

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4754143号
(P4754143)

(45) 発行日 平成23年8月24日(2011.8.24)

(24) 登録日 平成23年6月3日(2011.6.3)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)
 G O 1 N 33/53 (2006.01)
 G O 1 N 33/566 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02
 C 1 2 N 15/00 Z N A A
 G O 1 N 33/53 D
 G O 1 N 33/566

請求項の数 16 (全 51 頁)

(21) 出願番号 特願2001-530364 (P2001-530364)
 (86) (22) 出願日 平成12年10月10日(2000.10.10)
 (65) 公表番号 特表2003-512028 (P2003-512028A)
 (43) 公表日 平成15年4月2日(2003.4.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/028067
 (87) 国際公開番号 W02001/027146
 (87) 国際公開日 平成13年4月19日(2001.4.19)
 審査請求日 平成19年8月27日(2007.8.27)
 (31) 優先権主張番号 60/159,015
 (32) 優先日 平成11年10月12日(1999.10.12)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/159,210
 (32) 優先日 平成11年10月13日(1999.10.13)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 502129656
 ケモセントリックス、 インコーポレイテ
 ッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州9404
 3, マウンテンビュー, モード・アベニュー
 850
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (72) 発明者
 ゴスリング, ジュニファ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 941
 10, サン フランシスコ, バージニア
 アベニュー 322

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ケモカインレセプター

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ケモカインに対する C C X C K R の結合のモジュレーターを同定するための方法であ
 って、以下：

(a) 単離された C C X C K R ポリペプチドもしくは組換え C C X C K R ポリペ
 チドおよび該ケモカインを、試験化合物の存在下で接触させる工程であって、ここで、該
 C C X C K R ポリペプチドは、(i) 配列番号2のアミノ酸配列を含むか、またはその
 フラグメントもしくは改変体であり、ここで、該改変体は、配列番号2に対して少なくと
 も90%の配列同一性を有し、そして(ii) 該試験化合物の非存在下で該ケモカインに
 結合し得、そして該ケモカインは、E B I - 1 リガンドケモカイン(E L C)、二次的リ
 ンパ組織ケモカイン(S L C)、胸腺発現ケモカイン(T E C K)、B L C、C T A C K
 、m M I P - 1 および v M I P I I からなる群より選択される、工程、ならびに

(b) (a) における該ケモカインおよび該 C C X C K R ポリペプチドの結合レベル
 を、該試験化合物の非存在下における該結合レベルと比較する工程、
 を包含し、

ここで、結合における減少が、該試験化合物は結合のインヒビターであることを示し
 、そして結合における増加が、該試験化合物は結合のエンハンサーであることを示す、方
 法。

【請求項2】

前記接触させる工程が、前記 C C X C K R ポリペプチドを発現する細胞を接触させる

ことを包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ケモカインが標識されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記試験化合物が標識されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記標識が、蛍光標識、化学発光標識、アイソトープ標識および酵素標識からなる群より選択される、請求項 3 または請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 C C X C K R ポリペプチドが細胞画分の部分である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

C C X C K R 活性のモジュレーターを同定する方法であって、

(a) C C X C K R ポリペプチドを発現する細胞を、ケモカインの存在下で試験化合物と接触させる工程であって、ここで、該 C C X C K R ポリペプチドは、(i) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含むか、またはそのフラグメントもしくは改変体であり、ここで、該改変体は、配列番号 2 に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有し、そして(i i) 該試験化合物の非存在下で該ケモカインに結合し得、そして該ケモカインは、E B I - 1 リガンドケモカイン(E L C)、二次的リンパ組織ケモカイン(S L C)、胸腺発現ケモカイン(T E C K)、B L C、C T A C K、m M I P - 1 および v M I P I I からなる群より選択される、工程、ならびに

(b) 該試験化合物の存在下での生物学的活性の調節を検出する工程を包含し、ここで、該生物学的活性の調節は該試験化合物が C C X C K R 活性のモジュレーターであることを示し、そしてここで該生物学的活性は、細胞質ゾルの遊離カルシウムまたは走化性の変化である、方法。

【請求項 8】

前記 C C X C K R ポリペプチドは、組換えポリペプチドである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ケモカインは E L C である、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ケモカインは S L C である、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ケモカインは T E C K である、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ケモカインは B L C である、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ケモカインは C T A C K である、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 14】

前記ケモカインは m M I P - 1 である、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ケモカインは v M I P I I である、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 16】

前記改変体は、配列番号 2 に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するか、または前記改変体は、配列番号 2 に対して少なくとも 98 % の配列同一性を有する、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、ヒトケモカインレセプターに関し、そしてこのレセプターおよびそのリガンドに媒介される生理学および病理学的な状態を診断および治療するために有用な組成物お

10

20

30

40

50

よび方法に関する。本発明は、生物医学的な適用を見出す。

【0002】

(関連の出願の相互参照)

本願は、米国仮特許出願第60/159015号(1999年10月12日出願)、60/159210号(1999年10月13日出願)、60/172979号(1999年12月20日出願)、60/173389号(1999年12月28日出願)、および60/186626号(2000年3月3日出願)から優先権を主張する。前述の出願それぞれの開示は、本明細書中で全体としておよび全ての目的のために、明確に参照として援用される。

【0003】

(発明の背景)

ケモカインは、炎症応答反応、白血球輸送、新脈管形成、および他の細胞の移動および活性化に関連する生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たすサイトカインのクラスである。ケモカインは病理的な状態において、走化性および炎症のメディエーターとして役割を果たす。例えば、慢性関節リウマチに罹患した患者の滑液中では、他の関節疾患に罹患した患者の滑液よりも、ケモカインMCP-1の濃度がより高くなる。

【0004】

公知のケモカインは、代表的にはシステインモチーフの配置に基づく4つのサブファミリーの中の1つに割り当てられる。例えば、いわゆるケモカインでは、(アミノ末端から始まる)4つのシステインの最初の2つのシステインが、介在するアミノ酸により分離されている(すなわち、C-X-Cモチーフを有する)。ケモカインは、最初の2つのシステインの間に介在アミノ酸が存在しないことにより特徴付けられる(すなわち、C-Cモチーフを含む)。より小さいケモカインファミリーおよびケモカインファミリーは、単一のC残基()または3つの残基により分離された1対のシステイン(;すなわち、C₃Cモチーフを含む)により特徴付けられる。ケモカインに関する近年の総説については、Wardら、1998、Immunity 9:1-11、およびBaggioliniら、1998、Nature 392:565-568、ならびに本明細書中で引用される参考文献を参照のこと。

【0005】

ケモカイン活性は、レセプターにより媒介され得る。例えば、C-Cケモカインについてのいくつかの7回膜貫通ドメインGタンパク質結合レセプターがクローニングされている:MIP-1、RANTES、MCP-2、MCP-3、およびMIP-5を認識するC-Cケモカインレセプター-1(Neoteら、1993、Cell、72:415-415);MCP-1、MCP-2、MCP-3、およびMCP-4、またはMCP-5についてのレセプターであるCCR2;RANTES、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MIP-5、およびエオタキシン(eotaxin)についてのレセプターであるCCR3;MIP-1、MIP-1、およびRANTESについてのレセプターであるCCR5;MDCまたはTARCについてのレセプターであるCCR4;LARCについてのレセプターであるCCR6;およびSLCおよびELC(MIP-3;Sallustiora、1998、Immunol.Today 19:568およびWardら、1998、Immunity 9:1-11に総説される)についてのレセプターであるCCR7。

【0006】

走化性および炎症のメディエーターとしてのケモカインおよびそれらのレセプターの重要性に起因して、炎症応答および免疫応答の調節を容易にするために、このケモカインレセプターファミリーのメンバーを同定、単離、および特徴付けする必要がある。

【0007】

(発明の要旨)

1つの局面において、本発明は新規のケモカインレセプターであるCCX CKRを提供する。1つの実施形態において、本発明は単離されたCCX CKRポリペプチド、実質

10

20

30

40

50

的に純粋な C C X C K R ポリペプチド、または組換え C C X C K R ポリペプチド、もしくはそれらの免疫原性のフラグメントを提供する。1つの実施形態において、このポリペプチドは、配列番号2と同一のアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、このポリペプチドは、保存的な変異により配列番号2と異なるアミノ酸配列（配列番号2と少なくとも60%、80%、または90%同一）、および/または免疫学的に、配列番号2によりコードされる全長ポリペプチドと交差反応性であるアミノ酸配列を有する。1つの実施形態において、本発明のこのポリペプチドは融合タンパク質である。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、ケモカイン（例えば、E L C、S L C、T E C K、B L C、またはv M I P I I）と結合するような C C X C K R の活性を有する。1つの実施形態において、このポリペプチドは、高い親和性で E L C、S L C、および T E C K と結合する。

10

【0008】

関連する局面において、本発明は、C C X C K R ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド、または C C X C K R ポリペプチドをコードする配列に相補的な単離されたポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、このポリペプチドは、配列番号1と同一の、または配列番号1と厳密に相補的な、少なくとも10、15、25、50、または100個の隣接する塩基を有する。種々の実施形態において、このポリヌクレオチドは、配列番号1の全長の配列であり、本発明の C C X C K R ポリペプチド（例えば、配列番号2の配列またはそれらのフラグメントを有する）をコードし、高ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で選択的に配列番号1のポリヌクレオチド配列とハイブリダイズする。本発明のこのポリヌクレオチドは、プロモーターと作動可能に連結され得る。本発明は、本発明の C C X C K R ポリペプチドを発現する組換えベクター（例えば、発現ベクター）を提供する。1つの局面において、本発明は、C C X C K R ポリペプチドの活性（例えば、ケモカイン結合活性）を有するポリペプチドをコードする配列を有するポリヌクレオチドを提供する。そしてそのポリヌクレオチドは、（a）配列番号1または配列番号3の配列を有するポリヌクレオチド；または（b）ストリンジェントな条件下で（a）とハイブリダイズするポリヌクレオチド；あるいは（c）（a）または（b）で定義される配列について遺伝暗号の結果として縮重しているポリヌクレオチド配列、である。

20

【0009】

本発明はさらに、本発明の組換え C C X C K R ポリヌクレオチドを含む細胞（例えば、細菌細胞、真核生物細胞、哺乳動物細胞、またはヒト細胞）を提供し、そしてこの組換え C C X C K R ポリヌクレオチドを含む細胞を、このポリペプチドが発現する条件下で培養することにより、C C X C K R タンパク質、C C X C K R ペプチド、または C C X C K R 融合タンパク質を産生する方法を提供する。

30

【0010】

別の実施形態において、本発明は、本発明の C C X C K R ポリペプチドに特異的に結合する抗体、抗体フラグメント、または結合フラグメント（ファージディスプレイにより産生する）を提供する。この抗体はモノクローナル抗体であり得、そして少なくとも約 10^8 M^{-1} の親和性で結合し得る。本発明はまた、この抗体を分泌し得る単離された細胞または単離されたハイブリドーマを提供する。この抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であり得る。

40

【0011】

1つの局面において、本発明は、（a）このサンプルと、この遺伝子産物に特異的に結合するプローブとを接触させ（このプローブとこの遺伝子産物が複合体を形成する）、そしてその複合体の形成を検出することにより；または（b）生物学的サンプル中のこの遺伝子産物を特異的に増幅し（前述の遺伝子産物はポリヌクレオチドである）、そして増幅産物を検出することにより、サンプル中の C C X C K R 遺伝子産物を検出する方法を提供する；ここで、生物学的サンプル中のこの複合体の形成またはこの増幅産物の存在は、C C X C K R 遺伝子産物の存在と相関する。1つの実施形態において、この遺伝子産物はポリ

50

ペプチドであり、そしてプローブは抗体である。異なる実施形態において、この遺伝子産物は、RNAであり、このプローブはポリヌクレオチドである。

【0012】

本発明はまた、ケモカインおよびCCX CKRポリペプチドまたはそれらのフラグメントに結合するリガンドを接触させ、試験化合物を添加し、そしてこのケモカインの結合における任意の減少を測定することにより、化合物が直接的にCCX CKRポリペプチドと相互作用するか否かを決定する方法を提供する。種々の実施形態において、このケモカインは、ELC、SLC、TECK、BLC、mCTACK、mMIP-1、またはvMIPIIもしくはCCX CKRにより結合される天然に存在するリガンドである。いくつかの実施形態において、このケモカインは放射性標識される。従って、1つの局面において、本発明は、(a)試験化合物の存在下で、コードされたCCX CKRのポリペプチドおよびケモカインを接触させることにより、および(b)試験化合物の非存在下での結合レベルと、(a)におけるケモカインとポリペプチドとの結合レベルを比較する(結合の減少は、試験化合物が結合のインヒビターであることを示し、そして結合の増大は、試験化合物が結合のエンハンサーであることを示す。)ことにより、ケモカインに対するCCX CKRの結合のモジュレーターを同定する方法を提供する。1つの実施形態において、このケモカインは、ELC、SLC、TECK、BLC、mCTACK、mMIP-1、またはvMIPIIである。1つの実施形態において、このCCX CKRポリペプチドは細胞により発現される。

10

【0013】

関連する局面において、本発明は、組換えCCX CKRポリペプチドを発現する細胞と試験化合物を接触させ、そしてこの試験化合物の存在下では生じるが非存在下では生じない、生物学的な効果をアッセイすることにより、CCX CKR活性のモジュレーターを同定する方法を提供する(生物学的な効果を誘導する試験化合物は、CCX CKR活性のモジュレーターとして同定される)。1つの実施形態において、このアッセイされる生物学的な効果は、レセプターのインターナリゼーションである。いくつかの実施形態において、この方法はまた、アッセイの間のレセプター(例えば、ELC、SLC、TECK、BLC、mCTACK、mMIP-1、またはvMIPII)に結合するケモカインとこの細胞とを接触させる工程を包含する。

20

【0014】

別の関連する局面において、本発明は、CCX CKR活性(例えば結合)のモジュレーターを薬学的な用途のために処方することにより、薬学的組成物を作製するプロセスを提供する。

30

【0015】

本発明はまた、CCX CKR媒介性の疾患および状態の処置に有用な化合物を、この化合物がCCX CKRと相互作用するか否かを決定することにより、同定するための方法を提供する。

【0016】

別の局面において、本発明は、哺乳動物細胞または哺乳動物組織中のCCX CKRの活性または発現を減少または増加させることによるか、またはこの哺乳動物にCCX CKR機能のモジュレーターを投与することにより、哺乳動物におけるCCX CKR媒介性の状態を処置する方法を提供する。種々の実施形態において、CCX CKR機能のモジュレーターはケモカイン(例えばELC)とCCX CKRとの結合のインヒビターであるか、またはケモカイン(例えばELC)とCCX CKRとの結合のエンハンサーである。1つの実施形態において、本発明は、CCX CKRとケモカインとの結合を阻害する化合物の有効量を投与することにより、CCX CKR媒介性の状態または疾患の処置が必要な被験体における、そのような状態または疾患を治療する方法を提供する。種々の実施形態において、このCCX CKR媒介性の状態または疾患は、炎症性またはアレルギー性の疾患、自己免疫疾患、移植片拒絶、癌、新形性疾患、網膜障害、黄斑変性、感染症、または免疫抑制性疾患である。

40

50

【0017】

(詳細な説明)

(I. 定義)

以下の定義は、本発明の実施において読者を補助するために提供される。

【0018】

用語「対立遺伝子」または「対立遺伝子配列」とは、本明細書中で用いられる場合、CCX CKRポリペプチドをコードする遺伝子(すなわち、CCX CKRポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)の天然に存在する代替形態を言う。対立遺伝子は、変異(すなわち、核酸配列の変化)から生じ、そしてしばしば、改変および/または示差的に調節されたmRNAまたはポリペプチド(それらの構造および/または機能は、改変されてもされなくてもよい)を産生する。対立遺伝子を生じる共通の変異的な変化は、一般的には、ヌクレオチドの天然での欠失、付加または置換に基き、これらはそのコードされたアミノ酸に影響を与えても与えなくてもよい。これらの型の変化のそれぞれは、単独で起こり得るか、他の変化と組み合わせて起こり得るか、または所定の遺伝子、染色体、もしくは他の細胞性ポリヌクレオチド内で1回以上起こり得る。任意の所定の遺伝子は、対立遺伝子の形態を有さないかもしれないし、あるいは、1つまたは多数の対立遺伝子を有する。本明細書中で用いられる場合、用語「対立遺伝子」とは、遺伝子またはその遺伝子から転写されたmRNAのいずれかあるいは両方を言う。

10

【0019】

用語「アミノ酸」とは、本明細書中で用いられる場合、天然に存在するアミノ酸および合成的なアミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣物を言う。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によりコードされたアミノ酸、ならびに後に改変されるそれらのアミノ酸(例えば、ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタメート、およびO-ホスホセリン)である。アミノ酸アナログとは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基およびR基が結合する炭素、を有する化合物(例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム)を言う。そのようなアナログは、修飾されたR基を有する(例えば、ノルロイシン)か、または改変されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造は保持する。アミノ酸模倣物とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様の様式で機能する化学化合物を言う。

20

30

【0020】

用語「アンチセンス配列」とは、RNA配列と相補的な配列を有するポリヌクレオチドを言う。これらの用語は特に、mRNAまたはそれらの一部に結合し、リボソームによるmRNAの転写をブロックする核酸を含む。一般的にアンチセンス法は当該分野で周知である(PCT公開WO94/12633号、およびNielsenら、1991、Science、254:1497; OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES、A PRACTICAL APPROACH、F. Eckstein編、IRL Press at Oxford University Press(1991); ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS(1993、CRC Press)を参照のこと)。

40

【0021】

用語「組成物」とは、本明細書中で用いられる場合、特定の量の特定の成分を含む産物、ならびに、特定の量の特定の成分の組み合わせから直接的にかまたは間接的に生じる任意の産物を含むことを意図する。

【0022】

用語「保存的置換」とは、ポリペプチドについて記載される場合、ポリペプチドの活性を実質的に変化させない、ポリペプチドのアミノ酸組成における変化、すなわち、重要なアミノ酸の置換でさえ実質的に活性を変化させないような、同様の性質を有する他のアミノ酸とのアミノ酸の置換を言う。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当該

50

分野で周知である。以下の6つのグループは各々、互いに保存的置換であるアミノ酸を含む：1) アラニン (A)、セリン (S)、スレオニン (T)；2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；4) アルギニン (R)、リジン (L)；5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；および6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W) (Creighton, 1984, Proteins, W. H. Freeman and Company もまた参照のこと)。

【0023】

上記に定義した保存的置換に加えて、アミノ酸残基の他の改変で、「保存的に改変された改変体」を生じ得る。例えば、陽性であるか陰性であるかに関わらず、全ての荷電アミノ酸は互いに置換とみなし得る。さらに保存的に改変された改変体はまた、そのコードされた配列の1つのアミノ酸または数パーセントのアミノ酸 (例えば、しばしば、5%未満) を置換、付加または欠失する、個々の置換、欠失、または付加から生じ得る。さらに保存的に改変された改変体は、ネイティブまたは野生型の遺伝子により使用されるアミノ酸に対するコドン、同じアミノ酸に対する異なるコドンと置換することによる組換えポリペプチドから生製され得る。

【0024】

用語「制御エレメント」または「調節配列」は、エンハンサー、プロモーター、転写ターミネーター、複製起点、染色体組み込み配列、5' および 3' 非翻訳領域、それらと相互作用して転写および翻訳を行うポリペプチドまたは他の生体分子を含む。真核細胞について、制御配列は、プロモーターおよび好ましくはエンハンサー (例えば、免疫グロブリン遺伝子、SV40、サイトメガロウィルスに由来するエンハンサー) およびポリアダニル化配列を含み、そしてスプライシングドナー配列およびアクセプター配列を含み得る。用いられるベクター系および宿主に依存して、多くの適切な転写要素および翻訳要素 (構成性プロモーターおよび誘導性プロモーターを含む) が用いられ得る。CCX CKR について言及する場合、CCX CKR コード配列と天然で結合しているプロモーター以外のプロモーターは、「異種」プロモーターと呼ばれ得る。

【0025】

本明細書中で使用されるように、「誘導体化された」ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、または核酸は、誘導体化置換基を含むオリゴおよびポリヌクレオチドをいう。いくつかの実施形態では、置換基は、相補的ポリヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションに関して実質的に干渉しないものである。付随の化学置換基で修飾された誘導体化 (例えば、以前に合成されたオリゴまたはポリヌクレオチドの修飾による、または合成の間の修飾塩基または骨格アナログの取り込みにより) されたオリゴまたはポリヌクレオチドが、代謝的に活性な真核細胞に導入されて、CCX CKR DNA、RNA、またはタンパク質に対してハイブリダイズし得、ここで、それらは、局所的DNA、RNA、またはタンパク質に対する改変または化学的修飾を生じる。あるいは、誘導体化されたオリゴまたはポリヌクレオチドは、CCX CKR DNA もしくは CCX CKR 遺伝子産物と相互作用するか、または CCX CKR DNA、RNA もしくはタンパク質の発現もしくは機能を改変もしくは調整する CCX CKR ポリペプチドもしくはタンパク質と相互作用し得るか、もしくは改変し得る。例示の付着された化学置換基は、以下を包含する：ユーロピウム (III) テキサフィリン、架橋剤、ソラレン、金属キレート剤 (例えば、鉄/EDTAキレート (鉄触媒開裂のため)、トポイソメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、エキソヌクレアーゼ、リガーゼ、ホスホジエステラーゼ、光力学的ポルフィリン、化学療法薬 (例えば、アドリアマイシン、ドキソルビシン)、インターカレート剤、塩基修飾剤、免疫グロブリン鎖、およびオリゴヌクレオチド。鉄/EDTAキレート剤は、核酸配列の局所開裂が望ましい場合にしばしば使用される化学置換基である (Hertzberg ら、1982, J. Am. Chem. Soc. 104: 313; Hertzberg および Dervan, 1984, Biochemistry 23: 3934; Taylor ら、1984, Tetrahedron 40: 457; 50

Dervan, 1986, Science 232: 464)。例示の付着化学は、以下を包含する：例えば、付随の反応性アミノ基を介する直接連結、(CoreyおよびSchultz, 1988, Science 238: 1401, これは、本明細書中に参考として援用される)および他の直接連結化学。しかし、ストレプトアビジン/ビオチンおよびジゴキシゲニン/抗ジゴキシゲニン抗体連結もまた使用され得る。化学置換基を連結する方法は、米国特許第5,135,720号、同第5,093,245号および同第5,055,556号(これらは、本明細書中に参考として援用される)において提供される。他の連結化学は、実施者の判断で使用され得る。

【0026】

本明細書中で使用されるように、「検出可能な標識」は、当該分野における通常の意味を有し、そして検出する(例えば、物理的特性または化学的特性に起因して)、分子の存在を示す、またはそれが共有結合するかもしれない他の結合を行っている別の分子の結合を可能にするために使用される、または使用できる原子(例えば、放射性核種)、分子(例えば、フルオレセイン)、または複合体をいう。用語「標識」はまた、基質において作用して検出可能な原子、分子、もしくは複合体を生じる、共有結合された分子または他に結合された分子(例えば、酵素のような生体分子)をいう。本発明における使用に適した検出可能な標識は、分光光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段、化学的手段などによって検出可能な任意の組成物を包含する。

【0027】

用語「エピトープ」は、抗体により認識される抗原における部位という、その通常の意味を有する。エピトープは、代表的には、ポリペプチド全体の小部分である、アミノ酸のセグメントである。エピトープは、構造的(すなわち、不連続)であり得る。すなわち、それらは、タンパク質フォールディングにより併置された一次配列の不連続部分によってコードされるアミノ酸から形成され得る。

【0028】

用語「融合タンパク質」は、通常単一のアミノ酸配列と一緒に融合されない2つ(またはそれより多くの)異なる異種のポリペプチドから構成された複合ポリペプチド(すなわち、単一の連続したアミノ酸配列)をいう。従って、融合タンパク質は、これらの配列が、通常、天然に見られる単一のアミノ酸配列において同じ立体配置で見られないという条件で、2つの全体に異なるアミノ酸配列または2つの類似のもしくは同一のポリペプチド配列を含む単一のアミノ酸配列を含み得る。融合タンパク質は、組換え核酸方法を用いて(すなわち、組換え遺伝子融合産物(これら融合は、本発明のポリペプチドをコードするセグメントおよび異種ポリペプチドをコードするセグメントを含む)の転写および翻訳の結果として)または当該分野で周知の化学的合成方法によってのいずれかで、一般に調製され得る。

【0029】

用語「遺伝子産物」は、遺伝子から転写されたRNA分子、または遺伝子によりコードされたもしくはRNAから翻訳されたポリペプチドをいう。

【0030】

本明細書で使用するように、IgG抗体について「高親和力」との用語は、少なくとも約 10^6 M^{-1} 、より好ましくは少なくとも約 10^8 M^{-1} 、より好ましくは少なくとも約 10^9 M^{-1} 以上、例えば、 10^{12} M^{-1} 以上まで、の会合定数(K_a)をいう。しかし、「高親和力」結合は、他の抗体アイソタイプに対しては変動し得る。

【0031】

用語「免疫原」および「免疫原性」は、当該分野における通常の意味を有する。すなわち、免疫原は、ヒトおよび動物への注入の際に適応免疫応答(adaptive immune response)を惹起し得る分子(例えば、ポリペプチドまたは他の抗原)である。

【0032】

本明細書中で種々の形態で使用されるように、ケモカインレセプター活性の「モジュレー

10

20

30

40

50

ター」および「調整」との用語は、特定のケモカインレセプター、好ましくは、CCX CKRレセプターと関連した活性のアンタゴニズム、アゴニズム、部分的アンタゴニズム、および/または部分的アゴニズムを包含することが意図される。種々の実施形態において、「モジュレーター」は、CCX CKR発現または活性を阻害または刺激し得る。

【0033】

用語「核酸」および「ポリヌクレオチド」は、交換可能に使用され、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよび一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のそれらのポリマーをいう。特に限定されなければ、ポリヌクレオチド配列の開示は、相補配列もまた言及することが意図される。本明細書中で使用されるように、用語「ポリヌクレオチド」はオリゴヌクレオチドを包含する。

10

【0034】

用語「オリゴヌクレオチド」または「オリゴマー」は、およそ7ヌクレオチド以上、およびおよそ100ヌクレオチド程度の多さの核酸配列をいい、これらは、プライマーまたはプローブとして使用され得る。オリゴヌクレオチドは、しばしば約10および約50ヌクレオチドの間の長さであり、よりしばしば約12および約50ヌクレオチドの間、非常にしばしば、約15および約25ヌクレオチドの間の長さである。

【0035】

用語「作動可能に連結された」は、2つ以上のポリヌクレオチド（例えば、DNA）セグメントの間の機能的関係をいう：例えば、プロモーターまたはエンハンサーが、これが適切な宿主細胞または他の発現系において配列の転写を刺激する場合、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、作動可能に連結されている配列は、連続的であり、そしてシグナル配列の場合、連続し、かつ読み枠内にある。しかし、エンハンサーは、それらが転写を増強するコード配列に極めて接近して位置する必要はない。

20

【0036】

用語「ペプチド模倣性」および「模倣性」は、本発明のCCX CKRポリペプチドと実質的に同じ構造的特徴および機能的特徴を有する合成化学化合物をいう。ペプチドアナログは、テンプレートペプチドの特性に類似した特性を有する非ペプチド薬物として、製薬業において通常使用される。これらの非ペプチド化合物タイプは、「ペプチド模倣物 (peptide mimetics)」または「ペプチド模倣物 (peptidomimetics)」と呼ばれる (Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); および Evans et al. J. Med. Chem. 30: 1229 (1987)、これらは、本明細書中に参考として援用される)。治療的に有用なペプチドに構造的に類似であるペプチド模倣物は、等価のまたは増強された治療的または予防的効果を生じるために使用され得る。一般に、ペプチド模倣物は、パラダイムポリペプチド (すなわち、生物学的または薬理的活性を有するポリペプチド) (例えば、CCX CKR) に構造的に類似するが、以下からなる群から選択される連結によって必要に応じて置換される1つ以上のペプチド連結を有する：例えば、-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂-CH₂-、-CH=CH- (シスおよびトランス)、-COCH₂-、CH(OH)CH₂-、および-CH₂SO-。模倣物は、合成の非天然アミノ酸アナログで全体的に合成され得るか、または部分的に天然のペプチドアミノ酸と部分的に非天然のアミノ酸アナログとのキメラ分子である。模倣物はまた、任意の量の天然アミノ酸保存的置換を、このような置換が模倣物の構造および/または活性を実質的に変えない限り、取り込み得る。例えば、模倣物組成物は、それが、CCX CKRの結合または酵素活性を実施し得る場合、本発明の範囲内である。

30

40

【0037】

「薬学的に受容可能」とは、キャリア、希釈液、または賦形剤が、処方物の他の成分と適合性であり、それらのレシピエントに有害であってはならないことを意味する。

【0038】

用語「ポリペプチド」は、用語「タンパク質」と交換可能に使用され、そしてアミド連結

50

によって連結されるアミノ酸残基で構成されるポリマー（合成、天然に存在する、および天然に存在しないそれらのアナログ（アミノ酸および連結）を含む）をいう。ペプチドはポリペプチドの例である。

【 0 0 3 9 】

本明細書中で使用されるように、プローブは、ポリヌクレオチドおよび抗体の背景で使用される場合、別の分子に特異的に結合する分子をいう。プローブの一例は、「核酸プローブ」であり、これは、DNA、RNA、または他のポリヌクレオチドであり得る。核酸プローブについて特定の配列が与えられる場合、相補鎖もまた同定され、そして含まれることが理解される。この相補鎖は、標的が、実質的に相補的である核酸に対して特異的に結合する（例えば、アニールするか、またはハイブリダイズする）二本鎖核酸である状況において等しく十分に働く。プローブの別の例は、対応する抗原またはエピトープに特異的に結合する「抗体プローブ」である。

10

【 0 0 4 0 】

用語「組換え」は、インビトロで合成されるか、または他に操作されたポリヌクレオチド（例えば、「組換えポリヌクレオチド」）、組換えポリヌクレオチドを使用して細胞または他の生物系において遺伝子産物を生成する方法、または組換えポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチド（「組換えタンパク質」）をいう。従って、「組換え」ポリヌクレオチドは、その生成方法およびその構造のいずれかによって定義される。その生成方法に関して、プロセスは、組換え核酸技術の使用である（例えば、ヌクレオチド配列おけるヒトの介入（例代表的には、選択または生成）を包含する）。あるいは、これは、互い

20

【 0 0 4 1 】

句「～に選択的にハイブリダイズする」は、ポリヌクレオチドプローブが、標的配列が全細胞DNAまたはRNAの調製物中に存在する場合に特定の標的DNAまたはRNA配列に対してハイブリダイズするか、二重鎖形成するか、または結合することをいう。

30

【 0 0 4 2 】

抗体とタンパク質またはポリペプチドとの間の相互作用に言及する場合、句「～に特異的に免疫反応性である」または「特異的に結合する」は、抗体が、目的のタンパク質（例えば、CCX CKR）を特異的に認識し、そしてこれに対して相対的に高い親和力で結合し、これによりこの結合が、タンパク質および他の生物製剤の異種の集団におけるタンパク質の存在に決定的であることをいう。従って、指定された免疫アッセイ条件下では、特定化された抗体は、特定のポリペプチドに結合し、サンプル中に存在する他のポリペプチドと有意な量で結合しない。種々の免疫アッセイフォーマットが、特定のポリペプチドと特異的に免疫反応性である抗体を選択するために使用され得る。例えば、固相ELISA免疫アッセイは、ポリペプチドと特異的に免疫反応性であるモノクローナル抗体を選択するために慣用的に使用される。免疫アッセイフォーマットおよび特異的免疫反応性を決定するのに使用され得る条件については、Harlow, 1988, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York（本明細書中、以降、「Harlow」）を参照のこと。

40

【 0 0 4 3 】

本明細書中で使用されるように、「実質的に配列同一」とは、2つ以上の配列またはサブ配列が、以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いて測定されるように、または目視検査によって、比較して最大に一致するように整列した場合、少なくとも60%、好ましくは80%、最も好ましくは、90%、95%、98%、または99%のヌクレオチドまたは

50

アミノ酸残基同一性を有することをいう。2つの配列（アミノ酸またはヌクレオチド）は、その全長にわたって（例えば、それらが実質的に異なる長さである場合は、2つのうち短い方の長さ）、あるいは少なくとも約50、約100、約200、約500、もしくは約1000の連続したヌクレオチドのサブ配列、または少なくとも約10、約20、約30、約50または約100の連続したアミノ酸残基のサブ配列にわたって比較され得る。配列比較のために、代表的には、1つの配列が参照配列として作用し、これに対して試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列および参照配列をコンピュータに入力し、サブ配列座標を指定し、必要に応じて、配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムは、指定されたプログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列についての配列同一性パーセントを計算する。

10

【0044】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ実行（GAP, BESTFIT, FASTA, およびTFASTA, Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI）によって、または目視検査（一般には、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (supplemented through 1999)を参照のこと）によって実施され得る。これらの参考文献およびアルゴリズムの各々は、その全体が本明細書中に参考として援用される。前述のアルゴリズムのいずれかを使用する場合、「ウインドウ」長、ギャップペナルティーなどのデフォルトパラメーターが使用される。

20

【0045】

配列同一性および配列類似性のパーセントを決定するために適切であるアルゴリズムの一例は、BLASTアルゴリズムであり、これは、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)に記載される。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)より公に入手可能である。このアルゴリズムは、クエリー配列における短い長さのワードW（これは、データベース配列中で同じ長さのワードと整列した場合、いくつかのポジティブ値の閾値スコアTに適合するか、またはこれを満足する）を同定することによって、高スコアリング配列ペア（HSP）をまず同定することを包含する。Tは、近隣ワードスコア閾値と呼ばれる（Altschulら、前出）。これらの初期近隣ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見出す検索を開始するためのシードとして働く。次いで、ワードヒットは、累積アラインメントスコアが増大され得る限り、各配列に沿って両方向に伸長される。各方向へのワードヒットの伸長は、以下の場合中止される：累積アラインメントスコアが、その最大達成値から量Xだけ減少する；累積スコアが、ゼロ以下になる（1つ以上のネガティブスコアリング残基アラインメントの累積に起因する）；または、いずれかの配列の末端に達した場合。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T、およびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTプログラムは、11のワード長（W）、50のBLOSUM62スコアリング行列（Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)を参照のこと）アラインメント（B）、10の期待値（E）、M = 5、N = -4、および両鎖の比較を、デフォルトとして使用する。

30

40

50

【 0 0 4 6 】

配列同一性パーセントを計算することに加えて、B L A S Tアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計学的解析を実施する(例えば、Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787(1993)を参照のこと)。B L A S Tアルゴリズムによって提供される1つの類似性基準は、最小合計確率($P(N)$)(これは、2つのヌクレオチド配列または2つのアミノ酸配列間の適合が偶然に生じる確率の指標を提供する)である。例えば、核酸は、参照核酸に対する試験核酸の比較における最小合計確率が、約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、および最も好ましくは約0.001未満である場合、参照配列に類似するとみなされる。

10

【 0 0 4 7 】

2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であることのさらなる指標は、第一のポリペプチド(例えば、第一の核酸によりコードされるポリペプチド)が、第二のポリペプチド(例えば、第二の核酸によりコードされるポリペプチド)と免疫学的に交差反応性であることである。従って、ポリペプチドは、代表的には、例えば、2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、第二のポリペプチドと実質的に同一である。

【 0 0 4 8 】

2つの核酸配列が実質的に同一であることの別の指標は、2つの分子がストリンジントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。実質的な同一性は、セグメントが、代表的にはプローブヌクレオチド配列に由来する少なくとも約50の連続したヌクレオチドの配列を用いて、鎖またはその相補体に対してストリンジントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする場合に存在する。

20

【 0 0 4 9 】

「ストリンジントなハイブリダイゼーション条件」は、標的配列および標的に正確なまたはほぼ正確な相補性を有するプローブの融解温度(T_m)より約5 から約20 または25 下回る範囲の条件をいう。本明細書中で使用されるように、融解温度は、二本鎖核酸分子の集団が半解離して一本鎖になる温度である。核酸の T_m を計算するための方法は、当該分野で周知である(例えば、Berger and Kimmel, 1987, Methods In Enzymology, Vol. 152: Guide To Molecular Cloning Techniques, San Diego: Academic Press, Inc. および Sambrook et al.; 前出; (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratoryを参照のこと)。標準的な参考文献によって示されるように、 T_m 値の簡便な概算値が、以下の式によって計算され得る: $T_m = 81.5 + 0.41(\%G + C)$ (核酸が1M NaClの水溶液中にある場合)(例えば、Anderson and Young, 「Quantitative Filter Hybridization」、Nucleic Acid Hybridization (1985)を参照のこと)。他の参考文献は、構造ならびに配列特徴を T_m の計算に考慮に入れた、より精巧なコンピュータ計算を包含する。ハイブリッドの融解温度(およびストリンジントなハイブリダイゼーションの条件)は、プローブの長さおよび性質(DNA、RNA、塩基組成)ならびに標的の性質(DNA、RNA、塩基組成、溶液中に存在するかまたは固定化された、など)、ならびに塩および他の成分の濃度(例えば、ホルムアミド、デキストラン硫酸、ポリエチレングリコールの存在または不在)のような種々の要因によって影響される。これら要因の効果は周知であり、そして当該分野における標準的な参考文献において考察されている(例えば、Sambrook、前出および Ausubel、前出を参照のこと)。代表的には、ストリンジントなハイブリダイゼーション条件は、約1.0 M未満のナトリウムイオン、代表的には約0.01 ~ 1.0 Mのナトリウムイオン(pH 7.0 ~ 8.3)の塩濃度、および短いプローブ(例えば、10 ~ 50ヌクレオチド)については少なくとも約30 および長いプローブ(例えば、50ヌクレオチドより大

30

40

50

きい)については少なくとも約60の温度である。示したように、ストリンジェントな条件はまた、脱安定化剤(例えば、ホルムアミド)の添加によって達成され得る。この場合、より低い温度が用いられ得る。

【0050】

用語「実質的に純粋な」または「単離された」は、タンパク質およびポリペプチド(例えば、CCX CKR)に対して言及する場合、これらポリペプチドが、天然に付随するタンパク質または他の夾雑物から分離されていることを示す。タンパク質またはポリペプチドは、タンパク質が、そのタンパク質を含む組成物の総タンパク質含量の約50%より多く、および代表的には、総タンパク質含量の約60%より多くを構成する場合、実質的に純粋であるとみなされる。より代表的には、実質的に純粋なまたは単離されたタンパク質またはポリペプチドは、総タンパク質の少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%を構成する。好ましくは、タンパク質は、組成物において総タンパク質の約90%より多く、およびより好ましくは、約95%より多くを構成する。ポリヌクレオチドに言及する場合、用語「実質的に純粋」または「単離された」は、一般に、一般に付随する夾雑物(例えば、脂質、タンパク質、および他のポリヌクレオチド)から分離されたポリヌクレオチドをいう。本発明の実質的に純粋なまたは単離されたポリヌクレオチドは、純度が約50%より高い。代表的には、これらのポリヌクレオチドは、約60%より高い純度、より代表的には約75%から約90%の純度、および好ましくは約95%から約98%の純度である。

10

【0051】

用語「治療有効量」は、研究者、獣医師、および医師または他の臨床家によって探索される組織、系、動物またはヒトの生物学的または医学的応答を惹起する被験化合物の量を意味する。

20

【0052】

本明細書中で使用されるように、レセプター媒介「生物学的効果」は、天然に存在するリガンドへのレセプターの結合(例えば、ELCのCCX CKR結合)から生じる細胞機能または構造の変化をいい、そしてこれは、レセプターインターナリゼーション、レセプター媒介シグナル伝達(例えば、哺乳動物Gタンパク質の活性化、細胞質ゾル遊離カルシウムの濃度の迅速かつ一過性の増加の誘導)、細胞応答機能(例えば、化学走性の刺激または炎症メディエーターの放出)などを含み得る。

30

【0053】

(II. CCX CKRポリペプチド)

本発明は、単離された、実質的に純粋な、または組換えのCCX CKRポリペプチドおよび哺乳動物CCX CKRポリペプチドの免疫原性フラグメントを提供する。1つの実施形態において、CCX CKRポリペプチドまたはフラグメントは、配列番号2に記載の配列またはそれらのサブ配列に同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する。

【0054】

(A. CCX CKRポリペプチドおよび改変体)

本発明は、実質的に純粋な、単離された、または組換えのCCX CKRポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態において、CCX CKRポリペプチドは、配列番号2に示されるアミノ酸配列に同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、CCX CKRポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基の保存的置換によって特徴付けられた改変体および変異体である。

40

【0055】

本発明のポリペプチドは、全長(例えば、図1に示した種について約350アミノ酸を含む)であり得るか、または全長タンパク質のフラグメントをコードし得る(例えば、本発明のCCX CKRポリペプチドおよび改変体の少なくとも20、少なくとも40、少なくとも60、または少なくとも100残基を含む)。配列番号2のアミノ酸配列に対して何らかの様式で改変された(例えば、短縮化された、変異された、誘導体化された、または他の配列に融合された(例えば、融合タンパク質を形成するために))CCX CKR

50

ポリペプチドもまた、本発明により提供される。いくつかのCCX CKRポリペプチドは、配列番号2に対するアミノ酸残基の挿入、欠失、または置換を含む。例えば、いくつかの保守的アミノ酸置換が行われ得る。すなわち、選択されたアミノ酸を類似の構造的特徴（例えば、正味の電荷、疎水性など）を有する異なるアミノ酸と置換する。

【0056】

代表的には、CCX CKR改変体は、配列番号2の配列を有するCCX CKR対立遺伝子に構造的および機能的に類似する。構造類似性は、例えば、実質的配列同一性（上記で定義）、または免疫学的交差反応性によって示される。機能類似性は、例えば、天然に存在するCCX CKR対立遺伝子CCX CKR対立遺伝子（配列番号2の配列を有する）と類似または同一のリガンド結合特異性（例えば、高親和力でELC、SLC、およびTECKに結合する）によって示される。いくつかの実施形態において、本発明のCCX CKRポリペプチドは、配列番号2においてコードされた全長ポリペプチドの融合タンパク質またはフラグメント（例えば、リガンド結合フラグメント）である。この背景において使用されるように、CCX CKRの「リガンド結合フラグメント」は、ELC（例えば、ヒトまたはマウスELC）、SLC（ヒトまたはマウス）、またはTECK（ヒトまたはマウス）に、高親和力（例えば、約15 nM未満の見かけKiまたはリレーショナルIC50）または中程度の親和力（例えば、約15および約200 nMの間の見かけKiまたはリレーショナルIC50）で結合するレセプターポリペプチドのフラグメントである。結合を検出するための適切なアッセイは、当該分野で周知である。例えば、E. C Hulme「Receptor-Ligand Interactions」、A PRACTICAL APPROACH/THE PRACTICAL APPROACH SERIES (Series Eds D. Rickwood and BD Hames) IRL Press, Oxford University Press (1992), 特にCh. 6, Wang et al., 「The use of the filtration technique in in vitro radioligand binding assays for membrane-bound and solubilized receptors,」およびCh. 7, Hulme et al., 「Centrifugation binding assays」を参照のこと；また、Sissors et al., 1999, 「A Homologous Receptor Binding Assay for HTS on FlashPlate plus」NEN Life Science Products inc, Boston, MA 02118も参照のこと。

【0057】

1つの実施形態において、結合は、Dairaghi et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:28206-209（あらゆる目的のためその全体が参考として援用される）CCR3トランスフェクタントをCCX CKRトランスフェクタントに置き換える）により記載されるように検出される。1つの実施形態において、結合は、Dairaghi et al., 1999, J. Biol. Chem. 274:2156（あらゆる目的のためその全体が参考として援用される）（例えば、図4において示されるように）により記載のフィルターベースの技術を用いて検出される。簡潔には、この技術は、拡大された、効率が最大にされた放射性リガンド結合を利用する濾過プロトコルを用いる。これらのアッセイにおいて、 1×10^5 CCXCKR-293 HEK細胞を、25 mM HEPES、140 mM NaCl、1 mM CaCl₂、5 mM MgCl₂、および0.2%ウシ血清アルブミン（pH 7.1に調整）中で4で3時間、未標識ケモカインの存在下で¹²⁵I標識ELC（MIP3）（最終濃度およそ0.05 nM）とインキュベートする。反応を、PEI処理GF/Bガラスフィルター上で細胞採集器（Packard）を用いて吸引した。フィルターを2回洗浄し（25 mM HEPES、500 mM NaCl、1 mM CaCl₂、5 mM MgCl₂（pH 7.1に調整））、そしてシンチラント（例えば、MicroScint 20；50 μ l）を乾燥フィルターに添加し、計数する（例えば、Packard Topcountシンチ

10

20

30

40

50

レーションカウンターを使用する)。競合用量応答曲線を標準的な方法によって分析し、IC₅₀値を決定する(例えば、GraphPad Prismソフトウェア(San Diego, CA)を使用する)。さらに、Scatchard変換を使用して、1細胞当たりのレセプター部位を概算し得る(例えば、WaveMetrics Igorソフトウェア(Lake Oswego, OR)を使用する)。

【0058】

示されるように、結合アッセイは周知であり、そしてそれは、結合が種々の緩衝液条件ならびにインキュベーション時間および温度を用いて検出され得ることが理解される。例えば、アッセイは、37°から40°の範囲、好ましくは約40°および約25°の間、最も好ましくは40°の温度で、またはならびに1時間から一晚(例えば、約3時間)までのインキュベーション時間で実行され得る。緩衝液pHは、6.8から7.6の範囲であり得、そしてNaCl濃度は、0~160mM(例えば、生理緩衝液条件)であり得る。含まれるBSAの割合はまた、0.1%から0.5%まで変動し得る。模範的な条件は、25mM HEPES、140mM NaCl、1mM CaCl₂、5mM MgCl₂、および0.2%ウシ血清アルブミン(pH7.1に調整)中での40°で3時間の0.05nM¹²⁵I標識ELCとのインキュベーションである。他の変形もまた当該分野で公知である。

【0059】

本明細書中で使用されるように、ケモカインは、これが、少なくともレセプター、ならびに野生型CCR1と高いまたは、あるいは中程度の親和力で結合することが公知である特定化された参照ケモカイン(例えば、ELC、SLC、TECK、mMIP-1、hBLC-1、mMIP-1、CTACK)に結合する場合、CCR1ポリペプチドと特異的に結合する。

【0060】

いくつかの実施形態では、本発明のCCR1ポリペプチドは、免疫原として使用され得る(例えば、抗CCR1抗体を生成するために)。代表的には、本発明の免疫原性CCR1フラグメントは、配列番号2の少なくとも約6の連続した残基、よりしばしば少なくとも約8、約10、または約12、または約16の連続した残基を含む。

【0061】

本発明の実質的に純粋な、単離された、または組換えCCR1ポリペプチドはまた、配列番号2に示される配列を有するポリペプチドと特異的に免疫反応性である抗体に結合する能力によって特徴付けられ得る。特異的な免疫反応性は、通常、少なくとも10⁷、10⁸、10⁹、または10¹⁰M⁻¹のそのリガンド(例えば、CCR1)に対する抗体の特異的結合親和力によって特徴付けられる。

【0062】

多くの適用について、所定の環境におけるポリペプチドの同定、検出および定量を容易にするために、標識された実体(すなわち、検出可能な標識もしくは基、または架橋基に共有結合的に付着もしくは連結された)として本発明のCCR1ポリペプチドを提供することもまた望ましい。これらの検出可能な基は、検出可能なポリペプチ德基(例えば、アッセイ可能な酵素または抗体エピトープ)を含み得る。あるいは、検出可能な基は、種々の他の検出可能な基または標識(例えば、放射性標識(例えば、¹²⁵I、³²P、³⁵S)または化学発光基もしくは蛍光基)から選択され得る。同様に、検出可能な基は、基質、補因子、インヒビターまたはアフィニティリガンドであり得る。

【0063】

さらに、CCR1ポリペプチドは、1つ以上のアミノ酸残基を同じタイプのD-アミノ酸(例えば、リジンの代わりにD-リジン)と置換することによって修飾されて、より安定なペプチドを生成し得る。同様に、アミノ末端またはカルボキシル末端の修飾もまた、本発明のポリペプチドに安定化特性を付与するために使用され得る(例えば、カルボキシル末端のアミド化またはアミノ末端のアシル化またはPEG化誘導体)。

【0064】

(B . C C X C K R ポリペプチドの産生および単離)

本発明の C C X C K R ポリペプチドは、組換え方法または合成方法を使用して調製され得るか、または天然の細胞供給源から単離され得る。

【 0 0 6 5 】

C C X C K R ポリペプチドを C C X C K R ポリヌクレオチドから発現するための適切な組換え技術は、以下に開示される。Sambrook et al. , 1989 , MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL , (2nd ed .) Vols . 1 - 3 , Cold Spring Harbor Laboratory、および Ausubel、上記を参照のこと。C C X C K R ポリペプチド、改変体またはフラグメントのようなポリペプチドを合成するための合成方法は、Merrifield , 1963 , Amer . Chem . Soc . 85 : 2149 - 2456 , Atherton et al . , 1989 , SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS : A PRACTICAL APPROACH , IRL Press、および Merrifield , 1986 , Science 232 : 341 - 347 に記載される。

10

【 0 0 6 6 】

本発明の C C X C K R ポリペプチドの単離および精製は、当該分野において一般的に周知である方法によって実行され得る。これらの方法には、限定しないが、所望の純度を達成するために、イオン交換、疎水性相互作用、HPLC またはアフィニティークロマトグラフィーが挙げられる。1つの実施形態において、C C X C K R ポリペプチドは、イムノアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製される。例えば、C C X C K R ポリペプチドまたはその免疫原性フラグメント（例えば、配列番号 2 の配列または下位配列 (subsequence) を有する）に対して惹起される抗体は、適切な固体支持体に連結され、このペプチドと抗体との会合に助けとなる条件下で、C C X C K R ポリペプチドを含むポリペプチドの混合物（例えば、脳組織のホモジネート）と接触される。一旦、C C X C K R ポリペプチドが固定化抗体に結合されると、固体支持体は、結合していない物質および / または非特異的に結合したポリペプチドを除去するために洗浄される。次いで、所望のポリペプチドが、例えば、pH または緩衝液の塩濃度の変化によって、実質的に純粋な形態で固体支持体から溶出され得る。

20

【 0 0 6 7 】

(C . C C X C K R のペプチドアナログおよびペプチド模倣物)

「タンパク質」または「ポリペプチド」の項で主に記載されるが、当業者は、上記ポリペプチドの構造的アナログおよび誘導體（例えば、ペプチド模倣物など）が、例えば、C C X C K R アゴニストとして、あるいは C C X C K R 活性アンタゴニストとして、C C X C K R の置換として使用され得ることを理解する。ペプチド模倣物 (peptidomimetics、peptide mimetics) は、鑄型ペプチドの性質と類似した性質（例えば、生物学的活性）を有する非ペプチド薬物として薬学的工業において通常使用されるペプチドアナログである (Fauchere , 1986 , Adv . Drug Res . 15 : 29 ; Evans et al . , 1987 , J . Med . Chem . 30 : 1229)。これらは、通常、コンピュータ化された分子モデリングの援助の下で開発される。治療的に有用なペプチドに構造的に類似したペプチド模倣物は、等価な治療的効果を生成するために使用され得る。ペプチド模倣物は、例えば、より経済的な生成およびより大きな化学的安定性を含むポリペプチドの実施形態に対する有意な利点を有し得る。

30

40

【 0 0 6 8 】

(I I I . C C X C K R ポリヌクレオチド)

一つの局面において、本発明は、哺乳動物（例えば、ラットまたはヒト）C C X C K R 遺伝子または RNA の配列または下位配列を有するポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチド（例えば、RNA、DNA、PNA またはキメラ）は、一本鎖、二本鎖または混合ハイブリッドであり得る。一つの実施形態において、ポリヌクレオチドは、

50

配列番号 1 (図 1) の配列またはその下位配列 (例えば、本発明のポリヌクレオチドおよび改変体の少なくとも 15、少なくとも 25、少なくとも 50、少なくとも 100、少なくとも 200、または少なくとも 500 塩基を含む) を有する。本発明はまた、本明細書中に開示される C C X C K R ポリヌクレオチドに対する実質的な配列同一性を有するポリヌクレオチドを提供する。従って、本発明は、配列番号 1 の C C X C K R ポリヌクレオチドのヒト対立遺伝子改変体のような哺乳動物 (例えば、ヒト) C C X C K R 遺伝子の天然の対立遺伝子を提供する。

【0069】

以下に記載されるように、いくつかの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 2 (図 1) に対して実質的な配列同一性を有するポリペプチドをコードするか、またはこのようなポリペプチドのフラグメントをコードする (例えば、融合タンパク質)。遺伝子コードの縮重に起因して、配列番号 1 に実質的に類似しないが、配列番号 2 のポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドもまた意図される。他の実施形態において、本発明は、C C X C K R ポリペプチドを必ずしもコードしないが、例えば、プローブ、プライマー、アンチセンス、三重鎖またはリボザイム試薬などとして有用である C C X C K R ポリヌクレオチドを提供する。

【0070】

本発明はまた、C C X C K R ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、細胞株、およびトランスジェニック生物を含む。いくつかの実施形態において、本発明のベクター、細胞および生物は、コードされる C C X C K R ポリペプチドを発現し得る。

【0071】

本発明の開示の手引きを使用して、本発明の C C X C K R ポリヌクレオチドは、組換え手段によって産生され得る。例えば、Sambrook et al., Berger and Kimmel, (1987) Methods In Enzymology, Vol. 152: Guide To Molecular Cloning Techniques, San Diego: Academic Press, Inc.; Ausubel et al., Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1999) を参照のこと。あるいは、C C X C K R ポリヌクレオチドまたはフラグメントは、当該分野において周知の慣用的な方法を使用して化学的に合成され得る (Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68: 90; Brown et al., 1979, Meth. Enzymol. 68: 109; Beaucage et al., 1981, Tetra. Lett., 22: 1859 を参照のこと)。いくつかの実施形態において、本発明の C C X C K R ポリヌクレオチドは、非天然の塩基 (例えば、デオキシイノシン) (Batzner et al., 1991, Nucleic Acid Res. 19: 5081; Ohtsuka et al., 1985, J. Biol. Chem. 260: 2605-2608; Rossolini et al., 1994, Mol. Cell. Probes 8: 91-98 を参照のこと) あるいは改変骨格残基または連結を含む。

【0072】

(A. C C X C K R をコードするポリヌクレオチド)

1 つの局面において、本発明は、配列番号 2 の配列を有する C C X C K R ポリペプチド、そのフラグメント、その改変体 (例えば、保存性改変体または対立遺伝子改変体)、あるいは C C X C K R 融合タンパク質のような C C X C K R ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。1 つの実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 1 の配列またはそのフラグメントを含む。別の実施形態において、ポリヌクレオチドは、天然の C C X C K R ポリペプチドまたはフラグメントをコードするが、(例えば、遺伝子コードの縮重の結果として) 配列番号 1 とは異なる配列を有する。本発明のいくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、発現配列タグ H 6 7 2 2 4、A I 1 3 1 5 5、A A 2 1 5 5 7 7、A W 1 9 0 9 7 5 または A I 7 6 9 4 6 6、あるいはウシ P

10

20

30

40

50

P R 1 をコードするポリヌクレオチド以外である (M a t s u o k a e t a l , 1 9 9 3 , B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m 1 9 9 4 ; 5 4 0 - 1 1) 。

【 0 0 7 3 】

本発明のポリヌクレオチドは、C C X C K R ポリヌクレオチド (例えば、センスまたはアンチセンス R N A) およびポリペプチドの発現に有用である。ポリヌクレオチドおよびタンパク質の組換え発現のための方法は、当該分野において周知である。代表的には、本発明の C C X C K R ポリヌクレオチドは、C C X C K R ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの調製のための発現ベクターにおいて使用される。発現ベクターは、代表的には、転写制御シグナルおよび / または翻訳制御シグナル (例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、および A T G 開始コドン) を含む。さらに、発現の効率は、使用において細胞系に適切なエンハンサーの含有によって増強され得る。例えば、S V 4 0 エンハンサーまたは C M V エンハンサーは、哺乳動物宿主細胞において発現を増加するために使用され得る。

10

【 0 0 7 4 】

1 つの実施形態において、本発明の C C X C K R ポリペプチドをコードする D N A は、宿主細胞 (例えば、細菌 (例えば、E . c o l i 、 B a c i l l u s s u b t i l i u s) 、酵母 (例えば、S a c c h a r o m y c e s) 、昆虫 (例えば、S p o d o p t e r a a f r u g i p e r d a) または哺乳動物細胞培養系) にインビトロで導入され、発現し得る D N A 構築物に挿入される。本発明のポリペプチドの発現および産生に有用な哺乳動物細胞培養系の例には、ヒト胚腎臓株 (2 9 3 ; G r a h a m e t a l . , 1 9 7 7 , J . G e n . V i r o l . 3 6 : 5 9) ; C H O (A T C C C C L 6 1 および C R L 9 6 1 8) ; ヒト子宮頸癌細胞 (H e L a , A T C C C C L 2) ; および当該分野で公知の他のものが挙げられる。ポリペプチドを発現するための哺乳動物組織細胞培養物の使用は、一般的に、W i n n a c k e r , F R O M G E N E S T O C L O N E S (V C H P u b l i s h e r s , N . Y . , N . Y . , 1 9 8 7) および A u s u b e l 上記において議論される。

20

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態において、哺乳動物遺伝子由来または哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが、例えば、哺乳動物細胞株における発現に使用される。適切なプロモーターは、構成的、細胞型特異的、段階特異的、ならびに / あるいは調整可能 (m o d u l a t a b l e) または調節可能 (例えば、グルココルチコイドのようなホルモンによる) であり得る。有用なプロモーターには、メタロチオネインプロモーター、構成性アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導 M M T V プロモーター、S V 4 0 プロモーター、および当該分野において公知のプロモーター - エンハンサーの組み合わせが挙げられるが、これらには限定されない。

30

【 0 0 7 6 】

C C X C K R ポリペプチドまたはフラグメントはまた、宿主細胞染色体に組み込む適切な発現ベクターを使用して、トランスジェニック動物 (マウス、ヒツジ、ウシなど) および植物 (タバコ、シロイヌナズナ (a r a b i d o p s i s) など) において発現され得る。

40

【 0 0 7 7 】

(B . ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプローブおよびプライマー)

1 つの実施形態において、本発明は、C C X C K R ポリヌクレオチドを検出するかまたは増幅するためのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドプローブおよび / またはプライマーを提供する。種々の実施形態において、ポリヌクレオチド (例えば、プローブおよびプライマー) は、配列番号 1 に同一かまたは正確に相補的な少なくとも 1 0 の連続塩基、普通は、1 2 塩基、代表的には少なくとも 1 5 塩基、一般的には、少なくとも 1 8 塩基、そして頻繁には少なくとも 2 5 、少なくとも 5 0 、または少なくとも 1 0 0 塩基を含む。本発明の C C X C K R ポリヌクレオチドは、プローブまたはプライマーとして使用

50

される場合、これらは、一般的に、約 3000 塩基長未満であり；代表的には、これらは配列番号 1 に同一かまたは正確に相補的な、約 12 と約 100 の連続したヌクレオチド、より頻繁には、約 12 と約 50 の間の連続ヌクレオチド、なおより頻繁は、約 15 と約 25 の間の連続のヌクレオチドを含む。

【0078】

いくつかの実施形態において、プローブおよびプライマーは、例えば、プローブまたはプライマーに制限部位を加えることによって、改変される。他の実施形態において、本発明のプライマーまたはプローブは、さらなる配列（例えば、リンカー）を含む。なおいくつかの他の実施形態において、本発明のプライマーまたはプローブは、検出可能な標識を用いて改変される。例えば、プライマーおよびプローブは、例えば、誘導されるか、改変ヌクレオチド塩基を組み込むか、または抗リガンド（例えば、ビオチン）によって結合され得るリガンドを含むように、化学的に改変される。

10

【0079】

本発明の C C X C K R プローブおよびプライマーは、例えば、以下により詳細に議論されるように、生物学的サンプルにおける C C X C K R ポリヌクレオチドを検出または増幅するために、多くの目的に使用され得る。例えば、本明細書中の手引きが提供され、当業者は、C C X C K R 遺伝子、mRNA、または cDNA の全てまたは一部をサンプルにおいて特異的に増幅するプライマー対を選択し得る。好ましい実施形態において、プライマー対および増幅条件は、例えば、C C X C K R プライマーと他の遺伝子配列との間の 3' ミスマッチに起因して、サンプル中に存在する他のケモカインレセプター RNA を増幅しないように選択する。

20

【0080】

（C C X C K R 阻害性ポリヌクレオチド）

本発明は、C C X C K R ポリヌクレオチドを標的とするかまたは C C X C K R ポリヌクレオチドにハイブリダイズするアンチセンス、三重鎖およびリボザイム試薬のようなポリヌクレオチドを提供する。

【0081】

（1. アンチセンスポリヌクレオチド）

1 つの局面において、本発明は、C C X C K R 遺伝子の発現を阻害するために使用され得るアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを提供する。本発明のいくつかの治療方法（以下にさらに詳細に記載される）は、インビボの生理学的な条件下で C C X C K R 活性を阻害するかまたは刺激するために機能し、そして治療的效果に十分な時間の間、それらの条件下で比較的安定であるオリゴヌクレオチドの投与を包含する。ポリヌクレオチドは、このような安定性を与え、そして所望の組織、器官または細胞にオリゴヌクレオチドの標的化送達を促進するために改変され得る。

30

【0082】

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、C C X C K R をコードする mRNA または C C X C K R 遺伝子から転写される mRNA からの配列に特異的にハイブリダイズする、少なくとも約 10 塩基、代表的には少なくとも 12 または 14、そして約 3000 までの連続したヌクレオチドのアンチセンス配列を含む。さらに頻繁には、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、約 12 ~ 約 50 ヌクレオチドの長さ、または約 15 ~ 約 25 ヌクレオチドの長さである。一般的に、アンチセンスポリヌクレオチドは、安定な二重鎖を形成するのに十分長くあるべきだが、送達の様式に依存して、望ましい場合、インビボで投与するのに十分、短くあるべきである。標的配列への特異的ハイブリダイゼーションに必要なポリヌクレオチドの最小の長さは、いくつかの因子、例えば、他の因子もあるが、G / C 内容、ミスマッチ塩基（もしあれば）の位置、標的ポリヌクレオチドの集団と比較した配列の特異性の程度、およびポリヌクレオチドの化学的性質（例えば、メチルホスホネート骨格、ペプチド核酸、ホスホロチオエート）に依存する。

40

【0083】

一般的に、特異的なハイブリダイゼーションを確実にするために、アンチセンス配列は、

50

標的 C C X C K R 配列に実質的に相補的である。特定の実施形態において、アンチセンス配列は、標的配列に正確に相補的である。しかし、アンチセンスポリヌクレオチドはまた、C C X C K R RNA またはその遺伝子に対応する関連する標的配列への特異的結合が、ポリヌクレオチドの機能的な性質として保持される限り、ヌクレオチド置換、付加、欠失、遷移、転位または改変、あるいは他の核酸配列または非核酸部分を含み得る。

【 0 0 8 4 】

一つの実施形態において、アンチセンス配列は、C C X C K R mRNA の比較的アクセス可能な配列に相補的である（例えば、2 次構造を比較的欠く）。これは、例えば、M F O L D プログラム（G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , M a d i s o n W I ）を使用して推定の RNA 2 次構造を分析することによって、そして当該分野で公知のようにインビトロまたはインビボで試験することによって決定され得る。効果的なアンチセンス組成物を同定するための別の有用な方法は、オリゴヌクレオチドのコンビナトリアルアレイを使用する。（例えば、M i l n e r e t a l . , 1 9 9 7 , N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 1 5 : 5 3 7 を参照のこと）。

【 0 0 8 5 】

本発明はまた、アンチセンス配列に加えて（すなわち、抗 C C X C K R センス配列に加えて）配列を有するアンチセンスポリヌクレオチドを提供する。この場合、アンチセンス配列は、より長い配列のポリペプチド内に含まれる。別の実施形態において、ポリヌクレオチドの配列は、アンチセンス配列から本質的になるかまたはアンチセンス配列である。

【 0 0 8 6 】

アンチセンス核酸（DNA、RNA、改変、アナログなど）は、核酸を産生するための任意の適切な方法、例えば、化学合成および本明細書中に開示される組換え方法を使用して、なされ得る。一つの実施形態において、例えば、本発明のアンチセンス RNA 分子は、新規な化学合成によってまたはクローニングによって調製され得る。例えば、C C X C K R mRNA にハイブリダイズするアンチセンス RNA は、ベクター（例えば、プラスミド）中のプロモーターに作動可能に連結された逆方向に、C C X C K R DNA 配列（例えば、配列番号 1 またはそのフラグメント）を挿入（ライゲーション）することによって作製され得る。プロモーターならびに好ましくは、停止シグナルおよびポリアデニル化シグナルが適切に位置付けられる場合、非コード鎖に対応する挿入配列の鎖は、転写され、そして本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドとして作用する。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、無細胞抽出物、細胞、および動物（哺乳動物およびヒトを含む）における C C X C K R 活性を阻害するために使用され得る。

【 0 0 8 7 】

アンチセンスポリヌクレオチドに関連する一般的な方法について、A N T I S E N S E R N A A N D D N A , (1 9 8 8) , D . A . M e l t o n , E d . , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y) を参照のこと。D a g l e e t a l . , 1 9 9 1 , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h , 1 9 : 1 8 0 5 もまた参照のこと。アンチセンス両方の総説について、例えば、U h l m a n n e t a l . , C h e m . R e v i e w s , 9 0 : 5 4 3 - 5 8 4 (1 9 9 0) を参照のこと。

【 0 0 8 8 】

（三重鎖オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド）
本発明は、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNA、PNA など）を提供し、これは、二本鎖または二重鎖 C C X C K R 核酸（例えば、C C X C K R RNA の折り畳まれた領域、または C C X C K R 遺伝子）に結合し、三重鎖らせん含有、または「三重鎖」核酸を形成する。三重鎖らせんの形成は、例えば、C C X C K R 遺伝子の転写を阻害し、従って、細胞中の C C X C K R を減少させるかまたは除去することによって、C C X C K R 発現の阻害を生じる。任意の特定の機構によって束縛されることを意図しないが、三重鎖らせん対形成は、ポリメラーゼ、転写因子、または調節分子の結合が生じるように十分開く、二重らせんの能力を損なうと考えられる。

【0089】

本発明の三重鎖オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、三重らせん形成の塩基対形成規則を使用して（例えば、Cheng et al., 1988, J. Biol. Chem. 263: 15110; Ferrin and Camerini-Otero, 1991, Science 254: 1494; Ramdas et al., 1989, J. Biol. Chem. 264: 17395; Strobel et al., 1991, Science 254: 1639; および Rigas et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 9591; 本明細書中において参照として援用される）そして CCX CKR mRNA および / または 遺伝子配列を使用して構成される。代表的には、本発明の三重鎖形成オリゴヌクレオチドは、CCX CKR RNA または 遺伝子の特異的な配列に「相補的な」約 10 ~ 少なくとも約 25 のヌクレオチドまたはより長い特定の配列を含む（すなわち、安定な三重らせんを形成するのに十分長い）、望ましいならば、インビボで投与されるための送達の様式に依存する）。この文脈において、「相補性」は、安定な三重らせんを形成し得ることを意味する。1つの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、CCX CKR 遺伝子の制御領域（例えば、CCX CKR 5' 隣接配列、プロモーター、およびエンハンサー）にまたは転写開始部位（例えば、転写開始部位から - 10 と + 10 の間）に特異的に結合するように設計される。三重鎖 DNA を使用する細菌の治療的進歩の総説について、Ge et al., Huber and Carr, 1994, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co, Mt Kisco NY and Rininsland et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5854 を参照のこと。これらは、本明細書中において参考として援用される。

【0090】

(3. リボザイム)

本発明はまた、CCX CKR 活性の阻害に有用なリボザイムを提供する。本発明のリボザイムは、CCX CKR mRNA を結合し、そして特異的に切断し、そして不活化する。有用なリボザイムは、CCX CKR mRNA に相補的な 5' 末端および 3' 末端配列を含み得、本明細書中に開示される CCX CKR mRNA 配列に基づいて当業者によって操作され得る（PCT 公開 WO 93 / 23572 を参照のこと、上記）。本発明のリボザイムは、グループ I イントロンリボザイム（Cech, 1995, Biotechnology 13: 323）を有するものおよびハンマーヘッドリボザイム（Edgington, 1992, Biotechnology 10: 256）を含む。

【0091】

本発明のリボザイムは、GUA、GUU および GUC のような切断部位を有するリボザイムを含む。本発明に従う CCX CKR 活性のリボザイム媒介阻害に最適な他の切断部位は、PCT 公開 WO 94 / 02595 および WO 93 / 23569 に記載されるものであり、これらはともに、参考として援用される。切断部位を含む標的 CCX CKR 遺伝子の領域に対応する 15 と 20 の間のリボヌクレオチドの長さの短い RNA オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドをより望ましくし得る 2 次構造的特徴について評価され得る。切断部位の適切性もまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用して相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションへのアクセス性を試験することによって、または当該分野で公知の標準的な手順に従ってインビトロリボザイム活性について試験することによって、評価され得る。

【0092】

Huら、PCT 公開 WO 94 / 03596（本明細書中において参考として援用される）によって記載されるように、アンチセンスおよびリボザイムの機能は、単一のオリゴヌクレオチド中で組み合わせられ得る。さらに、リボザイムは、本発明の例示的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの記載とともに上記のように、1つ以上の改変ヌクレオチドまたはヌクレオチド間の改変連結を含み得る。

【 0 0 9 3 】

1つの実施形態において、本発明のリボザイムは、インビトロで作製され、そして細胞または患者に導入される。別の実施形態において、遺伝子治療法は、エキソビボまたはインビボで標的細胞中のリボザイムの発現のために使用される。

【 0 0 9 4 】

(4 . オリゴヌクレオチドの投与)

代表的には、本発明の治療方法は、インビボの生理学的な条件下で C C X C K R 活性を阻害するかまたは刺激するように機能し、治療効果に十分な時間の間、これらの条件下で比較的安定であるオリゴヌクレオチドの投与を包含する。上に記すように、改変核酸は、このような安定性を与える際、ならびに所望の組織、器官または細胞にオリゴヌクレオチドを標的化送達するために有用であり得る。

10

【 0 0 9 5 】

オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、本明細書中に記載されるように、適切な薬学的処方物中の薬物として直接送達されるか、または細胞へ核酸を導入する手段 (リボソーム、免疫リボソーム、銃式 (b a l l s t i c s) 、細胞への直接取り込みなどを含む) によって間接的に送達され得る。疾患の処置について、本発明のオリゴヌクレオチドは、治療の有効量で患者に投与される。治療の有効量は、疾患の症状を改善するかまたは標的細胞中の C C X C K R 活性を調節するのに十分な量である。治療目的のためのオリゴヌクレオチドの送達に有用な方法は、米国特許第 5 , 2 7 2 , 0 6 5 号に記載され、これは、本明細書中において参考として援用される。薬学的に活性な化合物の投与の他の詳細は、以下に提供される。別の実施形態において、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、本発明の遺伝子治療および組換え D N A 発現プラスミドを使用して送達され得る。

20

【 0 0 9 6 】

(D . 遺伝子治療)

遺伝子治療は、別の外因性のポリヌクレオチドの導入をいい、これは、このポリヌクレオチドが移される (代表的には) 哺乳動物細胞に対する医療的に有用な表現型の効果を作る。一つの局面において、本発明は、C C X C K R 関連状態の処置のための遺伝子治療方法および組成物を提供する。例示的な実施形態において、遺伝子治療は、C C X C K R 遺伝子産物 (例えば、C C X C K R 活性を増加させるために配列番号 2 の配列を有する C C X C K R ポリペプチドに実質的に類似した C C X C K R タンパク質、または活性を減少させるための阻害性 C C X C K R ポリペプチド) を発現するか、C C X C K R 遺伝子または m R N A 配列 (例えば、C C X C K R 活性を減少させるためのアンチセンス R N A) を有する核酸を発現するか、そうでなければ C C X C K R 遺伝子産物 (例えば、C C X C K R 活性を減少させるための C C X C K R m R N A に向けられたリボザイム) の発現に影響するポリペプチドまたはポリヌクレオチドを発現するか、外因性 C C X C K R 配列を置換または破壊する (例えば、遺伝子置換および遺伝子ノックアウト、それぞれ) ベクターを細胞に導入することを含む。多くの他の実施形態が、本明細書中の開示から当業者に明かである。

30

【 0 0 9 7 】

C C X C K R 遺伝子治療に有用なベクターは、ウイルスまたは非ウイルスであり得、本発明の C C X C K R 発現系に関連して上に記載されたものを含む。遺伝子治療ベクターは、本発明の開示に記載されるように、プロモーターおよび他の調節またはプロセッシング配列を含み得ることが当業者に理解される。普通、ベクターは、プロモーターを含み、必要に応じて、オリゴリボヌクレオチドの転写を駆動するのに役立つエンハンサー (プロモーター配列内に含まれるいずれとも別) 、ならびに望ましい場合、エピソーム維持または染色体一体化および高レベルの転写を提供する他の調節エレメントを含む。遺伝子治療に有用なプラスミドは、他の機能的なエレメント (例えば、選択マーカー、識別領域、および他の配列) を含み得る。さらなる配列は、細胞外と細胞内の両方で安定性、特定の器官、組織、または細胞集団に C C X C K R ヌクレオチド配列 (センスまたはアンチセンス

40

50

）の標的送達、細胞への侵入の媒介、細胞の核への侵入の媒介、および／または核DNA内での一体化の媒介を与える役割を有し得る。例えば、アプタマー様DNA構造、または他のタンパク質結合部分部位は、細胞表面またはレセプターに結合する血清タンパク質へのベクターの結合を媒介するために使用され得、これによって細胞へのDNAの移動の効率を増加する。他のDNA部位および構造は、核膜のレセプター、または核に行く他のタンパク質に直接的または間接的に結合し得、これによって、ベクターの核取り込みを促進する。他のDNA配列は、一体化の効率に直接的または間接的に影響し得る。

【0098】

適切な遺伝子治療ベクターは、複製起点を有しても有さなくてもよい。例えば、患者への投与の前にベクターの増殖のためにベクターに複製起点を含むことが有用である。しかし、複製起点はしばしば、ベクターが宿主染色体DNAに取り込まれるかまたは宿主mRNAまたはDNAに結合するように設計される。

【0099】

記載されるように、本発明はまた、遺伝子置換療法（すなわち、内因性CCX CKR遺伝子の組換え遺伝子での相同置換による置換）のための方法および試薬を提供する。相同組換えによって一体化のために特異的に設計されたベクターが使用され得る。相同組換えを最適化するための重要な因子は、配列同一性の程度、染色体配列に対する相同性の長さを含む。相同組換えを媒介する特異的な配列はまた、重要である。なぜなら、一体化は、転写的に活性なDNAにおいてずっとより容易に生じる。相同標的構築物を構築するための方法および材料は、例えば、Mansour et al., 1988, Nature 336:348; Bradley et al., 1992, Biotechnol 10:534に記載される。米国特許第5,627,059号；同第5,487,992号；同第5,631,153号；および同第5,464,764号も参照のこと。一つの実施形態において、遺伝子置換治療は、調節されるべきCCX CKR遺伝子の発現を制御する調節配列の全てまたは一部を変化させるかまたは置換することを含む。例えば、CCX CKRプロモーター配列（図5）は、（CCX CKR発現を減少させるため、または転写制御部位を無効にするために）破壊され得るか、あるいは外因性プロモーター（例えば、CCX CKR発現を増加するために）置換され得る。

【0100】

本発明はまた、CCX CKR「遺伝子ロックアウト」（すなわち、組換え的に産生されたベクターを使用して内因性CCX CKR遺伝子の相同組換えによる欠失または破壊）のための方法および試薬を提供する。遺伝子ロックアウトにおいて、標的配列は、調節配列（例えば、CCX CKRプロモーター）、あるいはRNAまたはタンパク質コード配列であり得る。内因性遺伝子の発現を変化させるための相同組換えの使用は、米国特許第5,272,071号、WO91/09955、WO93/09222、WO96/29411、WO95/31560、およびWO91/12650に詳細に記載される。Moyyahan et al., 1996, Hum. Mol. Genet. 5:875もまた参照のこと。

【0101】

遺伝子治療ベクターは、インビボ、インビトロまたはエキソビボで細胞または組織に導入され得る。エキソビボ治療のために、ベクターは、患者から得られる細胞（例えば、幹細胞）に導入され得、そして同じ患者に戻す自己移植のためにクローン的に増殖される（例えば、米国特許第5,399,493号および同第5,437,994号を参照のこと、これらは、本明細書中において参考として援用される）。

【0102】

（IV．抗体）

本発明は、ヒトCCX CKRポリペプチドと特異的な免疫反応性である抗体を提供する。従って、本発明の抗体は、配列番号2のアミノ酸配列、またはその免疫原性フラグメントに同一または実質的に同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドを特異的に認識し結合する。本発明の抗体は、普通、少なくとも約 10^7 、 10^8 、 10^9 、または 10^{10} M^{-1} の

10

20

30

40

50

CCX CKRに対する特異的結合を示す。

【0103】

本発明の抗CCX CKR抗体は、種々の使用（例えば、CCX CKRポリペプチドの単離（例えば、イムノアフィニティークロマトグラフィー）、CCX CKRポリペプチドの検出、およびCCX CKR活性の阻害（例えば、インビボまたはインビトロ））を有する。

【0104】

（A．抗CCX CKR抗体の産生）

本発明の抗CCX CKR抗体は、当業者に周知の種々の手段（例えば、前述のようなもの）により製造され得る。I節（前述）に記されるように、抗体は、本明細書において広範に規定されており、そして具体的に、フラグメント、キメラ、およびCCX CKRポリペプチドまたはエピトープに特異的に結合する類似の結合因子（例えば、ファージディスプレイ技術の産物）を含む。しかし、用語「抗体」は、CCX CKRによって結合される（すなわち、そのリガンドである）ケモカイン（例えば、ELC、SLC、TECK、BLC、およびvMIP II）をいうことは意図されない。

【0105】

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の産生方法は、当該分野で周知である。例えば、Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991); Stitesら（編）BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY（第7版）Lange Medical Publications, Los Altos, CA, およびそこで引用される参考文献（「Stites」）; Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE（第二版）、Academic Press, New York, NY (1986); KohlerおよびMilstein, 1975, Nature 256: 496-97; ならびにHarlowおよびLaneを参照のこと。これらの技術には、ファージまたは類似のベクターにおける組換え抗体のライブラリーからの抗体の選択による抗体調製が含まれる。Huseら、1989, Science 246: 1275-81; およびWardら、1989, Nature 341: 544-46を参照のこと。

【0106】

ポリクローナル抗体の産生のために、適切な標的免疫系が選択される（代表的には、マウスまたはウサギであるが、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ニワトリ、モルモット、サル、ラットもまた含まれる）。宿主によって産生される免疫グロブリンは、慣用の方法（アフィニティー精製を含む）で沈降、単離、および精製され得る。実質的に単一特異的な抗体集団は、ポリクローナル血清のクロマトグラフィー精製によって産生され得る。

【0107】

モノクローナル抗体のために、適切な動物が選択され、そして所望の免疫プロトコルに従う。本発明の抗体は、任意のアイソタイプ（例えば、IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEであり、IgG、IgA、およびIgMが最も好ましい。）のものであり得る。好ましいモノクローナル抗体である抗CCX CKR抗体は、CCX CKRの1つ以上の生物学的活性を中和する（すなわち、阻害またはブロックする）。このような抗体は、所望の阻害活性についてハイブリドーマ上清をスクリーニングすることによって得られ得る。10⁸リットル/モルの親和性、好ましくは、10⁹~10¹⁰またはそれより強い親和性を有するモノクローナル抗体は、以下に記載される方法によって産生され得る。非ヒトモノクローナル抗体（例えば、マウス、ウサギ、またはウマ）の産生は、周知であり、そして、例えば、宿主動物をCCX CKRまたはそのフラグメントを含有する調製物で免疫することによって達成され得る。免疫化動物から得られる抗体産生細胞は、不死化され、そしてスクリーニングされるか、またはCCX CKRポリペプチドに結合する抗体の産生のためにまずスクリーニングされ、次いで不死化される。

【0108】

本発明のいくつかの抗CCX CKRモノクローナル抗体は、それらの標的に対する親和性を減少せずにそれらの潜在的な抗原性を減少するために、ヒト化されているか、またはヒトもしくはキメラである。ヒト化抗体は、当該分野で記載されている。例えば、Queenら、1989、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029；米国特許第5,563,762号；同第5,693,761号；同第5,585,089号および同第5,530,101号を参照のこと。ヒト化のために使用されるヒト抗体配列は、天然に存在するヒト抗体であるか、またはいくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であり得る。Kettleboroughら、Protein Engineering 4:773(1991)；Kolbingerら、Protein Engineering 6:971(1993)を参照のこと。

10

【0109】

CCX CKRに対するヒト化モノクローナル抗体もまた、ヒト免疫系のエレメントを有するトランスジェニック動物を使用して産生し得る（例えば、米国特許第5,569,825号；同第5,545,806号；同第5,693,762号；同第5,693,761号；および同第5,7124,350号を参照のこと）。

【0110】

有効な抗CCX CKR結合組成物もまた、ファージディスプレイ技術を使用して産生し得る（例えば、Dowerら、WO91/17271およびMcCaffertyら、WO92/01047を参照のこと）。これらの方法において、ファージのライブラリーが産生され、そこでのメンバーは、それらの外側表面上に異なる抗体を提示する。抗体は、通常、FvまたはFabフラグメントとして提示される。所望の特異性を有するファージディスプレイ抗体は、CCX CKRポリペプチドに対するアフィニティー富化によって選択される。

20

【0111】

一旦発現されると、本発明の全抗体、それらのダイマー、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態は、当該分野の標準的な手順（硫酸沈殿、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳導など）に従って、精製され得る（一般的に、PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE 3RD EDITION (Spring-Verlag, N.Y., 1994)を参照のこと）。

30

【0112】

抗体（例えば、抗CCX CKR抗体）は、調製物中に存在する少なくとも約80%、よりしばしば少なくとも約90%、さらによりしばしばには少なくとも約95%、最もしばしば少なくとも約99%またはそれ以上のポリペプチド分子が、同じ抗原（例えば、CCX CKRポリペプチド）に特異的に結合する場合、実質的に純粋である。薬学的な使用のために、少なくとも約90~95%均一性の抗CCX CKR免疫グロブリンが好ましく、そして98から99%またはそれ以上の均一性をもっとも好ましい。

【0113】

（B.CCX CKR抗体の改変）

本発明の抗体は、改変して、または改変なしで使用し得る。頻繁には、その抗体は、共有結合によるかまたは非共有結合により、検出可能なシグナルを提供する物質と結合させることによって標識される。このような標識には、当該分野で周知のもの（例えば、放射性標識、蛍光標識、または生物活性（例えば、酵素）標識）が含まれる。標識された結合部分として、本発明の抗体は、診断的応用に特に有用であり得る。

40

【0114】

CCX CKRポリペプチドに対する抗体の特異性を共有するが、第二の部分に特異的に結合することもまた可能であるハイブリッド抗体もまた、本発明に包含される。ハイブリッド抗体において、1つの重鎖および軽鎖の対は、1つの抗体からであり、そして他の対は、別のエピトープに対して惹起されたものからである。これは、多機能結合価、すなわち、少なくとも2つの異なるエピトープに同時に結合する能力、の特性を生じる。このよ

50

うなハイブリッドは、それぞれの成分抗体を産生するハイブリドーマの融合によって、または組換え技術によって形成され得る。

【0115】

(C. 非交差反応抗体の選択)

いくつかの実施形態において、CCX CKRと特異的に免疫反応し、かつ、他のケモカインレセプターに対して低交差反応性を有するように選択された抗CCX CKRモノクローナル血清または抗CCX CKRポリクローナル血清が生成され、そして任意のそのような交差反応性は、免疫アッセイにおける使用の前に免疫吸着によって除去される。特異性に関してモノクローナル抗体をスクリーニングしそして特徴づけするための方法は、当該分野で周知であり、そして一般にHarlowおよびLane (前出) に記載される。

10

【0116】

ポリクローナル抗血清を産生するために (例えば、免疫アッセイにおいて使用するため)、配列番号2のタンパク質、ポリクローナル抗血清が、当該分野で周知の方法 (例えば、前出のようなもの) を使用して調製される。例えば、組換えタンパク質は、哺乳動物細胞株において産生され得る。balb/cのようなマウスの同系交配の株は、配列番号2のタンパク質を用いて、標準的なアジュバント (例えば、Freundアジュバント) および標準的なマウス免疫プロトコル (HarlowおよびLane (前述) を参照のこと) を使用して、免疫化される。あるいは、本明細書に開示される配列に由来し、そしてキャリアタンパク質に結合体化された合成ペプチドが、免疫原として使用され得る。ポリクローナル血清が収集され、そして免疫アッセイ (例えば、免疫原が固体支持体に固定されている固相免疫アッセイ) において免疫原タンパク質に対して力価測定される。10⁴またはそれ以上の力価を有するポリクローナル抗血清が選択され、そして他のヒトケモカインレセプター (例えば、1つ以上のCCR1、CCR2、(CCR2A、CCR2B)、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9A/B、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CX₃CR1、およびXCR1) または他のGタンパク質結合レセプター (例えば、ウシPPRI) に対するそれらの交差反応性について競合結合免疫アッセイ (例えば、HarlowおよびLane (前述) の570-573頁に記載されるもの) を使用して試験される。競合結合形式での免疫アッセイは、交差反応性決定のために使用され得る。例えば、配列番号2のタンパク質は、固相支持体に固定され得る。アッセイに添加されるタンパク質は、固定された抗原に対する抗血清の結合と競合する。固定されたタンパク質への抗血清の結合と競合する上記のタンパク質の能力は、配列番号2のタンパク質と比較される。上記のタンパク質についてのパーセント交差反応性が、標準的な計算を使用して計算される。上記のタンパク質の各々との10%未満の交差反応性を有する抗血清が選択されそしてプールされる。次いで、交差反応する抗体は、プールされた抗血清から上記のタンパク質との免疫吸着によって除去される。

20

30

【0117】

(V. CCX CKRリガンドの同定)

CCX CKRが結合するケモカインは、実施例4から6において以下に記載されるように同定された。CCX CKRに結合するリガンドの範囲には、高親和性を有するELC、SLC、CTACK、およびTECK、ならびに低親和性を有するBLC、mMIP-1、およびMIP1Iが含まれる。ケモカインELC (MIP-3とも呼ばれる) およびSLC (6Ckineとも呼ばれる)、ならびにその同族レセプターであるCCR7は、樹状細胞(DC)およびT細胞の調節に対して顕著な効果を有する。ELCおよびSLCは、成熟 (未成熟ではないが) DCの主要な誘引物質であることが示されており、そしてそれらは、新たに仮定されたT中心記憶 (central memory) (T_{CM}) リンパ球の移動を制御することが示唆されている。ELC、SLC、またはCCR7の天然のまたは標的化された遺伝子欠失は、DC、T、およびB細胞のトラフィッキングにおける顕著な不全、ならびに二次的リンパ器官構造の形態学的破壊を生じる (Sallu

40

50

stora、1999、Nature 401:708; Forsterら、1999、Cell 99:23; Gunnら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. 95:258; Gunnら、1999、J. Exp. Med. 189:451; Yanagiharaら、1998、J. Immunol. 161:3096; Yoshidaら、1997、J. Biol. Chem. 272:13803; Yoshidaら、1998、J. Biol. Chem. 273:7118)。CCR7は、別のケモカインレセプターであるCCR9（以前は、オーファンクロンGPR9.6）に関連し、CCケモカインTECKに対するレセプターであることが示されている（Zabelら、1999、J. Exp. Med. 190:1241; Zaballorsら、1999、J. Immunol. 162:5671）。CCR9/TECK対合は、胸腺細胞ならびに腸に標的化したホーミングパターンを有するリンパ球の調節にとって重要であることが報告されている（Younら、1999、Blood 94:2533）。現在までに、CCR9は、報告された唯一のTECKレセプターであり、そしてCCR7は、SLC結合の周辺の矛盾する報告にもかかわらず（Jenhら、1999、J. Immunol. 162:3765; Satorら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:8205）、ELCおよびSLCについての唯一の信憑性のあるレセプターであった。

10

【0118】

（VI. CCX CCR活性のモジュレーターのスクリーニングおよび同定） 本発明はまた、CCX CCRの活性を調節する化合物をスクリーニングし得るアッセイ方法を提供する。特に興味深いのは、CCX CCRに結合する化合物（ケモカインELCとの結合について競合する化合物を含む）である。本発明は、種々の薬物スクリーニング技術において組換えレセプターを使用することによる化合物のスクリーニングのために特に有用である。したがって、本発明は、CCX CCR機能の推定の特異的アゴニストまたはアンタゴニストを評価するための方法を含む。したがって、本発明は、CCX CCRケモカインレセプターの活性を調節する化合物のためのスクリーニングアッセイの調製および実行におけるこれらの化合物の使用に関する。例えば、本発明の化合物は、レセプター変異体を単離するために有用であり、これは、より強力な化合物のための優れたスクリーニングツールである。さらに、本発明の化合物は、CCX CCRケモカインレセプターに対する他の化合物の結合部位を樹立するかまたは決定することにおいて（例えば、競合阻害により）、有用である。本発明の化合物はまた、CCR-1、CCR-2（CCR2A、CCR2B）、CCR-3、CCR-4、CCR-5、およびCXCR-4を含む他のケモカインレセプターに比較して、CCX CCRケモカインレセプターの推定特異的モジュレーターの評価のための有用である。

20

30

【0119】

CCX CCR結合アッセイ、CCX CCRシグナリングアッセイ、走化性アッセイ、セカンドメッセンジャーレベル（すなわち、Ca⁺⁺）；細胞増殖；イノシトールホスファートプール変化；および細胞応答の他のアッセイを含む種々のアッセイは、CCX CCRモジュレーターを評価するために使用され得る。

【0120】

薬物スクリーニングの1つの方法は、CCX CCR（例えば、配列番号2を有するタンパク質）を発現する組換えDNA分子で安定にトランスフェクトされた真核生物または原核生物の宿主細胞を利用する。このような細胞は、生存形態または固定された形態のいずれかで、標準的なリガンド/レセプター結合アッセイのために使用され得る（Parceraら、1989、Science 246:243-247；およびOwiczkiら、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4007-4011（これは、細胞応答を検出するための感度のよい方法を記載する）を参照のこと）。試験化合物は、結合について、または結合のために別のリガンドとの競合についてアッセイされ得る。しばしば、試験化合物または「その他のリガンド」のいずれかが、標識される。種々の実施形態において、試験化合物は、CCX CCRまたはそのリガンド結合フラグメ

40

50

ントへの結合に対してケモカインまたは他のリガンドとの競合について評価される。いくつかの実施形態において、そのケモカインは、E L C、S L C、T E C K、B L C、C T A C K、m M I P - 1、または M I P I I である。関連する実施形態において、ケモカインは、C C X C K R ポリペプチドに高い親和性または中程度の親和性で結合する E L C、S L C、T E C K、B L C、C T A C K、m M I P - 1、または M I P I I 以外のケモカインである。

【0121】

適切なアッセイにおいて、ヒト C C X C K R タンパク質の少なくとも1つの特性、活性または機能的特徴を有する C C X C K R タンパク質（単離されたものであると組換えであろうと）が使用される。その特性は、結合プロフィール（例えば、E L C、S L C、および T E C K に対する結合であるが、C C X C K R レセプターポリペプチド（例えば、配列番号2の）がほとんどかまたは全く親和性を有せずに結合するケモカインに対する結合ではない（例えば、T E C K および E L C の両方または S L C に対する結合）のような結合特性（例えば、リガンドまたはインヒビターに対する）、シグナリング活性（例えば、哺乳動物 G タンパク質の活性化、迅速および一過性の細胞質遊離カルシウム [Ca^{++}] i の濃度の増大の誘導）、細胞応答機能（例えば、白血球による走化性の刺激または炎症メディエーターの放出）などであり得る。

【0122】

1つの実施形態において、C C X C K R タンパク質またはその改変体を含有する組成物は、結合に対して適切な条件下で維持される。C C X C K R レセプターは、試験されるべき推定因子（または少なくとも1つの推定因子を含有する第二の組成物）と接触され、そして結合が検出または測定される。

【0123】

1つの実施形態において、そのアッセイは、細胞ベースのアッセイであり、そして C C X C K R レセプターをコードする核酸配列を有するベクターまたは発現カセットで安定にまたは一過的にトランスフェクトされた細胞が使用される。その細胞は、レセプターの発現にとって適切である条件下で維持され、そして推定因子と結合が生じるのに適切な条件下で接触される。結合は、標準的な技術を使用して検出され得る。例えば、結合の程度は、適切なコントロールに比較して（例えば、推定因子の非存在下でバックグラウンドに対して、または公知のリガンドに対して）決定され得る。必要に応じて、そのレセプターを含有する細胞画分（例えば、膜画分）が全細胞の代わりに使用され得る。

【0124】

結合または複合体形成の検出は、直接的にまたは間接的に検出され得る。例えば、推定因子は、適切な標識（例えば、蛍光標識、化学発光標識、アイソトープ標識、酵素標識など）を使用して標識され得、そして結合は、標識の検出によって決定され得る。特異的および/または競合的結合は、競合または置換研究によって、標識していない因子またはリガンド（例えば、E L C、S L C、T E C K、B L C、m C T A C K、m M I P - 1、または M I P I I）を競合剤として使用して、評価され得る。

【0125】

他の実施形態において、結合阻害アッセイは、本発明の化合物を評価するために使用され得る。これらのアッセイにおいて、E L C、S L C、T E C K、B L C、または M I P I I を使用してリガンド結合のインヒビターとして評価される。この実施形態において、C C X C K R レセプターは、E L C、S L C、T E C K、B L C、m C T A C K、m M I P - 1、または M I P I I のようなリガンドと接触され、そしてリガンド結合の測定がなされる。次いで、そのレセプターは、リガンドの存在下（例えば、E L C、S L C、T E C K、B L C、m C T A C K、m M I P - 1、または M I P I I）で試験因子と接触され、結合の第二の測定がなされる。リガンド結合の程度の減少は、試験因子による結合の阻害の指標である。その結合の阻害アッセイは、C C X C K R を発現する全細胞を使用して行われ得るか、または C C X C K R を発現する細胞からの膜画分を使用して行われ得る。

10

20

30

40

50

【0126】

Gタンパク質に結合したレセプターへの、例えば、アゴニストの結合は、レセプターによるシグナリング事象を生じ得る。したがって、シグナリングアッセイはまた、本発明の化合物を評価するために使用され得、そして因子によるシグナリング機能の誘導が、任意の適切な方法を使用してモニターされ得る。例えば、Gタンパク質活性（例えば、GTPのGDPへの加水分解またはレセプター結合により誘発される後期（later）シグナリング事象）は、公知の方法によってアッセイされ得る（例えば、PCT/US97/15915；Neoteら、1993、Cell 72：415-25；Van Riperら、1993、J. Exp. Med. , 177：851-56およびDahindenら、1994、J. Exp. Med. , 179：751-56を参照のこと）。 10

【0127】

走化性アッセイもまた、レセプター機能を評価するため、および本明細書において提供される化合物を評価するために使用され得る。これらのアッセイは、因子によってインビトロまたはインビボで誘導された細胞（組換えCCX CKRを発現する細胞）の機能的移動に基づいており、そしてリガンド、インヒビター、またはアゴニストの走化性に対する結合および/または抗化合物を評価するために使用され得る。適切なアッセイは、PCT/US97/15915；Springerら、WO94/20142；Bermanら、1988、Immunol. Invest. , 17：625-77（1988）；およびKavanaughら、1991、J. Immunol. , 146：4149-4156に記載される。 20

【0128】

本明細書において提供される試験化合物CCX CKR活性モジュレーターまたは推定モジュレーターおよびその他の化合物はまた、その化合物がインビボで効果を発揮する能力を評価するために炎症のモデルを使用して評価され得る。適切なモデルは、以下のように記載されている：肺炎のためのヒツジモデル（Wegら、1993、J. Exp. Med. , 177：561を参照のこと）；およびラット遅延型過敏モデル（Randら、1996、Am. J. Pathol. , 148：855-864を参照のこと）。本発明の化合物を評価するための別の有用なモデルは、多発性硬化症についての実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）モデルであり、これはケモカインレセプター発現および機能をプローブする（Ransohoffら、1996、Cytokine Growth Factor Rev. , 7：35-46、およびKarpusら、1998、J. Immunol. 161：2667-2671を参照のこと）。 30

【0129】

さらに、白血球炎症アッセイはまた、化合物を評価するために使用され得る（Van Dammeら、1992、J. Exp. Med. , 176：59-65；Zachariaeら、1990、J. Exp. Med. 171：2177-2182；およびJoseら、1994、J. Exp. Med. , 179：881-887を参照のこと）。 40

【0130】

自動化アッセイのいくつかの方法が、短期間に数万の化合物のスクリーニングを可能にするために、近年において開発されている。Fodorら、1991、Science 251：767-73および複数の化合物による結合親和性の試験のための手段を記載する化学的多様性ライブラリーのその他の記載を参照のこと。適切なアッセイの開発は、本発明によって提供されるように、大量の精製CCX CKRおよび/または組換えCCX CKRを発現する細胞の利用可能性により大いに容易化され得る。 50

【0131】

本発明の検出方法およびスクリーニング法の実施形態において、ケモカインおよびCCX CKRポリペプチドは、同じ種のものである。関連する実施形態において、ケモカインは、レセプターに天然に結合する。

【0132】

（VII. CCX CKR媒介状態または疾患を処置する方法）

10

20

30

40

50

なお別の局面において、本発明は、このような疾患または条件を有する被験体に、治療有効量の C C X C K R 機能のモジュレーター（すなわち、C C X C K R 機能または遺伝子発現のアゴニスト（刺激剤）およびアンタゴニスト（阻害剤））を投与することによって、C C X C K R 媒介条件または疾患を処置する方法を提供する。このようなモジュレーターには、C C X C K R 機能の低分子アゴニストおよびアンタゴニスト；ポリペプチドインヒビター（例えば、優勢ネガティブ変異体）；アンチセンス、リボザイム、および三重鎖ポリヌクレオチド；遺伝子治療（阻害のための；例えば、遺伝子ノックアウトまたは過剰発現）などが含まれる。

【 0 1 3 3 】

炎症、感染、および癌に関連する疾患および状態は、本発明の化合物および組成物によって処置され得る。実施形態の 1 つのグループにおいて、ヒトまたはその他の種の疾患または状態（慢性疾患を含む）は、C C X C K R 機能のインヒビターで処置され得る。これらの疾患または状態には、（ 1 ）炎症またはアレルギー疾患（全身性過敏症または過敏応答、薬物アレルギー、昆虫の刺創アレルギー）；炎症性腸疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、回腸炎および腸炎）；膣炎；乾癬および炎症性皮膚疾患（例えば、皮膚炎、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹）；血管炎；脊椎関節症；強皮症；呼吸器アレルギー性疾患（例えば、喘息、アレルギー性鼻炎、過敏性肺疾患など）、（ 2 ）自己免疫疾患（例えば、関節炎（慢性関節リウマチおよび乾癬）、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、糖尿病、糸球体腎炎など）、（ 3 ）移植片拒絶（同種移植片拒絶および対宿主性移植片病を含む）、ならびに（ 4 ）所望でない炎症性応答が阻害されるべき他の疾患（例えば、アテローム性動脈硬化症、筋炎）が含まれる。別の実施形態のグループにおいて、疾患または状態は、C C X C K R 機能のアゴニストまたは C C X C K R 発現を増大するための試薬または方法で処置される。C C X C K R アゴニストで処置されるべき疾患の例には、癌、血管形成または新血管形成が役割を果たす疾患（新生物疾患、網膜症、および黄斑変性）、感染疾患、ならびに免疫抑制疾患が含まれる。C C X C K R 遺伝子産物、アゴニスト、およびアンタゴニストは、組織および器官の再モデリング、修復、および再生において同様に用途を見出す。

【 0 1 3 4 】

例えば、モジュレーター C C X C K R 活性は、炎症性応答に関与する細胞の増殖および分裂を阻害し得る。用語「炎症」は当該分野で通常の意味を有し、急性の応答（すなわち、炎症性プロセスが活性である応答）および慢性応答（すなわち、新たな結合組織の遅い進行および形成が特徴である）をいう。急性および慢性炎症は、関与する細胞型によって区別され得る。急性炎症は、しばしば、多系核の好中球が関与する；一方、慢性炎症は、通常、リンパ組織球増多症および／または肉芽腫症応答によって特徴付けられる。炎症には、特異的および非特異的防御系の両方の反応が含まれる。特異的防御系反応は、抗原（おそらく自己抗原も含まれる）に対する特異的な免疫系反応応答である。非特異的防御系反応は、免疫学記憶し得る白血球によって媒介される炎症性応答である。このような細胞には、顆粒球、マクロファージ、好中球、および好酸球が含まれる。炎症についてのアッセイは、当該分野で周知である。本発明によって提供される試薬は、慢性および急性状態の両方の炎症状態であって、感染に関連する炎症（例えば、敗血症性ショック、敗血症、または全身性炎症応答症候群（SIRS）、虚血性再灌流障害、内毒素致死性、関節炎、補体媒介超急性拒絶、腎炎、サイトカインまたはケモカイン誘導性肺疾患、炎症性腸疾患、クローン病）、またはサイトカイン（例えば、TNF または IL - 1）の過剰産生から生じるものを含むものを処置するために使用され得る。特定のタイプの炎症の例は、びまん性炎症、病巣炎症、ク룹性炎症、間質性炎症、閉塞性炎症、実質性炎症、反応性炎症、特異的炎症、毒性炎症、および外傷性炎症である。

【 0 1 3 5 】

本発明の方法および試薬は、哺乳動物のような動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス）処置において、または動物において、またはヒト疾患のインビトロモデル（例えば、細胞培養）で使用され得る。

【0136】

(VIIII. 薬学的組成物)

本発明は、CCX CKRのアゴニスト、アンタゴニスト、またはリガンドを含む治療組成物、およびCCX CKRによって媒介される生理学的または病理学的状態を処置する方法をさらに提供する。

【0137】

CCX CKRポリペプチド、そのフラグメント、センスおよびアンチセンスポリペプチド、抗CCX CKR抗体またはその結合フラグメント、ならびにCCX CKR活性のアンタゴニストまたはアゴニスト(例えば、低分子モジュレーター)は、滅菌条件下で処置されるべき宿主に直接投与され得る。しかし、活性成分は、単独で、投与されることが可能であり、それは、しばしば、薬学的処方物として提示することが好ましい。処方物は、代表的には、少なくとも1つの活性成分を、1つ以上の受容可能なそのキャリアと一緒に含む。各キャリアは、他の成分と適合性であり、そしてその患者に対して傷害性でないという意味において、薬学的にも生理学的にも受容可能であるべきである。例えば、生物活性剤は、半減期のような安定性または薬学的な特性を増強するために、投与前にオボアルブミンまたは血清アルブミンのようなキャリアタンパク質と複合体化され得る。さらに、本発明の治療処方物は、他の化学療法剤または化学予防剤と組み合わせて、または関連して、使用され得る。

【0138】

治療処方物は、薬学分野で周知の任意の方法によって調製され得る。例えば、Gilmanら(編)(1990) GoodmanおよびGilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics (第8版) Pergamon Press; および(1990) Remington's Pharmaceutical Sciences (第17版) Mack Publishing Co., Easton, P.a.; Avisら(編)(1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, N.Y.; Liebermanら(編)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, N.Y.; およびLeibermanら(編)(1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, N.Y.を参照のこと。

【0139】

処置されるべき疾患および被験体の状態に依存して、本発明の化合物は、経口、非経口(例えば、筋肉内注射または注入、腹腔内注射または注入、静脈内注射または注入、ICV注射または注入、嚢内注射または注入、皮下注射、または移植)により、吸入スプレー、鼻内、腔内、直腸内、舌下、または局所的投与経路により投与され得、そして単独もしくは各投与経路にとって適切な従来の非毒性の薬学的に受容可能なキャリア、アジュバント、およびビヒクルを含有する適切な投薬単位処方物において一緒に、処方され得る。活性成分を含有する薬学的組成物は、経口使用のため、例えば、錠剤、トローチ、ロゼンジ、水性もしくは油性の懸濁液、分散性粉末もしくは顆粒、エマルジョン、ハードカプセルもしくはソフトカプセル、またはシロップもしくはエリキシルとして、適切な形態であり得る。経口使用のために意図される組成物は、当該分野で公知の任意の方法にしたがって、薬学的組成物の製造のために調製され得、そしてそのような組成物は、薬学的にエレガントかつ口当たりのよい調製物を提供するために、甘味剤、香味剤、着色剤、および保存剤からなる群から選択される1つ以上の薬剤を含有し得る。錠剤は、錠剤の製造に適切な非毒性の薬学的に受容可能な賦形剤と混合して活性成分を含有する。これらの賦形剤は、例えば、不活性な希釈剤(例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム、またはリン酸ナトリウム); 顆粒化剤および崩壊剤(例えば、コーンスターチまたはアルギン酸); 結合剤(例えば、スターチ、ゼラチン、アカシア)、および潤滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク)であり得る。錠剤

は、被覆されていなくてもよく、またはそれらは、胃腸管において崩壊および吸収を遅延させ、それにより長期にわたって持続的な作用を提供するために、公知の技術によって被覆されていてもよい。例えば、時間遅延物質（例えば、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレート）が利用され得る。それらはまた、米国特許第4,256,108号；同第4,166,452号；および同第4,265,874号に記載される技術によってもまた、制御放出のための浸透圧治療錠剤を形成するために、被覆され得る。

【0140】

経口使用のための処方物はまた、硬質ゼラチンカプセル（ここでは、活性成分は、不活性な固体希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウムまたはカオリン）と混合される）として存在し得るか、または軟質ゼラチンカプセル（ここでは、活性成分は、水または油性媒体（例えば、ラッカセイ（peanut）油、液状パラフィンまたはオリーブ油）と混合される）として存在し得る。

10

【0141】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適切な賦形剤との混合物中に活性材料を含有する。このような賦形剤は、懸濁剤（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチル-セルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニル-ピロリドン、カラヤゴムおよびアラビアゴム）であり；分散剤または湿潤剤は、天然に存在するホスファチド（例えば、レシチン）、または脂肪酸と酸化アルキレンとの縮合生成物（例えば、ポリオキシ-エチレンステアレート）、または長鎖脂肪族アルコールとエチレンオキシドとの縮合生成物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール）、または脂肪酸およびヘキシトールから誘導される部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、または無水ヘキシトールおよび脂肪酸から誘導される部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物（例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエート）であり得る。この水性懸濁液はまた、1以上の防腐剤（例えば、エチルまたはn-プロピル、p-ヒドロキシベンゾエート）、1以上の着色剤、1以上の香味料、および1以上の甘味料（例えば、スクロースまたはサッカリン）を含んでもよい。

20

【0142】

油性懸濁液は、活性成分を植物油（例えば、ラッカセイ（arachis）油、オリーブ油、ゴマ油またはココナッツ油）中、または鉱油（例えば、液体パラフィン）中に懸濁することにより調合され得る。油性懸濁液は、増粘剤（例えば、みつろう、硬質ワックスまたはセチルアルコール）を含んでもよい。上記のような甘味料および香味剤が添加されて、口当たりのよい経口調製物を提供し得る。これらの組成物は、酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸）の添加により保存され得る。

30

【0143】

水の添加による水性懸濁液の調製に適切な分散性散剤および顆粒は、分散剤または湿潤剤、懸濁剤および1以上の防腐剤との混合物中に活性成分を提供する。適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤は、既に上記されるものにより例示される。さらなる賦形剤（例えば、甘味料、香味剤および着色剤）もまた存在し得る。

【0144】

本発明の薬学的組成物はまた、オイル-イン-ウォーター乳濁液の形態であり得る。油相は、植物油（例えば、オリーブ油またはラッカセイ油）もしくは鉱油（例えば、液体パラフィン）またはそれらの混合物であり得る。適切な乳化剤は、天然に存在するゴム（例えば、アラビアゴムもしくはカラヤゴム）、天然に存在するホスファチド（例えば、ダイズ、レシチン）、または脂肪酸および無水ヘキシトールから誘導されるエステルもしくは部分エステル（例えば、ソルビタンモノオレエート）、およびエチレンオキシドとのその部分エステルの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）であり得る。乳濁液はまた、甘味剤および香味剤を含んでもよい。

40

【0145】

シロップおよびエリキシルは、甘味剤（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、

50

ソルビトールまたはスクロース)を用いて調合され得る。このような調合物はまた、粘滑剤、防腐剤ならびに香味剤および着色剤を含んでもよい。

【0146】

薬学的組成物は、注射用水性懸濁液または油性懸濁液の形態であり得る。この懸濁液は、これらの適切な分散剤または湿潤剤、および上記されている懸濁剤を使用して、公知の技術に従って処方され得る。この滅菌注射可能な調製物はまた、非毒性の非経口的に受容可能な希釈剤または溶媒(例えば、1,3-ブタンジオール溶液)中の滅菌注射可能な溶液または懸濁液であり得る。受容可能なビヒクルおよび溶媒のなかでも、水、リンガー溶液および等張性塩化ナトリウム溶液を使用し得る。さらに、滅菌不揮発性油は、溶媒または懸濁培地として都合良く使用される。この目的のために、任意のブランドな油を使用し得、これらとしては、合成モノグリセリドおよびジグリセリドが挙げられる。さらに、脂肪酸(例えば、オレイン酸)が、注射可能物(infectable)の調製において用途を見出す。

10

【0147】

本発明の化合物はまた、薬物の直腸投与のための坐薬の形態で投与され得る。これらの組成物は、通常温度では固体であるが、直腸温度では液体であり、これにより直腸内で溶解して薬物を放出する、非刺激性賦形剤と薬物とを混合することにより調製され得る。このような材料は、ココアバターおよびポリエチレングリコールである。

【0148】

局所的な使用のために、本発明の化合物を含有する、クリーム剤、軟膏、ゼリー、溶液または懸濁液などが、使用され得る。本明細書中で使用される場合、局所適用はまた、口洗淨および含嗽薬の使用を含むことが意図される。

20

【0149】

本発明の薬学的組成物および方法はさらに、本明細書に記載されるように、上記病理学的状態の処置において通常適用される他の治療的に活性化化合物を含み得る。

【0150】

ケモカインレセプター調節を必要とする状態の処置または予防において、適切な用量レベルは、一般に一日に患者の体重1kgあたり約0.001~100mgであり、これは、単回用量または複数投与で投与され得る。好ましくは、投与量レベルは、一日あたり約0.01~約25mg/kgであり、より好ましくは一日あたり約0.05~約10mg/kgである。適切な投与量レベルは、1日あたり約0.01~25mg/kg、一日あたり約0.05~10mg/kgまたは1日あたり約0.1~5mg/kgであり得る。この範囲内で、投与量は、一日あたり約0.005~約0.05、0.05~0.5または0.5~0.5mg/kgであり得る。経口投与のために、組成物は、好ましくは、処置される患者への投与量の症候性適応について、約1~1000ミリグラム(好ましくは、約15、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500、600、750、800、900および1000ミリグラムの活性成分)の活性成分を含む錠剤の形態で提供される。この化合物は、一日あたり1~4回(好ましくは、一日あたり1回または2回)のレジメンで投与され得る。

30

【0151】

しかし、任意の特定の患者のための特定の用量レベルおよび頻度が変化し得、そして以下を含む種々の因子に依存することは、理解される:使用される特定の化合物の活性、代謝安定性およびこの化合物の作用の長さ、年齢、体重、全体的な健康、性別、食事、投与の様式および時間、排出速度、薬物の組み合わせ、特定の状態の重症度、および宿主が受けている治療。

40

【0152】

本発明の化合物は、炎症および免疫調節の障害および疾患(ぜん息およびアレルギー性疾患、ならびに自己免疫病理(例えば、慢性関節リウマチおよびアテローム性動脈硬化症)ならびに上記の病理が挙げられる)を予防および処置するための関連した有用性を有するほかの化合物と組み合わせられ得る。

50

【 0 1 5 3 】

例えば、炎症の処置または予防において、本発明の化合物は、抗炎症剤または鎮痛剤と組み合わせて使用され得る（例えば、アヘン剤アンタゴニスト、リボキシゲナーゼインヒビター（例えば、5 - リボキシゲナーゼのインヒビター）、シクロオキシゲナーゼインヒビター（例えば、シクロオキシゲナーゼ - 2 インヒビター）、インターロイキンインヒビター（例えば、インターロイキン - 1 インヒビター）、NMDA アンタゴニスト、酸化窒素のインヒビターまたは酸化窒素の合成のインヒビター、非ステロイド系抗炎症剤、またはサイトカイン抑制抗炎症剤（例えば、アセトアミノフェン、アスピリン、コジエン（codiene）、フェンタニル、イブプロフェン、インドメタシン、ケトロラック、モルヒネ、ナプロキセン、フェナセチン、ピロキシカム、ステロイド系鎮痛薬、サフェタニル、サンリンダク（sunlindac）、テニダブなど）。同様に、即時化合物は、鎮痛剤；相乗因子（例えば、カフェイン、H₂ - アンタゴニスト、シメチコン、水酸化アルミニウムまたは水酸化マグネシウム）；うっ血除去薬（例えば、フェニレフリン、フェニルプロパノールアミン、プソイドエヘドリン（pseudophedrine）、オキシメタゾリン、エピネフリン（epinephrine）、ナファゾリン、キシロメタゾリン、プロピルヘキサドリン、またはレボ - デスオキシ - エフェドリン）；鎮咳薬（antitussive）（例えば、コデイン、ヒドロコドン、カラミフェン、カルベタペンタンまたはデキサトラメトルファン（dextramethorphan））；利尿薬；および鎮静または非鎮静抗ヒスタミンと投与され得る。同様に、本発明の化合物は、本発明の化合物が有用である疾患または状態の処置 / 予防 / 抑制または寛解において使用される他の薬物と組み合わせて使用され得る。このような他の薬物は、本発明の化合物と同時にまたは続いて、そのために通常使用される経路により、そして通常使用される量で、投与され得る。本発明の化合物が1以上のほかの薬物と同時に使用される場合、本発明の化合物に加えてこのような他の薬物を含有する薬学的組成物が好ましい。従って、本発明の薬学的組成物はまた、本発明の化合物に加えて他の1以上の活性成分を含む。別々に投与されるかまたは同じ薬学的組成物中でのいずれかで投与される、本発明の化合物と組み合わせられ得る他の活性成分の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：

（a）VLA - 4 アンタゴニスト、（b）ベクロメタゾン、メチルプレニドゾロン、プレドニゾン、デキサメタゾンおよびヒドロコルチゾンのようなステロイド、（c）シクロスポリン、タクロリムス（tacrolimus）、ラパマイシン（rapamycin）および他のFK - 506 型免疫抑制薬のような免疫抑制薬；（d）プロモフェニルアミン、クロルフェニルアミン、d - クロルフェニラミン、トリプロリジン、クレマスチン、プロモジフェンヒドラミン、ジフェニルピラリン、トリペレナミン、ヒドロキシジン、メトジラジン、プロメタジン、トリメブラジン、アザタジン、シプロヘプタジン、アンタゾリン、フェニラミン、ピリラミン、アステミゾール、テルフェナジン、ロラダジン、セチリジン、フェクソフェンナジン（fexofenadine）、デスカルボエトキシロラタジン（descarboethoxyloratadine）などのような抗ヒスタミン（H₁ - ヒスタミンアンタゴニスト）；（e）2 - アゴニスト（テルブタリン、メタプロテレノール、フェノテロール、イソエタリン、アルブテロール、ビオルテロールおよびビルブテロール）、テオフィリン、クロモリンナトリウム、アトロピン、イプラトロピウムプロミド、ロイコトリエンアンタゴニスト（ザフィルカスト（zafirlukast）、モンテルカスト（montelukast）、プラナルカスト（pranlukast）、イラルカスト（iralukast）、ボビルカスト（pobilukast）、SKB - 106, 203）、ロイコトリエン生合成インヒビター（ジロイトン、BAY - 1005）、のような非ステロイド系抗ヒスタミン剤；（f）プロピオン酸誘導体（アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ブクロクス酸、カルプロフェン、フェンブフェン、フェノプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドプロフェン、ケトプロフェン、ミロプロフェン、ナプロキセン、オキサプロジン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、スプロフェン、チアプロフェン酸およびチオキサプロフェン）、酢酸誘導体（インドメタシン、アセメタシン、アルクロフェナック、クリダナク（c

10

20

30

40

50

lidanac)、ジクロフェナク、フェンクロフェナク、フェンクロジン酸、フェンチアザク、フロフェナク(frofenac)、イブフェナク(ibufenac)、イソキセパック、オキソピナク(oxpinac)、スリンダク、チオピナク(tiopinac)、トルメチン、ジドメタシン(zidometacin)およびゾメピラック)、フェナム酸誘導体(フルフェナム酸、メクロフェナム酸、メフェナム酸、ニフルム酸およびトルフェナム酸)、ピフェニルカルボン酸誘導体(ジフルニサルおよびフルフェニサル)、オキシカム(イソキシカム、ピロキシカム、スドキシカムおよびテノキシカム)、サリチレート(アセチルサリチル酸、スルファサラジン)およびピラゾロン(アパゾン、ベズピペリロン(bezpiperylon)、フェプラゾン、モフェブタゾン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン)のような非ステロイド系抗炎症剤(NSAID); (g)シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)インヒビター; (h)ホスホジエステリV型(PDE-IV)のインヒビター; (i)ケモカインレセプター(特にCCR-1、CCR-2、CCR-3およびCCR-5)の他のアンタゴニスト; (j)HMG-CoAレダクターゼインヒビター(ロバスタチン、シンバスタチンおよびプラバスタチン、フルバスタチン(fluvastatin)、アトルバルタチン(atorvastatin)、ならびに他のスタチン)、金属イオン封鎖剤(sequesterant)(コレステラミンおよびコレステポール)、ニコチン酸、フェノフィブル酸誘導体(ゲムフィブロジル、クロフィブレート、フェノフィブラート、およびベンザフィブラート(benzafibrate))およびプロブコールのようなコレステロール低下剤; (k)インスリン、スルホニル尿素、ピグアミド(biguanides)(メトホルミン)、 - グルコシダーゼインヒビター(アカルボース)およびグリタゾン(トログリタゾン(trogliclitazone)およびピオグリタゾン(pioglitazone))のような抗糖尿病剤; (l)インターフェロン の調製物(インターフェロン - 1、インターフェロン - 1); (m)5 - アミノサリチル酸およびそれらのプロドラッグ、代謝拮抗物質(例えば、アザチオプリンおよび6 - メルカプトプリン)ならびに細胞障害性化学治療剤のような他の化合物。第2の活性成分に対する本発明の化合物の重量比は、変化し得、そして各成分の有効量に依存する。一般に、各々の有効量が使用される。従って、例えば、本発明の化合物がNSAIDと組み合わせられる場合、NSAIDに対する本発明の化合物の重量比は、概して、約1000:1~約1:1000、好ましくは、約200:1~約1:200の範囲である。本発明の化合物と他の活性成分との組み合わせも、概して、

【0154】

(IX. CCX CKRポリヌクレオチドおよびポリペプチドの検出および定量化)
本発明は、生物学的サンプル中のCCX CKRポリヌクレオチドおよびポリペプチドの検出および定量化のための多くの方法を提供する。1つの実施形態では、CCX CKR遺伝子産物(例えば、ポリペプチドまたはmRNA)の発現および過剰発現は、CCX CKRにより媒介されるか、またはCCX CKRと関連する疾患または状態に相関する。CCX CKR遺伝子産物の検出が、細胞状態を同定するため(例えば、非成熟(成熟と対照的に)樹状細胞ならびに活性化T細胞を同定するため)に特に有用であることは、CCX CKR mRNA(図2B)の発現パターンから評価される。

【0155】

生物学的サンプルとしては、血液サンプル、血清、細胞(全細胞、細胞画分、細胞抽出物および培養細胞または細胞株を含む)、組織(生検から得られる組織を含む)、体液(例えば、尿、痰、羊水、滑液)または媒体由来(培養細胞または細胞株由来)、などが挙げられるがこれらに限定されない。CCX CKRポリヌクレオチドを検出または定量化する方法としては、シグナル増幅を用いるかまたは用いない増幅ベースのアッセイ、ハイブリダイゼーションベースのアッセイ、および増幅 - ハイブリダイゼーションを組み合わせたアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。CCX CKRポリペプチドの検出および定量化について、例示的な方法は、CCX CKRポリペプチドに特異的に結合する抗体もしくは他の結合因子またはエピトープを使用するイムノアッセイである。

【0156】

(A.CCX CKRポリペプチドのついでのアッセイ)

(1.増幅ベースの方法)

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)またはそのバリエーションは、例示的な増幅ベースのアッセイである。当業者をインビトロ増幅法へ導くに十分な技術の例は、PCR TECHNOLOGY: PRINCIPLES AND APPLICATIONS FOR DNA AMPLIFICATION, H. Erlich編, Freeman Press, New York, NY (1992); PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Innis, Gelfand, SniskyおよびWhite編, Academic Press, San Diego, CA (1990)に見出される。他の適切な標的増幅法としては、リガーゼ連鎖反応(LCR;例えば、WuおよびWallace, 1989, Genomics 4:560); スtrandディスプレイメントアンプリフィケーション(strand displacement amplification)(SDA;例えば、Walkerら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:392-396); 核酸配列ベースの増幅(NASBA, Cengage, Mississauga, Ontario;例えば、Compton, 1991, Nature 350:91)などが挙げられる。

10

【0157】

PCRの1つの有用な改変は、PCR ELISA(例えば、Boehringer Mannheim カタログ番号1 636 111)であり、ここでは、ジゴキシゲニン-dUTPが、PCR産物へ導入される。PCR反応混合物は、変性され、そしてPCR産物の内部配列ヘアニーリングするように設計されたビオチン標識化オリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。このハイブリダイズ産物は、ストレプトアビジンコートされたプレート上に固定され、そして抗ジゴキシゲニン抗体を使用して検出される。

20

【0158】

(2.ハイブリダイゼーションベースの方法)

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション技術を用いる特定のDNAおよびRNAの測定に関する種々の方法は、当業者に公知である(例えば、Sambrook、前出)。ハイブリダイゼーションベースのアッセイは、ポリヌクレオチドプローブが標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズするアッセイをいう。通常、本発明のポリヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブは、CCX CKR核酸配列の連続配列に完全または実質的に同一である。好ましくは、ポリヌクレオチドプローブは、少なくとも約10塩基であり、しばしば、少なくとも約20塩基であり、そしてときどき、約少なくとも200塩基以上の長さである。ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションにおける使用のためのポリヌクレオチドプローブ配列を選択する方法は、Sambrook(前出)に議論される。

30

【0159】

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーション形式は、当業者に公知である。いくつかの形式において、少なくとも1つの標的およびプローブが固定される。固定されるポリヌクレオチドは、DNA、RNA、または別のオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドであり得、そして天然に存在するヌクレオチドもしくは天然に存在しないヌクレオチド、ヌクレオチドアナログ、またはヌクレオチド骨格を含み得る。このようなアッセイは、以下に挙げられるいくつかの形式のうちのいずれかであり得る: サザンブロット、ノーザンブロット、ドットブロットおよびスロットブロット、高密度ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドアレイ(例えば、GeneChipsTM Affymetrix)、ディップスティック、ピン、チップ、またはビーズ。これらの技術の全ては、当業者に周知でありそして多くの市販の診断キットの基礎である。ハイブリダイゼーション技術は、概してHamesら、編、NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH IRL Press (1985); GallおよびPardue Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 63:378-

40

50

383(1969);およびJohnら、Nature、223:582-587(1969)に記載される。

【0160】

1つの実施形態において、インサイチュハイブリダイゼーションが、サンプル中のCCX CKR配列を検出するために使用される。インサイチュハイブリダイゼーションアッセイは、周知であり、そして概して、Angererら、METHODS ENZYMOL.、152:649-660(1987)およびAusubel(前出)に記載される。

【0161】

(B.CCX CKRポリペプチドアッセイ)

1つの実施形態において、CCX CKRポリヌクレオチドは、本発明の抗CCX CKR抗体を用いてサンプル中で検出される。多数の十分に確立された免疫学的結合アッセイが、本発明のCCX CKRを検出および定量するのに適している。例えば、米国特許第4,366,241号;同第4,376,110号;同第4,517,288号;および同第4,837,168号、ならびにMETHODS IN CELL BIOLOGY VOLUME 37:ANTIBODIES IN CELL BIOLOGY、Asai、編、Academic Press, Inc. New York(1993);BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY、第7版、StitesおよびTerr、編(1991);Harlow、前出[例えば、第14章]、ならびにAusubel、前出[例えば、第11章](これらの各々は、その全体が参考として、そして全目的のために援用される)を参照のこと。

【0162】

CCX CKRを検出するための免疫アッセイは、競合的であっても、非競合的であってもよい。通常、アッセイされるCCX CKR遺伝子産物は直接または検出可能な標識を用いて間接的に検出される。このアッセイに使用される特定の標識または検出可能な基は、通常、これらがこのアッセイに使用される抗体の特定の結合を有意に妨害しない限り、本発明の重要な局面ではない。標識は、捕獲因子(例えば、抗CCX CKR抗体)に共有結合されても、捕獲因子によって認識されるよりもCCX CKRポリペプチドを異なるエピトープにおいて特異的に結合する第3の部分(例えば、別の抗体)に結合されてもよい。

【0163】

(非競合免疫アッセイ)

非競合免疫アッセイは、捕獲分析物(ここでは、CCX CKRポリペプチド)の量が直接測定されるアッセイである。1つのこのようなアッセイは、2部位の、モノクローナルベースの免疫アッセイであり、これは、捕獲分析物上の2つの干渉しないエピトープに反応性のモノクローナル抗体を使用する。例えば、背景情報に関しては、Maddoxら、1983、J. Exp. Med.、158:1211を参照のこと。このようなアッセイにおいて、サンプル中のCCX CKR量は、直接測定される。例えば、いわゆる「サンドイッチ」アッセイを用いて、捕獲因子(ここでは、抗CCX CKR抗体)は、捕獲因子が固定される固体基板に直接結合され得る。次いで、これらの固定された抗体は、試験サンプル中に存在するポリペプチドを捕獲する。このようにして固定されたCCX CKRは次いで、標識因子(例えば、標識を保有する第2のCCX CKR抗体)によって結合される。あるいは、第2のCCX CKR抗体は、標識を欠くが、これは次に、第2の抗体が誘導される種の抗体に特異的な、標識された第3の抗体によって結合され得る。この第2のものは、検出可能な部分(例えば、ビオチン)で修飾され得、ここに、第3の標識された分子が、特異的に結合し得る(例えば、酵素標識ストレプトアビジン)。

【0164】

(2.競合免疫アッセイ)

競合アッセイにおいて、サンプル中に存在するCCX CKRポリペプチドの量は、サンプル中に存在する分析物(例えば、CCX CKRポリペプチド)により捕獲因子(例えば、抗CCX CKR抗体)から置換された(または競合して放された)、添加された(

10

20

30

40

50

外因性) C C X C K Rの量を測定することによって、間接的に測定される。1つの競合アッセイにおいて、既知量のC C X C K Rが、サンプルに添加され、次いでこのサンプルは、C C X C K Rを特異的に結合する捕獲因子(例えば、抗C C X C K R抗体)と接触される。この抗体に結合したC C X C K Rの量は、サンプル中に存在するC C X C K Rの濃度と逆比例する。

【0165】

好ましくは、この抗体は、固体基板上に固定される。この抗体に結合したC C X C K Rの量は、C C X C K R / 抗体複合体に存在するC C X C K Rの量を測定することによってか、あるいは複合体化されていないままのC C X C K Rの量を測定することのいずれかによって決定され得る。C C X C K Rの量は、標識されたC C X C K R分子を提供することによって検出され得る。

10

【0166】

例えば、ハプテン阻害アッセイを用いて、分析物(この場合、C C X C K R)は、固体基板上に固定される。既知量の抗C C X C K R抗体が、サンプルに添加され、次いで、このサンプルは、固定化C C X C K Rと接触される。この場合、固定化C C X C K Rに結合した抗C C X C K R抗体の量は、サンプル中に存在するC C X C K Rの量と逆比例する。さらに、固定された抗体の量は、抗体の固定された分画または溶液中に残ったままである抗体の分画のいずれかを検出することによって、検出され得る。検出は、直接(抗体が標識される場合)であっても、間接的(上記のように抗体へ特異的に結合する標識部分の引き続き添加による)であってもよい。

20

【0167】

(3. 他のアッセイ)

競合的および非競合的のC C X C K Rポリペプチド免疫アッセイに加えて、本発明はまた、C C X C K Rポリペプチドの検出および定量的ための他のアッセイを提供する。例えば、ウエスタンブロット(免疫ブロット)分析が使用されて、サンプル中のC C X C K Rの存在を検出および定量し得る。この技術は、一般的に、サンプルポリペプチドを分子量に基づいてゲル電気泳動によって分離する工程、この分離されたポリペプチドを適切な固体支持体(例えば、ニトロセルロースフィルター、ナイロンフィルター、またはナイロンフィルターの誘導物)へトランスファーする工程、およびこのサンプルをC C X C K Rに特異的に結合する抗体とインキュベートする工程を包含する。この抗C C X C K R抗体は、固体支持体上のC C X C K Rに特異的に結合する。これらの抗体は、直接標識されるか、あるいは、抗C C X C K Rに特異的に結合する標識抗体(例えば、標識ヒツジ抗マウス抗体)を用いて引き続き検出され得る。

30

【0168】

さらに、リボソーム免疫アッセイ(L I A)のようなアッセイがまた、本発明によって含まれる。L I Aは、特定の分子(例えば、抗体)を結合し、カプセル化された試薬もしくはマーカーを放出するために設計されたリボソームを使用する。次いで、この放出された化学物質は、標準的な技術に従って検出される(Monroeら、1986、Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34 - 41を参照のこと)。

【0169】

異なる実施形態において、このC C X C K Rタンパク質は、レセプターに結合する検出可能に標識されたケモカインリガンド(例えば、標識されたE L C、S L C、T E C K、B L C、m C T A C K、m M I P - 1 およびv M I P I I)を用いて検出され得る。

40

【0170】

(X. キット)

本発明の治療方法および診断(検出)方法に有用な試薬は、キット形態で好都合に提供される。従って、本発明は、本発明のポリペプチド、抗体、およびポリヌクレオチドを含むキットを含む。

【0171】

1つの実施形態において、このキットは、容器の中に1つ以上の以下を含む: (1) C C

50

X C K R ポリヌクレオチド（例えば、C C X C K R c D N A 配列に対応し、標的ポリヌクレオチドを増幅し得るオリゴヌクレオチドプライマーもしくはプローブ）；（２）抗 C C X C K R 抗体；（３）必要に応じて固体表面（例えば、スライドガラス、マルチウェルプレート、または試験管）上にコートされる、C C X C K R ポリペプチドまたはフラグメント、（４）C C X C K R ポリヌクレオチド（例えば、アッセイにおいてポジティブコントロールとして使用するため）、および（５）チューブ。本発明の検出方法を実施するための指示書、および校正曲線がまた、含まれ得る。

【 0 1 7 2 】

（ X I . ケモカインの参考文献）

ケモカインは、当該分野で周知である。例示的なケモカインとしては、図 4（ a ）に列挙されるものおよび他の種（例えば、哺乳動物、マウス、ラットウサギ、ヒト、非ヒト霊長類など）におけるホモログが挙げられる。以下の参考文献は、特定のサイトカインを記載する。これらおよび当該分野で公知の他のケモカインを記載するさらなる参考文献は、R & D Systems カタログ（ 1 9 9 9 ）および（ 2 0 0 0 ）（ R & D Systems Inc . , 6 1 4 M c K i n l e y P l a c e N . E . M N 5 5 4 1 3 ）、R & D オンラインカタログ（ www.rndsystems.com（例えば、1999 年 1 0 月 1 0 日））（これらの両方は、全ての目的のために参考として援用される）、C F B（C y t o k i n e F a c t s B o o k、1 9 9 4、A c a d e m i c P r e s s L t d .）（C h e m o k i n e F a c t s B o o k、1 9 9 7、A c a d e m i c P r e s s L t d .）（これは、全ての目的のために参考として援用される）、および G e n B a n k タンパク質配列データベース（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>）に提供される。

【 0 1 7 3 】

【 化 1 】

10

20

A. SLC/6-Ckine

- Campbell, J.J. et al., (1998) *J. Cell Biol.* 141(4):1053.
 Hedrick, J.A. and A. Zlotnik. (1997) *J. Immunol.* 159:1589.
 Hromas, R. et al., (1997) *J. Immunol.* 159:2554.
 Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer. (1999) *J. Leuk. Biol.* 65:6.
 Nagira, M. et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:19518.
 Yoshida, R. et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273(12):7118.
 Zlotnik, A. et al., (1999) *Crit. Rev. Immunol.* 19:1.

10

B. ELC/MIP-3 β

- Rossi, D.L. et al., (1997) *J. Immunol.* 158:1033.
 Rollins, B.J. (1997) *Blood* 90(3):909.
 Yoshida, R. et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:13803.

20

C. TECK

- Nomiyama, H. et al., (1998) *Genomics* 51(2):311.
 Vicari, A.P. et al., (1997) *Immunity* 7:291.
 Zaballo, A. et al., (1999) *J. Immunol.* 162(10):5671.
 Zlotnik, A. et al., (1999) *Crit. Rev. Immunol.* 19:1.

D. CTACK/ CCL27/ ALP/ ILC/ ESkin

- Morales et al., 1999, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14470-5
 Jarmin et al., 2000, *J Immunol.* 164:3460-4
 Baird et al., 1999, *J Biol Chem.* 274:33496-503
 Ishikawa-Mochizuki et al., 1999, *FEBS Lett.* 460:544-8
 Hromas et al., 1999, *Biochem Biophys Res Commun.* 258:737-40
 Pan et al., 2000, *J Immunol.* 165:2943-49
 Homey et al., *J Immunol.* 164:3465-70).

30

（XII）

E. BLC-1/BCA-1

- Forster, R. et al. (1996) *Cell* 87:1037.
 Gunn, M.D. et al., (1998) *Nature* 391:799.
 Legler, D.F. et al., (1998) *J. Exp. Med.* 187:655.

F. vMIPII

- Boshoff et al., (1997) *Science* 278:290-4
 Kledal et al., (1997) *Science* 277:1656-9
 Sozzani et al., (1998) *Blood* 92:4036-9
 Geras-Raaka et al., (1999), *Biochem Biophys Res Commun.* 253:725-7

G. MCP-4

- Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer. (1999) *J. Leuk. Biol.* 65:6.
 Ruffing, N. et al., (1998) *Cell Immunol.* 189(2):160.
 Uguccioni, M. et al., (1996) *J. Exp. Med.* 183:2379.
 Zlotnik, A. et al., (1999) *Crit. Rev. Immunol.* 19:1.

H. mMIP-1 γ (CCF18)

- Wang et al., *J Clin Immunol* (1998) 18:214-22
 Hara et al., *J Immunol.* (1995) 155:5352-8.

(XII. 実施例)

以下の実施例は、本願発明を制限するためではなく、例示のために提供される。いくつかの実験は、Goslingら、2000、*J. Imm.* 164:2851-56（これは、その全体が本明細書中に全ての目的に対して援用される）に記載される。

【0174】

(A. 略語)

EST、発現された配列のタグ；ORF、オープンリーディングフレーム；DC、樹状細胞；ELC、EBI1リガンドケモカイン；SLC、二次的リンパ組織ケモカイン；TECK、胸腺発現ケモカイン；HEK293、ヒト胚腎臓293細胞；PEI、ポリエチレネミン（polyethylenimine）；CCR、CCケモカインレセプター。

【0175】

(B. 材料および方法)

ヒト、ウイルス、およびマウスの組換えケモカインは、R & D Systems (Minneapolis, MN; http://cytokine.rndsystems.com/cyt_cat/cyt_cat.html) から得た。¹²⁵I 標識のELCおよびTECKは、Amershamから得た。全長CCX CKR発現構築物は、FLAGエピトープタグおよびプロラクチンシグナル配列を用いてpIRESpuro発現ベクター(Clontech, Palo Alto, CA)中に作製し、そしてHEK293細胞中に安定な形質転換体を作製するために使用した。CCX CKRおよびストークカイン(stalkokine)に関して一過性のトランスフェクトおよび安定なトランスフェクトは、Superfect試薬(Qiagen, Valencia, CA)を製

10

20

30

40

50

造者らのプロトコールに従って使用して行った。安定な方は、7日間、2 μ g/mL プロマイシン中で選択することによって作製し、発現は、抗FLAG M1 (Sigma, St. Louis, MO) および2'抗マウスPE結合体 (Coulter Immunotech, Miami, FL) を用いたFLAGエピトープのFACS分析によって確認した。

【0176】

(実施例1)

(CCX CKRの同定およびクローニング)

公知のケモカインレセプターのBLAST分析によって、ウシレセプターPPR1 (味覚レセプターとして表される (Matsuokaら、1993、Biochem Biophys Res Comm 194:540-11)) を同定した。PPR1配列を用いたヒトESTデータベースの検索によって、2つの非連続EST: H67224およびAI131555を同定した。プライマーを、H67224の5'末端に対して設計し(5' AAT TTG GCT GTA GCA GAT TTA CTC C 3' [配列番号4])、そしてAI131555の3'末端に対して逆方向で設計し(5' GCT AAA AGT ACT GGT TGG C 3' [配列番号5])、そしてヒト軟膜から単離されたゲノムDNAのPCR(5% DMSO、アニーリング58)に使用した。この反応は、ESTおよび連続する配列を含む855bpの産物を生じた。この855bpフラグメントの産物を、Rapid ScreenTMアレイされた脾臓cDNAライブラリー (Origene, Rockville, MD) のアンカーPCRスクリーンにおける使用のためのさらなるプライマーを設計するために使用し、5'伸長されたクローンを生じた; このクローンを、最終的にフィルターハイブリダイゼーションによってヒトゲノムライブラリーをスクリーニングするために使用した。全長コード配列を、校正Pfu (Stratagene) 酵素と共にOrigeneクローンPCRの5'配列からの逆プライマーを用いたゲノムクローンの配列分析によって推定した。この再び見いだされた配列を、いくつかのクローンに対して確認し、そして図1に示す。[予備的な配列決定は、以下の位置において図1と異なった: 47、64、78、120、131、545、571、574 (図1の番号付けを用いて)、これらは、それぞれ、G、G、G、C、C、T、A、およびTであり (配列番号3)、この改変体がまた、本発明によって意図される]。このコード配列を、FLAGエピトープタグおよびプロラクチンシグナル配列とともにpIRES puro発現ベクター (Clontech, Palo Alto, CA) にクローン化した。

【0177】

CCX CKR cDNAによってコードされる推定アミノ酸配列を、配列整列プログラムCLUSTAL (GeneWorks) を用いて他のヒトケモカインレセプターに対して比較した。ヒトCCR6、7、9およびオーファンSTRL33/Bonzoと整列されたCCX CKRアミノ酸配列が示される (図2A)。領域TM1~TM7に広がる疎水性膜の位置を、配列の上の傍線によって示す。CCX CKRと他のケモカインレセプターとの間で同一のアミノ酸を、四角で囲む。これらおよび他のヒトケモカインレセプター配列とのCCX CKRによってコードされるタンパク質の複数配列整列は、29~35%の範囲のアミノ酸同一性を示した。

【0178】

(実施例2)

(白血球および種々の組織におけるCCX CKR発現)

CCX CKR mRNAの発現を、ヒトcDNAのPCR分析ならびに種々の組織から単離されたRNAのRT-PCRによって決定した。第1に、造血細胞および造血組織におけるCCX CKR発現を、調べた。レセプター発現は、未成熟樹状細胞(DC) (GM-CSFおよびIL-4を用いて処置後、単球から誘導された)、3人のドナー中2人からの初代T細胞、ならびに脾臓組織およびリンパ節組織において明らかであった (図2B)。さらに、発現を、非リンパ組織 (例えば、心臓、腎臓、胎盤、気管、および脳) で

検出した；同じパネル上の分画されていない白血球がまた、ポジティブであった（図2B）。GAPDHに関するコントロールPCR産物によって、全ての出発RNAの完全性を確認した。

【0179】

観察されたCCX CKRパターンは、NCBIデータベースで見出されたヒトの発現された配列タグに関して報告された分布と重複し、そしてこれを拡張した。これらのESTは、腎臓、胎児心臓、嗅上皮、および扁桃B細胞から単離されている。従って、CCX CKRは、末梢の運動性細胞、ならびにリンパ組織および非リンパ組織において発現されるようである。

【0180】

（実施例3）

（CCX CKRタンパク質の安定発現）

CCX CKR cDNAによってコードされるタンパク質の機能特性（その潜在的なケモカイン結合プロフィールを含む）を評価するために、本発明者らは、付加されるN末端FLAGエピトープを用いてCCX CKRをコードする発現プラスミドを構築した。これは、抗FLAG mAbを用いて、最も高度に発現される安定形質転換体の検出および選択を可能にする。M1フラッグエピトープタグ化されたCCX CKRを安定に発現するヒト胚腎臓293（HEK293）細胞を、FACSによって確認し（図2C）、そしてさらなる分析のために選択した。FLAG-CCX CKR融合プラスミドでトランスフェクトされた細胞株を、「F-CCR10細胞」（例えば、F-CCR10 293細胞）という。

【0181】

（実施例4）

（CCX CKRトランスフェクト体のELC-ストークカインへの接着）

（A. ストークカインに対する接着によるレセプターインターロゲーション（interrogation））

「ストークカイン」技術を使用して、CCX CKRによって結合されるケモカインを同定した。簡単にいうと、固定化されたネイティブなケモカイン単独は、同族のレセプターを保有する細胞を捕獲し得ない（Imaiら、1997、Cell 91：521）。本発明者らは、非ネイティブなケモカイン構造のストークカインを開発し、これは、伸長された修飾ムチンに対するN末端接着に関して操作されたケモカイン部分を含む（Bazanら、1997、Nature 385：640）。1つの実施形態において、一過性トランスフェクト後にHEK293細胞の上清中で収集されたストークカインを、カルボキシル末端に対して操作されたキャリアドメイン（例えば、ポリHisエピトープ）に対する抗体を介して固体基板に固着させ、候補オーファンレセプターと相互作用するためにケモカインドメインを遊離にした。

【0182】

CCX CKRによって結合されるリガンドの同定に加えて、ストークカイン技術を使用して、接着を介して他のレセプター（例えば、オーファンケモカインレセプター）に対するリガンドを同定し得ることが理解される。

【0183】

CCX CKRに対するリガンド結合を決定するために、HEK293-CCX CKR細胞を使用して、ケモカイン「ストークカイン」（SK）（すなわち、個々のケモカインドメインが伸長された柄（stalk）構造の末端につなぎとめるように操作された分子）を呼びかけ（interrogate）た。ストークカインは、最初に抗His固定抗体（PBS中10ug/ml、一晚、室温）を用いてコートされた8ウェルのチャンバスライドガラスを用いて呼びかけ、洗浄し、そして「ブロック」（PBS中2% FBS/0.5% BSA）し；250ulのHEK293細胞ストークカイン上清を用いて処理し（1時間、37℃で）、そして500,000のHEK293-CCX CKRトランスフェクト体を用いてインキュベートした（1.5時間、室温）。可溶性サイトカインを

10

20

30

40

50

用いた競合による接着の阻害を、細胞を、 $5 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の組換えケモカインを用いてインキュベートすることによって実行した。全ての場合において、非接着細胞を、PBS中で洗浄することによって除去し；残存する接着細胞を、1%のグルタルアルデヒドを用いて固定し、写真画像化し、そして計数した。一次スクリーンの場合、この接着は、推定レセプター-リガンド相互作用を明らかにする。

【0184】

CCXCCR細胞は、ELCストックカインへ十分に接着した(ELC-SK；図3A)。さらに、ELC-SK媒介接着を、コンペティターとして可溶性ネイティブELCの存在下で消滅させた(図3A、上の列)。本発明者らはまた、可溶性SLCならびに可溶性TECKの存在下でのHEK293-CCXCKR細胞のELC-SK媒介接着における有意な減少を観察したが、可溶性MCP-3では観察されなかった(図3A、下の列)。これらの実験は、数回の独立した試行に対して実行し、そして定量し、この例は、図3Bに提供され、そして非常に再現可能であることが見出された。さらに、放射性標識されたELCを漸増する濃度の未標識ELCの存在下で従来の相同な競合アッセイに使用した。この結果により、HEK293-CCXCKR細胞に対するELCの有意な結合、しかし野生型(wt)HEK293細胞に対して有意でない結合が明らかになった(図3C)。ほとんど同一な結果を、コールドのTECKを用いた放射性標識TECKの相同な競合において得た(示さず)。これらを考慮すると、ストックカインベースの接着および放射性標識リガンド結合/相同な競合アッセイは、CCXCKRがケモカインの新規補体に結合する新規ケモカインレセプターであることを示す。

【0185】

(実施例5)

(CCXCKRの完全なリガンド結合「フィンガープリント」)

迅速かつ完全に所定のケモカインレセプターのリガンド結合フィンガープリントを規定するために、本発明者らは、精製されたケモカインおよびケモカイン改変体の大きなアレイを用いてケモカインレセプターを包括的にプロファイルするためのアプローチを確立した。本発明者らは、ELCおよび他のケモカインとCCXCKRとの相互作用を個々に確認するためにこのアプローチを使用した。CCXCKRの安定なトランスフェクト体に対する ^{125}I -標識-ELCまたは ^{125}I -TECKの放射性リガンド結合を使用して、新規レセプターに対するケモカイン特異性を決定した。約80個の異なる精製されたケモカインおよびケモカイン改変体を、結合実験において ^{125}I 標識ELC(図4A)または ^{125}I -TECK(示さず)に対するコールドのコンペティターとして使用した(最初は、200nMの飽和終濃度で)；結果は各々に関して比較可能であった。放射性標識されたりガンド結合の置換データによって、CCXCKRがヒトおよびマウスのELC、SLC、TECKに十分に結合し、そしてmMIP-1(しかし、そのヒトホモログは、結合しなかった)に温和に結合したことを確認した。さらに、CXCKケモカインBLC、およびヒトカボージ肉腫ヘルペスウイルスHHV8由来のウイルス性のコードされたvMIP-IIを含む、能力がより低い親和性の他のケモカインリガンドを、明らかにした(図4A)。試験された全ての他のケモカインは、放射性標識されたELCと一貫して競合しなかった。

【0186】

(実施例6)

(結合定数の決定)

結合分析を、「Displace Max」で示される濾過プロトコールを使用する効果的に最大化された放射性リガンド結合を用いて実行した(Dairaghiら、1999、J. Biol. Chem. 274:21569)。これらのアッセイにおいて、Displace Maxは、記載されるプロトコール(Dairaghiら、1999、J. Biol. Chem. 274:21569)を用いて、放射性標識されたELCまたはTECKを置換する能力における80より多くの異なる精製されたケモカインによるCCXCKRトランスフェクト体の同時インテロゲーションを使用した。

【0187】

一次スクリーンにおいて同定される結合相互作用を、CCX C K R安定トランスフェクト体に対する広範囲な放射性リガンド結合競合および置換データのスキッチャード変換によって定量的に試験した(図4B)。この結果により、 K_d 約5~15 nMの間の親和性を有するヒトELC、SLC、およびTECKの高い親和性結合を確認した。各場合において、マウスバージョンのこれらのケモカインはまた、さらにより大きな親和性で結合し; 明白な K_d 'は、図4Bに列挙される。興味深いことに、CCケモカインBLCがまた(より小さい親和性であるが)十分に結合し、急勾配に変曲された競合曲線を示す。ウイルスケモカインvMIP - IIは、温和から小さい親和性を示し、そしてCCX C K Rとの任意の相互作用を示す唯一のウイルスケモカインであった。同様の実験において、マウスCTACKは、約9 nMの K_d でレセプターに結合した(示さず)。CTACKはまた、CCL27、ALP、ILC、およびESkineといわれる。

10

【0188】

HEK293 - CCX C K R細胞は、いくつかの試験において強い細胞質カルシウムシグナルを示さなかったが、これは、Gタンパク質の希釈に起因し得る。なぜなら、このトランスフェクト体は、1細胞あたり250,000より多くの部位でCCX C K Rタンパク質を安定に発現するからである(示さず)。さらに、予備的なケモカイン分析において、CCX C K Rトランスフェクト体は、ELCおよびSLCに応じて温和な移動を示したが、結合活性を有さないケモカインに対しては示さなかった(示さず)。これらを考慮すると、これらのデータは、生理学的に相関する範囲のCCX C K Rに対するリガンドとして、ELC、SLCおよびTECK、可能性のあるより低い親和性相互作用でCX CケモカインBLCとウイルスケモカインvMIP - IIが挙げられることが、示される。

20

【0189】

(実施例7)

(CCX C K Rの小分子モジュレーターの同定)

本実験は、このレセプターのアゴニストおよびアンタゴニストを同定する際に使用されるスクリーニング手順を示す。化学ライブラリーの供給源のプレートは、市販の供給元から得、そしてDMSO中5 mg/mLで保存する。これらから、各ウェルに10個の化合物を含む複数化合物プレートを作製し、そしてこれらを20% DMSO中50 μ g/mLの濃度に希釈する。各混合物の20 μ Lのアリコートをし、試験プレートに入れ、これらを使用するまで凍結保存する。

30

【0190】

M1フラッグエピトープタグ化されたCCX C K Rを安定に発現するHEK293細胞(実施例3に記載される、前出)を、DMEM - 10% FBS中で培養し、そして、濃度が $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞/mLの間のときに収集する。これらの細胞を、遠心分離し、そして 5.6×10^6 細胞/mLの濃度までアッセイ緩衝液(20 mM HEPES、80 mM NaCl、1 mM $CaCl_2$ 、5 mM $MgCl_2$ 、および0.2%ウシ血清アルブミン、pH 7.4)中で再懸濁する。

【0191】

マルチプローブ自動化システムを用いて、0.09 mLの細胞を、化合物を含むアッセイ試験プレートの各ウェルに添加し、続いて、アッセイ緩衝液中で希釈された0.09 mLの ^{125}I - MIP 3/ELC (Amersham Pharmacia Biotechより)(最終濃度は約25~100 pM、各ウェルあたり約50,000 cpmを有する)を添加する。この化合物の最終濃度は、各々1~5 μ g/mLである。このプレートを、密封し、そして振盪台上で約3時間4でインキュベートする。このアッセイプレートを、真空収集装置上でPackard GP/Bフィルタープレートを用いて収集し、PEI溶液中で予備浸漬する。シンチレーション液(50 μ L)を各ウェルに添加し、このプレートを密封し、そしてTop Countシンチレーションカウンター中で計数する。コントロールウェルは、希釈物のみ(総カウントに対して)または過剰のELC(1

40

50

μg/mL、非特異的結合に対して)のいずれかを含み、そして各セットの化合物に対するELC結合の全阻害のパーセントを算出するために使用する。ELCとCCX CKRとの間の結合を阻害または増強することが見出される化合物が、同定される。

【0192】

(実施例8)

(CCX CKRのリガンド誘導インターナリゼーション)

Flag-CCX CKR融合プラスミドでトランスフェクトされた293細胞(すなわち、「293F-CCR10細胞」実施例3を参照のこと)を、37℃で変動する濃度のケモカイン(ELC、SLC、TECK、マウスCTACKおよびMCP-4)を用いて15分間または45分間インキュベートした。インキュベーション後、この細胞を、洗浄し、そして3%のparaホルムアルデヒドを用いて15分間氷上で固定した。この細胞を、抗Flag M1抗体を用いて染色し、続いて、PE-結合体抗マウス二次抗体を用いて染色した。次いで、FACS分析を実行して、レセプターの表面発現を決定した。

10

【0193】

結果:リガンドの存在下における抗体結合の減少は、レセプターのリガンド誘導インターナリゼーションの指標である。氷上でリガンドとインキュベートされ、次いで洗浄された細胞、またはリガンドの非存在下次抗体とインキュベートされた細胞は、細胞表面上のレセプターに対する抗体結合の阻害を示さなかった(すなわち、レセプターのインターナリゼーションがない;データは示さず)。レセプターのインターナリゼーションは、100nMのELC、SLC、TECK、およびマウスCTACKの存在下で観察された(図6を参照のこと)。MCP-4は、インターナリゼーションを引き起こさなかった。レセプターのインターナリゼーションは、用量および時間依存性で見出された。

20

【0194】

本明細書中に引用される全ての参考文献は、各個々の刊行物または特許出願が詳細かつ個々に全ての目的に対してその全体が参考として援用されることが示されるたのと同じ程度で、その全体が本明細書中に参考として、そして全ての目的のために援用される。

【0195】

本発明の多くの改変およびバリエーションが、本発明の精神および範囲から逸脱することなくなされ得、同様に、当業者に明らかである。本明細書中に記載される特定の実施形態は、例としてのみ提供され、そして本発明は、添付の特許請求の範囲が与えられるものと等価な全範囲と共に、この添付の特許請求の範囲によってのみ限定される。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、ヒトCCX CKR(配列番号1)についてのヌクレオチド配列、およびヒトCCX CKRポリペプチド(配列番号2)についての推定されるアミノ酸配列を示す。

【図2A】 図2Aは、他のケモカインレセプターの配列に整列させたCCX CKR配列を示す。図2Aは、他のケモカインレセプターのCCX CKRコード領域との配列相同性を示す。

【図2B】 図2Bは、CCX CKR RNAの発現パターンを示す。図2Bは、示される種々の器官由来の培養した初代細胞および組織全体由来の細胞質RNAのRT-PCRにより分析した、CCX CKR RNAを発現する細胞および組織を示す。

40

【図2C】 図2Cは、CCX CKRを発現する安定な細胞株の生成を示す。図2Cは、野生型HEK293細胞に対して、抗FLAG mAb染色の強度を比較した、N末端FLAGエピトープを含むCCX CKRタンパク質を安定に発現するトランスフェクトしたHEK293細胞の集団を示す。

【図3A】 図3は、ストークカイン(stalkokine)に対する接着によるCCX CKRリガンドの同定を示す。図3Aは、HEK293-CCX CKR細胞による、固定されたストークカイン(SK)の応答信号(interrogation)を示す。「コントロール」=ストークカインを含まないウェル(固着した抗体および培地は存在

50

する)に対するHEK293-CCX CKR細胞のバックグラウンドの接着; ELC-ストークカイン(SK)=固着した抗体を介して固定されたELC-ストークカインを含む位置へのHEK293-CCX CKR細胞の強い接着; ELC-SK+可溶性ELC、可溶性TECKまたは可溶性SLC=示されるような過剰濃度の可溶性組換え「ネイティブ形態」ケモカインの存在下での接着の解離; ELC-SK+可溶性MCP-3=多くの非競合ケモカインの代表としてのMCP-3の存在下での接着の非減少。野生型HEK293細胞はこのいずれの場所にも接着しないことが示された(データは示していない)。

【図3B】 図3は、ストークカインに対する付着によるCCX CKRリガンドの同定を示す。図3Bは、表示の実験からの可溶性ケモカインの存在下および非存在下でのELC-ストークカインに対するHEK293-CCX CKR細胞の接着量を示す。

10

【図3C】 図3は、ストークカインに対する付着によるCCX CKRリガンドの同定を示す。図3Cは、HEK293-CCX CKR細胞(黒四角)または野生型HEK293細胞(白四角)のいずれかに対する、漸増濃度のコールドELCの存在下で放射性標識ELCを用いた、相同的競合結合アッセイの結果を示す。

【図4A】 図4は、CCX CKRのリガンド結合フィンガープリントを示す。図4Aは、結合競合にあるウイルス、ヒトおよびマウスのケモカインの広範なアレイに対して¹²⁵I-ELCを用いることにより示される、CCX CKRタンパク質の結合活性の定義である。特異的結合のパーセント阻害を棒グラフで示し、ケモカインが、潜在的な「高い」親和性(黒棒)、潜在的な「中程度~低い」親和性(斜線棒)、または「非」親和性(白棒)のカテゴリに分類され得ることを強調する。結果は3回の測定の平均であり、全ての場合においてSEM 20%である; 誤差棒は、明確化のために省略されている。アッセイ間の実験上の誤差は±約20%であるので、0%の経線から左右にこの範囲内にある測定値は統計的に重要ではないと思われる。

20

【図4B】 図4は、CCX CKRのリガンド結合フィンガープリントを示す。図4Bは、高い親和性のCCX CKRリガンド結合についての順列である。CCX CKRへの¹²⁵I-ELCの結合に対する非標識ケモカインの競合を反映する多点測定。コールド(非標識)ELC、SLC、TECK、BLC、およびvMIP-IIを用いた平衡結合の代表的な結果および、下の表における計算されたIC50の比較。

【図5】 図5は、ゲノムクローンから決定された、CCX CKR遺伝子の5'から翻訳開始部位までのDNA配列を示す。

30

【図6A】 図6Aは、レセプター-FLAGエピトープ融合プラスミドでトランスフェクトした293細胞における、CCX CKRのリガンド誘導性のインターナリゼーションを示す。図6Aは、ケモカイン(1nM、10nMまたは100nMのELC、SLC、TECK、CTACKまたはMCP4)またはアイソタイプ抗体コントロールの存在下または非存在下で45分間インキュベートした細胞のFACSスキャンを示す。

【図6B】 図6Bは、レセプター-FLAGエピトープ融合プラスミドでトランスフェクトした293細胞における、リガンド誘導性のCCX CKRの取り込みを示す。図6Bは、15分間のインキュベーションの同じ実験を示す。

【图 1】

ATGCTTTTGG	ACAGACAG	GTCAACAG	TATTATTATG	AGGAARAAGA	50
MALE	QNNQ	STED		EENNE	
ATGAATAGCC	ACTGTATAGC	ACAGTCAG	TSAGCTGATC	TGTATGATG	100
MNG	TYDYD	SCQY		CLIKE	
AGAGTGTGAG	AGAATTGCA	AAAGTTTCT	TCCCTGTATT	CCTCAGCAAT	150
DVR	EFA	KVFL		T	
GTTTTCGTCA	TGGCATGTGC	AGGCATCAT	ATGVTATGAG	CAATTATTGC	200
VFVI	GLA	GNS		AT	
CTATTACAG	AAACAGAGAA	CCAAAGACAT	TGTGTACAT	CTGATAGATG	250
YYK	KQRT	KTD	VYI		
CTGTAGAGA	TTTACTCCTT	CTATTCTAG	TGCTCTTGT	GGCTGTAT	300
VAD	LLL	LFTL	PFWW	AVAT	
GCAGTGTGAG	GGTGGTTTT	AGGGAANAAT	ATGTCACAA	TACTCTCAG	350
AVHG	WVL	GXI	MCKI	TS	
CTTGTCAGCA	CTAACTTTG	TCCTCGGAT	MGATGTTG	ACTGTATCA	400
LYT	LNFFV	SGMT	QFL	CCTIS	
GCATGACAG	ATATGTGGCA	GTATCTAAG	TCCCAGGCA	GCAGAGAGT	450
IDR	YVA	V	PSQ	SCG	
GGAAAGACAT	GCAGTGATC	CTTCTTCGT	GTCTCGATGG	CTGCATCAT	500
GKFC	WII	CF	WMA	AIL	
GCTGACAGT	PQLV	FTTATAT	AGTAATAG	AATGTAGCT	550
ISI			VND	NARC	
CAATTCCTAT	TTTCCGCCG	TACCTAGGA	CATCATAG	ACCATTGAT	600
	F	LAG	SMK	AL	
GCAGTGTGAG	AGACTTCAT	TGGATTGTA	GTACCTTCT	TATTATAGG	650
QML	F			IMG	
GGTGTGTAC	VTATACAG	CAAGGACAT	CATGAGAGT	CCACATCTA	700
VCY	FITA		FKN	FKI	
AAATATTCTG	ACCCCTAATA	TTCTCTG	CAGTCTGTTAT	AGTTTCTAT	750
ISR	PLK	CVLTT		FI	
GTCACTCAAC	TGCTTTATAT	CAPTTCAAG	TGTCGCCAG	CCAGACATC	800
V	TQCL	IVK	FCRA	I	
CACTCATCC	CTGCACACCA	GTGCAACAT	GAGCAACAC	ATGACATCC	850
IYTS	LITS	CN	SKR	MDIA	
CTCTCAAGT	QACAGAAGC	ATGCACTCT	CTKCAAGCT	CCTCAACCA	900
IQV	TES	IALF	HSC	LNAP	
ATCTTTTATG	TTTTTARGG	AGACATCTT	AAAATCATG	TATGATGA	950
LXV	FMG	ASF	KNYV	MKV	
GGCCAAAGA	TATGGGTGT	GAGAGACAC	GAGACAACT	GTGAGAGAT	1000
AKK	TGSGWG	RRRQ	RQS	VEEF	
TTCTTTTGTG	STSGGGT	CCTACAGAC	CAACCATGCT	TTTTAGCAT	1050
	SE		TST	FSI	
TAAAGFTAA	ACGTGCTGC	FTTCTGCT	GATACATAT	ATGATGCTT	1100
	SSA		DDTAAE	-CFC	
TCCTCTCAAA	TAAACATCT	GCTCTTCT	GAAAGAAA	AAAAAN	1140

图 1

【 図 2 A 】

[illegible]

图 2A

【 ㄨ 2 B 】

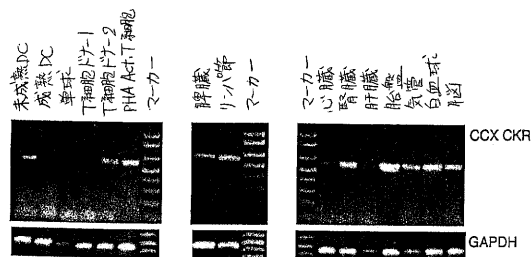
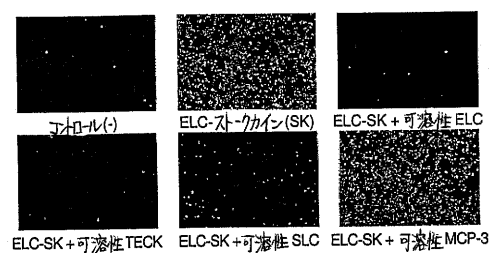


圖 2B

【 図 3 A 】



3A

【 ㄨ 2 C 】

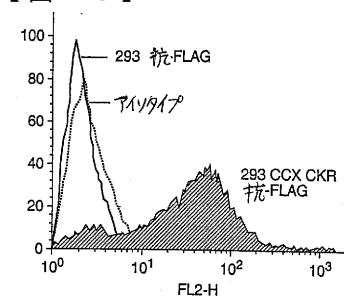
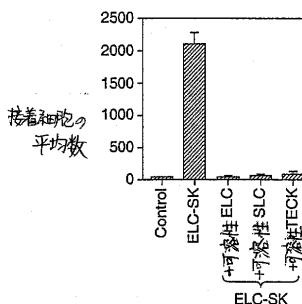


图 2C

【 ㄨ 3 B 】



3B

【図 3 C】

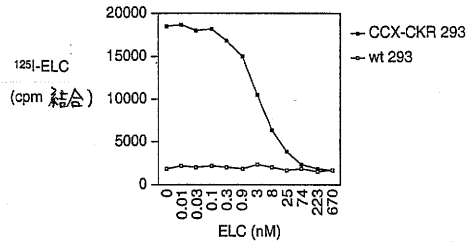


図 3C

【図 4 A】

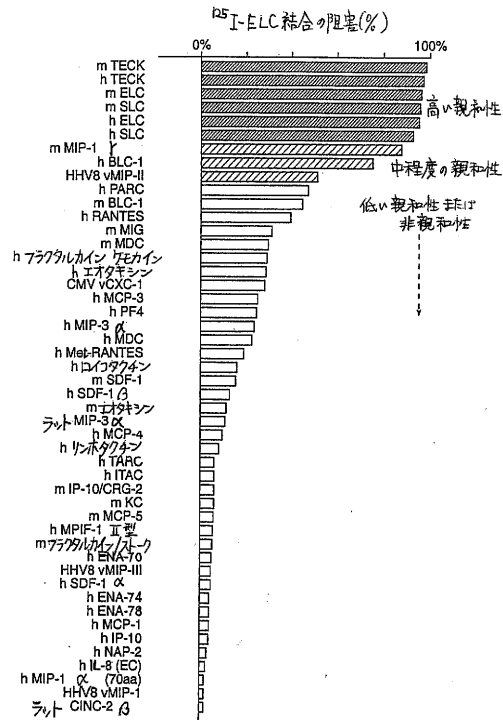


図 4A

【図 4A】の続き

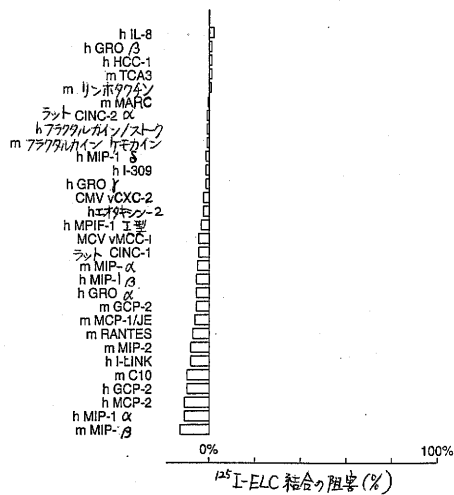
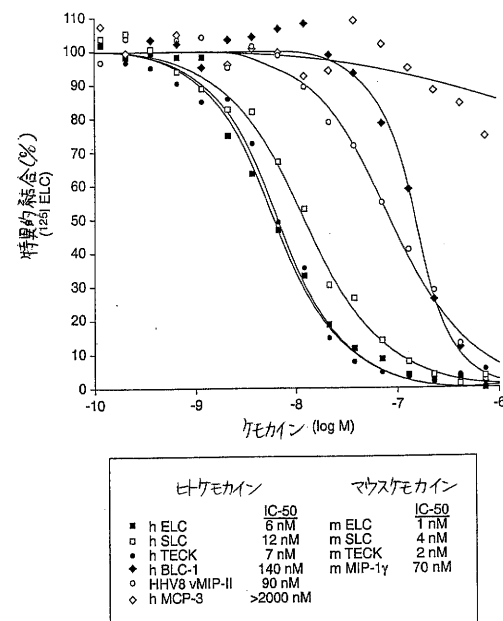


図 4A

【図 4 B】

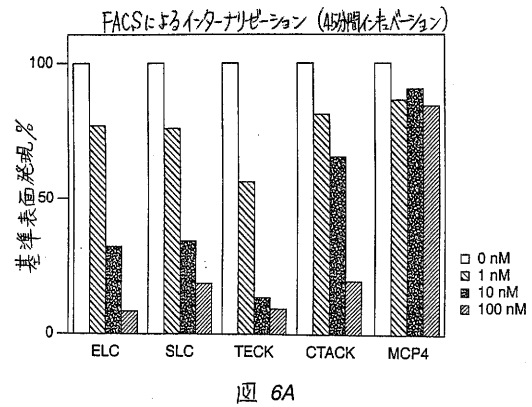


【 図 5 】

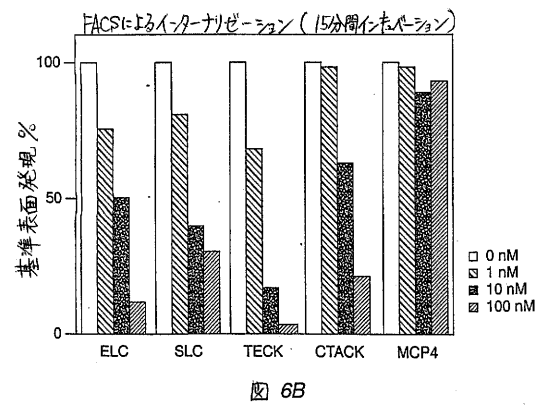
5'上流 COXIII	ATGCGATCAT TGGTTATTA AGGCAACTA GTGGAATTA GTGCAATTC	50
5'上流 COXIII	TGGGAATTT TATTTAACIT ATTAAATTA AATTATGAA TAACTACAA	100
5'上流 COXIII	ATAAATAATA AATTTAATTT AATTAACCA AGTAATTTGC TATTTCGTT	150
5'上流 COXIII	TTTATTCAT TGGTTGTGA TACCTTTTA CGATTCCAA AATTATGAT	200
5'上流 COXIII	GTAAGAATA TAACACTAT TATTCTTTT AGTAAATTC TAAATTAAT	250
5'上流 COXIII	TTCAATTTT AAAATTCAT TTTCATATA AGCTTCCTCT TTATTATGG	300
5'上流 COXIII	ATTATAGAG TAAGAARAT CTGACGGCA TTATGTTTA TTGCTGTCT	350
5'上流 COXIII	AAATCCAGC TCTTTCCAC AGAATTGGC AAGCAAGAT TTGATTAATA	400
5'上流 COXIII	ATCTTGGGT CATATCCAA TTGGGTCCC ATTAAAGAT TTCAAGAGT	450
5'上流 COXIII	GCTAGATCA GCTACATA TGTACAGA CAGGCTATA CTCTAGGAA	500
5'上流 COXIII	AGACAAACG AGCTGTATG AACTGTGTG TCTTTAGCA TATTTAGACA	550
5'上流 COXIII	AAATCATCT CTGATTTCT TTTCGATCT AGATTGAGC CTGGCTGCT 新読開始 AGCTGCTG	600
5'上流 COXIII	GCACAGATC GTCAACAGA TAAATATAT GAGGATATC GAATGATGC GAGGATATC GAATGATGC	649
5'上流 COXIII	GCCTATGCA CACAGATGC TATGACAGA TGTGCTG TCGATATCA GCCTATGCA CACAGATGC TATGACAGA TGTGCTG TCGATATCA	695
5'上流 COXIII	AGAGATAGA CAGAGATTT GCCTGCTGC TCTGCTGCT ATCTCTGAC AGGTTT TTT GAGGATTT TCTGCTGCT ATCTCTGAC	738
5'上流 COXIII	ATTA _____ AG _____ ATATTTTGT TCAATGACT TCGACAAAT TCGATGCTG TCGCAATTA	747
5'上流 COXIII	TGCTATATC AAGAACAGA GAACAAACG AGATGTGAC ATCTCTGAT	790
5'上流 COXIII	TGGCTGTAC AGATTATCT CTCATATCA CTCTGCTTT TTGGGCTGT	837
5'上流 COXIII	ATGCACTC AGGGGTGGT TTATGAGAA ATATGTGCA AATTAATCT	880
5'上流 COXIII	ATGCACTC AGGGGTGGT TTATGAGAA ATATGTGCA AATTAATCT	947

图 5

【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



フロントページの続き

(31)優先権主張番号 60/172,979

(32)優先日 平成11年12月20日(1999.12.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/173,389

(32)優先日 平成11年12月28日(1999.12.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/186,626

(32)優先日 平成12年3月3日(2000.3.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ダイラギ, ダニエル ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306, パロ アルト, コーネル ストリート 2080

(72)発明者 ハンリー, マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94925, コート マデラ, パークビュー サークル 81

(72)発明者 ミアオ, チェンフア

アメリカ合衆国 カリフォルニア 95129, サン ノゼ, レインボウ ドライブ ナンバー 2 7070

(72)発明者 タルボット, デイル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94127, サン フランシスコ, プレントウッド アベニュー 67

(72)発明者 シャル, トーマス ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94301, パロ アルト, ナンバー 5, ウェブスター プレイス 530

審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 国際公開第99/033876(WO,A1)

国際公開第99/024463(WO,A1)

特開平11-056377(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-1/70

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

WPI

BIOSIS(STN)

CAPLUS(STN)

MEDLINE(STN)

UniProt/GeneSeq