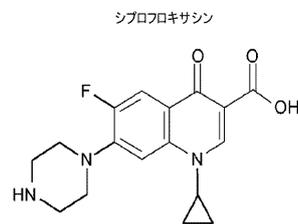
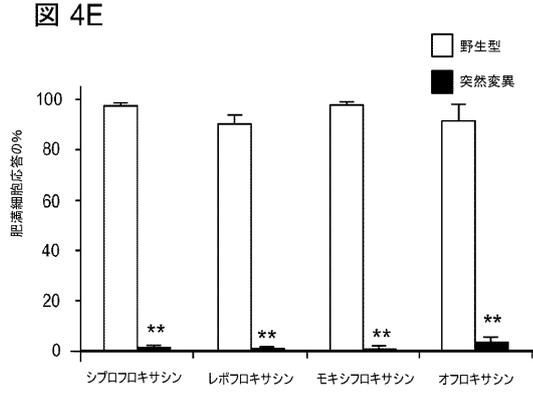


図 4D



【 図 4 - 4 】



【 図 5 - 1 】

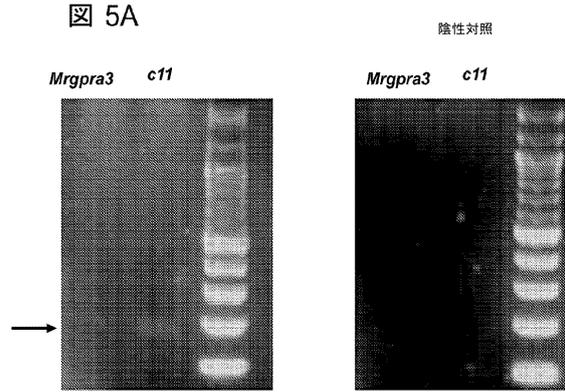


図 4F

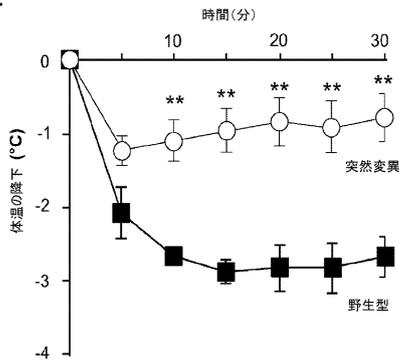
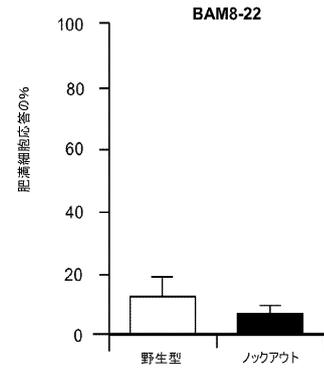


図 5B

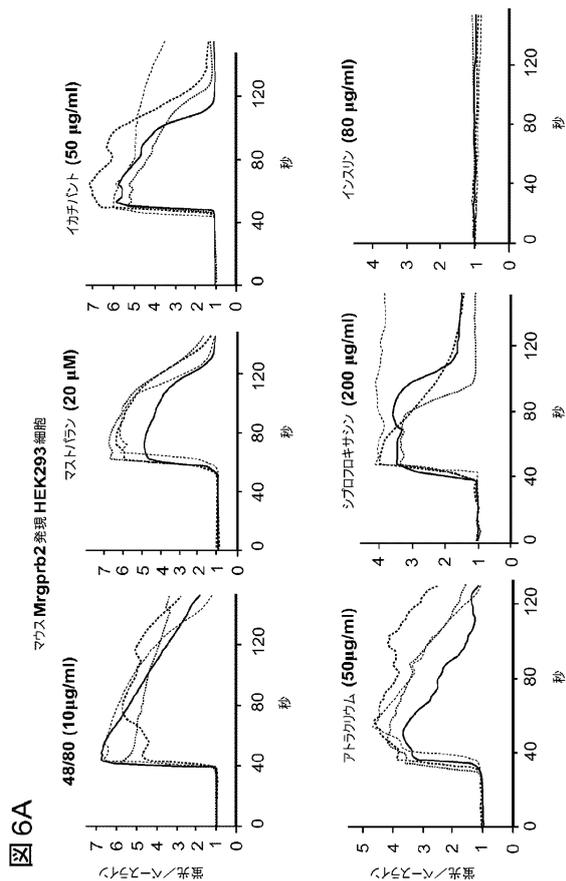


【 図 5 - 2 】

図 5C

	X2	b2	b1	b10	b11
PAMP (50 μ M)	✓	✓	×	×	×
48/80 (20 μ g/ml)	✓	✓	×	×	×
コルチスタチン (20 μ M)	✓	✓	×	×	×
物質P (100 μ M)	✓	✓	×	×	×
クロキシン (100 μ M)	×	×	×	×	×

【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

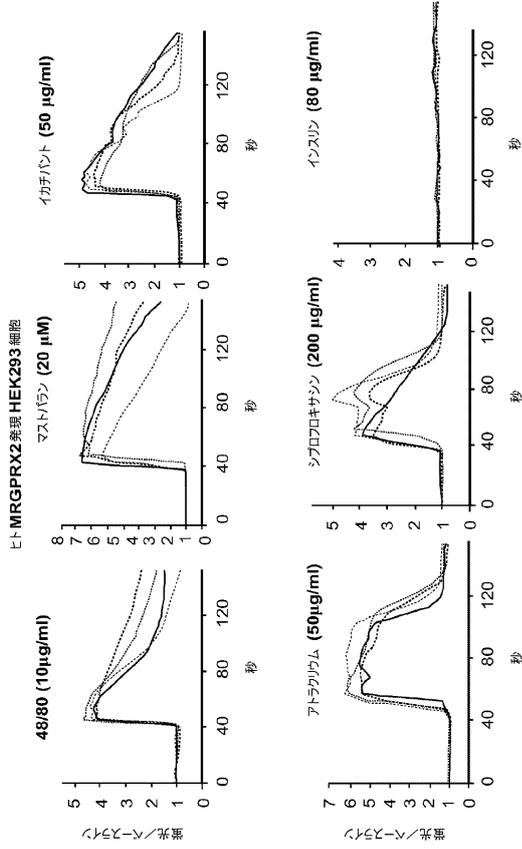


図 6B

【 図 7 】

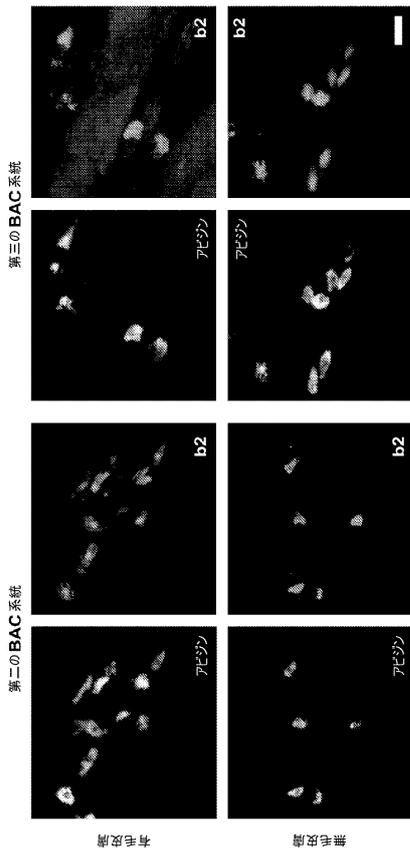


図 7

【 図 6 C 】

図 6C

物質	Mrgprb2 ED ₅₀	MRGPRX2 EC ₅₀
化合物 48/80	3.7 ± 0.5 µg/ml	470.1 ± 139.6 ng/ml
物質 P	54.3 ± 4.9 µM	152.3 ± 48.0 nM
コルチステチン-14	21.3 ± 0.9 µM	106.7 ± 39.3 nM
PAMP (9-20)	12.4 ± 1.6 µM	166.0 ± 35.7 nM
マストパン	24.0 ± 3.6 µM	3.9 ± 0.7 µM
イカチバント	32.5 ± 2.0 µg/ml	15.8 ± 2.7 µg/ml
セトロレリクス	23.4 ± 1.4 µg/ml	221.7 ± 63.1 ng/ml
セルモレリン	29.1 ± 1.2 µg/ml	4.5 ± 0.9 µg/ml
オクトレオチド	10.0 ± 1.1 µg/ml	6.6 ± 0.7 µg/ml
ロイプロリド	152.0 ± 7.1 µg/ml	9.1 ± 0.7 µg/ml
アトラクリウム	44.8 ± 1.4 µg/ml	28.6 ± 2.4 µg/ml
ロクロニウム	22.2 ± 3.3 µg/ml	261.3 ± 14.4 µg/ml
シプロフロキサシン	126.5 ± 5.1 µg/ml	6.8 ± 0.5 µg/ml
モキシフロキサシン	14.1 ± 2.1 µg/ml	9.9 ± 0.6 µg/ml
レボフロキサシン	807.6 ± 47.1 µg/ml	22.7 ± 0.4 µg/ml
オフロキサシン	225.0 ± 25.4 µg/ml	30.1 ± 1.5 µg/ml

【 図 8 A 】

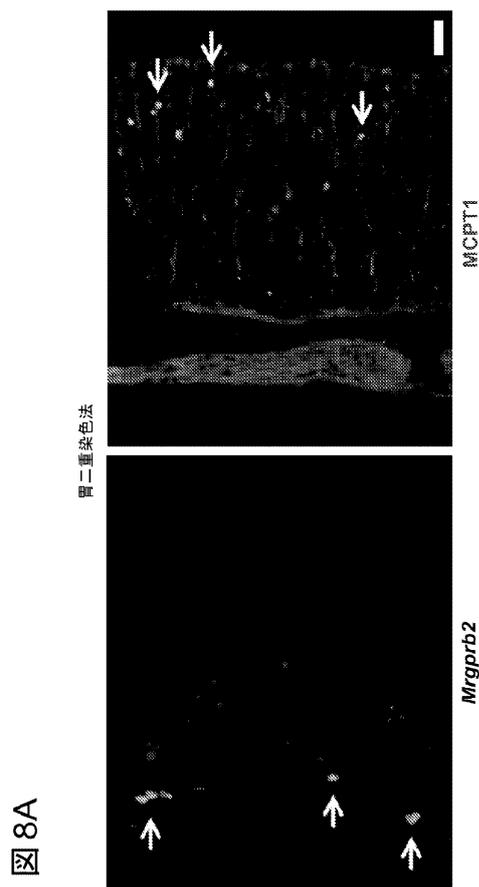


図 8A

【 図 8 B 】

白血球二重染色法

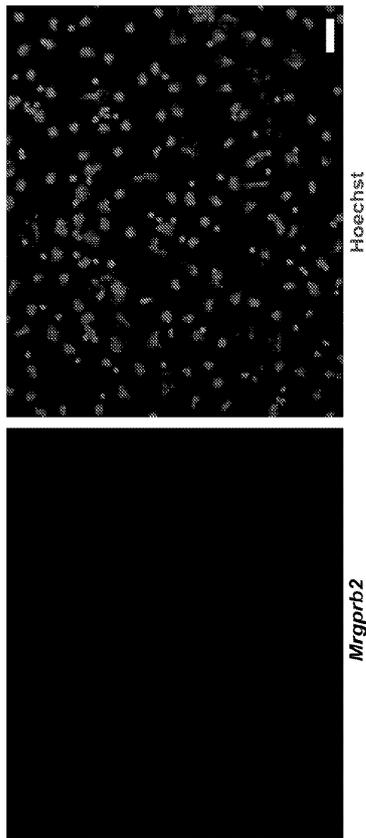


図 8B

【 図 9 - 2 】

図 9B 野生型
 TTCTGGGATCCGTAATGCACACGAAATGCCCTTCACTGTACATTTCAACCTGGCTATG
 突然変異
 TTCTGGGATCC-----GCACACGAAATGCCCTTCACTGTACATTTCAACCTGGCTATG

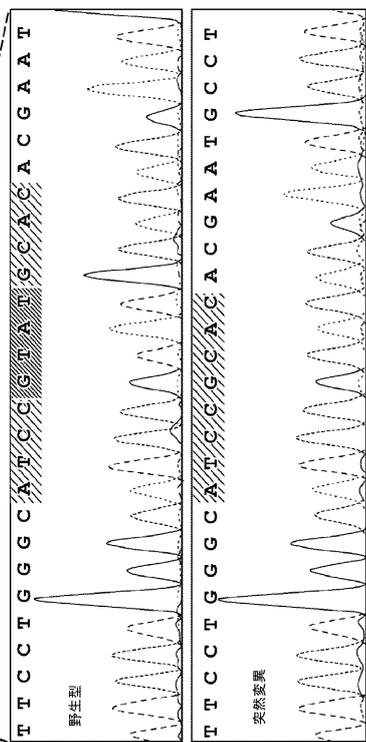
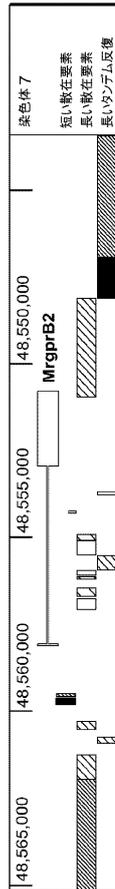


図 9C

【 図 9 - 1 】

図 9A



【 図 9 - 6 】

atgagtggagatttcctaataagaatcctaagcacctcagcctggaaacgaacatcaca
 M S G D F L I K N L S T S A W K T N I T
 gtgctgaatggaagtactacatcgatacttcagtttgtgtcaccaggaaccaagccatg
 V L N G S Y Y I D T S V C V T R N Q A M
 TML
 attttgtttccatcatcatttcccctggttggatgggactaaatgccatagtgctgtgg
 I L L S I I I S L V G M G L N A I V L W
 ↑突然変異
 ttcctgggcatccgcacacgaaatgccttcactgtctacattctcaacctggctatggctg
 F L G I R T R M P S L S T F S T W L W L
 acttttaccctgtgctctcagtttgtas
 T F F T C A L S L *

図 9D

【 図 10 A 】

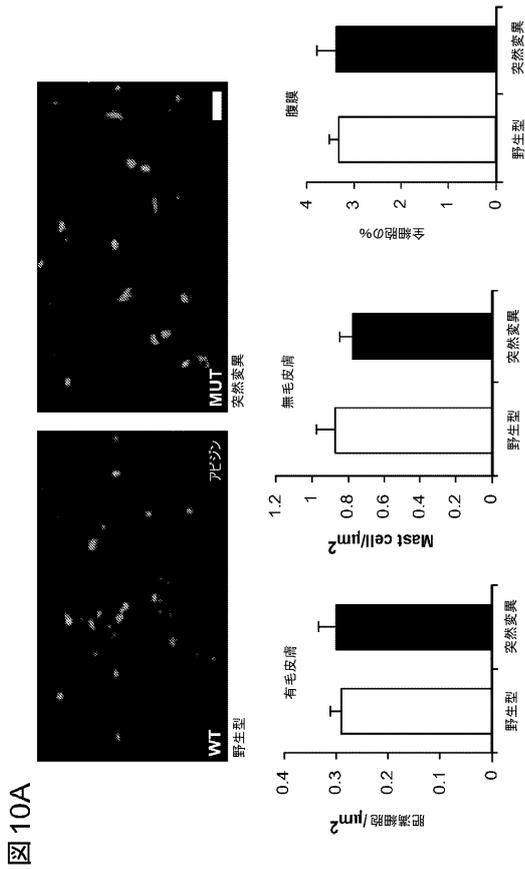
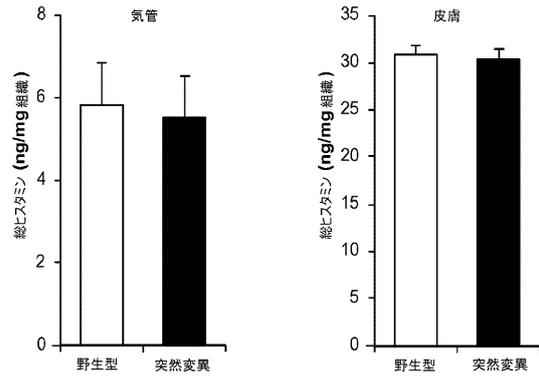


図 10A

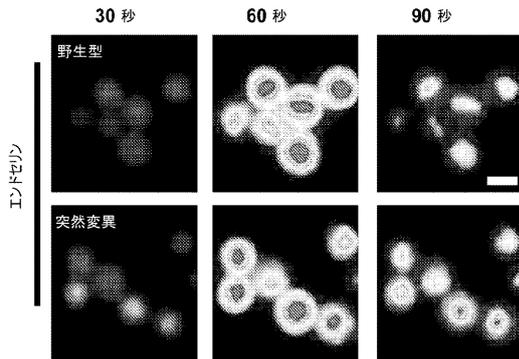
【 図 10 B 】

図 10B



【 図 11 - 1 】

図 11A



【 図 11 - 2 】

図 11B

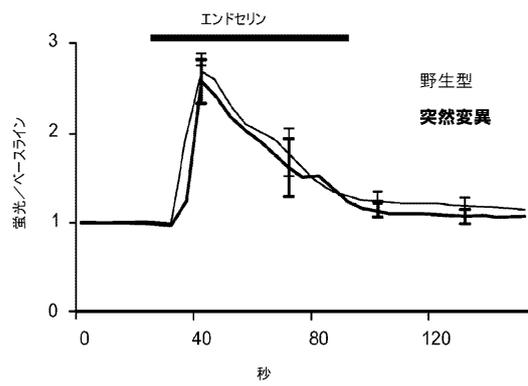
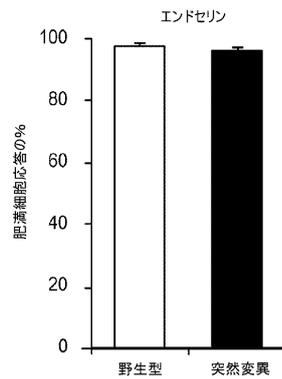
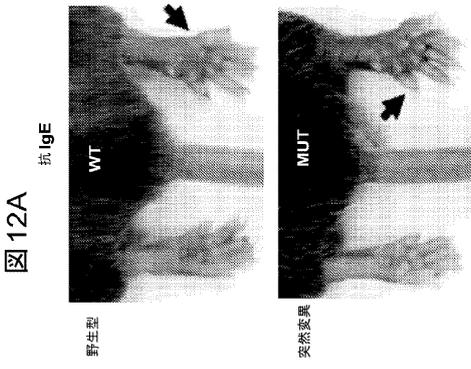
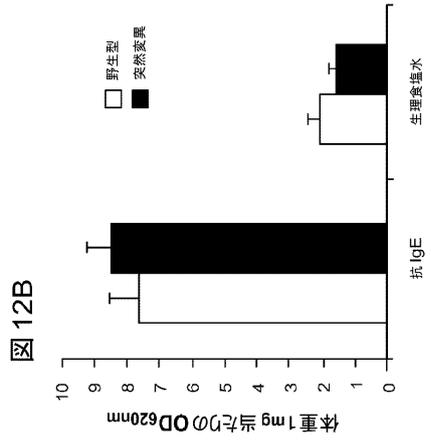


図 11C

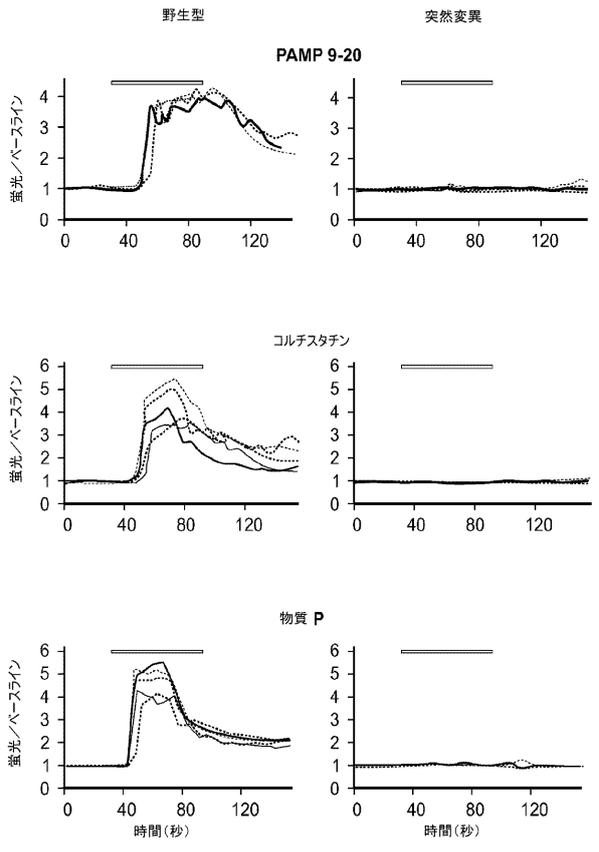


【 図 1 2 】



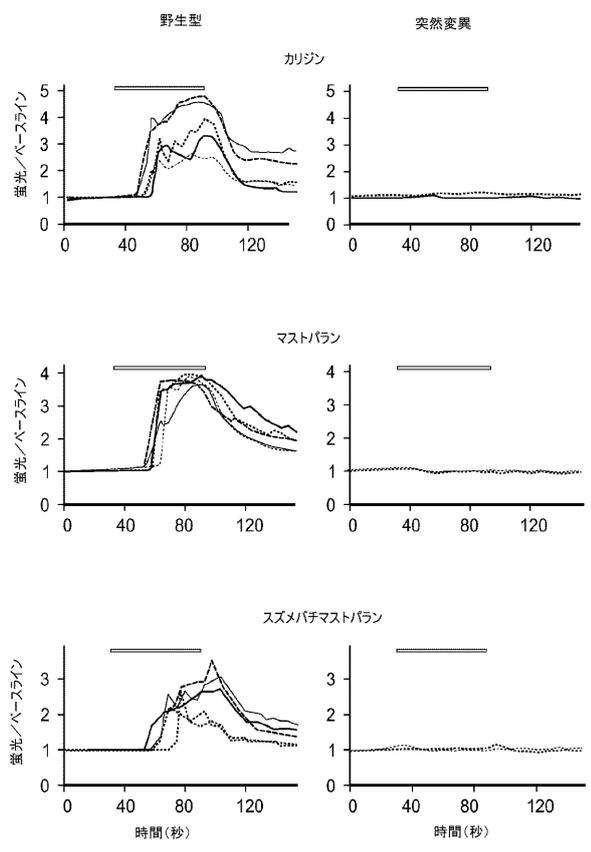
【 図 1 3 A - 1 】

図 13A-1

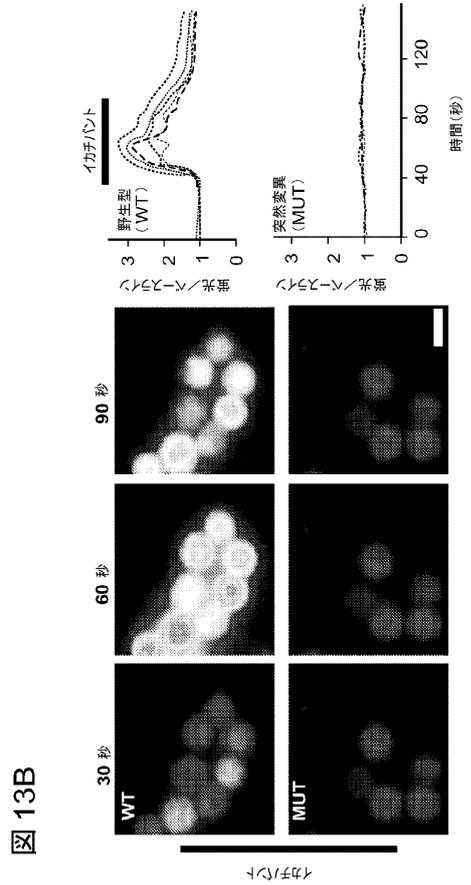


【 図 1 3 A - 2 】

図 13A-2

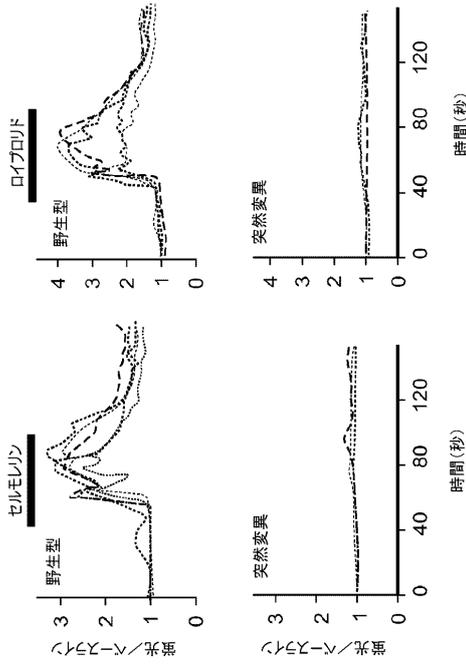


【 図 1 3 B 】



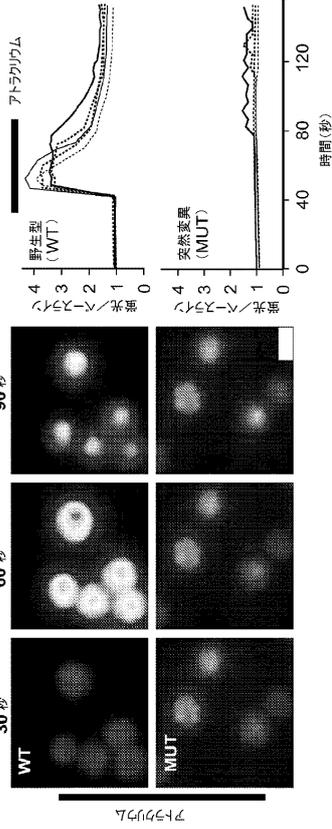
【 図 1 3 C 】

図 13C



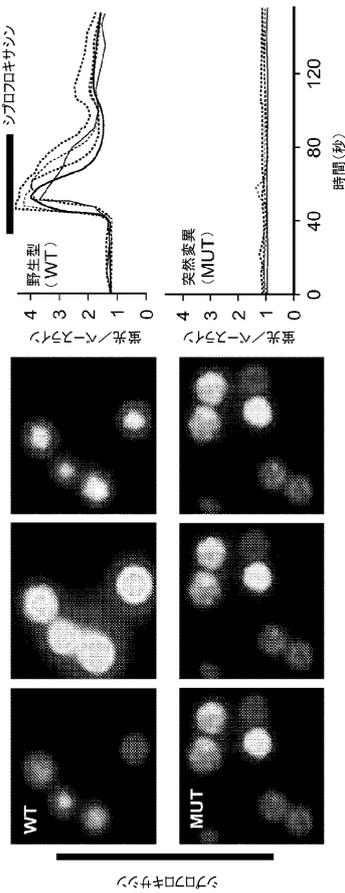
【 図 1 3 D 】

図 13D



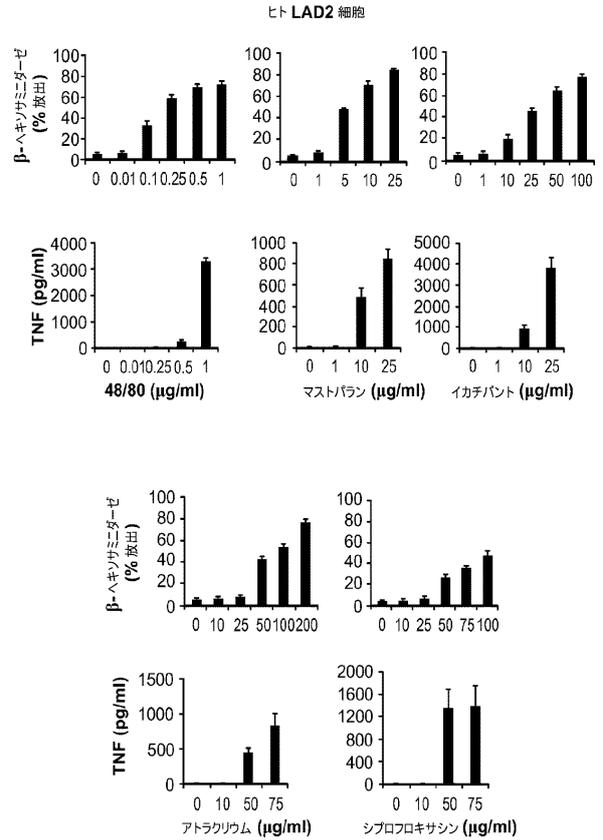
【 図 1 3 E 】

図 13E



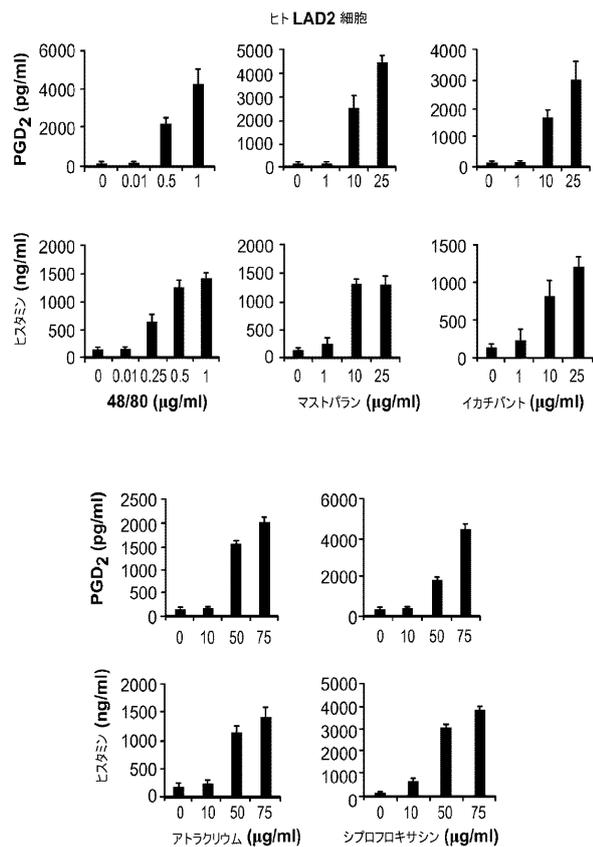
【 図 1 4 A - 1 】

図 14A-1



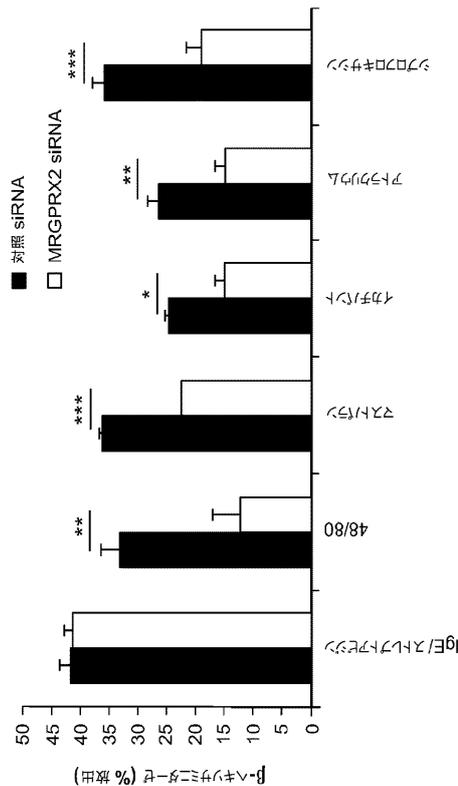
【 図 1 4 A - 2 】

図 14A-2



【 図 1 4 B 】

図 14B



【 図 1 5 A 】

図 15A

カチオン性ペプチド作動薬/アミノ

クラス	名称	治療する疾患	正味電荷	投薬量または濃度	経路	ISR 有無
GnRH 受容体 アンタゴニスト	ロイプロリド	前立腺癌	+1	5 mg/ml (連日注射用)	SC	25%
	ゴセリン	前立腺癌	+2	3.6-10.8 mg	皮下注射	未検出、発疹報告あり
	ヒストレリン	悪性前立腺癌、前立腺癌	+1	50 mg	皮下インプラント	5% のインプラント反応
	トリプトレリン	進行性前立腺癌	+1	1.8-11.25 mg	皮下注射	6%
GnRH 受容体 アンタゴニスト	ゼトレリカス	補助受精	+1	0.25-3 mg/ml	SC	最大 94%
	ガニレリカス	補助受精	+1	0.5 mg/ml	SC	最大 12.5%
	テガレリカス	進行性前立腺癌	+1	20-40 mg/ml	皮下注射	最大 44%
	オクトレオチド	末梢肥大症、カルシウム代謝障害の症状、VIP 腫腫	+2	0.05-1 mg/ml	SC, IM, IV	最大 38%
GHRH 様 agonist	ランレオチド	末梢肥大症	+2	60-120 mg/ml	皮下注射	最大 22%
	パシレオチド	クッシング病	+2	0.3-0.9 mg/ml	SC	17%
	セルモレリン	小児における加速的成長	+3	0.25-1.5 mg/ml	SC	約 15%
抗生物質	テサモレリン	HIV 関連脂膜炎/免疫不全症	+4	1 mg/ml	SC	最大 24.5%

【 図 1 5 B 】

図 15B

他のカチオン性ペプチド作動薬

クラス	名称	治療する疾患	正味電荷	投薬量または濃度	経路	ISR 有無
ブラジニオン受容体 アンタゴニスト	イカチバント	遺伝性血管浮腫	+3	10 mg/ml	SC	97-100%
ミトコンドリア膜 タンパク質様 agonist	酢酸クラチラマール	多発性硬化症	+2	20 mg/ml	SC	> 40%
副甲状腺ホルモン	テリパラチド	骨粗鬆症	+2	0.25 mg/ml	SC	5% が発疹を報告
アミノ酸様 agonist	プラムリンチド	糖尿病	+2	0.6 mg/ml	SC	未検出
グロチンペプチド拮抗薬	プレオマイシン	癌腫 及び リンパ腫	+2	3-15 mg/ml	IV, IM, SC	50%
中性及びアミノ酸性ペプチド作動薬	名称	治療する疾患	正味電荷	投薬量または濃度	経路	ISR 有無
グルカゴン(GLP-1) 様 agonist	エクセナチド	II 型糖尿病	-3	0.25 mg/ml	SC	2% 未満、おそれる体感/副作用
	グルカゴン	重症の低血糖	0	1 mg/ml	IV, IM, SC	-
	リラグルチド	II 型糖尿病	-3	6 mg/ml	SC	2%
抗レトロウイルス薬	エンフルチド	HIV 感染	-5	90 mg/ml	SC	98%
抗生物質	コリスメタート	グラム陰性細菌感染	-5	75 mg/ml	IM, IV	発疹報告あり

【 図 16 】

図 16

種類	名称	臨床濃度
アゴニスト	スクシニルコリン	20 mg/ml
非ステロイド性アンタゴニスト	ツボクラリン	---
	アトラクリウム	10 mg/ml
	ミバクリウム	2 mg/ml
ステロイド性アンタゴニスト	ロクロニウム	5 mg/ml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/043116
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 15/63(2006.01)i, C12N 15/85(2006.01)i, C07K 14/705(2006.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61P 37/08(2006.01)i, G01N 35/00(2006.01)j		
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) C12N 15/63; C12N 5/06; C12N 5/10; G01N 21/64; G01N 33/566; A61K 31/46; C12Q 1/68; A61K 38/16; C12N 15/85; C07K 14/705; A61K 31/7088; A61P 37/08; G01N 35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: mas-related G-protein coupled receptor member X2, MrgrprB2, mutation, pseudo-allergic-type reaction, cell		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012-0219968 A1 (MANCIBBO, HELENA S. et al.) 30 August 2012 See abstract; paragraphs [0043] and [0088]; claims 1-2 and 13.	1-2, 5, 10
Y		3-4, 7, 9
A		6, 8, 19-23
Y	US 2005-0164288 A1 (ANDERSON, DAVID J. et al.) 28 July 2005 See abstract; paragraphs [0052]-[0053] and [0392]; claim 1.	3-4, 7, 9
A	TATEMOTO, KAZUHIKO et al., 'Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors', Biochemical and Biophysical Research Communications, 3 November 2006, Vol. 349, No. 4, pp. 1322-1328. See the whole document.	1-10, 19-23
A	WO 01-11022 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION et al.) 15 February 2001 See abstract; claims 1-2 and 6-9.	1-10, 19-23
A	KAMOHARA, MASAZUMI et al., 'Identification of MrGX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides', Biochemical and Biophysical Research Communications, 20 May 2005, Vol. 330, No. 4, pp. 1146-1152. See the whole document.	1-10, 19-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 25 September 2015 (25.09.2015)		Date of mailing of the international search report 25 September 2015 (25.09.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO, Joo Hyung  Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/043116

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.: 11-18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11-18 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/043116

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010-065085 A2 (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 10 June 2010 See abstract; claims 1-2, 4 and 11-13.	1-10, 19-23
PX	MCNEIL, BENJAMIN D. et al., 'Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions', Nature, Epub. 17 December 2014, Vol. 519, No. 7542, pp. 237-241, additional extended data (1-13 sheets). See the whole document.	1-10, 19-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2015/043116

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2012-0219968 A1	30/08/2012	WO 2007-051063 A2 WO 2007-051063 A3 WO 2007-055823 A2 WO 2007-055823 A3	03/05/2007 07/05/2009 18/05/2007 12/06/2008
US 2005-0164288 A1	28/07/2005	AU 2001-59508 A1 AU 2003-237841 A1 CA 2407219 A1 CA 2486538 A1 EP 1280904 A2 EP 1280904 B1 EP 1515991 A2 JP 2003-533188 A JP 2006-504641 A US 2003-0092035 A1 US 2005-0037468 A1 US 2007-0196873 A1 US 7510845 B2 US 7691604 B1 US 8916355 B2 WO 01-83555 A2 WO 01-83555 A3 WO 2004-003133 A1 WO 2004-003133 A3	12/11/2001 19/01/2004 08/11/2001 08/01/2004 05/02/2003 14/12/2005 23/03/2005 11/11/2003 09/02/2006 15/05/2003 17/02/2005 23/08/2007 31/03/2009 06/04/2010 23/12/2014 08/11/2001 02/05/2002 08/01/2004 17/06/2004
WO 01-11022 A1	15/02/2001	None	
WO 2010-065085 A2	10/06/2010	US 2012-0073001 A1 US 2014-303231 A1 WO 2010-065085 A3	22/03/2012 09/10/2014 14/10/2010

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

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

(72)発明者 ドン, シンチョン
 アメリカ合衆国 メリーランド州 21029 クラークスビル, フローティング クラウド
 パス 12024

(72)発明者 マクニール, ベンジャミン
 アメリカ合衆国 ワシントン ディーシー 20009 16 ストリート ノースウェスト
 1701, アpartment 340

Fターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QS34 QX02
 4B065 AA90X CA44 CA46
 4C084 AA13 AA17 MA52 MA55 MA66 NA06 NA14 ZB131
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA52 MA55 MA66 NA06 NA14
 ZB13