

(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2009-529917

(P2009-529917A)

(43) 公表日 平成21年8月27日 (2009. 8. 27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G 0 4 5
<b>C 1 2 Q 1/04 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/04	4 B 0 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 4
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-501596 (P2009-501596)  
 (86) (22) 出願日 平成19年3月22日 (2007. 3. 22)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年11月14日 (2008. 11. 14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/007340  
 (87) 国際公開番号 W02007/109370  
 (87) 国際公開日 平成19年9月27日 (2007. 9. 27)  
 (31) 優先権主張番号 60/784, 620  
 (32) 優先日 平成18年3月22日 (2006. 3. 22)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508093300  
 ヴァイラル ロジック システムズ テク  
 ノロジー コーポレーション  
 アメリカ合衆国 9 8 1 1 9 ワシントン  
 州, シアトル, スイート 4 5 0, エリオ  
 ット アヴェニュー ウェスト 2 0 1  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100096183  
 弁理士 石井 貞次  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節

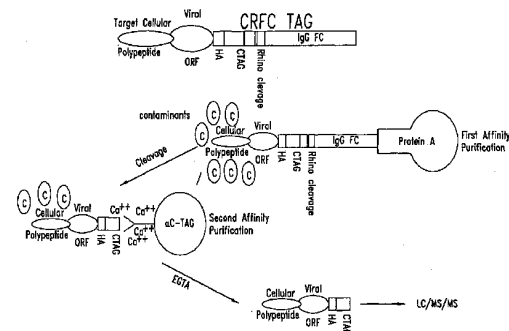
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標的ポリペプチドの同定方法および免疫学的疾患の治療のためのその使用

## (57) 【要約】

本発明は、ウイルスのビルレンス因子を同定するための方法、ならびに該ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定するための方法を提供する。前記細胞性ポリペプチドは、免疫学的疾患または障害を含めた疾患および障害を治療するための治療標的または治療薬として有用である。

【選択図】 図 5



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法であって、

(a) 細胞または該細胞の画分もしくは上清と、ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグに融合させた融合タンパク質とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が該細胞または該細胞の画分もしくは上清に随伴したポリペプチドと相互作用して融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、ただし、該ウイルス性ポリペプチドは少なくとも1つのビルレンス形質を示すものであること、

(b) 融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、

(c) 細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列、または少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、  
を含んでなる、上記方法。

10

**【請求項 2】**

ステップ(a)の前に、(i)ウイルスのゲノムにおいて、少なくとも40アミノ酸からなるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定すること、(ii)該ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグ配列に融合させた融合タンパク質を作製することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 3】**

少なくとも1つのビルレンス形質が、該ウイルスに感染した細胞における変異型ウイルス性ポリペプチドの発現が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質からなる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

少なくとも1つのビルレンス形質が、該ウイルスに感染した細胞における該ウイルス性ポリペプチドの発現不在が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質からなる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記ウイルス性ポリペプチドが、(A)該ウイルスに感染した細胞により分泌される、(B)細胞膜に結合している、または(C)細胞内にある、請求項1に記載の方法。

30

**【請求項 6】**

少なくとも1つのビルレンス形質が、該ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞により分泌される、または該ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞の細胞膜に結合される、という形質からなる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

少なくとも1つのビルレンス形質が、ウイルスゲノム中の前記ポリヌクレオチド配列がウイルスビルレンス因子である少なくとも1つの他のウイルス性ポリペプチドをコードするゲノム領域に位置する、という形質からなる、請求項2に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記領域がウイルスゲノムの5'末端または3'末端にある、請求項7に記載の方法。

40

**【請求項 9】**

前記ウイルスがDNAゲノム、二本鎖RNAゲノム、または一本鎖RNAゲノムを含む、請求項2に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記ウイルスがDNAゲノムを含み、かつボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはB型肝炎ウイルスである、請求項9に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記ウイルスがRNAゲノムを含み、かつピコルナウイルス、レトロウイルス、出血熱ウイルス、またはC型肝炎ウイルスである、請求項9に記載の方法。

**【請求項 12】**

50

ステップ(b)の前に、前記細胞を少なくとも1つの刺激にさらす、請求項1に記載の方法

。

【請求項 1 3】

前記細胞が免疫細胞であり、かつ少なくとも1つの刺激が、(a)該細胞により発現されるコグネイト抗原と特異的に結合する抗体、(b)ホルボールエステル、(c)コンカナバリンA、(d)サイトカイン、(e)ケモカイン、および(f)イオノマイシンから選択される、請求項12に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記細胞の画分が細胞溶解物、細胞抽出物、または少なくとも1つの分離された細胞オルガネラから選択される、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

アフィニティタグが検出可能な成分を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 1 6】

アフィニティタグがポリペプチドタグと検出可能な成分を含む、請求項1に記載の方法

。

【請求項 1 7】

検出可能な成分がフルオロフォア、放射性核種、酵素、およびビオチンから選択される、請求項15または16に記載の方法。

【請求項 1 8】

アフィニティタグがポリペプチドタグを含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 1 9】

アフィニティタグがプロテアーゼ認識配列をさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 2 0】

プロテアーゼ認識配列がウイルス性ポリペプチドとポリペプチドタグの間に位置する、請求項19に記載の方法。

【請求項 2 1】

ポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される、請求項17または19に記載の方法。

30

【請求項 2 2】

赤血球凝集素ペプチドがアミノ酸配列YPYDVDYA (配列番号1)からなり、カルモジュリン結合ポリペプチドがアミノ酸配列KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL (配列番号3)からなり、プロテインCタグがアミノ酸配列EDQVDPRLIDGK (配列番号4)からなり、ストレプトアビジン結合ペプチドがMDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP (配列番号6)またはDVEAWLDERVPLVET (配列番号7)から選択されるアミノ酸配列からなり、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメインがIgG結合タンパク質ZZからなり、Softag<sup>TM</sup>がアミノ酸配列SLAELLNAGLGGS (配列番号11)からなる、請求項21に記載の方法。

40

【請求項 2 3】

免疫グロブリンFcポリペプチドがヒトIgG免疫グロブリンFcポリペプチドである、請求項21に記載の方法。

【請求項 2 4】

ヒトIgG免疫グロブリンFcポリペプチドがヒトIgG1免疫グロブリンFcポリペプチドである、請求項23に記載の方法。

【請求項 2 5】

ポリペプチドタグが免疫グロブリンムテインFcポリペプチドであり、該免疫グロブリンムテインFcポリペプチドがヒトIgG1免疫グロブリンムテインFcポリペプチドである、請求項21に記載の方法。

【請求項 2 6】

50

アフィニティタグが第1のポリペプチドタグと第2のポリペプチドタグを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 27】

アフィニティタグがプロテアーゼ認識配列をさらに含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

プロテアーゼ認識配列が第1のポリペプチドタグと第2のポリペプチドタグの間に位置する、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

第1のポリペプチドタグと第2のポリペプチドタグが、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合タンパク質、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される、請求項28に記載の方法。

10

【請求項 30】

アフィニティタグが第3のポリペプチドタグをさらに含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 31】

第1のポリペプチドタグ、第2のポリペプチドタグ、および第3のポリペプチドタグが、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合タンパク質、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される、請求項30に記載の方法。

20

【請求項 32】

第1のポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチドであり、第2のポリペプチドタグがプロテインCタグであり、そして第3のポリペプチドタグがSoftag<sup>TM</sup>である、請求項30に記載の方法。

【請求項 33】

アフィニティタグが少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項 34】

第1のポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチドであり、第2のポリペプチドタグがプロテインCタグであり、第3のポリペプチドタグが少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメインであり、そして少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列である、請求項33に記載の方法。

30

【請求項 35】

第1のポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチドであり、第2のポリペプチドタグがプロテインCタグであり、第3のポリペプチドタグが免疫グロブリンムテインFcポリペプチドであり、そして少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列である、請求項33に記載の方法。

40

【請求項 36】

アフィニティタグが第1のポリペプチドタグ、第2のポリペプチドタグ、第3のポリペプチドタグ、および少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列を含んでなり、ここで、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列が第1のポリペプチドタグと第2のポリペプチドタグの間に位置するか、または該プロテアーゼ認識配列が第2のポリペプチドタグと第3のポリペプチドタグの間に位置する、請求項1に記載の方法。

【請求項 37】

アフィニティタグが第4のポリペプチドタグをさらに含む、請求項36に記載の方法。

【請求項 38】

第1、第2、第3、および第4のポリペプチドタグが、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュ

50

リン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される、請求項37に記載の方法。

【請求項 39】

第1のポリペプチドタグが赤血球凝集素ポリペプチドであり、第2のポリペプチドタグがカルモジュリン結合ポリペプチドであり、第3のポリペプチドタグがストレプトアビジン結合ペプチドであり、第4のポリペプチドタグが免疫グロブリンムテインFcポリペプチドであり、そして少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列である、請求項38に記載の方法。

10

【請求項 40】

第4のポリペプチドタグが第1、第2、または第3のポリペプチドタグと同じものである、請求項37に記載の方法。

【請求項 41】

第1のポリペプチドタグが赤血球凝集素ポリペプチドであり、第2のポリペプチドタグがプロテインCタグであり、第3のポリペプチドタグがストレプトアビジン結合ペプチドであり、そして第4のポリペプチドタグが第3のポリペプチドタグの繰り返しである、請求項40に記載の方法。

【請求項 42】

アフィニティタグが第2のポリペプチドタグと第3のポリペプチドタグの間にプロテアーゼ認識配列をさらに含む、請求項41に記載の方法。

20

【請求項 43】

プロテアーゼ認識配列がヒトラインウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列である、請求項42に記載の方法。

【請求項 44】

アフィニティタグが第2のプロテアーゼ認識配列をさらに含む、請求項33または36に記載の方法。

【請求項 45】

融合タンパク質がシグナルペプチド配列をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 46】

30

シグナルペプチド配列がアミノ酸配列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA (配列番号12)を含んでなる、請求項45に記載の方法。

【請求項 47】

ステップ(c)が、(i)単離した細胞性ポリペプチドをプロテアーゼで切断して、細胞性ポリペプチドの複数のポリペプチド断片を生成させること、(ii)少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つのポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定すること、(iii)少なくとも1つのポリペプチド断片のアミノ酸配列を既知の細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列と比較し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 48】

40

液体クロマトグラフィーと質量分析を含む方法によりアミノ酸配列を決定する、請求項47に記載の方法。

【請求項 49】

ステップ(b)が、(i)融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体とアフィニティタグのコグネイトリガンドとを、コグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成させるのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(ii)コグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体から融合タンパク質：細胞性ポリペプチドを単離することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 50】

融合タンパク質が組換えにより発現される、請求項1に記載の方法。

50

## 【請求項 5 1】

融合タンパク質がステップ(a)の細胞から組換えにより発現される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 5 2】

下記のステップ：

(i) 融合タンパク質と、少なくとも1個の細胞または該細胞の画分または該細胞の上清を含む生物学的サンプルとを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が少なくとも1個の細胞または細胞画分または細胞上清と相互作用するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、

(ii) 融合タンパク質が少なくとも1個の細胞またはその画分もしくは上清に結合するか否かを確認すること、

(iii) 融合タンパク質が結合する細胞を単離すること、

(iv) 該細胞の特性解析を行い、そこからウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを含む細胞タイプを決定すること、  
を含んでなる、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを含む細胞タイプを同定することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

10

## 【請求項 5 3】

ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法であって、

(a) ウイルスのゲノムにおいて、少なくとも40アミノ酸からなるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定すること、

(b) 細胞に、プロモーターと機能的に連結させた、アフィニティタグにインフレームで融合されたウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現構築物を導入すること、

(c) 該細胞から、または該細胞の画分から、または該細胞の上清から、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、

(d) 融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、

(e) 細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列、または少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、  
を含んでなる、上記方法。

20

30

## 【請求項 5 4】

ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法であって、

(a) 細胞または該細胞の画分もしくは上清と、ウイルス性ポリペプチド部分をアフィニティタグ部分に融合させた融合タンパク質とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が、該細胞または該細胞の画分もしくは上清に随伴したポリペプチドと相互作用して融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、ただし、該ウイルス性ポリペプチドは少なくとも1つのビルレンス形質を有するものであり、該アフィニティタグは少なくとも第1のポリペプチドタグ、第2のポリペプチドタグ、および少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列を含むものであること、

40

(b) 融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、ここで、前記単離は下記のステップ：

(i) 融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体と、第1のポリペプチドタグの第1のコグネイトリガンドとを、融合タンパク質のアフィニティタグ部分が第1のコグネイトリガンドと相互作用して第1のコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、

(ii) 第1のコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を、プロテアーゼ認識配列の部位でまたはその近くで該融合タンパク質を切断できるプロテアーゼと接触させて、切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を得ること、

(iii) 切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体と、第2のポリペプチドタグ

50

と特異的に結合する第2のコグネイトリガンドとを、第2のコグネイトリガンドおよび切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体が相互作用して第2のコグネイトリガンド：切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、

(iv) 第2のコグネイトリガンド：切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体から切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、を含むこと、

(c) 細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列、または少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、  
を含んでなる、上記方法。

10

#### 【請求項 5 5】

細胞または該細胞の画分もしくは上清と融合タンパク質とを接触させるステップの前に、(a)ウイルスのゲノムにおいて、少なくとも40アミノ酸からなるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定するステップと、(b)該ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグ配列に融合させた融合タンパク質を作製するステップをさらに含む、請求項54に記載の方法。

#### 【請求項 5 6】

ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法であって、

(a) ウイルスのゲノムにおいて、少なくとも40アミノ酸からなるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定すること、

20

(b) 該ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグ配列に融合させた融合タンパク質を作製すること、ここで、該アフィニティタグ配列は第1のポリペプチドタグ配列、第2のポリペプチドタグ配列、および第1と第2のポリペプチドタグ配列間に配置されたプロテアーゼ認識配列を含むものであること、

(c) 該融合タンパク質と、細胞またはその画分もしくは上清とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が、該細胞またはその画分もしくは上清に随伴したポリペプチドと相互作用して融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、

(d) 融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、ここで、前記単離は下記のステップ：

30

(i) 融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体と、第1のポリペプチドタグの第1のコグネイトリガンドとを、融合タンパク質のアフィニティタグ部分が第1のコグネイトリガンドと相互作用して第1のコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、

(ii) 第1のコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を、プロテアーゼ認識配列の部位でまたはその近くで該融合タンパク質を切断できるプロテアーゼと接触させて、切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を得ること、

(iii) 切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体と、第2のポリペプチドタグと特異的に結合する第2のコグネイトリガンドとを、第2のコグネイトリガンドおよび切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体が相互作用して第2のコグネイトリガンド：切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、

40

(iv) 切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、を含むこと、

(c) 細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列、または少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、  
を含んでなる、上記方法。

#### 【請求項 5 7】

50

免疫学的疾患または障害を治療するための薬剤を同定する方法であって、

(a) 請求項1に記載の方法に従ってウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、ただし、細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドとの相互作用によって免疫細胞の免疫応答性が改変されること、

(b) (i)細胞性ポリペプチドもしくは該細胞性ポリペプチドを含む細胞、(ii)ウイルス性ポリペプチド、および(iii)候補薬剤を、該細胞性ポリペプチドと該ウイルス性ポリペプチドが相互作用するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、

(c) 候補薬剤の非存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合レベルに対して、候補薬剤の存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合レベルを測定し、その際、候補薬剤の非存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合レベルと比較して、候補薬剤の存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合レベルが低下していれば、その候補薬剤を、免疫学的疾患または障害を治療するための薬剤として同定すること、を含んでなる、上記方法。

10

【請求項58】

前記薬剤が(a)抗体またはその抗原結合フラグメント、(b)ウイルス性ポリペプチド/Fcポリペプチド融合タンパク質、(c)ペプチド/Fcポリペプチド融合タンパク質、(d)小分子、(e)低分子干渉RNA(sirRNA)、(f)アンチセンスオリゴヌクレオチド、および(g)アプタマーから選択される、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

20

被験者の免疫学的疾患または障害を治療するための方法であって、該被験者に、細胞性ポリペプチドと、少なくとも1つのビルレンス形質を示すウイルス性ポリペプチドとの結合を阻害する抗体またはその抗原結合フラグメントを投与することを含んでなる、上記方法。

【請求項60】

免疫学的疾患または障害が、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病、敗血症、糖尿病、乾癬、アテローム性硬化症、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、強皮症、急性冠症候群、虚血再灌流、クローン病、子宮内膜症、糸球体腎炎、重症筋無力症、特発性肺線維症、喘息、急性呼吸促進症候群(ARDS)、血管炎、または炎症性自己免疫筋炎である、請求項57または58に記載の方法。

30

【請求項61】

心血管疾患または障害が、アテローム性硬化症、心内膜炎、高血圧症、または末梢虚血性疾患である、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

疾患または障害を治療する方法であって、それを必要とする被験者に、(a)医薬用として適する担体、および(b)請求項57に記載の方法により同定された薬剤を投与することを含んでなり、ここにおいて、該疾患または障害が免疫学的疾患または障害、心血管疾患または障害、代謝性疾患または障害、あるいは増殖性疾患または障害である、上記方法。

【請求項63】

前記薬剤が抗体またはその抗原結合フラグメントである、請求項62に記載の方法。

40

【請求項64】

疾患または医学的障害を治療するための治療薬の選択へと導く方法であって、

(a) ウイルスに感染した宿主において該ウイルスのビルレンスを増加させるウイルス性ポリペプチドを同定すること、

(b) ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、ここで、ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドへの結合が細胞の少なくとも1つの生物学的活性を改変させること、

(c) ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドへの結合を阻害する1種以上の薬剤を同定すること、

(d) 細胞の少なくとも1つの生物学的作用を改変させる、ステップ(c)で同定された1種

50



以上の薬剤の能力をカテゴリーに分類すること、ここで、少なくとも1つの生物学的作用を改変することが、疾患または医学的障害を発症するリスクを低減させるか、あるいは宿主において疾患または医学的障害の少なくとも1つの症状を軽減すること、

(e) 前臨床的および臨床的方法で試験するためにステップ(d)からの少なくとも1種の薬剤を選択し、そこから疾患または障害を治療するための治療薬の選択へと導くこと、を含んでなる、上記方法。

【請求項 6 5】

前記細胞の少なくとも1つの生物学的活性が免疫応答性であり、前記細胞が免疫細胞である、請求項64に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記疾患または障害が免疫学的疾患または障害、心血管疾患または障害、代謝性疾患または障害、あるいは増殖性疾患または障害である、請求項64に記載の方法。

【請求項 6 7】

免疫学的疾患または障害が、自己免疫疾患、または次の疾患：多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病、敗血症、糖尿病、乾癬、アテローム性硬化症、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、強皮症、急性冠症候群、虚血再灌流、クローン病、子宮内膜症、糸球体腎炎、重症筋無力症、特発性肺線維症、喘息、急性呼吸促進症候群(ARDS)、血管炎、および炎症性自己免疫筋炎から選択される炎症性疾患である、請求項66に記載の方法。

【請求項 6 8】

心血管疾患または障害が、アテローム性硬化症、心内膜炎、高血圧症、または末梢虚血性疾患である、請求項66に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2006年3月22日付けの米国仮特許出願第60/784,620号の優先権を主張するものであり、その全内容を参考として本明細書に組み入れる。

【0 0 0 2】

本発明は、細胞性ポリペプチドの生物学的活性が改変される場合に、疾患または障害（特に免疫学的疾患）の治療が可能となる、そうした細胞性ポリペプチドを同定する方法を提供する。前記方法は、ウイルスのビルレンス因子およびその細胞性リガンドを同定することを含む。本明細書ではさらに、細胞性標的に影響を及ぼしかつ疾患または障害を治療するための治療用分子として使用しうる薬剤、ならびに前記薬剤の同定方法をも提供する。この種の薬剤は、免疫系の免疫応答性を改変するのに有用であり、また、被験者の免疫学的疾患を治療するのに有用である。

【背景技術】

【0 0 0 3】

米国では、自己免疫疾患や炎症性疾患を含めた免疫学的疾患および障害に2000万人を超える人々が罹患している。多くの免疫学的疾患は次第に衰弱をきたし、長期に及ぶため、患者の一般的な健康状態だけでなく、生殖能力や幸福感にも影響を及ぼしてくる。

【0 0 0 4】

免疫応答のエフェクターもしくはモジュレーターである細胞性ポリペプチドを同定し、さらに該細胞性ポリペプチドと相互作用することによって免疫応答を調節する薬剤を同定する必要がある。そのような薬剤は免疫学的疾患および障害ならびに他の関連疾患および障害を治療および/または予防するのに有用である。本明細書では、治療標的として有用な細胞性ポリペプチドの同定方法を提供する。

【発明の開示】

【0 0 0 5】

発明の概要

本発明は、ヒトの免疫系を調節するのに重要な細胞性標的を迅速に同定し、その後、該

10

20

30

40

50

標的と結合してそれを調節するカウンター構造体 (counterstructures) を同定するための方法を提供するものである。

【0006】

一実施形態においては、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法を提供し、前記方法は、(a)細胞または該細胞の画分もしくは上清と、ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグに融合させた融合タンパク質とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が該細胞または該細胞の画分もしくは上清に随伴したポリペプチドと相互作用して融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、ただし、該ウイルス性ポリペプチドは少なくとも1つのビルレンス形質を示すものであること、(b)融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、(c)細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列、または少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、を含んでなる。ある実施形態では、ステップ(a)の前に、(i)ウイルスのゲノムにおいて、少なくとも40アミノ酸からなるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定すること、(ii)該ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグ配列に融合させた融合タンパク質を作製することをさらに含む。具体的な実施形態において、少なくとも1つのビルレンス形質は、該ウイルスに感染した細胞における変異型ウイルス性ポリペプチドの発現が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質である。別の具体的な実施形態において、少なくとも1つのビルレンス形質は、該ウイルスに感染した細胞における該ウイルス性ポリペプチドの発現の不在が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質である。さらに別の具体的な実施形態において、前記ウイルス性ポリペプチドは、(a)該ウイルスに感染した細胞により分泌される、(b)細胞膜に結合している、または(c)細胞内にある。特定の実施形態では、前記ウイルス性ポリペプチドが感染細胞により分泌される。別の特定の実施形態において、少なくとも1つのビルレンス形質は、該ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞により分泌される、または該ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞の細胞膜に結合される、という形質である。

【0007】

上記方法の別の具体的な実施形態において、少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルスゲノム中の前記ポリヌクレオチド配列がウイルスのビルレンス因子である少なくとも1つの他のウイルス性ポリペプチド(すなわち、第2のウイルス性ポリペプチド)をコードするゲノム領域に位置する、という形質である。前記領域はウイルスゲノムの5'末端または3'末端にある。ある実施形態では、ウイルスがボックスウイルスである。ある実施形態において、前記ウイルスはDNAゲノム、二本鎖RNAゲノム、または一本鎖RNAゲノムを含む。特定の実施形態では、前記ウイルスがDNAゲノムを含み、かつ前記ウイルスがボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはB型肝炎ウイルスである。別の具体的な実施形態では、前記ウイルスがRNAゲノムを含み、かつ前記ウイルスがピコルナウイルス、レトロウイルス、出血熱ウイルス、またはC型肝炎ウイルスである。

【0008】

ある実施形態では、上記方法のステップ(b)の前に、前記細胞を少なくとも1つの刺激にさらす。特定の実施形態では、前記細胞が免疫細胞であり、かつ少なくとも1つの刺激が(a)該細胞により発現されるコグネイト抗原と特異的に結合する抗体、(b)ホルボールエステル、(c)コンカナバリンA、(d)サイトカイン、(e)ケモカイン、および(f)イオノマイシンから選択される。他の特定の実施形態では、免疫細胞を上記刺激の少なくとも2つまたは少なくとも3つにさらす。別の実施形態では、前記細胞の画分が細胞溶解物、細胞抽出物、または少なくとも1つの分離された細胞オルガネラから選択される。特定の実施形態において、アフィニティタグは検出可能な成分を含み、他の特定の実施形態では、アフィニティタグはポリペプチドタグと検出可能な成分を含む。特定の実施形態においては、検出可能な成分がフルオロフォア、放射性核種、酵素、およびビオチンから選択される。

【0009】

上記方法のさらに別の実施形態においては、アフィニティタグがポリペプチドタグを含む。具体的な実施形態では、アフィニティタグがプロテアーゼ認識配列をさらに含む。さらに別の具体的な実施形態では、プロテアーゼ認識配列がウイルス性ポリペプチドとポリペプチドタグの間に位置する。特定の実施形態において、ポリペプチドタグは、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。特定の実施形態では、アフィニティタグがアミノ酸配列YPYD VDYA (配列番号1)からなる赤血球凝集素ペプチドを含む。別の特定の実施形態では、アフィニティタグがアミノ酸配列KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL (配列番号3)からなるカルモジュリン結合ポリペプチドを含む。さらに別の特定の実施形態では、アフィニティタグが免疫グロブリンFcポリペプチドを含み、該FcポリペプチドがヒトIgG免疫グロブリンFcポリペプチドである。ある特定の実施形態では、ヒトIgG免疫グロブリンFcポリペプチドがヒトIgG1免疫グロブリンFcポリペプチドである。他の特定の実施形態では、ポリペプチドタグが免疫グロブリンムテインFcポリペプチドであり、該免疫グロブリンムテインFcポリペプチドがヒトIgG1免疫グロブリンムテインFcポリペプチドである。さらに別の特定の実施形態では、アフィニティタグがアミノ酸配列EDQVDPRLIDGK (配列番号4)からなるプロテインCタグを含む。さらに別の特定の実施形態では、アフィニティタグがMDEKTTGWRGGHVVEGL AGELEQLRARLEHHPQGQREP (配列番号6)またはDVEAWLDERVPLVET (配列番号7)から選択されるアミノ酸配列からなるストレプトアビジン結合ペプチドを含む。さらに別の特定の実施形態では、アフィニティタグがIgG結合タンパク質ZZからなる少なくとも1つの免疫グロブリン結合性黄色ブドウ球菌プロテインAドメインを含む。さらに別の特定の実施形態では、Softag<sup>TM</sup>がアミノ酸配列SLAELLNAGLGGS (配列番号11)からなる。

10

20

30

40

50

#### 【0010】

上記方法の別の実施形態では、アフィニティタグが第1のポリペプチドタグと第2のポリペプチドタグを含む。具体的な実施形態では、アフィニティタグがプロテアーゼ認識配列をさらに含み、特定の実施形態では、プロテアーゼ認識配列が第1のポリペプチドタグと第2のポリペプチドタグの間に位置する。ある実施形態において、第1のポリペプチドタグと第2のポリペプチドタグは、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。

#### 【0011】

さらに他の実施形態においては、アフィニティタグが第3のポリペプチドタグをさらに含み、第1のポリペプチドタグ、第2のポリペプチドタグ、および第3のポリペプチドタグがそれぞれ、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。具体的な実施形態では、第1のポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチドであり、第2のポリペプチドタグがプロテインCタグであり、そして第3のポリペプチドタグがSoftag<sup>TM</sup>である。他の特定の実施形態では、アフィニティタグが少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列を含む。具体的な実施形態では、第1のポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチドであり、第2のポリペプチドタグがプロテインCタグであり、第3のポリペプチドタグが少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメインであり、そして少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列である。さらに別の実施形態では、第1のポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチドであり、第2のポリペプチドタグがプロテインCタグであり、第3のポリペプチドタグが免疫グロブリンムテインFcポリペプチドであり、そして少なくとも1つのプロテアー

ゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列である。さらに別の特定の実施形態では、アフィニティタグが第1のポリペプチドタグ、第2のポリペプチドタグ、第3のポリペプチドタグ、および少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列を含んでなり、ここで、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列は第1のポリペプチドタグと第2のポリペプチドタグの間に位置するか、または該プロテアーゼ認識配列が第2のポリペプチドタグと第3のポリペプチドタグの間に位置する。別の特定の実施形態では、アフィニティタグが第2のプロテアーゼ認識配列をさらに含む。

【0012】

上記方法のさらに別の実施形態においては、アフィニティタグが第4のポリペプチドタグをさらに含む。特定の実施形態では、第1、第2、第3、および第4のポリペプチドタグが、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。さらに別の特定の実施形態では、第1のポリペプチドタグが赤血球凝集素ポリペプチドであり、第2のポリペプチドタグがカルモジュリン結合ポリペプチドであり、第3のポリペプチドタグがストレプトアビジン結合ペプチドであり、第4のポリペプチドタグが免疫グロブリンムテインFcポリペプチドであり、そして少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列である。さらに他の実施形態では、第4のポリペプチドタグが第1、第2、または第3のポリペプチドタグと同じものである。具体的な実施形態では、第1のポリペプチドタグが赤血球凝集素ポリペプチドであり、第2のポリペプチドタグがプロテインCタグであり、第3のポリペプチドタグがストレプトアビジン結合ペプチドであり、そして第4のポリペプチドタグが第3のポリペプチドタグの繰り返しである。特定の実施形態において、アフィニティタグは第2のポリペプチドタグと第3のポリペプチドタグの間にプロテアーゼ認識配列をさらに含む。具体的な実施形態では、そのプロテアーゼ認識配列がヒトライノウイルスHRV3Cのプロテアーゼ認識配列である。別の具体的な実施形態では、アフィニティタグが第2のプロテアーゼ認識配列をさらに含む。

【0013】

上記方法のいずれかによれば、融合タンパク質はシグナルペプチド配列をさらに含む。特定の実施形態では、シグナルペプチド配列がヒト成長ホルモンシグナルペプチド配列のアミノ酸配列を含んでなり、特定の実施形態ではアミノ酸配列MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA (配列番号12)を含んでなる。

【0014】

上記方法の別の実施形態においては、ステップ(c)が、(i)単離した細胞性ポリペプチドをプロテアーゼで切断して、細胞性ポリペプチドの少なくとも1つのポリペプチド断片または複数のポリペプチド断片を生成させること、(ii)少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つのポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定すること、(iii)少なくとも1つのポリペプチド断片のアミノ酸配列を既知の細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列と比較し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することを含む。特定の実施形態では、液体クロマトグラフィーと質量分析を含む方法によりアミノ酸配列を決定する。特定の実施形態では、前記方法は液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析を含む。

【0015】

上記方法のさらに別の実施形態では、ステップ(b)が、(i)融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体とアフィニティタグのコグネイトリガンドとを、コグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成させるのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(ii)コグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体から融合タンパク質：細胞性ポリペプチドを単離することを含む。特定の実施形態では、融合タンパク質が組換えにより発現される。具体的な実施形態では、融合タンパク質がステップ(a)の細胞から組換えにより発現される。

## 【0016】

上記方法のさらに別の実施形態では、前記方法は、(i)融合タンパク質と、少なくとも1個の細胞または該細胞の画分または該細胞の上清を含む生物学的サンプルとを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が少なくとも1個の細胞または細胞画分または細胞上清と相互作用するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(ii)融合タンパク質が少なくとも1個の細胞またはその画分もしくは上清に結合するか否かを確認すること、(iii)融合タンパク質が結合する細胞を単離すること、(iv)該細胞の特性解析を行い、そこからウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを含む細胞タイプを決定することを含んでなる、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを含む細胞タイプを同定することをさらに含む。

10

## 【0017】

別の実施形態においては、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法を提供し、前記方法は、(a)ウイルスのゲノムにおいて、少なくとも40アミノ酸からなるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定すること、(b)アフィニティタグ配列に融合されたウイルス性ポリペプチドを含む融合タンパク質を作製すること、(c)該融合タンパク質と細胞またはその画分もしくは上清とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が該細胞またはその画分もしくは上清と相互作用して融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(d)融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、(e)細胞性ポリペプチドの全部または一部のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することを含んでなる。特定の実施形態では、ウイルス性ポリペプチドが少なくとも1つのビルレンス形質を示し、該形質は、該ウイルスに感染した細胞における変異型ウイルス性ポリペプチドの発現が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質を含む。別の特定の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、該ウイルスに感染した細胞における該ウイルス性ポリペプチドの発現の不在が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質を含む。さらに別の特定の実施形態では、ウイルス性ポリペプチドが、(i)該ウイルスに感染した細胞により分泌される、(ii)細胞膜に結合している、または(iii)細胞内にある。ある特定の実施形態において、ウイルス性ポリペプチドの少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞により分泌される、という形質を含む。別の特定の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞の細胞膜に結合される、という形質を含む。上記方法の別の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルスゲノム中の該ポリヌクレオチド配列がウイルスのビルレンス因子である少なくとも1つの他のウイルス性ポリペプチド（すなわち、第2のウイルス性ポリペプチド）をコードするゲノム領域に位置する、という形質を含み、該領域はウイルスゲノムの5'末端または3'末端にある。ある実施形態において、前記ウイルスはボックスウイルスである。特定の実施形態において、前記ウイルスはDNAゲノム、二本鎖RNAゲノム、または一本鎖RNAゲノムを含む。特定の実施形態では、前記ウイルスがDNAゲノムを含み、かつボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはB型肝炎ウイルスである。別の特定の実施形態では、前記ウイルスがRNAゲノムを含み、かつピコルナウイルス、レトロウイルス、出血熱ウイルス、またはC型肝炎ウイルスから選択される。ある実施形態では、融合タンパク質と細胞または該細胞の画分もしくは上清を接触させるステップの前に、前記細胞を少なくとも1つの刺激にさらす。特定の実施形態では、前記細胞が免疫細胞であり、かつ少なくとも1つの刺激が、(a)該細胞により発現されるコグネイト抗原と特異的に結合する抗体、(b)ホルボールエステル、(c)コンカナバリンA、(d)サイトカイン、(e)ケモカイン、および(f)イオノマイシンから選択される。他の特定の実施形態では、免疫細胞を上記刺激の少なくとも2つまたは少なくとも3つにさらす。別の実施形態では、前記細胞の画分が細胞溶解物、細胞抽出物、または少なくとも1つの分離された細胞オルガネラから選択される。特定の実施形態において、アフィニティタグは検出可能な成分を含み、他の特定の実施形態では、ア

20

30

40

50

フィニティタグがポリペプチドタグと検出可能な成分を含む。特定の実施形態においては、検出可能な成分がフルオロフォア、放射性核種、酵素、およびビオチンから選択される。特定の実施形態においては、アフィニティタグが少なくとも1つのポリペプチドタグを含み、ポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。別の実施形態では、アフィニティタグが少なくとも2つ、3つ、または4つのポリペプチドタグを含み、少なくとも2つ、3つ、または4つのポリペプチドタグのそれぞれが赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。具体的な実施形態において、アフィニティタグは少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列をさらに含み、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列のいずれかである。さらに別の具体的な実施形態において、アフィニティタグは少なくとも2つのプロテアーゼ認識配列をさらに含み、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列のいずれかである。

10

20

30

40

50

#### 【0018】

一実施形態においては、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法を提供し、該方法は、(a)ウイルスのゲノムにおいて、少なくとも40アミノ酸からなるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定すること、(b)細胞に、プロモーターと機能的に連結させた、アフィニティタグにインフレイムで融合されたウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現構築物を導入すること、(c)該細胞から、または該細胞の画分から、または該細胞の上清から、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、(d)融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、(e)細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列、または少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することを含んでなる。特定の実施形態では、ウイルス性ポリペプチドが少なくとも1つのビルレンス形質を示す。具体的な実施形態において、少なくとも1つのビルレンス形質は、該ウイルスに感染した細胞における変異型ウイルス性ポリペプチドの発現が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質を含む。別の特定の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、該ウイルスに感染した細胞における該ウイルス性ポリペプチドの発現の不在が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質を含む。さらに別の特定の実施形態では、ウイルス性ポリペプチドが、(i)該ウイルスに感染した細胞により分泌される、(ii)細胞膜に結合している、または(iii)細胞内にある。ある特定の実施形態において、ウイルス性ポリペプチドの少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞により分泌される、という形質を含む。別の特定の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞の細胞膜に結合される、という形質を含む。上記方法の別の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルスゲノム中の該ポリヌクレオチド配列がウイルスのビルレンス因子である少なくとも1つの他のウイルス性ポリペプチド（すなわち、第2のウイルス性ポリペプチド）をコードするゲノム領域に位置する、という形質を含み、該領域がウイルスゲノムの5'末端または3'末端にある。ある実施形態において、前記ウイルスはボックスウイルスである。特定の実施形態において、前記ウイルスはDNAゲノム、二本鎖RNAゲノム、または一本鎖RNAゲノムを含む。特定の実施形態では、前記ウイルスがDNAゲノムを含み、かつボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはB型肝炎ウイルスである。別の特定の実施形態では、前記ウイルスはRNAゲノムを含

み、かつピコルナウイルス、レトロウイルス、出血熱ウイルス、またはC型肝炎ウイルスから選択される。ある実施形態では、前記方法は、ステップ(c)の前に、前記細胞を少なくとも1つの刺激にさらすことをさらに含み、特定の実施形態では、前記細胞が免疫細胞であり、かつ少なくとも1つの刺激が、(a)該細胞により発現されるコグネイト抗原と特異的に結合する抗体、(b)ホルボールエステル、(c)コンカナバリンA、(d)サイトカイン、(e)ケモカイン、および(f)イオノマイシンから選択される。他の特定の実施形態では、免疫細胞を上記刺激の少なくとも2つまたは少なくとも3つにさらす。別の実施形態では、前記細胞の画分が細胞溶解物、細胞抽出物、または少なくとも1つの分離された細胞オルガネラから選択される。特定の実施形態において、アフィニティタグは検出可能な成分を含み、他の特定の実施形態では、アフィニティタグがポリペプチドタグと検出可能な成分を含む。特定の実施形態においては、検出可能な成分がフルオロフォア、放射性核種、酵素、およびビオチンから選択される。特定の実施形態においては、アフィニティタグが少なくとも1つのポリペプチドタグを含み、ポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAdメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。別の実施形態では、アフィニティタグが少なくとも2つ、3つ、または4つのポリペプチドタグを含み、少なくとも2つ、3つ、または4つのポリペプチドタグのそれぞれが赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAdメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。具体的な実施形態において、アフィニティタグは少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列をさらに含み、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列のいずれかである。さらに別の具体的な実施形態において、アフィニティタグは少なくとも2つのプロテアーゼ認識配列をさらに含み、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列のいずれかである。

#### 【0019】

さらに別の実施形態においては、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法を提供し、該方法は、(a)細胞または該細胞の画分もしくは上清と、ウイルス性ポリペプチド部分をアフィニティタグ部分に融合させた融合タンパク質とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が、該細胞または該細胞の画分もしくは上清に随伴したポリペプチドと相互作用して融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、ただし、該ウイルス性ポリペプチドは少なくとも1つのビルレンス形質を有するものであり、該アフィニティタグは少なくとも第1のポリペプチドタグ、第2のポリペプチドタグ、および少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列を含むものであること、(b)融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、ここで、前記単離ステップは、(i)融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体と、第1のポリペプチドタグの第1のコグネイトリガンドとを、融合タンパク質のアフィニティタグ部分が第1のコグネイトリガンドと相互作用して第1のコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(ii)第1のコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を、プロテアーゼ認識配列の部位でまたはその近くで該融合タンパク質を切断できるプロテアーゼと接触させて、切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を得ること、(iii)切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体と、第2のポリペプチドタグと特異的に結合する第2のコグネイトリガンドとを、第2のコグネイトリガンドおよび切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体が相互作用して第2のコグネイトリガンド：切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(iv)第2のコグネイトリガ

ド：切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体から切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離することを含むこと、(c)細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列、または少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することを含んでなる。特定の実施形態において、前記方法は、細胞または該細胞の画分もしくは上清と融合タンパク質とを接触させるステップの前に、(a)ウイルスのゲノムにおいて、少なくとも40アミノ酸からなるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定するステップと、(b)該ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグ配列に融合させた融合タンパク質を作製するステップをさらに含んでなる。特定の実施形態では、ウイルス性ポリペプチドが少なくとも1つのビルレンス形質を示す。具体的な実施形態において、少なくとも1つのビルレンス形質は、該ウイルスに感染した細胞における変異型ウイルス性ポリペプチドの発現が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質を含む。別の特定の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、該ウイルスに感染した細胞における該ウイルス性ポリペプチドの発現の不在が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質を含む。さらに別の特定の実施形態では、ウイルス性ポリペプチドが、(i)該ウイルスに感染した細胞により分泌される、(ii)細胞膜に結合している、または(iii)細胞内にある。ある特定の実施形態において、ウイルス性ポリペプチドの少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞により分泌される、という形質を含む。別の特定の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞の細胞膜に結合される、という形質を含む。上記方法の別の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルスゲノム中の該ポリヌクレオチド配列がウイルスのビルレンス因子である少なくとも1つの他のウイルス性ポリペプチド（すなわち、第2のウイルス性ポリペプチド）をコードするゲノム領域に位置する、という形質を含み、該領域がウイルスゲノムの5'末端または3'末端にある。ある実施形態において、前記ウイルスはボックスウイルスである。特定の実施形態において、前記ウイルスはDNAゲノム、二本鎖RNAゲノム、または一本鎖RNAゲノムを含む。特定の実施形態では、前記ウイルスがDNAゲノムを含み、かつボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはB型肝炎ウイルスである。別の特定の実施形態では、前記ウイルスはRNAゲノムを含み、かつピコルナウイルス、レトロウイルス、出血熱ウイルス、またはC型肝炎ウイルスから選択される。ある実施形態では、ステップ(a)の前に、前記細胞を少なくとも1つの刺激にさらし、特定の実施形態では、前記細胞が免疫細胞であり、かつ少なくとも1つの刺激が、(a)該細胞により発現されるコグネイト抗原と特異的に結合する抗体、(b)ホルボールエステル、(c)コンカナバリンA、(d)サイトカイン、(e)ケモカイン、および(f)イオノマイシンから選択される。他の特定の実施形態では、免疫細胞を上記刺激の少なくとも2つまたは少なくとも3つにさらす。別の実施形態では、前記細胞の画分が細胞溶解物、細胞抽出物、または少なくとも1つの分離された細胞オルガネラから選択される。特定の実施形態において、アフィニティタグは検出可能な成分を含み、他の特定の実施形態では、アフィニティタグがポリペプチドタグと検出可能な成分を含む。特定の実施形態においては、検出可能な成分がフルオロフォア、放射性核種、酵素、およびビオチンから選択される。特定の実施形態においては、アフィニティタグが少なくとも1つのポリペプチドタグを含み、ポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。別の実施形態では、アフィニティタグが少なくとも2つ、3つ、または4つのポリペプチドタグを含み、少なくとも2つ、3つ、または4つのポリペプチドタグのそれぞれが赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。具体的な実施形態において、ア

10

20

30

40

50



フィニティタグは少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列をさらに含み、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトラノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列のいずれかである。さらに別の具体的な実施形態において、アフィニティタグは少なくとも2つのプロテアーゼ認識配列をさらに含み、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトラノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列のいずれかである。

【0020】

別の実施形態においては、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法を提供し、該方法は、(a)単離したウイルス性ポリペプチドと細胞または該細胞の画分もしくは上清とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が該細胞に随伴したポリペプチドと相互作用してウイルス性ポリペプチド：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、ただし、該ウイルス性ポリペプチドは少なくとも1つのビルレンス形質を含み、該形質が以下から選択されること：(i)ウイルス（該ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを含む）に感染した細胞における該ウイルス性ポリペプチドの変異体の発現が該ウイルスのビルレンスの低下と相関すること、(ii)ウイルス（該ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを含む）に感染した細胞における該ウイルス性ポリペプチドの発現の不在が該ウイルスのビルレンスの低下と相関すること、(iii)該ウイルス性ポリペプチドがウイルス（該ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを含む）に感染した細胞により分泌されること、(iv)該ウイルス性ポリペプチドがウイルスのゲノム中に存在するポリヌクレオチド配列によりコードされ、該ポリヌクレオチド配列はウイルスのビルレンス因子である少なくとも1つの他のウイルス性ポリペプチド（すなわち、第2のウイルス性ポリペプチド）をコードするゲノム領域に位置すること、(v)該ウイルス性ポリペプチドがウイルスのゲノム中に存在するポリヌクレオチド配列によりコードされ、該ポリヌクレオチド配列はウイルスゲノムの5'末端または3'末端にあること、および(vi)該ウイルス性ポリペプチドが少なくとも40アミノ酸からなること、(b)該ウイルス性ポリペプチド：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、(c)細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列、または少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することを含んでなる。上記方法の別の実施形態では、ウイルスゲノム中の該ポリヌクレオチド配列が、少なくとも1つのウイルスビルレンス因子をコードするゲノム領域に位置し、該領域がウイルスゲノムの5'末端または3'末端にある。ある実施形態において、前記ウイルスはボックスウイルスである。特定の実施形態において、前記ウイルスはDNAゲノム、二本鎖RNAゲノム、または一本鎖RNAゲノムを含む。特定の実施形態では、前記ウイルスがDNAゲノムを含み、かつボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはB型肝炎ウイルスである。別の特定の実施形態では、前記ウイルスはRNAゲノムを含み、かつピコルナウイルス、レトロウイルス、出血熱ウイルス、またはC型肝炎ウイルスから選択される。ある実施形態では、ステップ(a)の前に、前記細胞を少なくとも1つの刺激にさらし、特定の実施形態では、前記細胞が免疫細胞であり、かつ少なくとも1つの刺激が、(a)該細胞により発現されるコグネイト抗原と特異的に結合する抗体、(b)ホルボールエステル、(c)コンカナバリンA、(d)サイトカイン、(e)ケモカイン、および(f)イオノマイシンから選択される。他の特定の実施形態では、免疫細胞を上記刺激の少なくとも2つまたは少なくとも3つにさらす。別の実施形態では、前記細胞の画分が細胞溶解物、細胞抽出物、または少なくとも1つの分離された細胞オルガネラから選択される。特定の実施形態において、アフィニティタグは検出可能な成分を含み、他の特定の実施形態では、アフィニティタグがポリペプチドタグと検出可能な成分を含む。特定の実施形態においては、検出可能な成分がフルオロフォア、放射性核種、酵素、およびビオチンから選択される。特定の実施形態においては、アフィニティタグが少なくとも1つのポリペプチドタグを含み、ポリペプチドタグが赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインC

10

20

30

40

50

タグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。別の実施形態では、アフィニティタグが少なくとも2つ、3つ、または4つのポリペプチドタグを含み、少なくとも2つ、3つ、または4つのポリペプチドタグのそれぞれが赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。具体的な実施形態において、アフィニティタグは少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列をさらに含み、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列のいずれかである。さらに別の具体的な実施形態において、アフィニティタグは少なくとも2つのプロテアーゼ認識配列をさらに含み、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列のいずれかである。

10

#### 【0021】

別の実施形態においては、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法を提供し、該方法は、(a)ウイルスのゲノムにおいて、少なくとも40アミノ酸からなるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定すること、(b)該ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグ配列に融合させた融合タンパク質を作製すること、ここで、該アフィニティタグ配列は第1のポリペプチドタグ配列、第2のポリペプチドタグ配列、および第1と第2のポリペプチドタグ配列間に配置されたプロテアーゼ認識配列を含むものであること、(c)該融合タンパク質と細胞またはその画分もしくは上清とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が該細胞またはその画分もしくは上清に随伴したポリペプチドと相互作用して融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(d)融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、ここで、前記単離ステップは、(i)融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体と、第1のポリペプチドタグの第1のコグネイトリガンドとを、融合タンパク質のアフィニティタグ部分が第1のコグネイトリガンドと相互作用して第1のコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(ii)第1のコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を、プロテアーゼ認識配列の部位でまたはその近くで該融合タンパク質を切断できるプロテアーゼと接触させて、切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を得ること、(iii)切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体と、第2のポリペプチドタグと特異的に結合する第2のコグネイトリガンドとを、第2のコグネイトリガンドおよび切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体が相互作用して第2のコグネイトリガンド：切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(iv)切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離することを含むこと、(d)細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列、または少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することを含んでなる。特定の実施形態では、ウイルス性ポリペプチドが少なくとも1つのビルレンス形質を示す。具体的な実施形態において、少なくとも1つのビルレンス形質は、該ウイルスに感染した細胞における変異型ウイルス性ポリペプチドの発現が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質を含む。別の特定の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、該ウイルスに感染した細胞における該ウイルス性ポリペプチドの発現の不在が該ウイルスのビルレンスの低下と相関する、という形質を含む。さらに別の特定の実施形態では、ウイルス性ポリペプチドが、(i)該ウイルスに感染した細胞により分泌される、(ii)細胞膜に結合している、または(iii)細胞内にある。ある特定の実施形態において、ウイルス性ポリペプチドの少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞により分泌される、という形質を含む。別の特定の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は

20

30

40

50

、ウイルス性ポリペプチドが該ウイルスに感染した細胞の細胞膜に結合される、という形質を含む。上記方法の別の実施形態では、少なくとも1つのビルレンス形質は、ウイルスゲノム中の該ポリヌクレオチド配列がウイルスのビルレンス因子である少なくとも1つの他のウイルス性ポリペプチド（すなわち、第2のウイルス性ポリペプチド）をコードするゲノム領域に位置する、という形質を含み、該領域がウイルスゲノムの5'末端または3'末端にある。ある実施形態において、前記ウイルスはボックスウイルスである。特定の実施形態において、前記ウイルスはDNAゲノム、二本鎖RNAゲノム、または一本鎖RNAゲノムを含む。特定の実施形態では、前記ウイルスがDNAゲノムを含み、かつボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはB型肝炎ウイルスである。別の特定の実施形態では、前記ウイルスはRNAゲノムを含み、かつピコルナウイルス、レトロウイルス、出血熱ウイルス、またはC型肝炎ウイルスから選択される。ある実施形態では、ステップ(c)の前に、前記細胞を少なくとも1つの刺激にさらし、特定の実施形態では、前記細胞が免疫細胞であり、かつ少なくとも1つの刺激が、(a)該細胞により発現されるコグネイト抗原と特異的に結合する抗体、(b)ホルボールエステル、(c)コンカナバリンA、(d)サイトカイン、(e)ケモカイン、および(f)イオノマイシンから選択される。他の特定の実施形態では、免疫細胞を上記刺激の少なくとも2つまたは少なくとも3つにさらす。別の実施形態では、前記細胞の画分が細胞溶解物、細胞抽出物、または少なくとも1つの分離された細胞オルガネラから選択される。特定の実施形態において、アフィニティタグは検出可能な成分を含み、検出可能な成分はフルオロフォア、放射性核種、酵素、およびビオチンから選択される。特定の実施形態においては、アフィニティタグを構成する少なくとも2つのポリペプチドタグがそれぞれ、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。別の実施形態では、アフィニティタグが少なくとも3つまたは4つのポリペプチドタグを含み、少なくとも3つまたは4つのポリペプチドタグのそれぞれが赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、プロテインCタグ、少なくとも1つの免疫グロブリン結合性の黄色ブドウ球菌プロテインAドメイン、およびSoftag<sup>TM</sup>から選択される。具体的な実施形態において、アフィニティタグは少なくとも1つの第2のプロテアーゼ認識配列をさらに含み、少なくとも1つの第2のプロテアーゼ認識配列がタバコエッチウイルスプロテアーゼ認識配列またはヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列のいずれかである。

#### 【0022】

さらに、本発明においては、宿主細胞と結合するウイルス性ポリペプチドからなるウイルスビルレンス因子を提供し、該ウイルス性ポリペプチドは以下の形質から選択される少なくとも1つの形質を示す：(a)ウイルス（該ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを含む）に感染した細胞における該ウイルス性ポリペプチドの変異体の発現が該ウイルスのビルレンスの低下と相関すること、(b)ウイルス（該ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを含む）に感染した細胞における該ウイルス性ポリペプチドの発現の不在が該ウイルスのビルレンスの低下と相関すること、(c)該ウイルス性ポリペプチドがウイルス（該ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを含む）に感染した細胞により分泌されること、(d)該ウイルス性ポリペプチドがウイルスのゲノム中に存在するポリヌクレオチド配列によりコードされ、該ポリヌクレオチド配列はウイルスのビルレンス因子である第2のウイルス性ポリペプチドをコードするゲノム領域に位置すること、(e)該ウイルス性ポリペプチドがウイルスのゲノム中に存在するポリヌクレオチド配列によりコードされ、該ポリヌクレオチド配列はウイルスゲノムの5'末端または3'末端にあること、および(f)該ウイルス性ポリペプチドが少なくとも40アミノ酸からなること。前記ウイルス性ポリペプチドが宿主細胞に結合すると、宿主細胞の少なくとも1つの生物学的活性が変化して、該宿主が該ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを含むウイルスによる感染に対して増大した感受性を示すようになる。特定の実施形態において、前記ウイルスはDNAゲノム

10

20

30

40

50

、二本鎖RNAゲノム、または一本鎖RNAゲノムを含む。特定の実施形態では、前記ウイルスがDNAゲノムを含み、かつボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはB型肝炎ウイルスである。別の特定の実施形態では、前記ウイルスはRNAゲノムを含み、かつピコルナウイルス、レトロウイルス、出血熱ウイルス、またはC型肝炎ウイルスから選択される。

#### 【0023】

別の実施形態においては、ウイルス性ポリペプチドと結合する細胞性ポリペプチドからなる単離されたポリペプチドを提供し、該細胞性ポリペプチドは以下のステップを含む方法に従って単離される：(a)ウイルスのゲノムにおいて、少なくとも40アミノ酸からなるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定すること、(b)該ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグに融合させた融合タンパク質を作製すること、(c)該融合タンパク質と細胞または該細胞の画分もしくは上清とを、該融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が該細胞またはその画分もしくは上清中に存在するポリペプチドと相互作用して融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(d)該融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離すること、(e)細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列、または少なくとも8アミノ酸からなる少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定し、それによりウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること。特定の実施形態において、前記ウイルスはDNAゲノム、二本鎖RNAゲノム、または一本鎖RNAゲノムを含む。特定の実施形態では、前記ウイルスがDNAゲノムを含み、かつボックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはB型肝炎ウイルスである。別の特定の実施形態では、前記ウイルスはRNAゲノムを含み、かつピコルナウイルス、レトロウイルス、出血熱ウイルス、またはC型肝炎ウイルスから選択される。特定の実施形態において、前記ウイルス性ポリペプチドは宿主細胞と結合するウイルス性ポリペプチドからなるウイルスのビルレンス因子であり、該ウイルス性ポリペプチドは上記のようなビルレンス形質を少なくとも1つ含む。

#### 【0024】

さらに、本発明においては、免疫学的疾患または障害を治療するための薬剤の同定方法を提供し、該方法は、(a)細胞性ポリペプチドを同定するための上記方法のいずれかに従って、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、ここにおいて、細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドとの相互作用によって免疫細胞の免疫応答性が改変されること、(b)(i)細胞性ポリペプチドもしくは該細胞性ポリペプチドを含む細胞、(ii)ウイルス性ポリペプチド、および(iii)候補薬剤を、該細胞性ポリペプチドと該ウイルス性ポリペプチドが相互作用するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(c)候補薬剤の非存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合のレベルに対して、候補薬剤の存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合のレベルを測定し、その際、候補薬剤の非存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合のレベルと比較して、候補薬剤の存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合のレベルが低下していれば、その候補薬剤を、免疫学的疾患または障害を治療するための薬剤として同定することを含んでなる。特定の実施形態において、前記薬剤は、(a)抗体またはその抗原結合フラグメント、(b)ウイルス性ポリペプチド/Fcポリペプチド融合タンパク質、(c)ペプチド/Fcポリペプチド融合タンパク質、(d)小分子、(e)低分子干渉RNA (siRNA)、(f)アンチセンスポリヌクレオチド、および(g)アプタマーから選択される。

#### 【0025】

別の実施形態においては、細胞性ポリペプチドと特異的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供するが、該細胞性ポリペプチドは上記のようにウイルス性ポリペプチドと結合し、上記方法のいずれかにより同定されるものである。特定の実施形態では、抗体がポリクローナル抗体である。他の特定の実施形態では、抗体がモノクローナル抗体で、該モノクローナル抗体がマウスモノクローナル抗体、ヒトモノクローナル抗体、

ラットモノクローナル抗体、およびハムスターモノクローナル抗体から選択される。他の実施形態において、抗体はヒト化抗体またはキメラ抗体である。本発明においては、抗体を発現する宿主細胞をも提供し、ある実施形態では宿主細胞がハイブリドーマ細胞である。具体的な実施形態において、抗原結合フラグメントはF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fd、およびFvから選択され、他の具体的な実施形態では、抗原結合フラグメントはヒト、マウス、ニワトリ、またはウサギ由来のものである。別の具体的な実施形態では、抗原結合フラグメントは一本鎖Fv(scFv)である。別の実施形態においては、(a)製薬上の担体と(b)前記抗体またはその抗原結合フラグメントを被験者に投与することを含んでなる、疾患または障害の治療方法を提供する。特定の実施形態では、前記疾患または障害は免疫学的疾患または障害、心血管疾患または障害、代謝性疾患または障害、あるいは増殖性疾患または障害である。具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害は自己免疫疾患または炎症性疾患である。さらに他の具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害は多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病、敗血症、糖尿病、乾癬、アテローム性硬化症、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、強皮症、急性冠症候群、虚血再灌流、クローン病、子宮内膜症、糸球体腎炎、重症筋無力症、特発性肺線維症、喘息、急性呼吸促進症候群(ARDS)、血管炎、または炎症性自己免疫筋炎である。別の具体的な実施形態では、前記疾患または障害は心血管疾患または障害であり、心血管疾患または障害がアテローム性硬化症、心内膜炎、高血圧症、または末梢虚血性疾患である。

10

#### 【0026】

別の実施形態においては、被験者の免疫学的疾患または障害を治療するための方法を提供し、該方法は、被験者に、細胞性ポリペプチドと、上記のような少なくとも1つのビルレンス形質を示すウイルス性ポリペプチドとの結合を阻害する抗体またはその抗原結合フラグメントを投与することを含んでなる。さらに別の実施形態では、疾患または障害を治療する方法であって、それを必要とする被験者に、(a)医薬用として適する担体、および(b)上記のような少なくとも1つのビルレンス形質を示すか、または上記方法のいずれかにより同定された細胞性ポリペプチドもしくはその細胞外ドメインと結合するウイルス性ポリペプチドと結合する細胞性ポリペプチド、を投与することを含んでなる上記方法を提供する。特定の実施形態において、細胞性ポリペプチドもしくは該細胞性ポリペプチドの少なくとも1つの細胞外ドメインは第2のポリペプチド配列に融合される。具体的な実施形態では、第2のポリペプチド配列が免疫グロブリンFcポリペプチドまたは免疫グロブリンム

テインFcポリペプチドである。特定の実施形態において、前記疾患または障害は免疫学的疾患または障害、心血管疾患または障害、代謝性疾患または障害、あるいは増殖性疾患または障害である。具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害が自己免疫疾患または炎症性疾患である。さらに他の具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害が多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病、敗血症、糖尿病、乾癬、アテローム性硬化症、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、強皮症、急性冠症候群、虚血再灌流、クローン病、子宮内膜症、糸球体腎炎、重症筋無力症、特発性肺線維症、喘息、急性呼吸促進症候群(ARDS)、血管炎、または炎症性自己免疫筋炎である。別の具体的な実施形態では、前記疾患または障害が心血管疾患または障害であり、心血管疾患または障害がアテローム性硬化症、心内膜炎、高血圧症、または末梢虚血性疾患である。

20

30

40

#### 【0027】

さらに、疾患または障害を治療する方法であって、それを必要とする被験者に、(a)医薬用として適する担体、および(b)下記のステップ：

(a)細胞性ポリペプチドを同定するための上記方法のいずれかに従って、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、ここにおいて、細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドとの相互作用によって免疫細胞の免疫応答性が改変されること、

(b)(i)細胞性ポリペプチドもしくは該細胞性ポリペプチドを含む細胞、(ii)ウイルス性ポリペプチド、および(iii)候補薬剤を、該細胞性ポリペプチドと該ウイルス性ポリペ

50

チドが相互作用するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、

(c) 候補薬剤の非存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合のレベルに対して、候補薬剤の存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合のレベルを測定し、その際、候補薬剤の非存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合のレベルと比較して、候補薬剤の存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合のレベルが低下していれば、その候補薬剤を、免疫学的疾患または障害を治療するための薬剤として同定すること、を含んでなる方法により同定された薬剤を投与することを含んでなる上記方法を提供する。特定の実施形態において、前記疾患または障害は免疫学的疾患または障害、心血管疾患または障害、代謝性疾患または障害、あるいは増殖性疾患または障害である。具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害が自己免疫疾患または炎症性疾患である。さらに他の具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害が多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病、敗血症、糖尿病、乾癬、アテローム性硬化症、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、強皮症、急性冠症候群、虚血再灌流、クローン病、子宮内膜症、糸球体腎炎、重症筋無力症、特発性肺線維症、喘息、急性呼吸促進症候群(ARDS)、血管炎、または炎症性自己免疫筋炎である。別の具体的な実施形態では、前記疾患または障害が心血管疾患または障害であり、心血管疾患または障害がアテローム性硬化症、心内膜炎、高血圧症、または末梢虚血性疾患である。

10

#### 【0028】

本発明はさらに、(a) ウイルスのビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドを同定すること、(b) 該ウイルスビルレンス因子が結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、ここにおいて、該ウイルスビルレンス因子の細胞性ポリペプチドへの結合が細胞の少なくとも1つの生物学的活性を改変すること、(c) 該ウイルスビルレンス因子の細胞性ポリペプチドへの結合を阻害する薬剤を同定し、それにより該細胞の少なくとも1つの生物学的活性を改変する薬剤を同定すること、(d) 少なくとも1つの前臨床試験を立案し実施して、該薬剤により細胞の少なくとも1つの生物学的活性を改変することが、ヒト被験者における疾患または医学的症状の治療に有用であることを示すか否かを確認すること、を含んでなるビジネス方法を提供する。特定の実施形態において、前記ビジネス方法はさらに、ヒト被験者における該薬剤の安全性を検討するための少なくとも1つの臨床試験を立案して実施することを含み、特定の実施形態では、該薬剤を必要とするヒト被験者における該薬剤の有効性を評価するための少なくとも1つの臨床試験を立案して実施することをさらに含み、他の特定の実施形態では、該薬剤を販売することをさらに含む。具体的な実施形態において、前記ビジネス方法は、ライセンス供与機関から取得会社にウイルス性ポリペプチドのライセンスを供与することを含む。別の具体的な実施形態では、ライセンス供与機関から取得会社に細胞性ポリペプチドのライセンスを供与することを含む。さらに別の具体的な実施形態では、前記方法はライセンス供与機関から取得会社へ薬剤のライセンスを与えることを含み、特定の実施形態では、ライセンス供与機関がバイオ医薬品会社である。他の特定の実施形態では、取得会社がバイオ医薬品会社である。ある特定の実施形態では、バイオ医薬品会社が細胞性ポリペプチドを同定するための実験を行う。他の特定の実施形態では、バイオ医薬品会社が薬剤を同定するための実験を行う。さらに別の実施形態では、前記ビジネス方法が、バイオ医薬品会社から販売会社へ薬剤販売の権利をライセンス供与することをさらに含む。別の具体的な実施形態では、前記ビジネス方法は、バイオ医薬品会社がロイヤリティ料金を販売会社から回収することをさらに含む。一実施形態において、前記薬剤は、(a) 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) ウイルス性ポリペプチド/Fcポリペプチド融合タンパク質、(c) ペプチド/Fcポリペプチド融合タンパク質、(d) Fcポリペプチドに融合された細胞性ポリペプチドのドメインまたは少なくとも8アミノ酸からなるその断片、(e) 小分子、(f) 低分子干渉RNA (siRNA)、(g) アンチセンスオリゴヌクレオチド、および(h) アプタマーから選択される。別の特定の実施形態では、細胞の少なくとも1つの生物学的活性が免疫応答性であり、前記細胞が免疫細胞である。具体的な実施形態では、前記疾患または障害が免疫学的疾患または障害、心血管疾患または障害、

20

30

40

50

代謝性疾患または障害、あるいは増殖性疾患または障害である。具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害が自己免疫疾患または炎症性疾患である。さらに他の具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害が多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病、敗血症、糖尿病、乾癬、アテローム性硬化症、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、強皮症、急性冠症候群、虚血再灌流、クローン病、子宮内膜症、糸球体腎炎、重症筋無力症、特発性肺線維症、喘息、急性呼吸促進症候群(ARDS)、血管炎、または炎症性自己免疫筋炎である。別の具体的な実施形態では、前記疾患または障害が心血管疾患または障害であり、心血管疾患または障害がアテローム性硬化症、心内膜炎、高血圧症、または末梢虚血性疾患である。

【0029】

別の実施形態においては、疾患または医学的障害を治療するための治療薬の選択へと導く方法であって、(a)ウイルスに感染した宿主において該ウイルスのビルレンスを増加させるウイルス性ポリペプチドを同定すること、(b)ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、ここで、ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドへの結合が細胞の少なくとも1つの生物学的活性を改変させること、(c)ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドへの結合を阻害する1種以上の薬剤を同定すること、(d)細胞の少なくとも1つの生物学的作用を改変させる、ステップ(c)で同定された1種以上の薬剤の能力をカテゴリーに分類すること、ここで、少なくとも1つの生物学的作用を改変することが、疾患または医学的障害を発症するリスクを低減させるか、あるいは宿主において疾患または医学的障害の少なくとも1つの症状を軽減すること、(e)前臨床的および臨床的方法で試験するための少なくとも1種の薬剤を選択し、そこから疾患または障害を治療するための治療薬の選択へと導くこと、を含んでなる上記方法を提供する。別の特定の実施形態では、前記細胞の少なくとも1つの生物学的活性が免疫応答性であり、前記細胞が免疫細胞である。具体的な実施形態では、前記疾患または障害が免疫学的疾患または障害、心血管疾患または障害、代謝性疾患または障害、あるいは増殖性疾患または障害である。具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害が自己免疫疾患または炎症性疾患である。さらに他の具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害が多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病、敗血症、糖尿病、乾癬、アテローム性硬化症、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、強皮症、急性冠症候群、虚血再灌流、クローン病、子宮内膜症、糸球体腎炎、重症筋無力症、特発性肺線維症、喘息、急性呼吸促進症候群(ARDS)、血管炎、または炎症性自己免疫筋炎である。別の具体的な実施形態では、前記疾患または障害が心血管疾患または障害であり、心血管疾患または障害がアテローム性硬化症、心内膜炎、高血圧症、または末梢虚血性疾患である。別の特定の実施形態においては、ステップ(a)をコンピュータ装置を用いて行い、このコンピュータ装置は、(i)複数のウイルス性ポリペプチドをコードする複数の異なるポリヌクレオチド配列を含む第1の情報ベース(knowledge base)、および(ii)ウイルスビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドを評価し選択するための複数のルールを含む第2の情報ベース(ここで、ウイルス性ポリペプチドはステップ(i)で受け取った情報から同定される)を含んでなる。

【0030】

別の実施形態においては、疾患または障害の治療薬を販売するためのビジネス方法であって、(a)ウイルスに感染した宿主においてウイルスのビルレンスを増強するウイルス性ポリペプチドに関する情報を受け取ること、(b)ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、ここで、ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドへの結合が細胞の少なくとも1つの生物学的活性を改変させること、(c)ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドへの結合を阻害し、かつ細胞の少なくとも1つの生物学的作用を改変させる1種以上の薬剤を同定すること、ここで、少なくとも1つの生物学的作用を改変することが、疾患または障害を発症するリスクを低減させるか、あるいは宿主において疾患または医学的障害の少なくとも1つの症状を軽減すること、(d)ステップ(c)で同定された薬剤を、疾患または医学的障害の治療のために医療専門家または患者に販売するこ



と、を含んでなる上記方法を提供する。具体的な実施形態では、前記疾患または障害が免疫学的疾患または障害、心血管疾患または障害、代謝性疾患または障害、あるいは増殖性疾患または障害である。具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害が自己免疫疾患または炎症性疾患である。さらに他の具体的な実施形態では、免疫学的疾患または障害が多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病、敗血症、糖尿病、乾癬、アテローム性硬化症、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、強皮症、急性冠症候群、虚血再灌流、クローン病、子宮内膜症、糸球体腎炎、重症筋無力症、特発性肺線維症、喘息、急性呼吸促進症候群(ARDS)、血管炎、または炎症性自己免疫筋炎である。別の具体的な実施形態では、前記疾患または障害が心血管疾患または障害であり、心血管疾患または障害がアテローム性硬化症、心内膜炎、高血圧症、または末梢虚血性疾患である。別の特定の実施形態においては、ステップ(a)をコンピュータ装置を用いて行い、このコンピュータ装置は、(i)複数のウイルス性ポリペプチドをコードする複数の異なるポリヌクレオチド配列を含む第1の情報ベース(knowledge base)、および(ii)ウイルスビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドを評価し選択するための複数のルールを含む第2の情報ベース(ここで、ウイルス性ポリペプチドはステップ(i)で受け取った情報から同定される)を含んでなる。

10

#### 【0031】

さらに、本発明においては、所望の結果を達成するためのウイルス性ポリペプチドの選択へと導くシステムを提供し、該システムは、(a) (i) 複数のウイルス性ポリペプチドをコードする複数のポリヌクレオチド配列を含む第1の情報ベース、および(ii) ステップ(i) で受け取った情報に基づいてウイルスビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドを評価し選択するための複数のルールを含む第2の情報ベース、を含んでなるコンピュータ装置、(b) 該コンピュータ装置に所望の結果および標的ウイルスビルレンス因子に関する情報を提供するための手段、(c) ウイルス性ポリペプチド(これを使用して、該ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することができ、該ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドへの結合が細胞の少なくとも1つの生物学的活性を改変させる)をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列を同定して、カテゴリーに分類するかまたはランク付けするための、該コンピュータ装置に内蔵された手段を含んでなる。

20

#### 【0032】

別の実施形態においては、所望の結果を達成するためのウイルス性ポリペプチドの選択へと導くコンピュータプログラム製品を提供し、該コンピュータプログラム製品は、コンピュータ読み取り可能なプログラムコード手段を組み込んだコンピュータ使用可能な記憶媒体を含み、該コンピュータ読み取り可能なプログラムコード手段は、(a) (i) 複数のウイルス性ポリペプチドをコードする複数のポリヌクレオチド配列を含む第1の情報ベース、および(ii) ステップ(i) で受け取った情報に基づいてウイルスビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドを評価し選択するための複数のルールを含む第2の情報ベースを作成するためのコンピュータ読み取り可能なプログラムコード手段、(b) 該コンピュータ装置に所望の結果および標的ウイルスビルレンス因子に関する情報を提供するためのコンピュータ読み取り可能なプログラムコード手段、(c) 標的ウイルスビルレンス因子(これを使用して、該ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することができ、該ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドへの結合が細胞の少なくとも1つの生物学的活性を改変させる)を同定して、カテゴリーに分類するかまたはランク付けするためのコンピュータ読み取り可能なプログラムコード手段を含んでなる。

30

40

#### 【0033】

別の実施形態においては、ウイルス性ポリペプチドと結合する細胞性ポリペプチドの生産方法を提供し、該方法は、(a) 上記方法に従って、ウイルス性ポリペプチドと結合する細胞性ポリペプチドを同定すること、(b) 該細胞性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を決定すること、(c) 該細胞性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に機能的に連結されたプロモーターを含む組換え発現ベクターを作製すること、(d) ステップ(c)

50



で作製された組換え発現ベクターを用いて宿主細胞のトランスフェクションまたは形質転換を行うこと、(e)ステップ(d)の宿主細胞を、該細胞性ポリペプチドの発現を可能にする条件下で培養すること、(f)宿主細胞培養物から該細胞性ポリペプチドを単離すること、を含んでなる。

#### 【0034】

別の実施形態においては、免疫学的疾患または障害を治療するための薬剤の生産方法を提供し、該方法は、(a)免疫学的疾患または障害を治療するための薬剤を同定すること、ここにおいて、同定ステップは、(i)上記方法のいずれかに従って、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること(ただし、細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドとの相互作用により、免疫細胞の免疫応答性が改変されること)、(ii)(A)細胞性ポリペプチドまたは該細胞性ポリペプチドを含む細胞、(B)ウイルス性ポリペプチド、および(C)候補薬剤を、細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドが相互作用するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること、(iii)候補薬剤の非存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合のレベルに対して、候補薬剤の存在下での該ウイルス性ポリペプチドの該細胞性ポリペプチドへの結合のレベルを測定し、それにより免疫学的疾患または障害を治療するための薬剤を同定すること、を含んでなり、(b)ステップ(a)で同定された薬剤を生産すること、を含んでなる。具体的実施形態では、前記薬剤は(a)抗体またはその抗原結合フラグメント、(b)ウイルス性ポリペプチド/Fcポリペプチド融合タンパク質、(c)ペプチド/Fcポリペプチド融合タンパク質、(d)Fcポリペプチドに融合された細胞性ポリペプチドのドメインまたは少なくとも8アミノ酸からなるその断片、(e)小分子、(f)低分子干渉RNA(sirRNA)、(g)アンチセンスオリゴヌクレオチド、および(h)アプタマーから選択される。

#### 【0035】

本明細書および特許請求の範囲で用いる単数形は、特に断らない限り、複数形への言及を含めるものとする。したがって、例えば「薬剤」という語は複数のそのような薬剤を含み、「細胞」という語は1個以上の細胞や当業者に公知のその均等物を含む、などである。「含む」という語(および関連用語)は、例えば本明細書に記載する合成物、組成物、方法、プロセスなどが、記載した特徴・構成「から成る」または「から本質的に成る」ことを除外するものではない。

#### 【0036】

本出願および/または出願データシートで挙げた米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許刊行物はいずれも、その全体を参考として本明細書に組み入れる。

#### 【0037】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、ヒト免疫系をモジュレートするのに重要な細胞性標的を迅速に同定し、次いでそうした標的に結合しかつそうした標的をモジュレートするカウンター構造体を同定する方法に関する。本明細書に開示の方法は、バイオインフォマティクスを用いてウイルスのビルレンス遺伝子を同定すること、およびウイルスのビルレンスポリペプチド、もしくはその断片(例えば細胞性ポリペプチドに結合する断片)をコードする前記のビルレンス遺伝子またはその部分(もしくは断片)を発現させることを含む。発現されたウイルスのビルレンスポリペプチドはさらに、検出および単離のための配列タグを1以上含みうる。発現された、タグ化ビルレンス遺伝子産物は、細胞を(例えば蛍光活性化セルソーティングにより)スクリーニングするか、または分離された細胞膜を(例えばBIAcoreにより)スクリーニングして、ビルレンス遺伝子産物と相互作用する細胞性標的分子を同定するために使用される。次いで細胞性標的は、例えばそのアミノ酸配列を決定することにより、単離し同定することができる。

#### 【0038】

本明細書に記載の方法は、細胞、細胞の画分、または細胞の上清と、ウイルスのビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチド(ウイルスのビルレンスポリペプチドとも言う)を

接触させ、次いでウイルスのビルレンスポリペプチドが結合する細胞標的を同定することを含む。ウイルスのビルレンス遺伝子および該ビルレンス遺伝子によりコードされるポリペプチドは、例えばバイオインフォマティクス手法により同定される。ウイルスのビルレンスポリペプチド(または細胞性ポリペプチドと相互作用するその断片もしくは一部)およびアフィニティタグ(エピトープタグとも言う)を含む融合タンパク質を用意することもできる。特定の実施形態では、前記の方法には、細胞性ポリペプチド標的(これには細胞により分泌される細胞性ポリペプチド標的も含まれる)を単離するためのタンデムアフィニティー精製(TAP)タグ手法の改変も含まれる。

#### 【0039】

ウイルスは、細胞サイトカイン、細胞ケモカインまたはサイトカインもしくはケモカインの受容体のウイルス性相同体であるタンパク質をコードすることにより、感染宿主の免疫系による検出と排除を回避するための様々な機構を進化させてきた。例えばボックスウイルスのゲノムは可溶性のウイルス性腫瘍壊死因子(TNF)受容体をコードし、これが炎症誘発性サイトカインであるTNFと結合して、それを阻害する。ウイルス性ポリペプチドが標的とする他の細胞性ポリペプチドとしては、インターロイキン1、種々のケモカイン、およびCD30が挙げられる。

#### 【0040】

ウイルスは、ウイルスの感染を制限して、その複製周期に悪影響を及ぼすように感染宿主が発達させた機構に抵抗すべく進化してきた。ウイルスは、宿主の免疫応答の回避またはモジュレーションを可能にする性質、特徴および/または機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。さらに、ウイルスは宿主から遺伝子を獲得する能力および/または宿主遺伝子のウイルス性相同体を進化させる能力および/または宿主遺伝子のウイルス性モジュレーターを進化させる能力を有する。したがって、進化する能力を有するおよび/または宿主から遺伝子を獲得する能力を有するウイルスは、宿主のウイルスに対する免疫応答をモジュレートするビルレンス因子と呼ばれるタンパク質(本明細書においてウイルスのビルレンスポリペプチドとも言う)をコードするゲノムを有する。したがってウイルスのビルレンス因子のリガンドである宿主内の細胞性成分は、重要な免疫調節性標的となり得る。

#### 【0041】

特に、免疫細胞により発現されかつウイルスのビルレンス因子(すなわち少なくとも1つのウイルスビルレンス特性を示すウイルス性ビルレンスポリペプチドまたはウイルス性ポリペプチド)と相互作用する細胞性ポリペプチド(これには細胞表面ポリペプチド、分泌ポリペプチド、および細胞内ポリペプチドが含まれる)の同定は、免疫学的障害、例えば多発性硬化症、慢性関節リウマチ、および全身性エリテマトーデス(SLE)を含む炎症性疾患および自己免疫疾患を治療するために使用することのできる薬剤を同定するために有用であり有益である。別の実施形態において、ウイルスのビルレンス因子の同定は、ビルレンス因子をコードするウイルス(または関連ウイルス)により引き起こされるウイルス感染の治療および/または予防用の薬剤を同定するために有用である。かかる免疫学的疾患および障害ならびにウイルス感染の治療および予防に使用することのできる組成物を同定し開発する必要がある。

#### 【0042】

##### 細胞性ポリペプチド治療標的を同定するための手法

細胞活性または機能を変更するのに適した標的である細胞性ポリペプチドを同定するための本明細書に記載の手法としては、ウイルス性ポリペプチド(例えばウイルスのビルレンスポリペプチドまたはビルレンス因子)が結合する細胞性ポリペプチドを同定する手法が挙げられる。かかる手法は、細胞または該細胞の画分もしくは上清を、融合タンパク質と接触させることを含む。融合タンパク質は、アフィニティタグに融合させたウイルスのビルレンスポリペプチドからなる。融合タンパク質および細胞(またはコグネイト細胞性ポリペプチドが含まれる細胞画分、細胞培養上清、細胞溶解物、細胞抽出物、もしくは細胞外上清)は、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド成分が細胞、該細胞の画分もし

くは該細胞の上清に随伴したポリペプチドと相互作用して融合タンパク質/細胞性ポリペプチド複合体を形成するのに十分な時間および条件下で、相互作用できるようにする。前記複合体はアフィニティタグを介して分離することができるが、アフィニティタグはそのコグネイトリガンドに結合することが可能である。細胞性ポリペプチドの正体は、本明細書に記載され当技術分野で使用されている方法に従い同定することができ、こうした方法としては、LC-MS/MS、MALDI-TOF、免疫アッセイ、ペプチドマッピング、およびアミノ末端解析(例えばエドマン分解)を含むアミノ酸解析が挙げられるがこれらに限らない。

#### 【0043】

標的細胞性ポリペプチドのアフィニティ分離のための代表的方法は、タンデムアフィニティ精製(TAP) (TAPタグとも言う)である (例えば、Rigautら Nat. Biotech. 17:1030-32 (1999); Puig ら, Methods 24:218-29 (2001); Knuesel ら Mol. Cell. Proteomics 2:1225-33 (2003)を参照されたい)。TAP法は、生物学的複合体中に存在する成分の同定を可能にする。精製は迅速に行うことができ、一般にはいずれかの成分のまたは生物学的複合体の変性を必要としない条件下で行われる。典型的には、TAPタグ(またはアフィニティタグ)を対象のポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端(この場合は、ウイルスゲノムのオープンリーディングフレームによりコードされるウイルスビルレンスポリペプチド、またはその一部)に融合させ、これを細胞または細胞画分と接触させて対象のポリペプチドと細胞性ポリペプチドとを相互作用できるようにし、その結果、対象のポリペプチドと細胞性ポリペプチドの間で複合体が形成される。次いでアフィニティタグの結合特性を利用することにより複合体を分離する。特定の実施形態ではTAP手法の後に、標的細胞性ポリペプチドの正体を液体クロマトグラフタンデム型質量分析(LC-MS/MSと言う)により決定する。この手法は本明細書において詳細に説明する。

#### 【0044】

##### ウイルス性ポリペプチド

治療標的となる細胞性ポリペプチドを同定する方法において有用なウイルス性ポリペプチドとしては、宿主内で疾患を引き起こすウイルスの能力を維持するまたは高める、すなわちウイルスのビルレンスに影響を及ぼす、ウイルス性ポリペプチドが挙げられる。かかるウイルス性ポリペプチドのことを本明細書ではウイルスのビルレンスポリペプチドと言い、これは少なくとも1つのビルレンス特性を示すウイルス性ポリペプチドである。特定の実施形態では、ウイルスのビルレンスポリペプチドが結合する、また治療薬がターゲティングされ得る細胞性ポリペプチドを同定する方法はさらに、ウイルスのゲノム中から、1以上のビルレンス形質を有するウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定すること(例えば、少なくとも20、30、または40個連続したアミノ酸をコードするポリヌクレオチド配列を同定すること)を含む。次いで同定されたウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグに結合させるが、これについては本明細書においてさらに詳細に説明する。

#### 【0045】

ビルレンス、すなわち疾患を引き起こすウイルスの能力には、どの程度ウイルスが宿主の防御機構の1以上を征服または最小化できるかが含まれる。微生物のビルレンスを保つまたは高める微生物(ウイルスも含む)の成分のことを、ビルレンス因子とも言う。ウイルスのビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチド(またはウイルスビルレンスポリペプチド)は、宿主の免疫応答を回避するまたはモジュレートする能力を有する。本明細書に記載のように、ウイルスのビルレンスは、一部には、ウイルス内に含まれる遺伝情報の進化により、また、ウイルスが宿主から遺伝子を獲得する能力および/または宿主遺伝子のウイルス性相同体を進化させる能力および/または宿主遺伝子のウイルス性モジュレーターを進化させる能力により保たれる。ウイルスのビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドとしては、細胞性ポリペプチドに結合したときに細胞性ポリペプチドの生物学的機能または活性に影響を及ぼす(すなわちモジュレートするもしくは変更する)ポリペプチドが挙げられるが、こうしたウイルス性ポリペプチドは免疫応答(ウイルスによる感染を予防、最小化、低減、抑制または阻害し、また、それに関連する疾患の続発症を予防、最小

化、低減、抑制または阻害する)に影響を及ぼす宿主の能力を改変する。

【0046】

ウイルスのビルレンス因子である1以上のウイルス性ポリペプチドをコードするウイルスゲノムは、一本鎖DNAゲノム、二本鎖DNAゲノム、二本鎖RNAゲノム、または一本鎖RNAゲノム(センスもしくはアンチセンス)でありうる。例となるDNAウイルスとしては、限定するものではないが、ラージDNAゲノム(二本鎖DNA)ウイルス、例えばヘルペスウイルス、アデノウイルス、およびボックスウイルスが挙げられる。ウイルスのビルレンスに寄与するポリペプチドをコードする他のウイルスとしては、ピコルナウイルス(RNA含有型ウイルス、例えばエンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルス(A型肝炎ウイルス)、カルジオウイルス、アフトウイルス、パレコウイルス、エルボウイルス、コブウイルス、およびテスコウイルス); 出血熱ウイルス(RNA含有型ウイルス、例えばアレナウイルス、フロウイルス、ブニウイルス、フラビウイルス); インフルエンザウイルス(一本鎖RNAウイルス); レトロウイルス(例えばオンコウイルスおよびレンチウイルス(RNA含有型ウイルス、例えばHIV-1、HIV-2、HTLV-1、HTLV-2)); B型肝炎ウイルス(DNA含有型ウイルス); C型肝炎ウイルス(RNA含有型ウイルス); ならびにコロナウイルスが挙げられるがこれらに限らない。アンチセンスRNAウイルスのことを当技術分野ではマイナスRNA鎖ウイルスとも言い、これには例えば麻疹ウイルス、ムンプス・ウイルス、インフルエンザウイルス、エボラウイルス、および呼吸器合胞体ウイルスが含まれる。プラス鎖RNAウイルス(センスRNAウイルスとも言う)としては、例えばポリオウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、ルベラウイルス、黄熱病ウイルス、西ナイルウイルス、デング熱ウイルス、A型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスが挙げられる。

10

20

【0047】

ボックスウイルスは、細胞の細胞質で複製し、多数の異なる宿主において複製するよう適応した二本鎖DNAウイルスの一群を形成する。多くのボックスウイルスの適応機構は、ウイルスが宿主の免疫系を回避できるようにするおよび/またはウイルス複製を容易にする宿主遺伝子の獲得を伴う(Smithら, Science 248:1019 (1990); Bugert and Darai, Virus Genes 21:111 (2000); Alcamíら, Semin. Virol. 8:419 (1998); McFadden and Barry, Semin. Virol. 8:429 (1998))。このプロセスはボックスウイルスゲノムが比較的大きく複雑であることにより促進される。ボックスウイルスとしては、例えばオルトボックスウイルス、例えばワクシニア、サル痘、牛痘、および天然痘(variola)ウイルス(例えば痘瘡(smallpox)ウイルス)、レポリボックスウイルス、例えば粘液腫ウイルスおよびショープ線維腫ウイルス、モルスキボックス(例えば伝染性軟属腫)、ヤタボックスウイルス(例えばヤバ様疾患ウイルス)、パラボックスウイルス(例えばORFウイルス)が挙げられる。例として、天然痘ワクチンとして広く使用されている原型ボックスウイルスであるワクシニアウイルスは、ゲノムが約190キロ塩基対であり、これは200を超えるタンパク質をコードすると考えられる(Goebelら, Virology 179:247 (1990))。ワクシニアウイルスおよび他種のボックスウイルスの全ゲノムが配列決定されているが、多数の可能性のあるオープンリーディングフレーム(ORF)の機能、および該ORFによりコードされるポリペプチドの存在は未だに不明である。

30

【0048】

ウイルスのゲノム、例えばラージDNAゲノム含有型ウイルス(ボックスウイルスなど)の多数のORFのうちでウイルスのビルレンス因子をコードする配列を同定するためにウイルスゲノム内のポリヌクレオチド配列を迅速に調べることは、治療標的となる細胞性ポリペプチドを同定するための本明細書に記載の方法に有用である。特定の実施形態では、ウイルス、例えばボックスウイルスのゲノムを解析して、ウイルスのビルレンスに寄与するウイルス性ポリペプチドをコードするウイルスゲノム内のポリヌクレオチド配列を同定する。かかるウイルス性ポリペプチドは、少なくとも1つ(すなわち1以上)のビルレンス特性またはビルレンス形質を示す。

40

【0049】

ウイルスのビルレンス因子の典型的なビルレンス形質としては、ウイルスのビルレンス

50

因子を発現するウイルスに感染した宿主において観察される形質、または組織培養で増殖させた細胞において観察される形質が挙げられる。ウイルスのビルレンスに寄与するウイルス性ポリペプチドとしては、例えばそれがウイルス性ポリペプチドの生物学的活性を改変させる(例えば統計的に有意なまたは生物学的に有意な様式で減少させる)突然変異(自然淘汰または分子生物学分野の当業者が実施する種々の突然変異誘発技術の結果としての少なくとも1個のアミノ酸の置換、挿入、または欠失)を有する場合のように、それが変更されている場合のポリペプチドが含まれる。かかるウイルス性ポリペプチド変異体(または改変型ウイルス性ポリペプチド)が、変異型(または改変型)ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを含むウイルスに感染した細胞において発現されるとき、変異型(または改変型)ウイルス性ポリペプチドの発現はウイルスのビルレンスの低下と相関する。

10

#### 【0050】

また、ウイルスのビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドのビルレンス形質は、ウイルスに感染した細胞におけるウイルス性ポリペプチドの発現の不在と、ウイルスのビルレンスの低下との相関によって示される。ウイルス性ポリペプチドの発現の欠損とビルレンスの低下との相関は、ウイルス性ポリペプチドをコードする遺伝子を欠失させた、サイレンシングさせた(例えばウイルスに感染した細胞をアンチセンスポリヌクレオチドで処理することによる、または低分子干渉性RNA (siRNA)を用いるRNA干渉による)、またはノックアウトさせた組換えウイルスを細胞に感染させることにより観察できる。組織培養では、細胞に、対象の特定のウイルス性ポリペプチドの変異体を発現するまたは上記のウイルス性ポリペプチドを発現しないウイルスを感染させたときには、細胞の継代は悪影響を受けない可能性がある。宿主において、少なくとも1つのビルレンス形質を示すウイルス性ポリペプチドには、その発現が(例えばウイルス性ポリペプチドの生物学的活性を変更する少なくとも1つの変異の導入により、または発現の低下または発現の欠如により)変更されたときに、該変更された発現がビルレンスの低下(すなわち、疾患、および/または炎症の増加、および/または他のタイプの免疫応答の増加を引き起こすウイルスの能力の低下)と相関するウイルス性ポリペプチドが含まれる。すなわち、宿主は、変異型ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノム、または該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含まないゲノムを有するウイルスに対して増大した免疫応答性を有する。

20

#### 【0051】

ビルレンス形質はまた、ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを有するウイルスに感染した細胞中で発現された後の、該ウイルス性ポリペプチドの細胞中でのまたは細胞外での位置に関連している。感染細胞内で発現した後のウイルス性ポリペプチドは、細胞内の場所に残存してもよく、細胞外ドメインを有する膜貫通ポリペプチドであってもよく、または感染細胞により分泌されてもよい。感染細胞により分泌されるまたは細胞外ドメインを有するウイルス性ポリペプチドは、宿主の他の細胞と、または宿主の他の細胞に結合したもしくはそれにより分泌された他の分子と相互作用することによりウイルスのビルレンスに寄与する。かかる分子としては、限定するものではないが、細胞表面抗原、サイトカイン、ケモカイン、ホルモン、および宿主防御に寄与する他の分子が挙げられる。

30

#### 【0052】

ウイルスのビルレンスに寄与するウイルス性ポリペプチドは、典型的にはウイルスゲノムにおいて互いに近接した位置のポリヌクレオチド配列によりコードされる。したがって、ウイルス性ポリペプチドのビルレンス形質には、当該ポリペプチドが、ウイルスのビルレンスポリペプチドであることが当技術分野で知られているまたは本明細書に記載されるおよび当技術分野で実施される方法によりウイルスのビルレンスポリペプチドであることが決定された、少なくとも1つの他のポリペプチドをコードするゲノム領域に位置するポリヌクレオチド配列によりコードされることが含まれる。例えばボックスウイルスにおいて、ウイルスのビルレンスポリペプチドであるウイルス性ポリペプチドをコードする、ウイルスゲノム中に存在するポリヌクレオチド配列は、ウイルスゲノムの5'末端または3'末端の方に配置される。特定の場合には、ビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、ゲノムの5'末端または3'末端から1/3以内または

40

50

1 / 4 以内の位置に存在し得る(すなわち、かかるポリヌクレオチド配列は、ウイルスゲノムの5'末端または3'末端のいずれかの少なくとも20%、25%、30%、33%、または少なくとも35%以内に存在するヌクレオチドを含む)。

【0053】

したがって、本明細書においては宿主細胞に結合するウイルスのビルレンスポリペプチドであるウイルスビルレンス因子をも提供する。かかるウイルスビルレンス因子は、例えば以下のような形質(ビルレンス形質)を少なくとも1つ有するウイルス性ポリペプチドである：(a)ウイルスに感染した細胞におけるウイルス性ポリペプチドの変異体(または改変されたウイルス性ポリペプチド)の発現がウイルスのビルレンスの低下と相関すること、ただし該ウイルスは前記ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを有すること；(b)ウイルスに感染した細胞におけるウイルス性ポリペプチドの発現の不在がウイルスのビルレンスの低下と相関すること、ただし該ウイルスはウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを有すること；(c)前記ウイルス性ポリペプチドがウイルスに感染した細胞により分泌されること、ただし該ウイルスはウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを有すること；(d)前記ウイルス性ポリペプチドがウイルスのゲノムに存在するポリヌクレオチド配列によりコードされること、ここで該ポリヌクレオチド配列は少なくとも1つのウイルスビルレンス因子をコードするゲノム領域に位置すること；(e)前記ウイルス性ポリペプチドがウイルスのゲノムに存在するポリヌクレオチド配列によりコードされること、ここで前記ポリヌクレオチド配列はウイルスゲノムの5'末端または3'末端に位置すること；(f)前記ウイルス性ポリペプチドが少なくとも40アミノ酸からなること(これはシグナルペプチド配列を含んでもよい)。ビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドが細胞と相互作用する(細胞内にあるか、細胞膜に存在するか、または分泌される細胞性ポリペプチドと特異的に結合することを含む)と、該ウイルス性ポリペプチドは宿主細胞の少なくとも1つの生物学的活性を変更し、その結果宿主が該ウイルス性ポリペプチドをコードするゲノムを有するウイルスによる感染に対して増大した感受性(または感染に抵抗する能力の低下)を示すようになる。

【0054】

ウイルスのビルレンスポリペプチド(またはその変異体、誘導体もしくは断片)は、治療薬として使用することもできる。ある実施形態において、ウイルスのビルレンスポリペプチドまたはビルレンスポリペプチドを含む融合ポリペプチドは、それを必要とする患者または被験者の治療に使用することができる。ある特定の実施形態において、被験者は急性の免疫応答を示す、例えば非限定的な例として、被験者は急性呼吸促進症候群(ARDS)を示す。ウイルスビルレンスポリペプチド(またはその変異体、誘導体もしくは断片)に特異的な被験者による免疫応答の可能性または程度を低下させるか最小化するために、ウイルス性ポリペプチドを、限られた回数で投与したり、ウイルス性ポリペプチドの免疫原性が低下するように該ウイルス性ポリペプチドの翻訳後修飾を変更する様式で産生させたり誘導することができ、また、ウイルス性ポリペプチドの抗原性を低下させるか最小化する条件下で投与することができる。例えばウイルスのビルレンスポリペプチドは、免疫応答(特にウイルス性ポリペプチドに特異的な応答)を抑制する第2の組成物の被験者への投与の前に、それと同時に、またはその後に投与することができる。さらに、当業者は、治療薬(これには複数回投与することのない治療薬も含まれる)の有効性を高めうる、ポリペプチドの半減期を増大させるおよび/または薬物動態特性を改善する方法(例えば該ポリペプチドをペグ化することによる方法)を熟知している。

【0055】

ウイルスのビルレンスに寄与することの知られているウイルス性ポリペプチドは、典型的には長さにして少なくとも20、30、もしくは40アミノ酸、または長さにして少なくとも50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、250、300、もしくは400アミノ酸以上である。ビルレンス因子であるポリペプチドをコードし得るポリヌクレオチド配列をウイルスゲノムから同定するには、ゲノムの配列を調べて少なくとも20、30、40、50アミノ酸またはそれ以上(すなわち20、30、40、または50連続アミノ酸)についてのオープンリ

ーディングフレームを有する領域を同定する。特定の実施形態では、ポリヌクレオチド配列は、少なくとも40アミノ酸からなるポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む。本明細書に記載の方法により同定されたオープンリーディングフレームがコードするウイルス性ポリペプチドは、全長ウイルス性ポリペプチドであるか、または全長ポリペプチドの一部もしくは断片であり得る。特定の実施形態では、ウイルスビルレンスポリペプチドの断片は、全長ポリペプチドの少なくとも10、15、20、25、30、40、50またはそれ以上連続した(または隣接する)アミノ酸からなり、かつ細胞性ポリペプチドに結合することのできる断片である。

【0056】

ポリヌクレオチド配列は、シグナルペプチド配列および成熟ポリペプチドまたは全長成熟ポリペプチドの一部をコードするヌクレオチドを含みうる。シグナルペプチド(分泌タンパク質および細胞表面タンパク質が細胞内膜を通して最終的な局在位置へとトランスポケーションされることを促進する)は、かかるタンパク質のN末端に位置し、典型的には長さにして13~40アミノ酸である。シグナルペプチド配列を有するポリペプチドのことをプレ-プロテインとも言う。シグナルペプチドは通常はプレ-プロテインから切断されて成熟タンパク質をもたらす。シグナルペプチドは、特定の配列特性、またはシグナルペプチドを成熟ポリペプチド配列から区別するような他の特性を示す;シグナルポリペプチドのアミノ酸配列を決定する補助としてコンピュータプログラムを使用することができる(Zhangら, Protein Sci. 13:2819-24 (2004))。

【0057】

ウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の精査は、ウイルスゲノムあるいは推定上のウイルスゲノム、またはその任意の部分もしくは領域のポリヌクレオチド配列を、例えばコンピュータと適当なソフトウェアプログラムを用いて、スキャンングすることにより行うことができる。ウイルスゲノムまたはウイルスゲノムの一部のポリヌクレオチド配列は、容易に利用可能なコンピュータプログラムを用いて6つのオープンリーディングフレーム(フォワードが3つおよびリバースが3つ)に翻訳することができる。ソフトウェアプログラムとしては、市販のプログラム、または注文設計により作成されるプログラムが含まれる。次にこの6つのオープンリーディングフレームを、さらなるコンピュータソフトウェアプログラムを用いてまたは用いないで精査し、少なくとも20、30、または40アミノ酸をコードするオープンリーディングフレームを有する位置をウイルスゲノム中で同定することができる。

【0058】

オープンリーディングフレームによりコードされるウイルス性ポリペプチドは、本明細書に記載のウイルスの全長ビルレンスポリペプチドまたはウイルスビルレンスポリペプチドの断片もしくは一部であり、治療標的である細胞性ポリペプチドを同定するために使用することができる。少なくとも20個連続した(または隣接する)アミノ酸、少なくとも30もしくは少なくとも40アミノ酸または少なくとも50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200またはそれ以上(または記載した範囲の任意の整数)のアミノ酸を含むウイルス性ポリペプチドの断片もしくは部分は、アフィニティタグに結合または融合させることができる。本明細書に記載の方法に有用なウイルス性ポリペプチドの断片もしくは部分としては、膜ポリペプチドであるウイルス性ポリペプチドの細胞外部分、または少なくとも1つの結合ドメインを含むウイルス性ポリペプチドの一部が挙げられる。

【0059】

ウイルスビルレンスポリペプチドまたは細胞性ポリペプチドまたは本明細書に記載の他のポリペプチドについてのタンパク質(またはポリペプチド)ドメインとは、構造的および/または機能的に規定または記載することのできるポリペプチドまたはタンパク質の領域を言う。例えばポリペプチドのドメインは、酵素のモチーフまたは領域、(リガンドまたは特異的結合抗体の)結合ドメイン、位置(例えば細胞外ドメインもしくは細胞内ドメイン)、および独立して折り畳まれた構造単位、ならびに当技術分野で理解される他の定義を表しうる。ポリペプチド中のドメインの存在は、既知のまたは類似のドメインとの配列類

似性を決定するために一次配列を調べるにより決定することができ、または容易に入手可能なコンピュータプログラム、例えばPROSITE、BLOCKS、PRINTS、DOMAK、およびPFAM（また例えばSiddiquiら、Protein Science 4:872-884 (1995)を参照されたい）を用いて決定する（もしくはドメインの存在の可能性を決定する）ことができる。

#### 【0060】

本明細書に記載のウイルス性ポリペプチドには、ウイルス性ポリペプチドの変異体も含まれる。ウイルス性ポリペプチド変異体としてはウイルス株変異体または他の変異体が挙げられる。変異体は、自然多型から生じることもあり、または組換え法（例えば特定の宿主での発現のためのコドン最適化を得るため、またはアミノ酸変異を導入するため）もしくは化学合成により合成することもでき、1以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失により野生型ポリペプチドと異なり得る。本明細書に記載のように同定されたウイルス性ポリペプチドの変異体は、ウイルスゲノムによりコードされるアミノ酸配列に対して少なくとも70%～100%のアミノ酸同一性（つまり、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一性）を有する。好ましくは少なくとも1つのアミノ酸の置換、欠失、または挿入を有するウイルス性ポリペプチドの変異体は、同じ生物学的活性（少なくとも1つの細胞性ポリペプチドに結合する能力を含む）を保持する。1以上の置換を有するウイルス性ポリペプチド変異体は、好ましくは野生型ポリペプチド配列と比較して保存的置換を有する。

#### 【0061】

保存的置換とは、あるアミノ酸が類似の特性、すなわちペプチド化学の当業者によりポリペプチドの二次構造と水に対する特性が実質的に変わらないと予測されるような類似の特性を有する別のアミノ酸で置換されることである。アミノ酸置換は、一般に残基の極性、荷電、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性特性の類似性に基づいて行うことができる。例えば負に荷電したアミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる；正に荷電したアミノ酸としてはリシンおよびアルギニンが挙げられる；また、同様の親水性値の非荷電の極性頭部基を有するアミノ酸としては、ロイシン、イソロイシンおよびバリン；グリシンおよびアラニン；アスパラギンおよびグルタミン；ならびにセリン、トレオニン、フェニルアラニンおよびチロシンが挙げられる。保存的置換の例としては、ある脂肪族アミノ酸を別の脂肪族アミノ酸（イソロイシン、バリン、ロイシン、またはアラニンなど）で置き換えること、またはある極性残基を別の極性残基で置き換えること（例えばリシンとアルギニン間、グルタミン酸とアスパラギン酸間、またはグルタミンとアスパラギン間の置換）が挙げられる。類似アミノ酸または保存的アミノ酸置換とは、あるアミノ酸残基を類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換える置換でもあり、これには塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）；酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）；非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、ヒスチジン）；非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）；分枝側鎖（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン）を有するアミノ酸が含まれる。比較的分類しにくいとされるプロリンは、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（例えばLeu、Val、Ile、およびAla）と特性が似ている。特定の状況では、グルタミンをグルタミン酸で、またはアスパラギンをアスパラギン酸で置き換えることは、グルタミンとアスパラギンがそれぞれグルタミン酸とアスパラギン酸のアミド誘導体であるという点に置いて類似置換と見なすことができる。変異体はさらに、あるいはこれとは別に、ウイルス性ポリペプチドの特性（結合特性を含む）に悪影響を及ぼさない非保存的变化を含みうる。

#### 【0062】

変異体はさらに（あるいは代わりに）、例えばポリペプチドの活性に最小限の影響しか与えないアミノ酸の欠失または付加により改変されうる。特に、変異体はアミノ末端および/またはカルボキシ末端において追加のアミノ酸配列を有しうる。かかる配列は、例えばポリペプチドの精製または検出を促進するために利用できる。



## 【0063】

ウイルスのビルレンスポリペプチド、その断片、一部、または変異体をコードするポリヌクレオチド配列は、ウイルスゲノムで同定されたポリヌクレオチド配列を含み、また、遺伝子コードの縮重のためゲノム配列と異なるポリヌクレオチド変異体を含む。ポリヌクレオチド変異体はまた、本明細書に記載のウイルスビルレンスポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

## 【0064】

当業者は、ポリペプチド変異体を調製するにあたり、当業者が通常用いる種々の突然変異誘発技術のいずれかを用いて、ポリヌクレオチド配列に変異を容易に導入することができる。突然変異は、天然型配列の断片へのライゲーションを可能にする、制限部位が両側にある突然変異配列を有するオリゴヌクレオチドを合成することにより、特定の遺伝子座に導入することができる。ライゲーション後に得られる再構築配列は、所望のアミノ酸の挿入、置換または欠失を有する誘導体または変異体をコードする。

## 【0065】

あるいはまた、オリゴヌクレオチドにより特定される部位特異的(またはセグメント特異的)突然変異誘発法を用いて、置換、欠失または挿入により変更された特定のコドンを含む改変型ポリヌクレオチドを用意することができる。上記の改変を行うための典型的な方法は、Walderら (Gene 42:133, 1986); Bauerら (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smithら (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); およびSambrookら (上記)に開示されている。所望の欠失に隣接する都合のよい制限エンドヌクレアーゼ部位を利用することにより、ウイルスのビルレンスポリペプチドの欠失誘導体またはトランケーション誘導体(例えば可溶性の細胞外部分)を構築することもできる。制限の後に、突出部分を埋め、DNAを再度ライゲーションさせることができる。上記のような改変を行うための典型的な方法の例は、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001))に開示されている。

## 【0066】

ポリヌクレオチドに導入される突然変異は、コード配列のリーディングフレームを保存することが好ましい。さらに、突然変異は、転写されたときに、mRNAの翻訳に悪影響を及ぼすと考えられる二次mRNA構造(例えばループまたはヘアピン)を生じるようにハイブリダイズする相補的な領域を生成させないことが好ましい。突然変異部位を予め決定することはできるが、該突然変異の性質それ自体を予め決定する必要はない。例えばランダム突然変異誘発を標的コドンに行い、発現した変異体を生物学的活性の獲得、喪失、または保持についてスクリーニングすることができる。あるいは突然変異は、天然配列の断片へのライゲーションを可能にする制限部位が両側にある変異型配列を有するオリゴヌクレオチドを合成することにより、特定の遺伝子座に導入することができる。ライゲーション後に得られる再構築配列は、所望のアミノ酸の挿入、置換または欠失を有する誘導体をコードする。本明細書に記載のウイルスビルレンスポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸分子はまた、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)突然変異誘発、化学的突然変異誘発(Drinkwater and Klinedinst, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3402-3406, 1986); 強制ヌクレオチド誤組込み(例えばLiao and Wise Gene 88:107-111, 1990); またはランダムに突然変異させたオリゴヌクレオチドの使用(Horwitzら, Genome 3:112-117, 1989)などといった技術を用いて構築することができる。

## 【0067】

2以上のウイルス性ポリヌクレオチドならびにそれがコードするポリペプチドおよび変異体の、それぞれヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、任意の標準的なソフトウェアプログラム、例えばBLAST、tBLAST、pBLAST、またはMegAlignを用いて比較することができる。さらにその他のものとしては、DNASTAR社(登録商標)(Madison, Wisconsin)が作製したLasergeneバイオインフォマティックスコンピュータソフトウェア一式に提供されるプログラム; CLUSTALWプログラム(Thompsonら, Nucleic Acids Res. 22:4673-80 (1994))などがある。

1)) ; および「GeneDoc」(Nicholasら, EMBNEW News 4:14 (1991))が挙げられる。ALIGN またはBLASTなどのアルゴリズムの文献は例えばAltschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; またはHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992に見出せる。BLASTはNCBIのウェブサイトから入手することができる。かかるアルゴリズムとしてはAlignまたはBLASTアルゴリズムが挙げられ(例えばAltschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992を参照されたい)、これらもNCBIウェブサイトで入手することができる([オンライン]インターネットのncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLASTを参照されたい)。デフォルトパラメーターを使用してもよい。最適アライメントを決定することにより2種のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を比較するための他の方法は、当業者によって実施されている(例えばPeruski and Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wuら(編), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," in Methods in Gene Biotechnology, 123-151頁 (CRC Press, Inc. 1997); およびBishop (編), Guide to Human Genome Computing, 第2版(Academic Press, Inc. 1998)を参照されたい)。

10

#### 【0068】

本明細書において用いる「同一性パーセント」とは、ウイルス性ポリペプチド(すなわち少なくとも1つのビルレンス形質を示すウイルス性ポリペプチドであるウイルスのビルレンスポリペプチド)またはその断片もしくは変異体の配列を、コンピュータ実行アルゴリズムを使用し、典型的にはデフォルトパラメーターを用いて、テスト配列と比較することにより得られるパーセント値である。変異型ポリペプチドは、種々の突然変異、例えば点突然変異、フレームシフト突然変異、ミスセンス突然変異、付加、欠失などを1以上含むように作製することができ、または変異体は修飾、例えば特定の化学置換基による修飾(これにはグリコシル化、アルキル化なども含まれる)の結果生じるものでありうる。本明細書において用いる、2種のペプチドまたはポリペプチド間の「類似性」は、一般に、あるペプチドまたはポリペプチドのアミノ酸配列を、第2のペプチドまたはポリペプチドのアミノ酸配列およびその保存されたアミノ酸置換体と比較することにより決定する。

20

#### 【0069】

ウイルスのビルレンスポリペプチドも含め、ウイルス性ポリペプチドは、当技術分野で用いられる化学合成法(自動化手法による合成を含む)により、該ポリペプチドを化学合成して調製することができる。ポリペプチドの自動合成装置はPerkin-Elmer社, Applied BioSystems Division (Foster City, CA)などの業者から市販されており、業者の説明書にしたがい稼働させることができる。かかるポリペプチドは、市販の固相技術のいずれか、例えばMerrifield固相合成法を用いて、合成することができ、この方法では成長するアミノ酸鎖にアミノ酸が逐次的に付加される(例えばMerrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963)を参照されたい)。例えばポリペプチドは、N- (9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)またはtert-ブトキシカルボニル(tBoc)-保護ストラテジーを用いて、ヘキサフルオロリン酸2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム(HATU)またはヘキサフルオロリン酸2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム(HBTU)をカップリング剤として使用し、合成することができる(例えばSchnoelzerら, Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180-193 (1992); Hackengら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7845-50 (1997)を参照されたい)。粗製のポリペプチドは、分取逆相クロマトグラフィーを用いてさらに精製することができる。他の精製方法、例えば分画クロマトグラフィー、ゲル濾過、ゲル電気泳動、またはイオン交換クロマトグラフィーを使用してもよい。さらにD-アミノ酸またはL-アミノ酸およびその組み合わせを含め、あらゆる天然アミノ酸またはその誘導体を用いることができる。特定の実施形態では、合成ウイルス性ポリペプチドは、ウイルスゲノムによりコードされるアミノ酸配列と同一であるか、または少なくとも80%同一である(これには少なくとも85%、90%、もしくは95%または80%~100%の間の任意のパーセントが含まれる)アミノ酸配列を有する。

30

40

#### 【0070】

50

あるいはまた、ウイルスのビルレンスポリペプチドは、本明細書に記載のおよび／または当技術分野で通常用いられる組換え発現方法により調製することができ、このときウイルス性ポリペプチドまたはウイルス性ポリペプチドを含む融合タンパク質は、核酸発現構築物中の発現制御配列(例えばプロモーター、エンハンサー、転写開始部位)に機能的に連結されたポリヌクレオチドから発現される。本明細書に詳述するウイルス性ポリペプチドおよびウイルス性ポリペプチドを含む融合ポリペプチドは、かかるポリペプチドをコードする任意のポリヌクレオチドを含むベクターおよび構築物、特に組換え発現構築物を用いて発現させることができる。宿主細胞をベクターおよび／または構築物で遺伝的に操作して、こうしたポリペプチドおよび融合タンパク質、またはその断片もしくは変異体を組換え技術により産生させる。本明細書に記載の各々のポリペプチドおよび融合ポリペプチドは、適当なプロモーターの制御下で、哺乳動物細胞、酵母、細菌または他の細胞内で発現させることができる。DNA構築物から誘導されたRNAを使用し、無細胞翻訳系を用いてかかるタンパク質を産生させることもできる。原核性および真核性の宿主用の適当なクローニングベクターおよび発現ベクターは、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor, New York, (2001)に記載されている。

10

#### 【0071】

##### 細胞および細胞性ポリペプチド

疾病過程のエフェクターによって何らかの方法で影響される細胞性ポリペプチド、または該エフェクターである細胞性ポリペプチドを同定するための方法をここに記載する。細胞性ポリペプチドの生物学的活性を少なくとも1つ(すなわち1以上)変更すること(統計的に有意にまたは生物学的に有意に増加または減少させること)により、疾病過程を抑制する、消失させる、遅延させる、または妨害することができ、それにより、罹患した宿主の疾患または障害が治療および／または予防され、あるいは／または、該疾患または障害の少なくとも1つの症状が抑制、軽減、または消失される。

20

#### 【0072】

本明細書に記載するように、ウイルス、例えばボックスウイルスは、感染中に発現されるタンパク質をコードしており、該タンパク質は1以上の細胞性分子と相互作用することにより宿主免疫系を回避するおよび／または宿主免疫系を抑制するウイルスの能力に寄与している。こうしたウイルス性ポリペプチドは、限定するものではないが、細胞表面抗原、細胞表面受容体、サイトカイン、ケモカイン、サイトカインまたはケモカイン結合タンパク質、細胞内シグナリングポリペプチド、または細胞表面受容体もしくはシグナル伝達分子の基質、および免疫応答に影響を及ぼしそれを調節する他の免疫調節分子を含む細胞性ポリペプチドと相互作用する(例えば米国特許第5,359,039号、米国特許第6,852,486号、米国特許第5,871,740号、米国特許第6,843,991号、米国特許第6,355,252号を参照されたい)。

30

#### 【0073】

細胞性ポリペプチドは、インタクトな細胞、細胞画分、および／または細胞上清を含む生物学的サンプルを用いて、本明細書に記載の方法にしたがい同定することができる。本明細書において用いる「生物学的サンプル」とは、特定の実施形態において、少なくとも1つの細胞または細胞の画分または細胞の上清を含むサンプルを言う。生物学的サンプルは、血液サンプル(ここから血清または血漿を調製することができる)、生検標本、体液(例えば肺洗浄液、腹水、粘膜洗浄液、滑液)、骨髓、リンパ節、組織移植片、臓器培養物、または被験者もしくは生物学的供給源からの任意の他の組織もしくは細胞調製物であり得る。

40

#### 【0074】

被験者または生物学的供給源は、ヒトまたは非ヒト動物、初代細胞培養物(例えば免疫細胞、ウイルス感染細胞)、または培養適合細胞株(染色体に組み込まれたまたはエピソーム性の組換え核酸配列を含んでもよい遺伝子操作細胞株、不死化されたまたは不死化可能な細胞株、体細胞ハイブリッド細胞株、分化したまたは分化可能な細胞株、形質転換細胞株などを含むが、これらに限らない)とすることができる。種々の正常細胞および腫瘍

50

細胞タイプを用いてウイルスのビルレンスポリペプチドと結合するまたは相互作用する細胞性ポリペプチドを同定することができ、このような細胞としては、B細胞およびT細胞(活性化または非活性化)、マクロファージ、上皮細胞、線維芽細胞、ならびにRaji(B細胞リンパ腫)、THP-1(急性単球性白血病)、およびJurkat(T細胞リンパ腫)のような細胞株が挙げられる。本明細書に記載の方法に有用な細胞は免疫細胞であり、これにはT細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージなどが含まれる。免疫細胞は、本明細書に記載の生物学的サンプル中に存在するか、またはそれから単離することができる。例えば、免疫細胞または任意の他の細胞は、初代もしくは長期細胞培養から得ることができ、または被験体(ヒトまたは非ヒト動物)から得られた生物学的サンプル中に存在するか、またはそれから単離することができる。

10

#### 【0075】

サンプルはさらに、形態学的完全性または物理的状态が、例えば下記的手段により破壊された組織または細胞調製物を意味する：切開、解離、可溶化、分画化、ホモジェナイズ、生化学的もしくは化学的抽出、粉状化、凍結乾燥、超音波処理、またはその組み合わせ、あるいは被験者または生物学的供給源に由来するサンプルを処理するための他の手段。かかる細胞調製物としては、本明細書に記載の方法に用いることのできる細胞溶解物または細胞抽出物などの細胞画分が挙げられる。細胞画分には、細胞由来の1以上の分離されたオルガネラの調製物も含まれる。細胞オルガネラとしては、限定するものではないが、核、ミトコンドリア、核小体、中心小体、中心体、ゴルジ体、細胞骨格、サイトゾル、分泌小胞、リソソーム、ペルオキシソーム、液胞、細胞膜、および小胞体が挙げられる。細胞画分にはまた、複雑な多分子構造体、例えば脂質ラフトおよび他の転送および輸送複合体も含まれる。細胞画分および単離された細胞オルガネラは、当技術分野で通常使用される方法により調製することができる。

20

#### 【0076】

本明細書に記載するように、ウイルスのビルレンスポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドには、細胞により分泌される細胞性ポリペプチドが含まれる。したがって、例えば細胞洗浄液、細胞培地、または馴化培地(すなわち、細胞が細胞性ポリペプチドを分泌するのに十分な期間にわたり増殖させた培養中の細胞からの培地)、または任意の他の細胞外調製物を含めた、細胞上清を本明細書に記載の方法に使用することができる。血液、血清、血漿、脳脊髄液、または本明細書に記載の他の体液のような生物学的サンプルは、ウイルス性ポリペプチドが結合する1以上の細胞性ポリペプチドを含むことがあり、細胞により分泌されるか、または正常もしくは異常な細胞死を含む他のプロセスを介して細胞から放出される細胞性ポリペプチドの存在を検出するための供給源として使用することができる。

30

#### 【0077】

特定の実施形態では、本明細書に詳述するように、細胞または細胞画分もしくは上清を、アフィニティタグに融合したウイルス性ポリペプチドを含む融合タンパク質と接触させる前に、それと同時に、またはその後、細胞を刺激する。細胞は、少なくとも1種の刺激、少なくとも2種の刺激、または2種を超える異なる刺激を用いて刺激することができる。典型的な刺激としては、細胞により発現されるコグネイト抗原(例えば細胞表面マーカー抗原または細胞表面受容体)に特異的に結合する抗体；ホルボールエステル(これは遺伝子発現をモジュレートし、細胞骨格を再編成し、かつ/または大量タンパク質合成を刺激する)(例えばホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA))、ならびに他のマイトジェン(例えばコンカナバリンAおよび他のレクチン、リボ多糖、フィトヘマグルチニン(PHA)、ポークウィードマイトジェン(PWM)、インスリン、ポリペプチド増殖因子)、サイトカイン、ケモカイン、およびイオノマイシンが挙げられる。特定の実施形態では、細胞を少なくとも2種の薬剤の組み合わせ、例えばPMAとイオノマイシンまたはPWMとインスリンに曝露することができる。

40

#### 【0078】

ウイルス性ポリペプチド/細胞性ポリペプチド複合体の検出

50

本明細書に記載するように、ウイルスのビルレンスポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法であって、細胞性ポリペプチドの供給源(例えば細胞、細胞画分、または細胞上清)と、ウイルス性ポリペプチドとを、該ウイルス性ポリペプチドが該細胞性ポリペプチドと複合体を形成するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させること(混合すること、組み合わせること、または何らかの様式で相互作用させること)を含む、前記方法を提供する。次いでウイルス性ポリペプチド/細胞性ポリペプチド複合体を検出および/または単離することができる。特定の実施形態では、ウイルス性ポリペプチドはアフィニティタグと融合しており、融合タンパク質を形成する。かかる融合タンパク質は、細胞性ポリペプチドの精製および/または単離のためのタンデムアフィニティ精製などの方法に使用することができる。細胞性ポリペプチドの正体は、当技術分野で使用され本明細書に記載される種々の方法、例えばLC-MS/MSなどにより決定することができる。

10

#### 【0079】

##### 融合タンパク質：アフィニティタグに融合させたウイルス性ポリペプチド

ある実施形態において、ウイルスのビルレンスポリペプチド(またはその断片)は、アフィニティタグと融合しており、これは細胞性ポリペプチドを同定するための本明細書に記載の方法に使用することができる。アフィニティタグは、当技術分野で用いられる方法にしたがい、少なくとも1つのポリペプチドタグおよび/または少なくとも1つの検出可能な成分(または標識もしくはレポーター分子)、例えば酵素、細胞毒性薬剤、または他のレポーター分子、例えば色素、放射性核種、発光団、蛍光団、またはビオチンなどを含みうる。ポリペプチドの放射性標識技術は当技術分野で知られている(例えばAdams, *In Vivo* 12:11-21 (1998); Hiltunen, *Acta Oncol.* 32:831-9 (1993)を参照されたい)。検出可能な成分は、例えば該ポリペプチドに存在する利用可能なアミノ酸側鎖、末端アミノ酸、または炭水化物官能基を介して、ウイルス性ポリペプチドまたはポリペプチドタグに結合されるが、このとき該結合または結合法が分子の有用性を消失させるように結合特性に悪影響を及ぼすものではないことを条件とする。特に官能基としては、例えば遊離のアミノ基、イミノ基、チオール基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、またはアルデヒド基が挙げられる。ポリペプチド(ウイルス性ポリペプチド、またはアフィニティタグのポリペプチドタグ部分)および検出可能な成分の結合は、かかる官能基および検出可能な成分中の適当な官能基を介して達成されうる。連結は直接または間接的(スパーシング基もしくはは架橋基を介する)であってよい(例えば国際特許出願公開番号WO 93/06231、WO 92/22583、WO 90/091195、およびWO 89/01476を参照されたい; また、例えばPierce Biotechnology社、Rockford、ILなどの業者を参照のこと)。

20

30

#### 【0080】

ポリペプチドタグを有するアフィニティタグは、当業者が熟知している種々の技術によりウイルス性ポリペプチドに結合させることができる。ウイルス性ポリペプチドとアフィニティタグを含む融合タンパク質は、細胞性ポリペプチドに結合したときに、例えば以下の方法や技術により検出、同定または単離されうる: ポリペプチドタグと検出可能なコグネイト結合分子(すなわちコグネイトリガンド)との相互作用、検出可能な成分(例えば標識成分)による融合タンパク質の直接共有結合的修飾、融合タンパク質の特定の標識化レポーター分子への非共有結合的結合、酵素活性を有する成分を含む融合タンパク質による検出可能な基質の酵素的改変、または融合タンパク質の固相支持体上への(共有結合または非共有結合による)固定化。アフィニティタグのコグネイトリガンド(ポリペプチドタグのコグネイトリガンドを含む)は、ポリペプチドタグと相互作用して複合体を形成することのできる分子である。コグネイトリガンドの例としては、限定するものではないが、ポリペプチドタグに特異的に結合する抗体(またはそのフラグメントもしくは誘導体)、小分子、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ホルモン、細胞受容体ポリペプチド(またはその断片もしくはドメイン)、細胞表面抗原、またはポリペプチドタグが結合する他の細胞性分子が挙げられる。ウイルス性ポリペプチドは、当技術分野で記載され当業者が通常用いる方法にしたがい、望ましいアフィニティ特性を有するペプチドタグのような別のポ

40

50

リペプチドに融合することができる(例えば米国特許第5,100,788号; WO 89/03422; 米国特許第5,489,528号、米国特許第5,672,691号; WO 93/24631; 米国特許第5,168,049号、米国特許第5,272,254号; EP 511,747を参照されたい)。

#### 【0081】

特定の実施形態では、ウイルスのビルレンスポリペプチドに結合しているアフィニティタグは、少なくとも1つのポリペプチドタグを含む; 特定の他の実施形態では、アフィニティタグは少なくとも2、3、または4以上のポリペプチドタグを含む。ポリペプチドタグの例としては、限定するものではないが、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリン ムテインFcポリペプチド、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ポリペプチド(またはそのドメインもしくはペプチド)、プロテインCタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド(またはその断片)、プロテインA断片(例えばIgG結合ZZポリペプチド)、およびSoftag<sup>TM</sup>ペプチドが挙げられる。さらなるアフィニティタグとしては、ポリヒスチジンタグ(hisタグ)またはFLAG(登録商標)エピトープタグ(DYKDDDDK、配列番号20)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、GST、またはXPRESS<sup>TM</sup> エピトープタグ(DLYDDDDK、配列番号21; (Invitrogen社, Carlsbad, CA)などが挙げられる(例えば米国特許第5,011,912号; Hoppら, Bio/Technology 6:1204 (1988)を参照されたい)。アフィニティ配列はベクターにより供給され、例えばヘキサヒスチジンタグはpBAD/His (Invitrogen社)により提供される。あるいはまた、アフィニティ配列は、合成的に付加したり、または核酸コード配列を組換えにより作製するために使用するプライマーに(例えばポリメラーゼ連鎖反応を用いて)組込むことができる。

10

20

#### 【0082】

ある実施形態において、少なくとも1つのポリペプチドタグはFcポリペプチドである。特定の実施形態では、Fcポリペプチドはヒト起源であり、どのような免疫グロブリンクラス、例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、またはIgA由来であってもよい。特定の実施形態では、FcポリペプチドはヒトIgG1免疫グロブリン由来である(Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest、第4版、(U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, 1991)を参照されたい)。別の実施形態において、Fcポリペプチドは非ヒト動物、例えば限定するものではないが、マウス、ラット、ウサギ、またはハムスター由来のFcポリペプチドのアミノ酸配列を含みうる。Fcポリペプチドの結合パートナー(またはコグネイトリガンド)としては、例えばプロテインA(または免疫グロブリンFcポリペプチドに結合するプロテインAの少なくとも1つのドメイン); プロテインG; 特定の生物種に由来するFcポリペプチドと特異的に結合する抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体(例えば、特定の生物種由来の、特定のクラスまたはアイソタイプのFcポリペプチドと特異的に結合する抗体、例えばヒトIgG1 Fcポリペプチドと特異的に結合する抗体)が挙げられる。Fcポリペプチドを含むアフィニティタグを有する融合タンパク質は、例えば融合タンパク質が細胞性ポリペプチドと複合体を形成したときに該複合体を本明細書に記載のまたは当技術分野で知られているFcポリペプチド結合パートナーまたはリガンドのいずれか1つと接触させることにより、同定、検出または単離することができる。

30

#### 【0083】

ヒトおよび種々の生物種に由来するFcポリペプチドのアミノ酸配列は当技術分野で入手可能であり、例えばKabatら (Sequences of Proteins of Immunological Interest、第4版(U.S. Dept. of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, 1991))より入手可能である。一例として、本明細書に記載の融合タンパク質のFcポリペプチドタグは、ヒト免疫グロブリン、例えばIgG1のヒンジ領域、CH2ドメイン、およびCH3ドメインの全部または一部のアミノ酸配列を含み得る。Fcポリペプチドは第2のFcポリペプチドと相互作用し、共有結合(例えばジスルフィド結合の形成)および非共有結合相互作用を介して二量体を形成することができる。

40

#### 【0084】

本明細書に記載のFcポリペプチドには、Fcポリペプチド変異体も含まれる。かかるFcポ

50

リペプチド変異体の1種は、鎖間ジスルフィド結合を形成する1個以上のシステイン残基(例えばヒンジ領域における1個以上のシステイン残基)が別のアミノ酸、例えばセリンで置換されており、Fcポリペプチドを形成する2つの重鎖定常領域ポリペプチド間に形成され得る鎖間ジスルフィド結合の数が減っている。さらに、またはこれとは別に、典型的には免疫グロブリン分子中の軽鎖定常領域とジスルフィド結合を形成するヒンジ領域の最もアミノ末端のシステイン残基を欠失または置換(例えばセリン残基で置換)することができる。Fcポリペプチド変異体の別の例は、Fcポリペプチドのエフェクター機能のレベルが低下するようにエフェクター機能に関与する1個以上のアミノ酸が置換または欠失された変異体である。例えばFc領域中のアミノ酸を置換することにより、補体カスケードの成分の結合を低下もしくは排除したり(例えばDuncanら, *Nature* 332:563-64 (1988); Morganら, *Immunology* 86:319-24 (1995)を参照されたい)、または免疫細胞により発現されるIgG Fc受容体に結合するFcフラグメントの能力を低下もしくは無効化したり(Winesら, *J. Immunol.* 164:5313-18 (2000); Chappelら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9036 (1991); Canfieldら, *J. Exp. Med.* 173:1483 (1991); Duncanら, 上記);または抗体依存性細胞傷害性を変更したりすることができる。野生型Fcポリペプチドと異なる、このようなFcポリペプチド変異体のことを本明細書では、ムテインFcポリペプチドとも言う。

10

#### 【0085】

ある実施形態において、ウイルスのビルレンスポリペプチド(またはその断片もしくは変異体)は、野生型Fc領域ポリペプチドにおいてFcポリペプチドまたは免疫グロブリンの1以上のIgG Fc受容体(特定の免疫細胞上に発現される)への結合に寄与する残基が少なくとも1つ置換されたFcポリペプチドと、インフレイムで融合される。かかるムテインFcポリペプチドは、ムテインFcポリペプチドのCH2ドメイン中の少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を有し、その結果、IgG Fc受容体(例えば免疫細胞の表面に存在するIgG Fc受容体)に結合する融合ポリペプチドの能力が低下する。

20

#### 【0086】

背景として、ヒト白血球上では3種の異なるタイプのFc IgG-受容体が発現されており、これらは構造および機能的な特性、ならびに抗原構造により識別可能である(この差異はCD特異的モノクローナル抗体により検出される)。これらのIgG Fc受容体はFc RI (CD64)、Fc RII (CD32)、およびFc RIII (CD16)と呼ばれており、これらは互いに重複するサブセットの白血球上に示差的に発現される。

30

#### 【0087】

Fc RI (CD64)は、単球、マクロファージ、好中球、骨髄前駆細胞、および樹状細胞上に発現される高親和性受容体であり、アイソフォームIaおよびIbを含む。Fc RII (CD32)は、IIa、IIb1、IIb2、IIb3、およびIIcのアイソフォームを含み、最も広く分布しているヒトFc Rタイプの低親和性受容体である。これはほとんどのタイプの血液白血球、ならびにランゲルハンス細胞、樹状細胞、および血小板上に発現される。Fc RIII (CD16)には2つのアイソフォームがあり、そのいずれもヒトIgG1およびIgG3に結合することができる。Fc RIIIaアイソフォームはIgGに対して中程度の親和性を有し、マクロファージ、単球、ナチュラルキラー(NK)細胞、およびT細胞サブセット上に発現される。Fc RIIIbはIgGに対する低親和性受容体であり、好中球上に選択的に発現される。

40

#### 【0088】

IgG Fc受容体結合に寄与するCH2ドメインのアミノ末端部分の残基には、位置Leu234-Ser239の残基が含まれる(Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-Ser(配列番号22)(EUナンバリングシステム、Kabatら, 上記)(例えばMorganら, *Immunology* 86:319-24 (1995)およびそこに引用されている参考文献を参照されたい)。これらの位置は、典型的なヒトIgG1 Fcポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号25)の位置15-20に対応する。CH2ドメイン中のこれら6つの位置の1以上(すなわち1、2、3、4、5、または6つ全て)のアミノ酸の置換は、1以上のIgG Fc受容体(またはそのアイソフォーム)に結合するFcポリペプチドの能力の低下をもたらす(例えばBurtonら, *Adv. Immunol.* 51:1 (1992); Huletら, *Adv. Immunol.* 57:1 (1994); Jefferisら, *Immunol. Rev.* 163:59 (1998); Lundら, *J. Immunol.* 147:265

50

7 (1991); Sarmayら, Mol. Immunol. 29:633 (1992); Lundら, Mol. Immunol. 29:53 (1992); Morganら, 上記を参照されたい)。EU 位置234-239における1以上のアミノ酸の置換に加えて、この領域(位置239のカルボキシ末端側または位置234のアミノ末端側のいずれか)に隣接する1、2、または3個またはそれ以上のアミノ酸が置換されていてもよい。

【0089】

一例として、位置235のロイシン残基(これは配列番号25の位置16に対応する)をグルタミン酸残基またはアラニン残基で置き換えると、Fc RIに対する免疫グロブリン(例えばヒトIgG3)の親和性が、それぞれ消失または低減する(Lundら, 1991、上記; Canfieldら, 上記; Morganら, 上記)。別の例として、位置234および235のロイシン残基(これは配列番号25の位置15および16に対応する)を、例えばそれぞれアラニン残基で置き換えると、Fc RIIaへの免疫グロブリンの結合が消失する(例えばWinesら, 上記を参照されたい)。あるいは、位置234のロイシン(配列番号25の位置15に対応する)、位置235のロイシン(配列番号25の位置16に対応する)、および位置237のグリシン(配列番号25の位置18に対応する)を、それぞれ異なるアミノ酸で置き換えることができ、例えば位置234のロイシンをアラニン残基(L234A)で、位置235のロイシンをアラニン残基(L235A)またはグルタミン酸残基(L235E)で、位置237のグリシン残基を別のアミノ酸、例えばアラニン残基(G237A)で置き換えてもよい。

【0090】

ある実施形態において、ウイルスのビルレンスポリペプチド(またはその変異体もしくは断片)とインフレイムで融合したムテインFcポリペプチドは、本明細書に記載のように、ヒトIgG1 CH2ドメインの位置234-239(EUナンバリングシステム)に対応する、配列番号25の位置15-20に1、2、3、4、5、または6つの突然変異を有する。典型的なムテインFcポリペプチドは配列番号23に示したアミノ酸配列からなり、ここにおいて(L234A)、(L235E)、および(G237A)に対応する置換は配列番号23の位置13、14、および16に存在する。

【0091】

別の実施形態において、ムテインFcポリペプチドは、Fcポリペプチドのヒンジ領域中のシステイン残基の突然変異を含む。一実施形態においては、完全な免疫グロブリン分子において軽鎖の定常領域のシステインとジスルフィド結合を形成する、Fcポリペプチドのヒンジ領域のアミノ末端に最も近位のシステイン残基(例えば、野生型IgG1免疫グロブリンのFc部分のヒンジ領域のアミノ末端に最も近位のシステイン残基)が欠失されるか、または別のアミノ酸で置換される。すなわち、例として、配列番号25の配列を有する典型的なFcポリペプチドの位置1のシステインに対応するシステイン残基を欠失させるか、またはこの位置のシステイン残基を、ジスルフィド結合を形成することのできない別のアミノ酸、例えばセリン残基で置換する。別の実施形態において、ムテインFcポリペプチドはFcポリペプチドのヒンジ領域のアミノ末端に最も近位のシステイン残基の欠失または置換を有し、さらに隣接するC末端アミノ酸の欠失または置換を有する。特定の実施形態では、このシステイン残基および隣接C末端残基の両方がムテインFcポリペプチドのヒンジ領域から欠失される。具体的な実施形態では、ムテインFcポリペプチドは、配列番号25の位置1に対応する位置のシステイン残基と配列番号25の位置2に対応する位置のアスパラギン酸が欠失されたアミノ酸配列からなる。ヒンジ領域でこれらのシステインおよびアスパラギン酸残基が欠失されているFcポリペプチドは、宿主細胞内で効率的に発現され、特定の場合には、野生型のシステインおよびアスパラギン酸残基を保持するFcポリペプチドよりも細胞内で効率的に発現され得る。

【0092】

ある特定の実施形態において、ムテインFcポリペプチドは、野生型Fcポリペプチド(配列番号25)と異なる配列番号23のアミノ酸配列からなる。配列番号23のアミノ酸配列では、配列番号25の位置1のシステイン残基が欠失されており、配列番号25の位置2のアスパラギン酸も欠失されており、配列番号25の位置15のロイシン残基はアラニン残基で置換されており(すなわち配列番号23の位置13)、位置16のロイシン残基はグルタミン酸残基で置換されており(すなわち配列番号23の位置14)、位置18のグリシンはアラニン残基で置換され



ている(すなわち配列番号23の位置16)(図6;配列番号23を参照されたい)。したがって、典型的なムテインFcポリペプチドは、そのアミノ末端部分にKTHTCPPCPAPEAEGAPS(配列番号26)というアミノ酸配列を有する(典型的なFcムテイン配列である配列番号23を参照されたい)。

#### 【0093】

他のFc変異体は、ごくわずかな変更、例えば、限定するものではないが、共有結合性化学的修飾、挿入、欠失および/または置換(これには保存的置換も含まれる)を有する、既知のFcポリペプチド配列と類似したアミノ酸配列を包含する。互いに類似しているアミノ酸配列は広範な配列相同性の領域を共有している。同様に、Fc変異体をコードするヌクレオチド配列は、実質的に類似するヌクレオチド配列を包含し、ごくわずかな変更、例えば限定するものではないが、共有結合性化学的修飾、挿入、欠失および/または置換(これには遺伝子コードの縮重によるサイレント突然変異も含まれ得る)を有し得る。互いに類似しているヌクレオチド配列は広範な配列相同性の領域を共有している。

10

#### 【0094】

アフィニティタグとして、単独でまたは少なくとも1つの追加のポリペプチドタグと共に、使用することのできる別のポリペプチドタグとしては、赤血球凝集素ペプチドが挙げられるが、これは特定の実施形態ではヒトインフルエンザ赤血球凝集素ペプチドである。典型的な赤血球凝集素ペプチドのアミノ酸配列は、YPYDVDYA(配列番号1)を含む。赤血球凝集素ペプチドに特異的に結合する抗体は、赤血球凝集素ペプチドに対するコグネイトリガンドの例であり、市販されている(例えばRoche Diagnostics社、Roche Applied Science, Indianapolis, IN; Vector Laboratories社, Burlingame, CA)。

20

#### 【0095】

別の実施形態においては、cAMPキナーゼまたはCBPドメインまたはCBPペプチドに由来するカルモジュリン結合ポリペプチド(CBP)を、少なくとも1つのポリペプチドタグとして使用することができる(例えばPuigら, Methods 24:218-29 (2001)を参照されたい)。CBP全長ポリペプチドのペプチドまたはドメインであるCBP成分は、カルシウム( $\text{Ca}^{2+}$ )の存在下でカルモジュリン(すなわちコグネイトリガンド)に結合することができる。典型的なCBPペプチドは配列番号3の配列(KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL)を有し、これは、カルモジュリン結合タンパク質の隣接アミノ酸であるかまたはスパーサーペプチドに相当する、少なくとも1、2、3、4、5、6、7個、またはそれ以上のアミノ酸をアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかに有し得る。CBP成分とカルモジュリンとの相互作用は、EGTAまたはEDTAのようなキレート剤の添加により妨害することができる。特定の場合には、ウイルスのビルレンスポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定するための本明細書に記載の方法に用いる細胞、細胞画分、または細胞上清中に内在性カルモジュリンが存在する。CBP成分を有する融合タンパク質の内在性カルモジュリンへの結合は、融合タンパク質:細胞性ポリペプチド複合体(または本明細書に記載の方法により形成される他の複合体)をカルモジュリンの外来供給源にさらす前に、キレート剤を添加することにより防止したり、著しく減少させたりすることができる。

30

#### 【0096】

アフィニティタグは、ポリペプチドタグとしてプロテインCタグを含むこともできる。プロテインCタグは、ヒトプロテインC(ビタミンK依存型セリンプロテアーゼ)の重鎖に由来するアミノ酸配列EDQVDPRLIDGK(配列番号4)を有する。プロテインCタグのポリペプチドタグを検出するための、またはプロテインCタグポリペプチドタグを含む複合体または融合タンパク質を単離するための抗体は市販されている(例えばRoche Applied Science社; Delta BioLabs社, Gilroy, CA; Abcam社, Cambridge, MA; Immunology Consultants Laboratory社, Newburg, ORを参照されたい)。HPC4(Roche Applied Science)と呼ばれる抗体へのC-タグペプチドの結合はカルシウム依存性であり、カルシウム結合ドメインがこの抗体上に存在する。カルシウム依存性の特異的抗体に結合されているプロテインCタグをポリペプチドタグとして有する融合ポリペプチドは、EDTAのようなキレート剤を用いて溶出する(すなわちプロテインCタグと抗体との結合相互作用を破壊する)ことができる。

40

50

## 【0097】

アフィニティタグは、ストレプトアビジン結合ペプチド(SBP) (またはその断片)をも含む。SBPのアミノ酸配列は、例えばMDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP (配列番号6、これは配列番号9のヌクレオチド配列によりコードされる)を有する。アフィニティタグは1つのSBP成分を含んでもよいし、2つのSBP成分(例えば配列番号8、これは配列番号10のヌクレオチド配列によりコードされる)をタンデムで含んでもよく、これはストレプトアビジン結合ペプチドとそのコグネイトリガンドであるストレプトアビジンとの相互作用の親和性を高める。特定の実施形態では、ストレプトアビジンとSBPペプチドタグの間のより低い親和性の相互作用が望ましいことがある。したがって、15アミノ酸からなるSBPペプチド(DVEAWLDERVPLVET; 配列番号7)を使用してもよい(また、例えばLamla, Protein Expr. Purif. 33:39-47 (2004)を参照されたい)。SBPポリペプチドとストレプトアビジンとの結合は、ストレプトアビジンへの結合についてSBPと競合するビオチンの添加により破壊することができる。

10

## 【0098】

ウイルス性ポリペプチド融合タンパク質のアフィニティタグ部分に組込むことのできる別のポリペプチドタグは、免疫グロブリンの特定のクラスおよびアイソタイプのFc部分に結合するブドウ球菌プロテインA結合ドメインである。上記Fc部分はブドウ球菌プロテインA結合ドメインタグに対するコグネイトリガンドとして機能する。アフィニティタグは、2つ以上のブドウ球菌プロテインA結合ドメインを含みうる。ある実施形態において、ブドウ球菌プロテインA結合ドメインはIgG結合タンパク質ZZからなり、これが免疫グロブリンのFc部分に結合する(例えばNizardら, Protein Eng. 14:439-446 (2001); Nizardら, FEBS Lett. 433:83-88 (1998)を参照されたい)。ZZポリペプチドは、ブドウ球菌プロテインA(そのポリペプチド配列およびコードヌクレオチド配列は当技術分野で広く知られている)の変異型Bドメインを重複させることにより作製される(例えばNizardら, (2001), 上記; Nilssonら, Protein Eng. 1:107-13 (1987); Ljungbergら, Mol. Immunol. 30:1279-85 (1993); Janssonら, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 20:69-78 (1998)を参照されたい; さらに、例えばGenBank登録番号M74186 (1993年6月21日)およびM74187 (1996年5月23日)を参照されたい)。

20

## 【0099】

アフィニティタグは、アミノ酸配列SLAELLNAGLGGS(配列番号11)(大腸菌RNAポリメラーゼのエピトープ)からなるSoftag<sup>TM</sup>ペプチドであるポリペプチドタグを含みうる(NeoClone社, Madison, WI)。このペプチドタグは、Softag<sup>TM</sup>のコグネイトリガンドの例であるNT73と呼ばれる抗体と特異的に結合する(Thompsonら, Biochemistry 31:7003-7008 (1992); Anthonyら, J. Biol. Chem. 277:46433-41 (2002))。Softag<sup>TM</sup>とNT73の間の結合相互作用は、低分子量ポリヒドロキシル化合物(ポリオール)および非カオトロピック塩の存在下で破壊することができる(Thompsonら, 上記を参照されたい)。

30

## 【0100】

本明細書に記載のように、特定の実施形態では、ウイルスのビルレンスポリペプチドとアフィニティタグを含む融合タンパク質は、治療薬の適当な標的となり得る細胞性ポリペプチドを同定するための本明細書に記載の方法に使用することができ、また、かかる細胞性ポリペプチドを発現する細胞タイプを同定する方法に使用することができる。特定の実施形態ではアフィニティタグは少なくとも1つのポリペプチドタグを含み、特定の他の実施形態ではアフィニティタグは少なくとも2、3、または4つのポリペプチドタグを含み得る。融合タンパク質は、本明細書に記載のおよび当技術分野で通常使用される合成生化学的および有機化学的手法を用いて作製することができる。融合タンパク質はまた、やはり本明細書に記載のおよび分子生物学の技術分野で通常使用される分子生物学的技術および手法を用いて組換えにより作製し、次いで真核細胞または原核細胞において組換えタンパク質として発現させることができる。

40

## 【0101】

本発明において用いる、ウイルス性ポリペプチドおよびアフィニティタグを有する融合

50

タンパク質は、融合ポリペプチドの成分間にスパーサーペプチド配列をさらに含み得る。例えばスパーサーペプチドはウイルス性ポリペプチドとアフィニティタグの間に位置してもよく、または該アフィニティタグが少なくとも2つのポリペプチドタグを有する場合には、ポリペプチドタグの間にアミノ酸スパーサー配列があってもよい。スパーサーペプチドは少なくとも1、2、3、4、5、6、または7個以上のアミノ酸でありうる。スパーサーペプチドを融合タンパク質に組み込んで、融合タンパク質の各成分の適正な折りたたみを可能にする、または確実にする、または促進することができる。さらに、またはこれとは別に、融合タンパク質を組換えで作製するときには、スパーサーペプチドは、組換え構築物のヌクレオチド配列に組み込まれかつクローニング目的に有用である、ポリヌクレオチド制限部位の翻訳産物（すなわちコードされたアミノ酸配列）であり得る。特定の他の実施形態では、（例えば本明細書に記載の）ポリペプチドタグのアミノ末端またはカルボキシ末端の1、2、または3個のアミノ酸を欠失または置換してもよく、これは制限部位配列またはスパーサー配列を設けるのに有用でありうる。

10

20

30

40

50

#### 【0102】

アフィニティタグは少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列をさらに含みうる。プロテアーゼ認識配列とは、特定のプロテアーゼにより認識されタンパク質分解的切断に必要な連続するアミノ酸配列を言う。プロテアーゼ認識配列は、プロテアーゼ切断部位と同じ場所にある、切断がプロテアーゼ認識配列でおこってもよい。プロテアーゼ認識配列はプロテアーゼにより加水分解されるペプチド結合の両側の1個以上のアミノ酸を含みうる。あるいはプロテアーゼ認識配列は、プロテアーゼの切断部位からアミノ末端もしくはカルボキシ末端に向かって1、2個またはそれ以上離れたアミノ酸でありうる。したがって、プロテアーゼはプロテアーゼ認識配列を含むポリペプチドをプロテアーゼ認識配列またはその近傍で切断する。

#### 【0103】

ある実施形態において、プロテアーゼ認識配列はタバコエッチウイルス(TEV)プロテアーゼのプロテアーゼ切断部位を含む。TEVプロテアーゼは、一般式E-X-X-Y-X-Q-(G/S)（配列番号28）（式中のXは任意のアミノ酸を意味する）で表される線状エプトープを認識する。特定の実施形態では、融合タンパク質は、アミノ酸配列 ENLYFQS（配列番号29）を有するTEVプロテアーゼ認識配列を含む。別の頻繁に使用されるTEVプロテアーゼ認識配列は、アミノ酸ENLYFQG（配列番号30）からなる。可変アミノ酸位置に特定の他のアミノ酸を組込むと、TEVプロテアーゼによりさほど効率的には切断されないペプチド配列が得られるが、これは特定の実施形態では望ましいかもしれない。このプロテアーゼはグルタミン残基とグリシンまたはセリン残基(-Q-(G/S))の間を切断する。

#### 【0104】

特定の実施形態では、アフィニティタグはヒトライノウイルス3C(HRV3C)プロテアーゼ部位を含み得る。プロテアーゼ認識配列はアミノ酸LEVLFQGP（配列番号16）からなる。特定の他の実施形態では、アフィニティタグは少なくとも2つのプロテアーゼ認識配列、例えばTEVプロテアーゼ認識配列とヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ認識配列を含む。

#### 【0105】

特定の実施形態では、アフィニティタグは少なくとも2つのポリペプチドタグを含む。特定の他の実施形態では、アフィニティタグは少なくとも2つのプロテアーゼ認識配列を含みうる。例えばアフィニティタグが少なくとも3つのポリペプチドタグを含み、第1のプロテアーゼ認識配列が第1および第2のポリペプチドタグの間にあり、第2のプロテアーゼ認識配列が第2のポリペプチドタグと第3のポリペプチドタグの間にあってよい。あるいは、少なくとも2つのプロテアーゼ認識配列を有する融合タンパク質は、ウイルス性ポリペプチドとアフィニティタグの間に第1プロテアーゼ認識配列を有し、アフィニティタグ中に存在する2つのポリペプチドタグの間に第2プロテアーゼ認識配列を含み得る。当業者には理解されようが、本明細書に記載の融合タンパク質およびアフィニティタグ中のプロテアーゼ認識配列は、アフィニティタグの任意の2つのポリペプチドタグの間に配置されてもよいし、ウイルス性ポリペプチドとアフィニティタグの間に配置されてもよい

。

## 【0106】

アフィニティタグは、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチドのアミノ末端に配置されてもよいし、ウイルス性ポリペプチドのカルボキシ末端に配置されてもよい。融合タンパク質を組換え的に発現させるときに、標準的な分子生物学および組換え発現の方法および手順を用いる当業者であれば、ウイルス性ポリペプチドのいずれかの末端にアフィニティタグを配置することが発現、すなわち融合タンパク質の翻訳、折りたたみ、および/または輸送のいずれかに悪影響を及ぼすかを容易に決定することができる。その後、これにしたがって、融合タンパク質の発現が著しい悪影響を受けないように組換えベクターを構築することができる。

10

## 【0107】

ある実施形態において、アフィニティタグは、1つのポリペプチドタグ、例えばムテインFcポリペプチドを含む。別の実施形態において、アフィニティタグは、本明細書に記載の少なくとも2、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つまたは6つのポリペプチドタグを含み、これには限定するものではないが、免疫グロブリンFcポリペプチド、免疫グロブリンムテインFcポリペプチド、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ペプチドまたはカルモジュリンドメイン、プロテインCタグ、ストレプトアビジン結合ペプチド(またはその断片)、Hisタグ、プロテインA断片(例えばIgG結合ZZポリペプチド)、およびSoftag<sup>TM</sup>ペプチドが含まれる。特定の実施形態では、1以上のポリペプチドタグが反復され、すなわち同じポリペプチドタグの少なくとも2つのアミノ酸配列がアフィニティタグ中で反復される。反復されるポリペプチドタグは互いに直接隣接していてもよく、または少なくとも1つの異なるポリペプチドタグにより分離されていてもよい。

20

## 【0108】

ある特定の実施形態において、アフィニティタグは、赤血球凝集素ペプチド、C-タグペプチド、およびSoftag<sup>TM</sup>ペプチドを含む。別の特定の実施形態では、アフィニティタグは赤血球凝集素ペプチド、C-タグペプチド、およびムテインFcポリペプチドタグを含む。別の特定の実施形態では、アフィニティタグは、赤血球凝集素ペプチド、Cタグペプチド、およびプロテインA断片、例えばIgG結合型ZZポリペプチドを含む。別の実施形態において、アフィニティタグは赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ペプチドまたはドメイン、ストレプトアビジン結合ペプチド(SBP)(またはその断片)を含む。別の実施形態において、アフィニティタグは、赤血球凝集素ペプチド、C-タグペプチド、およびSBPまたはその断片を含む。特定の実施形態では、SBPペプチドまたはその断片が少なくとも2回反復される。別の実施形態においてアフィニティタグは、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ペプチドまたはドメイン、SBP(またはその断片)、およびムテインFcポリペプチドを含む。本明細書に記載のさらなる他の実施形態では、アフィニティタグは本明細書に記載の特定の実施形態を含め、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列をさらに含む。非限定的な例として、赤血球凝集素ペプチド、カルモジュリン結合ペプチドまたはドメイン、SBP(またはその断片)、およびムテインFcポリペプチドを含むアフィニティタグは、プロテアーゼ認識配列、例えばTEVプロテアーゼ認識配列またはHRV3Cプロテアーゼ配列を、任意の2つのポリペプチドタグの間にさらに含むことができる。1つのポリペプチドタグ、例えばムテインFcポリペプチドを含むアフィニティタグは、ウイルス性ポリペプチド配列とムテインFcポリペプチドの間にプロテアーゼ認識配列をさらに含む。

30

40

## 【0109】

組換え発現構築物

ある実施形態において、ウイルス性ビルレンスポリペプチドおよびアフィニティタグを含む融合タンパク質は、組換えにより発現される。本明細書に記載の方法によれば、融合タンパク質は、ウイルス性ポリペプチドに結合する細胞性ポリペプチドを同定する、もしくははその細胞性ポリペプチドを随伴する細胞タイプを同定するための、プローブとして使用することができる。他の実施形態において、融合タンパク質は、本明細書でより詳細に記載される方法によって、ウイルス性ビルレンスポリペプチドが結合する細胞性ポリペ

50

チドを同定するために、加えてそれを単離するために用いられるが、その方法は、タンデムアフィニティ精製 (TAP) タグ法に類似したステップを含むことができ、ここで、この融合タンパク質は、標的の細胞性ポリペプチドを随伴する細胞において、組換えにより発現される (例えば、Rigautら、*Nat. Biotech.* 17:1030-32 (1999); Puigら、上記; Tastoら、*Yeast* 18:657-62 (2001); Gouldら、*Methods* 33:239-44 (2004)を参照されたい)。本明細書に記載のアフィニティタグを含む融合タンパク質は、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを単離精製するために特に有用である。

#### 【0110】

ウイルス性ビルレンスポリペプチドおよびアフィニティタグからなる融合タンパク質は、本明細書に記載された、および/または当技術分野において記載された、組換え発現法によって調製することができるが、この場合、ウイルス性ポリペプチドを含む融合タンパク質は、核酸発現構築物において発現制御配列 (例えば、プロモーター、エンハンサー、転写開始点) に機能的に連結されたポリヌクレオチドから発現される。融合タンパク質は、本明細書においてきわめて詳細に記載されるように、そうしたポリペプチドをコードする任意のポリヌクレオチドを含有する構築物、特に組換え発現構築物、およびベクターを用いて発現させることができる。当技術分野で一般に認められ、十分に解明された遺伝暗号を考慮すれば、分子生物学分野の当業者は、ウイルス性ポリペプチドおよびポリペプチドタグをコードする上記のようなポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、本明細書に記載され当技術分野で公知の、ウイルス性ポリペプチドおよびポリペプチドタグのアミノ酸配列に基づいて、容易に決定することができる。こうしたポリペプチドおよび融合タンパク質、またはそれらの断片もしくは変異体を組換え技術によって作製するために、宿主細胞をベクターおよび/または構築物によってトランスフェクト、形質転換、もしくは形質導入することができる。本明細書に記載のポリペプチドおよび融合タンパク質はそれぞれ、適当なプロモーターの制御を受けて、哺乳類細胞、酵母、細菌、もしくは他の細胞内で、発現させることができる。原核生物および真核生物宿主とともに使用するのに適したクローニングおよび発現ベクターは、例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor, New York, (2001)に記載されている。特定の実施形態において、宿主細胞は真核細胞であり、この真核細胞は哺乳類細胞であって、これには、例えば、CV1/EBNA細胞、HEK293細胞、HEK293T細胞、COS-7細胞、CHO細胞などが含まれる。

#### 【0111】

ポリヌクレオチド、核酸、または核酸分子は、一本鎖もしくは二本鎖のデオキシリボ核酸 (DNA) もしくはリボ核酸 (RNA) ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、またはそれらの断片のいずれかを表す。ポリヌクレオチドは、生物学的起源から単離することができる、ならびに/または、当技術分野で実施されている、クローニングおよび増幅に関する標準的な分子生物学的方法 (例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)) によって作製および増幅することができる。ポリヌクレオチド断片は、ライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼおよび/またはエキソヌクレアーゼ活性のいずれかによって、PCR産物から、もしくは単離されたポリヌクレオチドから得ることができる。核酸は、天然に存在するヌクレオチド (例えば、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチド)、天然に存在するヌクレオチドの類似体 (例えば、天然に存在するヌクレオチドの - 鏡像異性体)、または両者の組み合わせである、単量体で構成されることができる。修飾ヌクレオチドは、糖鎖、および/またはピリミジンもしくはプリン塩基部分に修飾を有することができる。

#### 【0112】

ある実施形態において、組換え発現構築物は、ウイルス性ポリペプチドをインフレームでアフィニティタグと融合させた融合タンパク質をコードする、ポリヌクレオチド配列を含む。本明細書に記載のように、アフィニティタグは、少なくとも1、2、3、4、もしくは5個以上のポリペプチドタグを含むことができるが、さらに、少なくとも1つ、もしくは少なくとも2つのプロテアーゼ認識配列を含んでいてもよい。本明細書に記載のよう

に、組換え発現構築物は、スパーサーペプチドをコードするヌクレオチド配列も含有する。本明細書に記載され、しかも当技術分野で利用されているポリペプチドタグ配列のように、あるポリペプチドのアミノ酸配列が既知である場合、そうしたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、標準的な分子生物学の知見（例えば、各アミノ酸に対するコドンの配列）および当業者が日常的に行っている方法によって、容易にデザインして調製することができる。

#### 【0113】

組換え構築物はさらに、融合タンパク質とインフレイムで機能的に連結して融合させたシグナルペプチド配列を含むことができる。シグナルペプチドは、組換え発現構築物内に組み込まれ、分泌タンパク質もしくは細胞表面タンパク質として、細胞内の膜を横切って最終的な局在化に至る、融合タンパク質のトランスポレーションを促進することができる。シグナルペプチド配列は、融合タンパク質のN末端に位置し、典型的には13~40アミノ酸の長さである。したがって、シグナルペプチドは、アフィニティタグがウイルス性ポリペプチドのカルボキシ末端に付いている、もしくは融合されている場合には、ウイルス性ポリペプチドのアミノ末端に位置することになり、あるいは、アフィニティタグがウイルス性ポリペプチドのアミノ末端に付いている、もしくは融合されている場合には、シグナルペプチドは融合ポリペプチドのアフィニティタグのアミノ末端に位置することになる。

#### 【0114】

融合タンパク質にインフレイムで融合されるシグナルペプチド配列の一例が、ヒト成長ホルモンシグナルペプチド配列である。組換え構築物は、したがって、アミノ酸配列MATGSRTSLLLLAFGLLCLPWLQEGSA（配列番号12）をコードするヌクレオチド配列を含有する。シグナルペプチド配列はさらに、制限酵素部位のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸を含んでいてもよい。制限酵素部位は、融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を構築するために、異なるポリヌクレオチド配列をクローニングおよびサブクローニングするのに有用であると考えられる。細胞酵素が成熟融合タンパク質からシグナルペプチドを切断する部位によっては、制限酵素部位のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸は、全部、または一部が、融合タンパク質のアミノ末端に付いている可能性がある。ある実施形態において、組換え構築物は、制限酵素Spe1もしくはAsp718の認識部位に対応するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含有するが、このヌクレオチド配列はそれぞれ、Thr-SerおよびGly-Thrのアミノ酸をコードするものである。したがって、Spe1およびAsp718の制限部位に対応するヌクレオチドを追加して含有するヒト成長ホルモンシグナルペプチド配列は、アミノ酸配列MATGSRTSLLLLAFGLLCLPWLQEGSATSGT（配列番号13）からなる。当業者は、どの制限酵素部位ヌクレオチド配列がアミノ酸をコードしているかを容易に判定できるのに加えて、シグナル配列のカルボキシ末端に、追加の制限酵素部位、もしくは代替の制限酵素部位を組み入れることができる。制限酵素部位ヌクレオチド配列は、ウイルス性ポリペプチドとアフィニティタグの間、および/またはアフィニティタグのポリペプチドタグ間に組み込まれていてもよい。

#### 【0115】

一般に、組換え発現ベクターは、複製開始点、宿主細胞の形質転換を可能にする選択マーカー、例えば、大腸菌（*E. coli*）のアンピシリン耐性遺伝子および出芽酵母*S. cerevisiae*のTRP1遺伝子、ならびに下流の構造配列の転写を指示する高発現遺伝子から誘導されたプロモーターを含有する。プロモーターは、特に、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）のような解糖酵素、因子、酸ホスファターゼ、もしくは熱ショックタンパク質をコードするオペロンから誘導することができる。異種構造配列は、翻訳開始および終結配列とともに適切に構築される。ウイルス性ビルレンスポリペプチドおよびアフィニティタグを含有する本明細書に記載の融合タンパク質を発現させるために使用および改造することができるベクターは市販されており、例えば、pcDNA<sup>TM</sup>3.1および関連ベクター（Invitrogen）、アデノウイルスベクターおよびアデノ関連ウイルスベクター（例えば、pAAVベクター、Stratagene, La Jolla, CA）、ならびにレンチウイルスベクター系を含むレトロウイルスベクター（例えば、pSL9）などがある。

## 【0116】

前記組換え発現構築物を含有する宿主細胞は、ベクターおよび/または発現構築物（例えば、クローニングベクター、シャトルベクター、もしくは発現構築物）を、安定して導入する、または一過性に導入する（形質導入、形質転換、もしくはトランスフェクトすることによって、遺伝子工学により作製することができる。本明細書に記載の融合タンパク質をコードする、クローニングされたポリヌクレオチド配列を含有するベクター構築物は、例えば、リボソームを介したトランスフェクション、リン酸カルシウムによるトランスフェクション（Wiglerら、Cell 14:725, 1978; CorsaroおよびPearson、Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52:456, 1973）、エレクトロポレーション（Neumannら、EMBO J. 1:841-845, 1982）、またはDEAE-デキストランによるトランスフェクション（Ausubelら、(編)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987); レトロウイルス、アデノウイルス、およびプロトプラスト融合によるトランスフェクション（Sambrookら、上記、を参照されたい）によって、哺乳類培養細胞に導入することができる。クローニングされたDNAを含有するベクターにより安定してトランスフェクトされた細胞を同定するために、一般に、選択マーカーが、目的のポリヌクレオチドとともに細胞内に導入される。哺乳類培養細胞で使用するのに好ましい選択マーカーは、ネオマイシン、ハイグロマイシン、およびメトトレキサートのような薬物に対する耐性を付与する遺伝子である。選択マーカーは、増幅可能な選択マーカーであってもよい。好ましい増幅可能な選択マーカーは、DHFR遺伝子、およびネオマイシン耐性遺伝子である。選択マーカーは、Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Massachusetts)によって概説されている。

10

20

## 【0117】

ベクターもしくは構築物は、プラスミド、ウイルス粒子、ファージ、などの形をとってもよい。作製された宿主細胞は、プロモーターを活性化し、形質転換体を選択する、または特定の遺伝子もしくはコード化ヌクレオチド配列を増幅する目的で、必要に応じて改変された従来の栄養培地で培養することができる。特定の宿主細胞のための培養条件、例えば、温度、pHなどの選択および維持は、当業者には容易に明らかとなる。好ましくは、宿主細胞を、技術的に確立された方法論にしたがって、培養下での持続的な増殖に適応させて、培養細胞株を生じることができる。ある実施形態において、細胞株は不死化細胞株であるが、これは、対数増殖後に培養下で、繰り返し（生存し続けながら少なくとも10回）継代することができる細胞株を表す。ある実施形態において、細胞株を生じるために使用される宿主細胞は、無秩序に増殖する能力のある細胞、例えば、癌細胞であり、悪性転換細胞であり、あるいは悪性細胞である。

30

## 【0118】

ウイルス性ビルレンスポリペプチド、またはウイルス性ポリペプチドを含む融合タンパク質を発現するのに有用な細菌発現構築物は、発現ベクター内に、望ましいタンパク質をコードする構造DNA配列を、適当な翻訳開始および終結シグナルとともに、機能的プロモーターを有する作動可能な読み枠で挿入することによって構築される。構築物は、ベクター構築物の保持を確認するため、そして必要ならば、宿主内で増幅をもたらすために、1つもしくは2つ以上の選択可能な表現型のマーカー、および複製開始点を含有することができる。形質転換に適した原核生物宿主には、大腸菌（*E. coli*）、枯草菌（*Bacillus subtilis*）、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）、ならびにシュードモナス（*Pseudomonas*）属、ストレプトミセス（*Streptomyces*）属およびブドウ球菌（*Staphylococcus*）属のさまざまな細菌種があるが、選択肢として他のものも用いることができる。他のどのようなプラスミドもしくはベクターも、それが宿主内で複製可能、かつ存続可能である限り、使用することができる。したがって、例えば、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、ポリペプチドを発現するための組換え発現構築物として、さまざまな発現ベクター構築物のいずれかに含まれることになる。こうしたベクターおよび構築物には、染色体DNA配列、非染色体性DNA配列、および合成DNA配列があり、例えば、細菌プラスミド；ファージDNA；バキュロウイルス；酵母プラスミド；プラスミドとファージDNAとの組み合わせか

40

50

ら誘導されたベクター；ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病などのウイルスDNAである。しかしながら、他のどのようなベクターも、それが宿主内で複製可能かつ存続可能である限り、組換え発現構築物の調製に使用することができる。

#### 【0119】

1つもしくは複数の適当なDNA配列を、さまざまな方法でベクター内に挿入することができる。一般に、DNA配列は、当技術分野で既知の方法によって、1つもしくは複数の適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。クローニング、DNA分離、増幅、および精製のための標準的な技法、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼなどに関する酵素反応のための標準的な技法、ならびにさまざまな分離法は、当業者に知られており、しかも広く用いられている技法である。数多くの標準的技法が、例えば、Ausubelら、(Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., 1993)); Sambrookら、(Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、(Cold Spring Harbor Laboratory 2001)); Maniatisら、(Molecular Cloning、(Cold Spring Harbor Laboratory 1982))などに記載されている。

#### 【0120】

発現ベクター内でポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、mRNA合成を指示するために、少なくとも1つの適当な発現制御配列（例えば、プロモーターもしくは制御されたプロモーター）に、機能的に連結されている。このような発現制御配列の代表的な例としては、LTRもしくはSV40プロモーター、大腸菌lacもしくはtrp、ラムダファージ $P_L$ プロモーター、ならびに原核もしくは真核細胞またはそれらのウイルスにおいて遺伝子の発現を制御することが知られている他のプロモーターがある。プロモーター領域は、CAT（クロラムフェニコールトランスフェラーゼ）ベクター、または選択マーカーを有する他のベクターを用いて、任意の望ましい遺伝子から選択することができる。具体的な細菌プロモーターには、lacI、lacZ、T3、T5、T7、gpt、ラムダ $P_R$ 、 $P_L$ 、およびtrpがある。真核生物プロモーターには、CMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来LTR、およびマウスメタロチオネイン-Iがある。適当なベクターおよびプロモーターの選択、ならびに本明細書に記載のポリヌクレオチドに機能的に連結された、少なくとも1つのプロモーターもしくは制御されたプロモーターを含む特定の組換え発現構築物の調製は、十分、当業者のレベルの範囲内である。

#### 【0121】

誘導型の制御されたプロモーター、および/または嚴重に制御されたプロモーターのデザインおよび選択は、当技術分野においてよく知られており、個別の宿主および発現系によって決まってくる。pBAD発現系（Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA）は、アラビノース代謝経路を制御する大腸菌アラビノースオペロン（ $P_{BAD}$ もしくは $P_{ARA}$ ）を使用する、嚴重に制御された発現系の一例である（Guzmanら、J. Bacteriology 177:4121-30 (1995); Smithら、J. Biol. Chem. 253:6931-33 (1978); Hirshら、Cell 11:545-50 (1977)を参照されたい）。この系を用いるさまざまなベクターが市販されている。嚴重に制御されたプロモーターで駆動される発現系の他の例としては、Stratagene (La Jolla, CA) から市販されているPET発現系（米国特許第4,952,496号を参照されたい）、もしくはtet制御発現系（Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-51 (1992); Gossenら、Science 268:1766-69 (1995))が挙げられる。pLP-TRE2アクセプターベクター（BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA）は、CLONTECH社のCreator<sup>TM</sup>クローニングキットとともに使用するためにデザインされており、目的とする遺伝子の、嚴重に制御された誘導性発現のための、テトラサイクリン制御発現構築物を、部位特異的なCre-lox組換え系を用いて迅速に生成する（例えば、Sauer, Methods 14:381-92 (1998); Furth, J. Mamm. Gland Biol. Neoplas. 2:373 (1997)を参照されたい）が、これは宿主細胞の不死化にも用いることができる（例えば、Cascio, Artif. Organs 25:529 (2001)を参照されたい）。

#### 【0122】

ベクターは、レトロウイルスベクターのようなウイルスベクターであってもよい。例えば、レトロウイルスプラスミドベクターの起源となりうるレトロウイルスには、モロニー



マウス白血病ウイルス、脾臓壊死症ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスがあるが、それらに限定されない。ウイルスベクターはまた、1つもしくは複数のプロモーターを含有する。使用することができる適当なプロモーターには、レトロウイルスLTR; SV40プロモーター; およびヒトサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター (Millerら、Biotechniques 7:980 990 (1989) に記載)、またはその他のプロモーター (例えば、ヒストン、pol IIIおよびアクチンプロモーターなどを含む、真核細胞プロモーター)があるが、それらに限定されない。使用することができる他のウイルスプロモーターには、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ (TK) プロモーター、およびB19パルボウイルスプロモーターがあるが、それらに限定されない。

10

#### 【0123】

プロデューサー細胞株を作製するために、レトロウイルスプラスミドベクターを用いてパッケージング細胞株 (例えば、PE501、PA317、-2、-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、CRE、CRIP、GP+E-86、GP+envAm12、DAN; 例えば、Miller, Human Gene Therapy, 1:5-14 (1990)も参照されたい) に形質導入する。当技術分野で周知の何らかの方法、例えば、エレクトロポレーション、リボソームの使用、およびリン酸カルシウム沈澱によって、ベクターは、パッケージング細胞に形質導入することができる。プロデューサー細胞株は、本明細書に記載のポリペプチドもしくは融合タンパク質をコードする核酸配列を含有する、感染性レトロウイルスベクター粒子を生成する。そこで、こうしたレトロウイルスベクター粒子を用いて、in vitroでも、in vivoでも、真核細胞に形質導入することができる。形質導入することができる真核細胞には、例えば、胚性幹細胞、胚性癌腫細胞、造血幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、ケラチノサイト、内皮細胞、気管支上皮細胞、および他の培養細胞株がある。

20

#### 【0124】

別の例として、ポリペプチドもしくは融合タンパク質の発現を指示する組換えウイルス構築物によって形質導入された宿主細胞は、ウイルス出芽の際にウイルス粒子によって取り込まれた宿主細胞膜の一部に由来する、発現されたポリペプチドもしくは融合タンパク質を含有するウイルス粒子を生成する可能性がある。ポリペプチドをコードする核酸配列を、バキュロウイルスシャトルベクターにクローニングしてもよく、その後このベクターはバキュロウイルスと組み換えられて、組み換えバキュロウイルス発現構築物を生じるが、この構築物は、例えば、Sf9宿主細胞に感染するために使用されるものである (例えば、Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology 第39巻、Richardson編、(Human Press 1995); Piwnicka-Worms, "Expression of Proteins in Insect Cells Using Baculoviral Vectors," Short Protocols in Molecular Biology、第2版、Ausubelら編(John Wiley & Sons 1992)より、第16章、第II項、16-32ページから16-48ページまで、を参照されたい)。

30

#### 【0125】

#### 標的細胞性ポリペプチドを同定するための方法

ある実施形態において、ウイルス性ビルレンスポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定するための方法が与えられるが、その方法は、細胞、または該細胞の画分もしくは上清と、ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグに融合させた融合タンパク質とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が、該細胞または該細胞の画分もしくは上清に随伴したポリペプチドと相互作用するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させて、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成させることを含んでなり、このウイルス性ポリペプチドは少なくとも1つのビルレンス形質を示すものである。接触 (すなわち、混合、配合、または何らかの方法で細胞と融合タンパク質との相互作用を可能にすること) のステップは、当技術分野で使用される任意の適当な反応容器で行うことができる。次に、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離し、ポリペプチド全体の、または少なくとも1つの細胞性ポリペプチド断片 (もしくは複数個の断片) の

40

50

、アミノ酸配列を決定することによって、細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列を決定するが、ここでそれぞれの断片は、少なくとも8アミノ酸からなるものであって（これには、全体として任意の個数で8個以上のアミノ酸を有する任意のポリペプチド断片が含まれる）、それによってウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する。細胞性ポリペプチドを同定するための典型的な技法、または技術と方法の組み合わせには、タンデムアフィニティ精製（TAP）とその後のLC-MS/MS（液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析）があるが、これは当技術分野で行われており、本明細書にも記載されている。

#### 【0126】

本明細書に記載のように、ウイルス性ビルレンスポリペプチドは、感染宿主においてウイルス病原性の原因となる、ウイルス由来のポリペプチドである。ウイルス性ポリペプチドの少なくとも1つのビルレンス形質は当技術分野で知られている可能性がある。あるいはまた、本明細書に記載の方法は、ウイルス性ポリペプチドが、本明細書に詳述されたビルレンス形質である少なくとも1つの形質を、有しているか否かを判定することを、さらに含むことができる。ウイルス性ポリペプチドのポリペプチド配列は、やはり当技術分野で判明している場合があり、または、本明細書に記載の方法にしたがって決定することもできる。同様に、本明細書にビルレンス形質として記載されたウイルス性ポリペプチドの形質が、当技術分野で知られていることがあるが、その形質がウイルスの病原性と関係があることは、当業者に明白である場合もあるし、そうでないこともある。ウイルス性ポリペプチドが1つもしくは複数のビルレンス形質を有するかどうかを判断する手順および技法は、本明細書に記載された、当業者が精通している方法にしたがって実施することができる。例えば、細胞、細胞上清、または細胞画分を接触させるステップの前に、ウイルスゲノムのポリヌクレオチド配列を本明細書に記載のように検査もしくはスキャンして、少なくとも40アミノ酸（シグナルペプチド配列を含むことができる）をコードする、少なくとも1つのオープンリーディングフレームを同定することができる。その代わりに、またはそれに加えて、本方法はさらに、下記のうちいずれか1つもしくは2つ以上を含むことができる：ウイルスに感染した細胞内での変異型ウイルス性ポリペプチドの発現が、ウイルス毒性の減少と相関すると判断すること；ウイルスに感染した細胞内でウイルス性ポリペプチドが発現しないことが、ウイルス毒性の減少と相関すると判断すること；ウイルス性ポリペプチドが、ウイルスに感染した細胞によって分泌される、細胞膜に結合している、または細胞内に存在すると判断すること；ならびに、ウイルスゲノム内のポリヌクレオチド配列が、ウイルス性ビルレンス因子である少なくとも1つの他のウイルス性ポリペプチドをコードするゲノム領域に位置すると判断すること（ただしこの領域はウイルスゲノムの5'末端または3'末端にある）。

#### 【0127】

ウイルス性ポリペプチドおよびアフィニティタグを含む融合タンパク質は、本明細書に記載の方法にしたがって、合成により、または遺伝子組換えにより、調製することができる。融合タンパク質と、細胞、細胞の画分、もしくは細胞の上清との接触には、細胞もしくは画分もしくは上清の相互作用を可能にすること、例えば、何らかの方法で、細胞、細胞の画分、もしくは細胞の上清と融合ポリペプチドとを合わせて、混合もしくは配合することが含まれる。細胞の細胞性ポリペプチドは、細胞の細胞表面で発現される可能性があり、または細胞から分泌されるため、細胞上清から得ることができるので、この細胞性ポリペプチドを本明細書に記載の融合タンパク質と接触させることができる。具体的な実施形態において、細胞上清、例えば馴化培地（すなわち、細胞性ポリペプチドが分泌される、または何らかの方法で細胞によって放出されるのに十分な時間にわたって培養された、多数の細胞から集められた培地）を、融合ポリペプチドと接触させる。

#### 【0128】

細胞、細胞画分、もしくは細胞上清と、融合ポリペプチドとの接触は、融合タンパク質が細胞内に導入される場合の接触も含む。例えば、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含有する組み換え発現構築物を、トランスフェクション、形質転換、また

は本明細書に記載され、当技術分野で実施されている他の方法によって、細胞内に導入して、融合タンパク質が細胞によって発現されるようにすることができる。こうして融合タンパク質は、細胞内にある細胞性ポリペプチド、膜（細胞オルガネラの膜、もしくは細胞の膜のいずれか）と結合した細胞性ポリペプチド、または細胞により分泌された細胞性ポリペプチド（しかもこれは細胞上清中に存在しうる）と相互作用することが可能となる。融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、例えば、Ulmerら、Science 259:1745-49 (1993)に記載され、Cohen, Science 259:1691-92 (1993)により概説されるように、「裸の」ポリヌクレオチドとして細胞に導入することもできる。裸のポリヌクレオチドの取り込みは、生分解性ビーズ上にポリヌクレオチドをコーティングすることによって増加させることが可能であって、このビーズは効率的に細胞内に運び込まれる。

10

#### 【0129】

特定の実施形態において、融合タンパク質は、融合タンパク質の分泌を促す、例えばヒト成長ホルモンシグナルペプチド配列のようなシグナルペプチド配列を含有しており、分泌型細胞性ポリペプチドである細胞性ポリペプチドと融合タンパク質との相互作用をより容易に可能にする。したがって、分泌型細胞性ポリペプチドであるポリペプチドを含む細胞性ポリペプチドを同定するために、融合タンパク質は、例えば、成長ホルモンシグナルペプチド配列をインフレームでウイルス性ポリペプチドと融合させて含んでいてもよく、このウイルス性ポリペプチドはやはりインフレームでアフィニティタグと融合されている。具体的な実施形態において、アフィニティタグは、アフィニティタグのアミノ末端からカルボキシ末端に向かって、赤血球凝集素ペプチド（例えば、YPYDVEDYA（配列番号1））、カルモデュリン結合ポリペプチド（例えば、KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL（配列番号3））、TEVプロテアーゼ認識配列、ストレプトアビジン結合ペプチド、および免疫グロブリンムテインFcポリペプチド（例えば、ヒトIgGムテインFcポリペプチド）を含む。別の具体的な実施例において、融合タンパク質のアフィニティタグは、赤血球凝集素ペプチド（例えば、YPYDVEDYA（配列番号1））、カルモデュリン結合ポリペプチド（例えば、KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL（配列番号3））、ヒトライノウイルス3Cプロテアーゼ認識配列、ならびにストレプトアビジン結合配列、およびストレプトアビジン結合配列のもう1つのリピートを含む。

20

#### 【0130】

ある実施形態において、細胞は、細胞、細胞画分、もしくは細胞上清を融合タンパク質と接触させる前、接触させるのと同時、または接触させた後に刺激を受ける。本明細書に記載のように、刺激には、例えば、細胞によって発現されるコグネイト抗原（例えば、細胞表面マーカー抗原、もしくは細胞表面受容体）と特異的に結合する抗体；ホルボールエステル（例えば、PMA）、および他のマイトジェン；サイトカイン；ケモカイン；およびイオノマイシン；または少なくとも2つの活性物質の組み合わせ（例えば、PMAとイオノマイシン；PWM（ヤマゴボウマイトジェン）とインスリン）がある。

30

#### 【0131】

やはり本明細書に記載のように、細胞溶解物もしくは細胞抽出物などの細胞画分を、本明細書に記載の方法に使用することができる。細胞画分には、細胞から分離された1つもしくは複数のオルガネラの調製物もあるが、これは本明細書に記載されており、また、脂質ラフトのような複雑な多分子構造、および他の輸送（トラフィッキングおよびトランスポート）複合体も含まれる。細胞画分、細胞溶解物、細胞抽出物、および分離された細胞オルガネラは、個別の細胞に適した方法および技術によって調製することができるが、これは当業者が精通している機械、物理、および化学の技術の1つもしくはそれらの組み合わせを含むことができる。細胞上清は、例えば細胞洗浄液、細胞培養培地もしくは馴化培地（すなわち、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを細胞が分泌するのに十分な時間にわたって増殖させた、培養細胞から得られる培地）、または他の何らかの細胞外調製物（生物学的サンプルなど）を含むが、この細胞上清を本明細書に記載の方法に使用することができる。本明細書に記載のように、ある細胞の細胞画分もしくは細胞上清を、その細胞によって発現される融合タンパク質と接触させることができる。あるいは

40

50

はまた、細胞上清もしくは細胞画分を採取してから、融合タンパク質と接触させてもよい。

#### 【0132】

細胞、細胞上清、もしくは細胞画分と、融合タンパク質との相互作用は、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が細胞性ポリペプチドと、相互作用する、もしくは結合することを可能にするが、この細胞性ポリペプチドは、ウイルス性ポリペプチドをコードし発現させるウイルスによる宿主の感染時に、ウイルス性ポリペプチドが相互作用する細胞性ポリペプチドである。相互作用は、単離しうる融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体の形成を可能にするのに適した条件（例えば、温度、雰囲気、栄養、バッファー、pHなど）下で、かつ十分な時間にわたって行われる。本明細書に記載のように、融合タンパク質はアフィニティタグを含有するが、このアフィニティタグは、検出可能な成分、および/または少なくとも1つのポリペプチドタグを含有する。

10

#### 【0133】

ある実施形態において、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体は、アフィニティタグの少なくとも1つのポリペプチドタグのコグネイトリガンドと、この複合体とを接触させることによって、細胞、細胞画分、または細胞上清から分離することができる。ポリペプチドタグとコグネイトリガンドの例は、本明細書に詳細に記載される。コグネイトリガンドは、例えばプラスチック、ガラス、もしくは金属表面のような、固相担体に結合させることができる。こうした担体にはスライドガラス、ビーズ、プレート（マルチウェルプレートなど）、ナノ粒子、または他のマトリックス（ポリマーマトリックス、負荷電マトリックス、および正荷電マトリックスなど）があるが、それらに限定されない。細胞、細胞画分、または細胞上清から、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を分離するために、ポリペプチドタグとそのコグネイトリガンドとが結合するのに適した条件下で、かつ結合するのに十分な時間、この複合体をコグネイトリガンドと相互作用させておき、その結果としてコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体が形成される。その後、コグネイトリガンドとポリペプチドタグとの相互作用を妨げて、コグネイトリガンドから複合体を分離することによって、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離することができる。当業者は、複合体形成に適した条件、および複合体を分裂させるのに適した条件（pH；バッファー；イオン、塩、カチオン、もしくはキレート剤の存否；など）、ならびにコグネイトリガンドとポリペプチドタグとの間の複合体形成に十分な時間を、容易に決定することができる。

20

30

#### 【0134】

あるいはまた、アフィニティタグがプロテアーゼ認識配列を含む場合には、それぞれのプロテアーゼとコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体とを、プロテアーゼが融合ポリペプチドを切断して、切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を遊離するのに十分な条件で、かつ十分な時間にわたって、接触させることができる。特定のポリペプチドタグは、それぞれのコグネイトリガンド（例えば、SBPペプチド（配列番号6）もしくはタンデムSBPタグ（配列番号8）；Fcポリペプチド-コグネイトリガンド相互作用；または特定の抗体-ポリペプチドのタグ特異的結合）に対して高い親和性を示すので、ポリペプチドタグとコグネイトリガンドとの相互作用を途絶させるには、細胞性ポリペプチドの構造に悪影響を及ぼす、もしくはウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの相互作用を妨害する可能性のある条件（例えば、低pH、カオトロピック剤、高塩濃度）が必要である。少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列をアフィニティタグに組み込むことは、融合タンパク質（もしくはその一部）：細胞性ポリペプチド複合体を分離して単離する能力をもたらし、したがって、細胞性ポリペプチドの、および/またはウイルス性ポリペプチド：細胞性ポリペプチド相互作用の、起こりうる不都合な変化を最小限にとどめる。それに加えて、少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列をアフィニティタグに組み込んだ後、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体からアフィニティタグ部分をタンパク質分解により切断することは、融合タンパク質に対する細胞性ポリペプチドの質量比を高め、したがって、LC-MS/MS（液体クロマトグラフィー後のタンデム質量

40

50

分析)のような本明細書に記載の方法による細胞性ポリペプチドの検出および分析の感度を高める。細胞性ポリペプチド：融合タンパク質複合体は、本明細書にさらに詳細に記載される、当技術分野で周知の、例えば、表面プラズモン共鳴法 (SPR)；蛍光励起細胞分取 (FACS) (例えば、細胞表面発現ポリペプチドを同定するため)；および動力学的タンパク質相互作用測定装置、例えば、KinExA<sup>TM</sup> 装置 (例えば、Sapidyne Instruments社, Boise, ID) (例えば、馴化培地のような細胞上清中の細胞性ポリペプチドを同定するため)などの方法によって、同定および検出することができるが、これらの方法はさらに、放射性標識 (例えば、S<sup>35</sup>、P<sup>32</sup>など)の使用を含むことができる。

#### 【0135】

細胞、細胞画分、もしくは細胞上清から融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を単離した後、細胞性ポリペプチドを同定する。ある実施形態において、細胞性ポリペプチドの同定は、全長ポリペプチドの解析、例えば本明細書に記載のように、特定の細胞性ポリペプチドと特異的に結合する能力で特徴付けられた抗体を用いて免疫測定法を行うことによって、判断することができる。(複合体中の、もしくは複合体から分離された)細胞性ポリペプチドを、例えば、免疫プロット法、イムノアッセイ (ELISAなど)、ラジオイムノアッセイ、競合アッセイ、および当技術分野で行われている他のアッセイといった、免疫化学法などの方法で同定することができる。イムノアッセイは、異なる細胞性ポリペプチドに対する特異性を有する数多くの抗体と、細胞性ポリペプチドとを接触させる、マトリクス法、もしくは多重法、もしくはハイスループット法で行うことができる。もっと長い細胞性ポリペプチド断片もしくは全長ポリペプチドを同定するための方法の他の例には、MALDI-TOFがあるが、これは当技術分野で日常的に行われており、本明細書にも記載されている。本明細書に記載のように、こうした方法は、全長細胞性ポリペプチドもしくはその断片を分析するために使用することができるが、前記断片は少なくとも6アミノ酸の、もしくは6アミノ酸からそのポリペプチドの全長を構成するアミノ酸数までの任意の数のアミノ酸の断片とすることができる。

#### 【0136】

他の実施形態において、細胞性ポリペプチドの、またはその少なくとも1つのペプチドのアミノ酸配列を決定することができる。ある実施形態において、細胞性ポリペプチドは、複合体から分離することができる。細胞性ポリペプチドもしくはそのペプチドのアミノ酸配列は、当業者が実践し、本明細書にも記載された、多くの方法のうちいずれか1つによって決定することができる。例えば、細胞性ポリペプチドの部分加水分解は、アミノ酸配列を決定することができるペプチドを生成させることになる。部分加水分解は、化学的な方法、または酵素的な方法によって行うことができる。タンパク質の化学的な部分加水分解のために使用される化合物には、弱酸 (例えば、ギ酸、40) (特異性：Asp-Pro)；ヒドロキシルアミン (特異性：Asn:Gly)；臭化シアン (特異性：Metのカルボキシル側)；ヨードソ安息香酸 (特異性：Trpのカルボキシル側)；ならびに、2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸とそれに続くアルカリ処理 (特異性：Cysのアミノ側)がある。配列決定可能なペプチド断片を生成するために有用なタンパク質分解酵素には、例えば、トリプシン (特異性：ArgおよびLysのカルボキシル側)；キモトリプシン (特異性：Tyr、Phe、およびTrpのカルボキシル側)；エラスターゼ (特異性：AlaおよびGlyのカルボキシル側)；フィシン (特異性：非荷電、芳香族アミノ酸)；パパイン (Arg、Lys、およびPheのカルボキシル側)；ペプシン (特異性：PheおよびLeuのカルボキシル側；非極性ペア)；サーモリシン (特異性：LeuおよびPheのアミノ側；非極性残基)；ならびにトロンピン (特異性：Argのカルボキシル側)がある。アミノ酸配列分析のために質量分析にかけるペプチドを生成させるのに特に有用なプロテアーゼはトリプシンであり、またAsp-N (特異性：AspおよびCysのアミノ側)、Glu-C (特異性：GluおよびAspのカルボキシル側)、Lys-C (特異性：Lysのカルボキシル側)、ならびにArg-C (特異性：Argのカルボキシル側)と呼ばれるプロテアーゼも挙げられるが、これらは市販されている (例えば、Sigma Aldrich, St. Louis, MOを参照されたい)。本明細書で使用されるアミノ酸の3文字表記および1文字表記は、そうした略号として当技術分野で広く受け入れられている基準に従う。

## 【 0 1 3 7 】

ある実施形態において、細胞性ポリペプチドは、その細胞性ポリペプチド（もしくは細胞性ポリペプチド：融合タンパク質複合体）をプロテアーゼと接触させて、長さが少なくとも8~20（特に指定された長さ範囲の間の任意の整数、例えば8、10、12、14、16、18もしくは20アミノ酸）の、またはより長いペプチド断片を生成させることによって同定される。その後、細胞性ペプチド断片を分離または単離して、個々の断片をアミノ酸分析に供することができる。分離法には、例えば、当業者が日常的に使用している、2次元LCを含めたさまざまな液体クロマトグラフィー（LC）技術（高速液体クロマトグラフィー、高速タンパク質液体クロマトグラフィー）、他のクロマトグラフィー法（例えば、アフィニティ、イオン交換、薄層、ゲルクロマトグラフィーなど）、およびさまざまな電気泳動技術のいずれもが含まれる。例えば、LCステップから得られたペプチドのアミノ酸配列は、その後、当技術分野で行われているさまざまな配列決定法、例えば、質量分析によって決定することができるが、この質量分析はイオンスペクトル同定をもたらし tandem 質量分析（MS/MS）を包含しており、これはさらに親ペプチドイオンのフラグメンテーションの誘導を含むことができる。次に、この質量分析データを、そのデータと既知のポリペプチドに関するデータベースの情報とを比較するソフトウェアプログラム（例えば、Sequest (Sequest Technologies, Inc. Lisle, IL); Mascot (Matrix Science Ltd., London, UK); またはX!Tandem (オープンソース・ソフトウェア、Global Proteome Machine Organization); 例えば、Clauserら、Anal. Chem. 71:2871 (1999)も参照されたい)で解析することができる。イオンスペクトルも、X!HUNTERのようなソフトウェアパッケージを用いて、高い信頼度で特定のペプチドに関連づけられるスペクトルのデータベースと比較することによって、同定することができる。

10

20

## 【 0 1 3 8 】

質量分析法には、エレクトロスプレーイオン化法があるが、これは高い感度をもたらし、直接ペプチドおよびタンパク質の分析に適用することができる。エレクトロスプレーイオン化の使用による多価荷電は、サンプルによって左右されるが、トリプル四重極型機器を用いて分析可能な質量上限を、一部のタンパク質について50-80kDaの範囲に拡大することができる。ペプチドおよびタンパク質の質量分析のために、サンプルは稀酸に溶解することが好ましい。多くの場合、サンプルは少なくとも1回のHPLCを経ている。トリプル四重極型機器でエレクトロスプレー-質量分析法を用いて、ポリペプチド/ペプチドに関するさまざまな情報を得ることができる。これには、分子量測定、質量増加による化学修飾の帰属、娘イオンスキャン（配列分析のため）、プリカーサーイオンスキャン、一定の質量差のスキャン、および選択イオンモニタリングが含まれる。

30

## 【 0 1 3 9 】

ペプチド分析のため、トリプル四重極型の技術が、配列/構造情報のためにイオンの衝突誘起解離（CID）を行う目的で使用される。配列決定することができる最大残基数は、通常20アミノ酸程度である。もっと長いペプチド/タンパク質から配列分析するには、通常、分析前にプロテアーゼ消化ステップが必要である。

## 【 0 1 4 0 】

例えば、LC-MS/MSは、イオントラップ型質量分析計（例えば、LC/MS/MS LCQ Deca XP (ThermoFinnigan, Thermo Electron Corp., Waltham, MA); QSTAR (登録商標) Elite LC/MS/MS System, Applied Biosystems/MDS Sciex)を用いて行われ、ポリペプチドの断片のアミノ酸配列（MS/MS配列）に基づいて、標的細胞性ポリペプチドを同定することができる。質量分析計を、HPLCシステムのようなLCシステムにつなげることができる。標的細胞性ポリペプチドのプロテアーゼ消化後、例えば、トリプシンによる消化後、そのペプチドを逆相カラム上に注入し、ペプチドの疎水性に基づいて分離する。カラムから脱着されたペプチドは、直接、質量分析計に溶出される。イオントラップ内でインタクトなペプチドの質量を測定する。次に各ペプチドは順にトラップ内で分離され、衝突エネルギーが増大して、それがペプチドを断片化し、ペプチドの配列を表すMS/MSスペクトルを与える。MS/MSスペクトルは、データベース（タンパク質、DNA、もしくはEST）に対して検索をかけて

40

50

、対応するインタクトな質量およびフラグメント質量を有するペプチドを同定する。典型的には、タンパク質同定ソフトウェアが、実測MS/MSマススペクトルと、上記のデータベースのタンパク質から計算された理論的ペプチド質量スペクトルとの適合についてスコアを割り当てる。他の典型的な方法は、米国特許第6,829,539号および第6,908,740号に記載されている。例えば、Linら、J. Biomol. Techniques 14:149-55 (2003); Tomlinsonら、Rapid Commun. Mass Spectrom. 17:909-16 (2003); Yiら、Rapid Commun. Mass Spectrom. 17:2093-98 (2003)も参照されたい。

#### 【0141】

標的細胞性ポリペプチドを同定するために使用することができる他の質量分析法には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型 (MALDI-TOF)、MALDI-TOF-MSがある。プロテアーゼ消化およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ゲル電気泳動を受けたタンパク質由来のペプチドを分析する方法が、当技術分野で利用可能である (例えば、Egelhoferら、Anal. Chem. 74:1760-71 (2002); Cohenら、Anal. Biochem. 247:257-67 (1997); Cottrellら、Protein and peptide analysis by mass spectrometry. J. R. Chapman. Totowa, N.J., Humana Press. 61:67-82 (1996); Fernandezら、Electrophoresis 19:1036-45 (1998) Jensenら、Proteins Suppl. 2: 74-79 (1998)を参照されたい)。また、例えば、Andersenら、Nat. Biotechnol. 14: 449-57 (1996); Chapman, Protein and peptide analysis by mass spectrometry C. J. R. Totowa, NJ, Humana Press. 61:9-28 (1996); Gillece-Castroら、Methods Enzymol. 271:427-48 (1996); Hillenkampら、Methods Enzymol. 193: 280-95 (1990); Kattaら、Anal. Chem. 70:4410-6 (1998); Pattersonら、Anal. Chem. 67:3971-78 (1995); Wangら、Protein and peptide analysis by mass spectrometry J. R. Chapman. Totowa, NJ, Humana Press. 61:161-70 (1996); Oliverら、Methods Mol. Biol. 61:295-309 (1996); Covey, Methods Mol. Biol. 61:83-99 (1996); Ducretら、Protein Sci. 7:706-19 (1998); Fearnleyら、Biochem. Soc. Trans. 24:912-7 (1996); Yates, Methods Enzymol. 271:351-77 (1996)も参照されたい。

#### 【0142】

ポリペプチド、もしくはそのペプチドのアミノ酸配列を決定するために、当技術分野で知られているさらに別の方法を使用することができる。こうした方法には、例えば、アミノペプチダーゼM切断と併用することができるエドマン分解を用いたN末端基の分析; C末端分析: および、いくつかのカルボキシペプチダーゼ酵素 (例えば、カルボキシペプチダーゼC、カルボキシペプチダーゼY) のいずれかを用いたC末端アミノ酸の酵素的切断がある。

#### 【0143】

ある実施形態において、ウイルス性ポリペプチド (すなわち、少なくとも1つのビルレンス形質を示すウイルス性ポリペプチドである、ウイルス性ビルレンスポリペプチド) が相互作用する細胞性ポリペプチドであって、その細胞性ポリペプチドが治療標的として役立つ可能性がある、前記細胞性ポリペプチドを同定する方法は、その細胞性ポリペプチドを含有する細胞タイプを同定することをさらに含んでなる。ウイルス性ポリペプチドおよびアフィニティタグを含有する融合タンパク質と、少なくとも1つの細胞、その細胞画分、もしくはその細胞上清を含む生物学的試料とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が前記の少なくとも1つの細胞、その細胞画分、もしくはその細胞上清と相互作用するのを可能にするのに十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって、接触させることができる。融合タンパク質と細胞 (もしくは細胞画分もしくは細胞上清) との結合レベルを測定することができるが、これは融合タンパク質と生物学的試料との結合の有無を示す。その後細胞を分離して特性解析すると、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを含有する、少なくとも1つの細胞タイプを同定することができる。ある実施形態において、アフィニティタグは、融合タンパク質: 細胞複合体の単離、および/または細胞タイプの特性解析に有用な、検出可能な部分、例えば、フルオロフォア、放射性核種、酵素、もしくはビオチンを含有する。

#### 【0144】

例えば、血液、骨髓、さまざまな組織サンプルといった生物学的試料は、異なるタイプの細胞を含有する可能性がある。細胞のタイプ（もしくは細胞型）は、本明細書に記載のように、例えば、造血細胞および神経細胞といった系統の異なる細胞を包含するが、例えばさまざまな種類の免疫細胞（T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージなど）のように、さらにきわめて近縁である、異なるタイプの細胞も指している。細胞のタイプは、細胞表面抗原の発現、形態、刺激に対する反応、および他の特徴によって識別し、特性解析することができるが、これは、標準的な試薬および方法（例えば、イムノアッセイ、顕微鏡検査、および生物活性アッセイ）によって容易に行うことができる。

#### 【0145】

ある実施形態において、ウイルス性ビルレンスポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定する方法が与えられるが、その方法は、細胞、または該細胞の画分もしくは上清と、ウイルス性ポリペプチド（少なくとも1つのビルレンス形質を有する）をアフィニティタグに融合させた融合タンパク質とを、融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が、該細胞または該細胞の画分もしくは上清に随伴したポリペプチドと相互作用するのに十分な条件下でかつ十分な時間にわたり接触させて（混合、配合、または細胞内での融合タンパク質の発現を含めて、何らかの方法で相互作用を可能にして）、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を与えることを含んでなるものである。ある実施形態において、アフィニティタグは少なくとも第1のポリペプチドタグ、および第2のポリペプチドタグを含有し、さらに少なくとも1つもしくは2つの追加のポリペプチドタグを含んでいてもよく、また少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列を含有する。融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体は、その後、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体と、第1のポリペプチドタグのコグネイトリガンドとを、融合タンパク質のアフィニティタグ部分が第1のコグネイトリガンドと相互作用して第1のコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を与えるのに十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって、接触させることによって単離することができる。次に、第1のコグネイトリガンド：融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を、プロテアーゼ認識配列もしくはその近傍で融合タンパク質を切断することができるプロテアーゼと接触させ、混合し、もしくは配合して、切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を与えることができる。次のステップで、第2のポリペプチドタグと特異的に結合する第2のコグネイトリガンドと、切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を、第2のコグネイトリガンドと切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体が相互作用するのに十分な条件下で、かつ十分な時間にわたり接触させて（混合、配合、またはなんらかの方法で相互作用を可能にして）、第2のコグネイトリガンド：切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を形成させる。次に切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を、第2のコグネイトリガンド：切断融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体から分離し、細胞性ポリペプチド、またはその細胞性ポリペプチドの少なくとも1つのポリペプチド断片のアミノ酸配列を決定するが、この場合少なくとも1つのポリペプチド断片は少なくとも8アミノ酸（または少なくとも10、12、14、16、18もしくは20アミノ酸の長さ、またはそれ以上）からなる。

#### 【0146】

#### 細胞性ポリペプチドおよび薬剤

ウイルス性ポリペプチドに結合する細胞性ポリペプチドも、本明細書で提供される。本明細書に記載のように、細胞性ポリペプチドは、ウイルスゲノムにおいてウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を同定することを含む方法にしたがって、単離することができるが、このウイルス性ポリペプチドは、本明細書に記載のように、少なくとも1つのビルレンス形質を示すものであり、少なくとも40アミノ酸（シグナルペプチド配列を含んでいてもよい）からなる。ある実施形態において、ウイルス性ポリペプチドをアフィニティタグ配列に融合させた、または何らかの方法で結び付けた融合タンパク質を作製し、次に融合タンパク質のウイルス性ポリペプチド部分が細胞内、もしくは該細胞画分中、もしくは該細胞上清中に存在するポリペプチドと相互作用することを可能にするのに十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって、細胞、または該細胞画分もしくは該細胞



胞上清と接触させて、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体を与える。本明細書に詳細に記載されるように、融合タンパク質：細胞性ポリペプチド複合体が単離され、細胞性ポリペプチドの、またはそのポリペプチドの少なくとも1つの断片のアミノ酸配列が、本明細書に記載の方法にしたがって決定されるが、この断片は少なくとも8アミノ酸（または少なくとも10、12、14、16、18もしくは20アミノ酸の長さ、またはそれ以上）からなる。本明細書に記載のように、ウイルス性ポリペプチドは、ウイルスのゲノム（RNAもしくはDNA）によってコードされているが、これには、ボックスウイルス、アデノウイルス、およびヘルペスウイルスといった大型DNAゲノムウイルスが含まれ、さらに本明細書に記載の、もしくは当技術分野で既知の他の任意のウイルスゲノム、または公知の、もしくは入手可能なゲノムが含まれる。

10

#### 【0147】

本明細書に記載の方法によって同定される細胞性ポリペプチドには、細胞表面抗原、細胞表面受容体、サイトカイン、ケモカイン、サイトカインもしくはケモカイン結合タンパク質、細胞内シグナル伝達ポリペプチド、または細胞表面受容体もしくはシグナル伝達分子の基質があるが、それらに限定されない。ウイルス性ポリペプチドと結合する細胞性ポリペプチドの例としては、受容体様タンパク質チロシンホスファターゼ（RPTP）（例えば、白血球共通抗原関連タンパク質（LAR）、RPTP-、およびRPTP-）（例えば、米国特許第6,852,486号；国際公開公報WO 98/37217；Ngら、J. Gen. Virol. 82:2095-105 (2001)；米国特許出願第60/721,876号を参照されたい）がある。RPTPと結合するウイルス性ポリペプチドA41Lは、牛痘ウイルス（CPV）、ワクシニアウイルス（Copenhagen株、Ankara株、Tian Tan株およびWR株）および痘瘡ウイルス（Harvey株、India-1967株およびGarcia-1966株を含む）などの、いくつかの異なるボックスウイルスに存在する。LAR、RPTP-、および/またはRPTP-に対するA41Lの結合は、これらのホスファターゼの少なくとも1つの生物学的機能を変化させ、本明細書に記載のように、免疫細胞の細胞表面に発現されるLAR、RPTP-、および/またはRPTP-とA41Lとの相互作用は、その細胞の免疫応答性を変化させる（例えば、抑制もしくは増強する）。

20

#### 【0148】

ウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの相互作用（例えば、ウイルス性ポリペプチドA41Lと細胞性ポリペプチドRPTPとの相互作用、これは免疫細胞の免疫応答性を変化させる）の結果としての、細胞の生物学的活性の変化は、ウイルス性ポリペプチドと類似した様式で、生物活性薬剤（化合物もしくは分子）によっても達成されることがある。生物活性薬剤には、例えば、小分子、核酸（例えば、アプタマー、siRNA、アンチセンス核酸）、抗体およびそのフラグメント、ならびに融合タンパク質（例えば、ペプチド-Fc融合タンパク質、および免疫グロブリンFcポリペプチドのような他の部分と融合させた細胞ポリペプチドドメインもしくは断片（少なくとも8、10、12、14、16、18、20、25、もしくは30アミノ酸））がある。薬剤は、少なくとも1つの細胞性ポリペプチドと、その細胞性ポリペプチド上のある位置で、相互作用し、かつ結合することができ、その位置は、ウイルス性ポリペプチドが結合するのと同じ位置、もしくはその近傍である。あるいはまた、ウイルス性ポリペプチドの作用と同様の、薬剤による少なくとも1つの生物学的機能の変化は、ウイルス性ポリペプチドが結合する位置から遠位の位置での、薬剤の細胞性ポリペプチドとの結合もしくは相互作用に起因する可能性がある。競合結合アッセイおよび機能アッセイなどの結合実験は、細胞の免疫応答性のレベルを示すものであって、本明細書に記載され当技術分野で実践されている方法にしたがって実施され、薬剤が免疫細胞と結合してその免疫応答性に影響を及ぼす能力およびレベルを、測定して比較することができる。

30

40

#### 【0149】

疾患もしくは障害、例えば、心血管疾患もしくは障害、代謝疾患もしくは障害、増殖性疾患もしくは障害、または免疫疾患もしくは障害を治療するための薬剤を同定する方法が本明細書で与えられる。上記のような疾患もしくは障害を治療するのに有用な薬剤は、細胞性ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的機能を変化させる能力を有する。その方法

50

は、細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドとを相互作用させるのに十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって、(i)細胞性ポリペプチド、または細胞性ポリペプチドを含有する細胞、または細胞上清もしくは細胞画分；(ii)ウイルス性ポリペプチド（すなわち、ウイルス性ビルレンスポリペプチドであり、しかも本明細書に記載の少なくとも1つのビルレンス形質を示すウイルス性ポリペプチド）；および(iii)候補薬剤を互いに接触させること（すなわち、混合、配合すること、または何らかの方法で相互作用を可能にすること）を含むものである。細胞性ポリペプチド、または細胞性ポリペプチドを含有する細胞上清もしくは細胞画分を、反応容器内で、候補薬剤あり、およびなしの状態と接触させる（すなわち混合する、など）。次に、当業者によって日常的に実践され、本明細書にも記載されている方法にしたがって、候補薬剤の存在下での、細胞性ポリペプチドのウイルス性ポリペプチドとの結合レベル（第1の結合レベル）を測定し、候補薬剤非存在下での細胞性ポリペプチドのウイルス性ポリペプチドとの結合レベル（第2の結合レベル）と比較する。候補薬剤なしでのウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの結合レベルは、薬剤存在下での結合レベルと同時に測定することができるが、あるいは、候補薬剤非存在下でのウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの結合レベルは、過去の経過から判断することもできる。候補薬剤非存在下でのウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合レベルと比較した、候補薬剤存在下でのウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合レベルの減少は、その薬剤がウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合を（部分的に、または完全に）阻害することを示しており、したがって疾患または障害の治療に有用な薬物が同定される。このように、薬剤の細胞性ポリペプチドとの結合は、ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合によって影響を受ける、細胞性ポリペプチドの生物学的機能（例えば、免疫細胞の免疫応答性）のうち少なくとも1つもしくは複数に影響を及ぼす。こうした薬剤を同定するための方法は、当業者に周知の任意の適当な対照を追加して含む。

10

20

30

40

50

#### 【0150】

具体的な実施形態において、免疫疾患または障害を治療するための薬剤を同定する方法が与えられ、その方法はウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを本明細書に記載の方法にしたがって同定することを含むが、ただし細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチド（すなわち、ウイルス性ビルレンスポリペプチドであり、しかも本明細書に記載の少なくとも1つのビルレンス形質を示すウイルス性ポリペプチド）との相互作用は、免疫細胞の免疫応答性を变化させる（すなわち、統計学的に有意に、または生物学的に有意に、増加させる、または減少させる）ものである。その方法は、細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドとを相互作用させるのに十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって、(i)細胞性ポリペプチド、または細胞性ポリペプチドを含有する細胞、もしくは細胞上清もしくは細胞画分；(ii)ウイルス性ポリペプチド；および(iii)候補薬剤を互いに接触させること（すなわち混合、組み合わせること、または何らかの方法で相互作用を可能にすること）を含むものである。上記のように、候補薬剤存在下でのウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合レベルを、候補薬剤非存在下でのウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合レベルと比較する。候補薬剤存在下でのウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合レベルが、薬剤非存在下でのウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合レベルと比べて減少しているならば、その薬剤は、免疫疾患もしくは障害の治療に有用である可能性がある。ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合を阻害する（または、妨害する、減少させる、最小限にする、または抑止する）候補薬剤は、ウイルス性ポリペプチドを模倣し、それと同様に作用する可能性があり、したがって、細胞性ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性に影響を及ぼす可能性がある。こうした生物学的活性には、免疫細胞の免疫応答性を变化させること（ある実施形態では、免疫細胞の免疫応答性を抑制すること、ならびに別の実施形態では、免疫細胞の免疫応答性を増強すること）が含まれるが、それに限定されない。したがって、こうした薬剤は、免疫疾患または障害の治療に有用である。

#### 【0151】

免疫応答性は、サイトカインレベル、増殖、および刺激の測定といった、当業者により実施されている方法にしたがって、測定することができる。免疫細胞の免疫応答性は、細胞接着および細胞遊走の変化を評価すること、ならびに細胞性タンパク質（細胞骨格タンパク質、ならびに細胞接着および遊走に影響を与える他のタンパク質などであるが、これに限らない）のチロシンリン酸化パターンを調べることによって、測定することができる。

#### 【0152】

本明細書に記載の薬剤は、免疫疾患もしくは障害、心血管疾患もしくは障害、代謝疾患もしくは障害、または増殖性疾患もしくは障害を、治療もしくは予防する、抑制する、その進行を遅らせる、またはそれに伴う症状を軽減するのに役立つ可能性がある。免疫障害には、炎症性疾患もしくは障害、および自己免疫疾患もしくは障害が含まれる。炎症もしくは炎症反応は、傷害に対する宿主の正常で防御的な反応であるが、炎症は、望ましからざる損傷を引き起こす可能性がある。例えば、アテローム性動脈硬化は、少なくともある程度は、動脈損傷に対する病的反応であり、その結果としての炎症カスケードである。

#### 【0153】

薬剤または細胞性ポリペプチド（もしくはその断片）は、免疫疾患もしくは障害といった、本明細書に記載の疾患もしくは障害を有する、または有する疑いのある患者を治療するのに有用である。こうした治療を必要とする患者は、免疫疾患の症状が発現した、または発現するリスクのある、ヒト、またはヒト以外の霊長類もしくは他の動物（すなわち家畜への使用）とすることができる。ヒト以外の霊長類もしくは他の動物の例としては、家畜、ペット、および動物園の動物（例えば、ウマ、ウシ、スイギュウ、ラマ、ヤギ、ウサギ、ネコ、イヌ、チンパンジー、オランウータン、ゴリラ、サル、ゾウ、クマ、大型のネコ科動物など）があるが、それらに限定されない。

#### 【0154】

本明細書に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントで治療することができる免疫疾患の例には、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、移植片対宿主病（GVHD）、敗血症、糖尿病、乾癬、アテローム性動脈硬化、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、強皮症、急性冠症候群、虚血再灌流、クローン病、子宮内膜症、糸球体腎炎、重症筋無力症、特発性肺線維症、喘息、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、血管炎、または炎症性自己免疫性筋炎および他の炎症性および筋肉変性疾患（例えば、皮膚筋炎、多発筋炎、若年性皮膚筋炎、封入体筋炎）があるが、それらに限定されない。ARDSは、成人および小児で発症する可能性があり、多くの場合、肺泡毛細管ユニットを傷つける、直接的な肺もしくは全身の傷害（例えば、敗血症、肺炎、誤嚥）に続いて起こる。例えば、腫瘍壊死因子（TNF-）、インターロイキン（IL-）、IL-10、および可溶性細胞間接着分子1（sICAM-1）などのいくつかのサイトカインが、同症候群の発現に関わっている。生物学的試料中のこれらの因子およびサイトカインレベルの増減は、本明細書にも記載され、当技術分野で日常的に行われている方法およびアッセイによって容易に測定することができ、急性状態をモニターし、さらに治療効果をモニターすることができる。

#### 【0155】

治療することができる心血管疾患もしくは障害は、免疫疾患／障害とも見なされる疾患および障害を包含することがあるが、これには、例えば、アテローム性動脈硬化、心内膜炎、高血圧、または末梢性虚血性疾患が含まれる。代謝疾患もしくは障害には、糖尿病、肥満、ならびにミトコンドリア機能の異常もしくは変化に関連する疾患および障害がある。

#### 【0156】

本明細書に記載のように、薬剤は、小分子と呼ばれる化合物であってもよい。小分子の薬剤は、化合物、組成物、もしくは分子の「ライブラリー」またはコレクションのメンバーとして与えられることがある。小分子は、典型的には、 $10^5$ ダルトン未満、 $10^4$ ダルトン未満、または $10^3$ ダルトン未満の分子量を有する。例えば、テスト化合物のライブラリー

10

20

30

40

50

のメンバーを、それぞれが少なくとも1つの細胞性ポリペプチド、または本明細書で与えられる細胞性ポリペプチドの起源を含有する複数のサンプルに与えた後に、前記メンバーが細胞性ポリペプチドの生物活性を増強もしくは抑制する能力、またはウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの相互作用を抑制もしくは増強する能力について、サンプルをアッセイする。

#### 【0157】

免疫細胞の免疫応答性のような、細胞の生物学的機能を変化させるために使用される生物活性薬剤であって、しかも疾患もしくは障害の治療に使用することができる前記薬剤は、ペプチド-免疫グロブリン(Ig)定常領域 融合ポリペプチドであり、これにはペプチド-IgFc融合ポリペプチドがある。ペプチドは、任意の天然に存在する、または組換えによって調製された分子とすることができる。例えばペプチド-IgFc融合ポリペプチドのような、ペプチド-Ig定常領域 融合ポリペプチド(当技術分野では、ペプチボディ(peptibody)とも呼ばれる(例えば、米国特許第6,660,843号を参照されたい))は、目的とするタンパク質の活性を変化させることができる、生物学的に活性なペプチドもしくはポリペプチドを含有する。Fcポリペプチドは、本明細書に記載のように、ムテインFcポリペプチドであってもよい。細胞の生物学的機能、例えば免疫細胞の免疫応答性を変化させるペプチドは、コンビナトリアルライブラリー(例えば、国際特許出願PCT/US91/08694およびPCT/US91/04666を参照されたい)、ならびにファージディスプレイペプチドライブラリー(例えば、Scottら、Science 249:386 (1990); Devlinら、Science 249:404 (1990); Cwirlaら、Science 276: 1696-99 (1997); 米国特許第5,223,409号; 米国特許第5,733,731号; 米国特許第5,498,530号; 米国特許第5,432,018号; 米国特許第5,338,665号; 1994; 米国特許第5,922,545号; 国際出願公開番号WO 96/40987およびWO 98/15833を参照されたい)から、同定して単離することができる。

#### 【0158】

ある実施形態において、目的の細胞性ポリペプチドをコードする配列の少なくとも一部に相補的であるポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド(例えば、低分子干渉核酸、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、またはペプチド核酸)であって、しかも遺伝子および/またはタンパク質の発現を変化させるために使用することができる前記ポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドが与えられる。本明細書に記載のように、細胞性ポリペプチドをコードする核酸分子と特異的に結合する、またはハイブリダイズするこれらのポリヌクレオチドは、当技術分野で利用可能なヌクレオチド配列を用いて調製することができる。別の実施形態において、アダプターのような、配列特異的でない核酸分子も、遺伝子および/またはタンパク質発現を変化させるために使用することができる。

#### 【0159】

アンチセンスポリヌクレオチドは、mRNAもしくはDNAといった核酸に、配列特異的に結合する。アンチセンス剤として使用するためのオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの同定、ならびに標的化デリバリーのための遺伝子をコードするDNAの同定には、当技術分野でよく知られている方法が用いられる。例えば、こうしたオリゴヌクレオチドの望ましい性質、長さ、および他の特徴がよく知られている。アンチセンス技術を用いて、ポリメラーゼ、転写因子、または他の制御分子の結合に干渉することにより、遺伝子発現を調節することができる(Geeら、Huber and Carr, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co. (Mt. Kisco, NY; 1994)を参照されたい)。

#### 【0160】

目的の細胞性ポリペプチドをコードする遺伝子の発現をモジュレートする(減少させる、または抑制する)ために、低分子干渉RNAを使用してもよい。本明細書の記載は、小核酸分子を用いたRNA干渉によって遺伝子の発現および活性をモジュレートするのに有用な、化合物、組成物、および方法に関するものである。とりわけ、低分子干渉RNA(siRNA)、マイクロRNA(miRNA)および低分子ヘアピンRNA(shRNA)分子といった、小核酸分子を、目的の細胞性ポリペプチドの発現をモジュレートするために、本明細書に記載の方法にしたがって使用することができる。siRNAポリヌクレオチドは二本鎖RNA(dsRNA)からな

ることが好ましいが、一本鎖RNAでもよい（例えば、Martinezら、Cell 110:563-74 (2002)を参照されたい）。siRNAポリヌクレオチドは、本明細書で与えられ、既知であって、しかも当業者によって使用されている、他の天然に存在する、組換えの、または合成の、ヌクレオチド（リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチド、または両者の組み合わせ）および/またはヌクレオチドアナログの一本鎖もしくは二本鎖ポリマーを含んでいてもよい。

#### 【0161】

二本鎖siRNAポリヌクレオチドの少なくとも一方の鎖は、そのsiRNAポリヌクレオチドのいずれか一方のストランド、または両方のストランドの3'末端で「オーバーハング」となっている（すなわち、相手方のストランドの相補的塩基と塩基対を組んでいない）、少なくとも1つ、好ましくは2つのヌクレオチドを有する。典型的には、siRNAポリヌクレオチド二本鎖の各ストランドが、3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハングを有する。2ヌクレオチドオーバーハングは、チミジンジヌクレオチド(TT)とすることができるが、他の塩基、例えば、TCジヌクレオチド、もしくはTGジヌクレオチド、または他の任意のジヌクレオチドからなってもよい（例えば、国際特許出願公開WO 01/75164を参照されたい）。あるいはまた、siRNAポリヌクレオチドは、平滑末端を有していてもよく、すなわち、二本鎖の一方のストランドの各ヌクレオチドは、他方のストランドのヌクレオチドと（例えば、Watson-Crick塩基対合によって）完全に相補的である。

#### 【0162】

別の実施形態において、目的の細胞性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（またはその一部）のデオキシリボースリン酸骨格を変更することによって、ペプチド核酸（PNA）を調製することができる（例えば、Hyrup B.ら、Bioorganic & Medicinal Chemistry 4:5-23(1996)を参照されたい）。「ペプチド核酸」または「PNA」という用語は、デオキシリボースリン酸骨格が擬ペプチド骨格で置き換えられ、4つの核酸塩基のみが保持されている、核酸ミミック（模倣体）、例えば、DNAミミックを表す。PNAの中性骨格は、イオン強度の低い条件下で、DNAおよびRNAとの特異的なハイブリダイゼーションを可能にすることが判明している。PNAオリゴマーの合成は、標準的な固相ペプチド合成法によって行うことができる（例えば、Hyrup B.、上記；Perry-O'Keefeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14670-75 (1996)を参照されたい）。細胞性ポリペプチドに特異的なPNA分子は、例えば、転写もしくは翻訳の停止を誘導することによって、または複製を抑制することによって、遺伝子発現を配列特異的にモジュレートするための、アンチセンスもしくはアンチジーン剤として使用することができる。

#### 【0163】

アプタマーは、核酸、タンパク質、脂質などを含めた他の分子と結合する能力に基づいて、ランダムプールから選択された、一般に一本鎖の、DNAもしくはRNA分子である。目的のポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドと結合して、転写もしくは翻訳を変化させる、アンチセンスポリヌクレオチド、低分子干渉RNA（siRNA）、またはリボザイムとは異なり、アプタマーはポリペプチドを標的として、それに結合することができる。アプタマーは、ランダムな、または無修飾のオリゴヌクレオチドライブラリーから、特定の標的と結合する能力によって、選択することができる（例えば、米国特許第6,867,289号；第5,567,588号を参照されたい）。アプタマーは、さまざまな二次元および三次元構造を形成する能力を有し、単量体であれ多量体であれ、事実上あらゆる化合物に対するリガンドとして機能する（すなわち、特異的な結合対を形成する）のに十分な、そのモノマー内部で利用可能な化学的多用途性を有している。いかなる大きさの、またはいかなる組成の分子も、標的となりうる。in vitro選択の反復プロセスを用いて、標的に対して高い親和性を有する分子種についてライブラリーを濃縮することができる。このプロセスは、ライブラリーを望ましい標的とともにインキュベートし、標的と結合したものを遊離のオリゴヌクレオチドを分離し、さらに、結合したオリゴヌクレオチドサブセットを、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて、増幅する、というサイクルを繰り返すことを含むものである。選択された、標的に対して高い親和性を有する配列のサブ集団から、サ

ブ集団をサブクローニングし、特定のアプタマーをより詳細に調べて、標的の生物学的機能を変化させるアプタマーを同定することができる（例えば、米国特許第6,699,843号を参照されたい）。

【0164】

アプタマーは、任意のデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはこれらの塩基の修飾されたもの、例えば、デオキシチオリン酸（もしくはホスホロチオ酸）を含むことができるが、これはリンに結合した非架橋リガンドの1つとして酸素のかわりに硫黄を有するものである。モノチオリン酸 Sは1つの硫黄原子を有し、したがってリンを中心としてキラルになる。ジチオリン酸は、2つの酸素が置換されており、したがってキラルでない。ホスホロチオ酸ヌクレオチドは市販されているが、当技術分野で公知のいくつかの異なる方法によって合成することもできる。

10

【0165】

薬剤には、目的とする細胞性ポリペプチドと特異的に結合する抗体、またはその抗原結合フラグメントが挙げられる。これらの特異的抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナルであって、動物の免疫化、およびその後の抗体の分離によって調製することができるが、または抗体は、組み換え抗体であってもよい。

【0166】

本明細書で使用される場合、抗体が検出可能なレベルで目的の細胞性ポリペプチドと反応し、好ましくは親和定数 $K_a$ が約 $10^4 \text{ M}^{-1}$ 以上、もしくは約 $10^5 \text{ M}^{-1}$ 以上、約 $10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上、約 $10^7 \text{ M}^{-1}$ 以上、または $10^8 \text{ M}^{-1}$ であるならば、その抗体は細胞性ポリペプチドに対して「免疫特異的である」、「特異的である」、または同ポリペプチドと「特異的に結合する」と言われる。コグネイト抗原に対する抗体の親和性も、一般に、解離定数 $K_D$ として表され、抗細胞性ポリペプチド抗体が、 $10^{-4}$ 以下、約 $10^{-5}$ 以下、約 $10^{-6}$ 以下、 $10^{-7}$ 以下、または $10^{-8}$ 以下の $K_D$ で結合するならば、その抗体は細胞性ポリペプチドと特異的に結合している。このような定義は、本明細書に記載の他の抗原抗体反応、例えば、ポリペプチドタグとそのコグネイトリガンド、にも適用することができる。

20

【0167】

結合パートナーもしくは抗体の親和性は、従来技術、例えば、Scatchardら (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949))によって記載された技術を用いて、また表面プラズモン共鳴 (SPR; BIAcore<sup>TM</sup>, Biosensor, Piscataway, NJ)によって、容易に測定することができる。表面プラズモン共鳴のために、標的分子を固相に固定化し、フローセルに沿って流れる移動相中のリガンドと接触させる。リガンドと固定化標的との結合が生じると、局所的な屈折率が変化してSPR角の変化をもたらし、それを、反射光の強度変化を検出することによって、リアルタイムでモニターすることができる。表面プラズモン共鳴シグナルの変化率を解析して、結合反応の結合および解離相に対する見かけの速度定数を得ることができる。これらの値の比が、見かけの平衡定数（親和性）を与える（例えば、Wolffら, Cancer Res. 53:2560-2565 (1993)を参照されたい）。

30

【0168】

本明細書に記載の細胞性ポリペプチドに対する抗体の結合特性は、一般に、免疫検出法を用いて測定および評価することができるが、こうした方法には例えば、酵素結合免疫吸着法 (ELISA)、免疫沈降法、免役プロット法、向流免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ、ドットプロットアッセイ、阻害もしくは競合アッセイなどがあり、当業者はこれらを容易に実施することができる（例えば、米国特許第4,376,110号および第4,486,530号；Harlowら, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)を参照されたい）。イムノアッセイ法は、抗体が細胞性ポリペプチドと特異的に結合するかどうか、ならびに他の細胞性ポリペプチドを認識しないか、もしくはそれと交差反応しないかどうかを判断するための対照および手順を含むことができる。

40

【0169】

抗体は、例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、またはIgAといった、いかなる免疫グロブリンクラスに属していてもよい。抗体は、例えば、家禽（例えば、ニワトリ）および哺乳類と

50

いった、動物から得ることができる、または動物起源とすることができるが、哺乳類にはマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、もしくは他の齧歯類、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ヒト、もしくは他の霊長類が含まれ、しかしそれに限定されることはない。抗体は、内在化される抗体であってもよい。こうした技術で、本明細書に記載の細胞性ポリペプチドもしくはその断片（少なくとも6アミノ酸）を抗原として用いて動物を免疫し、ポリクローナル抗血清を生じさせる。適当な動物には、例えば、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシがあり、またもっと小型の哺乳類、例えばマウス、ラットおよびハムスター、または他の種の動物を含めることもできる。

#### 【0170】

抗体は、一般に、当業者に周知のさまざまな技術のいずれかによって調製することができる。例えば、Harlowら、*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Peterson, *ILAR J.* 46:314-19 (2005)を参照されたい。細胞性ポリペプチドと特異的に結合するポリクローナル抗体は、当業者によって報告され、実践されている方法を用いて調製することができる（例えば、Greenら、「ポリクローナル抗血清の生産」（“Production of Polyclonal Antisera”）、*Immunochemical Protocols* (Manson 編)より、1-5ページ (Humana Press 1992); Harlowら、*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Williamsら、「プラスミドベクターを用いた大腸菌における外来タンパク質の発現と特異的ポリクローナル抗体の精製」（“Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies”）、*DNA Cloning 2: Expression Systems*, 第2版、Gloverら(編)より、15ページ (Oxford University Press 1995)を参照されたい)。ポリクローナル抗体は、典型的には、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ウシ、またはヒツジといった動物中に生じるが、類人猿から抗細胞性ポリペプチド抗体を得ることもできる。診断および治療に役立つ抗体をヒヒで産生させるための一般的な技法は、例えば、国際特許出願公開WO 91/11465 (1991)、およびLosmanら、*Int. J. Cancer* 46:310, 1990に見出すことができる。

#### 【0171】

目的の細胞性ポリペプチドと特異的に結合するモノクローナル抗体、ならびに望ましい結合特異性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ（これは不死の真核細胞株の例である）も、例えば、KohlerおよびMilstein (*Nature*, 256:495-97 (1976), *Eur. J. Immunol.* 6:511-19 (1975))の方法、およびその改良法（例えば、Coliganら(編)、*Current Protocols in Immunology*, 1:2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991); 米国特許第4,902,614号、第4,543,439号および第4,411,993号; *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennettら(編) (1980); ならびに*Antibodies: A Laboratory Manual*, HarlowおよびLane (編), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)を参照されたい; またBrandら、*Planta Med.* 70:986-92 (2004); Pasqualiniら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:257-59 (2004)も参照されたい)を用いて調製することができる。動物、例えば、ラット、ハムスター、または、もっと一般的にはマウスを、当技術分野で行われている方法にしたがって調製された細胞性ポリペプチド免疫原で、免疫する。特異的抗体産生の有無は、初回注入（注入物は、ポリクローナル抗体作製のために本明細書に記載のいくつかの経路のいずれかによって、投与することができる）後、および/またはブースター注入後に、血清サンプルの採取、ならびに当業者に周知であって本明細書に記載されるいくつかの免疫検出法のいずれかによる、細胞性ポリペプチドと結合する抗体の存在の検出によって、モニターすることができる。

#### 【0172】

細胞性ポリペプチドと特異的に結合する抗体は、ヒトモノクローナル抗体とすることができる。ヒトモノクローナル抗体は、当業者が精通しているいくつかの技術によって作製することができる。そうした方法には、ヒト末梢血液細胞（例えば、Bリンパ球を含有する）のエプスタインバールウイルス（EBV）による形質転換（例えば、米国特許第4,464,456号を参照されたい; また、例えば、Glaskyら、*Hybridoma* 8:377-89 (1989)も参照され

たい) ; ヒトB細胞のin vitro免疫化 (例えば、Boernerら、J. Immunol. 147:86-95 (1991)を参照されたい) ; 挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子を保有する免疫化トランスジェニックマウス由来の脾細胞の融合 (例えば、Greenら、Nature Genet. 7:13 (1994); Lönbergら、Nature 368:856 (1994); Taylorら、Int. Immun. 6:579 (1994); 米国特許第5,877,397号; Bruggemannら、Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58 (1997); Jakobovitsら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:525-35 (1995)を参照されたい) ; ヒト免疫グロブリンV領域ファージライブラリーからの分離 ; 抗-細胞性ポリペプチド抗体を産生しているB細胞からの軽鎖および重鎖可変領域のクローニング (WO 92/02551; 米国特許第5,627,052号; Babcockら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48 (1996)) ; または当技術分野で公知の、ならびに本明細書の記載に基づく、他の方法があるがそれらに限定されない。

10

#### 【0173】

目的の細胞性ポリペプチドに特異的なキメラ抗体は、ヒト化抗体も含めて、やはり本発明にしたがって作製することができる。キメラ抗体は、第1の哺乳類に由来する少なくとも1つの定常領域、および第2の別の哺乳類に由来する少なくとも1つの可変領域を有する。例えば、Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-55 (1984)を参照されたい。ある実施形態において、キメラ抗体は、非ヒトモノクローナル抗体に由来する少なくとも1つの可変領域ドメイン、例えばマウス、ラットもしくはハムスターモノクローナル抗体由来の可変領域をコードするポリヌクレオチド配列を、少なくとも1つのヒト定常領域をコードする核酸配列を含有するベクター内にクローニングすることによって構築することができる (例えば、Shinら、Methods Enzymol. 178:459-76 (1989); Wallisら、Nucleic Acids Res. 21:2921-29 (1993)を参照されたい)。

20

#### 【0174】

非ヒト/ヒトキメラ抗体をさらに遺伝子操作して、「ヒト化」抗体を作製することができる。このヒト化抗体は、非ヒト哺乳類の免疫グロブリン由来の複数のCDR、少なくとも1つのヒト可変フレームワーク領域、および少なくとも1つのヒト免疫グロブリン定常領域を含むことができる。したがって、ヒト化抗体をデザインするための有用な戦略は、例えば、説明のためであって限定するわけではないが、キメラ抗体の非ヒトフレームワーク領域にもっとも相同的なヒト可変フレームワーク領域の同定を含むことができる (例えば、Jonesら、Nature 321:522-25 (1986); Riechmannら、Nature 332:323-27 (1988)を参照されたい)。

30

#### 【0175】

したがって、ヒト化抗体をデザインすることは、例えばコンピュータモデリングによって、CDRループの高次構造および非ヒト可変領域の構造的決定要因を決定したのち、そのCDRループおよび決定要因を既知のヒトCDRループ構造および決定要因と比較することを含むことができる (例えば、Padlanら、FASEB 9:133-39 (1995); Chothiaら、Nature, 342:377-83 (1989)を参照されたい)。コンピュータモデリングを用いて、配列相同性により選択されたヒト構造テンプレートを非ヒト可変領域と比較することもできる (例えば、Bajorathら、Ther. Immunol. 2:95-103 (1995); 欧州特許EP-0578515-A3; Daviesら、Ann. Rev. Biochem. 59:439-73, (1990)を参照されたい)。非ヒトCDRのヒト化が結果的に結合親和性の減少をもたらす場合には、コンピュータモデリングの助けを借りて、親和性を部分的に、完全に、もしくは最適以上に (すなわち非ヒト化抗体より高いレベルにまで増加) 回復させるように、部位特異的もしくは他の変異誘発法によって変化させることができる、特定のアミノ酸残基を同定することができる。当業者はこうした技術に精通しており、容易に、こうしたデザイン法に対する多数の変法および修正を正しく評価することができると思われる。

40

#### 【0176】

特定の使用のために、抗体の抗原結合フラグメントが望ましいことがある。例えば、抗体のタンパク質分解性加水分解、その例として従来法による全抗体のペプシンもしくはパイン消化により、抗体フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fab'、Fv、およびFdを得ることができる。実例として、抗体フラグメントは、ペプシンによる抗体の酵素的分解によって作

50



製され、 $F(ab')_2$ と呼ばれるフラグメントを与えることができる。このフラグメントを、チオール還元剤を用いてさらに切断し、 $Fab'$  1 価フラグメントを作製することができる。必要ならば、切断反応は、ジスルフィド結合の切断の結果生じるスルフヒドリル基のための保護基を使用して、実施することができる。別の方法として、パパインを用いた抗体の酵素的切断は、2つの1価 $Fab$ フラグメントおよび $Fc$ フラグメントを生じる（例えば、米国特許第4,331,647号；Nisonoffら、Arch. Biochem. Biophys. 89:230 (1960)；Porter, Biochem. J. 73:119 (1959)；Edelmanら、Methods in Enzymology 1:422 (Academic Press 1967)；Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston (1986)を参照されたい）。抗原結合フラグメントは、例えば、固定化されたプロテインA、プロテインG、 $Fc$ 特異的抗体、または固定化された細胞性ポリペプチドもしくはその断片を用いた、アフィニティークロマトグラフィーによって $Fc$ フラグメントから分離することもできる。抗体を切断するための他の方法、例えば、重鎖を分離して1価軽-重鎖フラグメント( $Fd$ )を形成させること、フラグメントをさらに切断すること、または他の酵素的、化学的、または遺伝学的技法も、フラグメントが、インタクトな抗体により認識される細胞性ポリペプチドと結合する限り、使用することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0177】

また、抗体フラグメントは、それが特異的な抗原と結合して複合体を形成するという点で抗体のように作用する、いかなる合成タンパク質、または遺伝子工学で作製されたタンパク質であってもよい。例えば、抗体フラグメントには、軽鎖可変領域からなる単離されたフラグメント、重鎖および軽鎖の可変領域からなる $Fv$ フラグメント、軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリinkerによって連結されている組換え一本鎖ポリペプチド分子( $scFv$ タンパク質)、および超可変領域を模したアミノ酸残基からなる最小認識単位がある。本発明の抗体は、好ましくは、少なくとも1つの可変領域ドメインを含む。可変領域ドメインは、いかなる大きさでも、いかなるアミノ酸組成を有していてもよく、一般に、抗原結合を担う少なくとも1つの超可変アミノ酸配列を含有するものであるが、この配列は1つもしくは複数のフレームワーク配列と隣接しており、またはそれらを有する骨組みの中にある。一般的に言って、可変( $V$ )領域ドメインは、免疫グロブリン重鎖可変ドメイン( $V_H$ )および/または軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )の任意の適当な取り合わせとすることができる。したがって、例えば、 $V$ 領域ドメインは単量体であってもよく、 $V_H$ もしくは $V_L$ とすることができるが、これは独立に、許容される親和性で抗原と結合する能力を有する。あるいはまた、 $V$ 領域ドメインは二量体であってもよく、 $V_H-V_H$ 、 $V_H-V_L$ 、または $V_L-V_L$ 二量体を含有することができる。好ましくは、 $V$ 領域二量体は、非共有結合している少なくとも1つの $V_H$ 鎖および少なくとも1つの $V_L$ 鎖を含有する（以後、 $F_v$ と称する）。必要ならば、これらの鎖は、2つの可変ドメイン間のジスルフィド結合を介して直接、または、例えばペプチドリinkerのようなリンカーを介して共有結合し、一本鎖 $Fv(scF_v)$ を形成してもよい。

#### 【0178】

最小認識単位は、1つの相補性決定領域(CDR)を含む抗体フラグメントである。このようなCDRペプチドは、目的の抗体のCDRをコードするポリヌクレオチドを構築することによって得ることができる。このポリヌクレオチドは、例えば、当業者が実施している方法にしたがって、抗体産生細胞から単離された、またはその細胞内に含まれているmRNAを鋳型として用いて可変領域を合成することができる、ポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって調製される（例えば、Larrickら、Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, (1991)；Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritterら（編）より、166ページ (Cambridge University Press 1995)；およびWardら、"Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birchら（編）より、137ページ (Wiley-Liss, Inc. 1995)を参照されたい）。あるいはまた、こうしたCDRペプチドおよび他の抗体フラグメントは、自動ペプチド合成装置を用いて合成することができる。

#### 【0179】

ある実施形態によれば、本明細書に記載のIg分子のいずれの非ヒト、ヒト、またはヒト化重鎖および軽鎖可変領域も、scFvポリペプチドフラグメント（一本鎖抗体）として構築することができる。例えば、Birdら、*Science* 242:423-426 (1988); Hustonら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83 (1988)を参照されたい。多機能性scFv融合タンパク質は、scFvポリペプチドをインフレームでコードするポリヌクレオチド配列と、既知のさまざまなエフェクタータンパク質のいずれかをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド配列とを連結することによって、作製することができる。こうした方法は当技術分野で知られており、例えば、欧州特許EP-B1-0318554、米国特許第5,132,405号、米国特許第5,091,513号、および米国特許第5,476,786号に記載されている。一例として、エフェクタータンパク質は、免疫グロブリン定常領域配列を含有することができる。例えば、Hollenbaughら、*J. Immunol. Methods* 188:1-7 (1995)を参照されたい。エフェクタータンパク質の他の例は酵素である。限定的でない例として、こうした酵素は治療目的の生物活性を与えることができる（例えば、Siemersら、*Bioconjug. Chem.* 8:510-19 (1997)を参照されたい）が、あるいは診断用の目的で、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼが触媒する、数多くの周知の基質の検出可能な産物への変換といった、検出可能な活性を与えることもできる。

10

#### 【0180】

抗体はまた、ヒト免疫グロブリンファージライブラリー、ウサギ免疫グロブリンファージライブラリー、マウス免疫グロブリンファージライブラリー、および/またはニワトリ免疫グロブリンファージライブラリーから同定して単離することができる（例えば、Winterら、*Annu. Rev. Immunol.* 12:433-55 (1994); Burtonら、*Adv. Immunol.* 57:191-280 (1994); 米国特許第5,223,409号; Huseら、*Science* 246:1275-81 (1989); Schlebuschら、*Hybridoma* 16:47-52 (1997)およびそれに引用されている参考文献; Raderら、*J. Biol. Chem.* 275:13668-76 (2000); Popkovら、*J. Mol. Biol.* 325:325-35 (2003); Andris-Widhopfら、*J. Immunol. Methods* 242:159-31 (2000)を参照されたい）。ヒト以外の種、もしくは非ヒト免疫グロブリンライブラリーから単離された抗体は、本明細書に記載の、当技術分野で公知の方法にしたがって遺伝子操作され、抗体もしくはそのフラグメントを「ヒト化」することができる。目的とする細胞性ポリペプチドに特異的に結合するIgフラグメント（Fab、Fv、scFv、またはそれらの多量体）を選択するためにスクリーニングすることができる、免疫グロブリン可変領域遺伝子のコンビナトリアルライブラリーを、ファージベクター内に作ることができる（例えば、米国特許第5,223,409号; Huseら、*Science* 246:1275-81 (1989); Sastryら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5728-32 (1989); Altin-Meesら、*Strategies in Molecular Biology* 3:1-9 (1990); Kangら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363-66 (1991); Hoogenboomら、*J. Molec. Biol.* 227:381-388 (1992); Schlebuschら、*Hybridoma* 16:47-52 (1997)およびそれに引用されている参考文献; 米国特許第6,703,015号を参照されたい）。

20

30

#### 【0181】

他の実施形態において、細胞性ポリペプチドに特異的な抗体は、多量体の抗体フラグメントである。有用な方法論は、例えば、Haydenら、*Curr Opin. Immunol.* 9:201-12 (1997)およびColomaら、*Nat. Biotechnol.* 15:159-63 (1997)に概説されている。例えば、多量体の抗体フラグメントは、ファージ技術によって作製され、ミニ抗体（米国特許第5,910,573号）またはダイアボディ（Holligerら、*Cancer Immunol. Immunother.* 45:128-30 (1997)）を形成することができる。細胞性ポリペプチドに特異的なFvの多量体である、多量体フラグメントを作製することができる。多量体型抗体には、ある抗原に特異的な第1のFvを、異なる抗原特異性を有する第2のFvとともに含有する、二重特異性および二機能性抗体がある（例えば、Drakemanら、*Expert Opin. Investig. Drugs* 6:1169-78 (1997); Koelemijら、*J. Immunother.* 22:514-24 (1999); Marvinら、*Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-58 (2005); Dasら、*Methods Mol. Med.* 109:329-46 (2005)を参照されたい）。

40

#### 【0182】

最小認識単位は、1つの相補性決定領域（CDR）を含む抗体フラグメントである。この

50

ようなCDRペプチドは、目的の抗体のCDRをコードするポリヌクレオチドを構築することによって得ることができる。このポリヌクレオチドは、例えば、当業者により実施されている方法にしたがって、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、抗体産生細胞から単離されたmRNA、またはその細胞内に含まれているmRNAを鋳型として用いて可変領域を合成することによって、調製される（例えば、Larrickら、Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritterら（編）より、166ページ (Cambridge University Press 1995); およびWardら、"Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birchら（編）より、137ページ (Wiley-Liss, Inc. 1995) を参照されたい）。あるいはまた、こうしたCDRペプチドおよび他の抗体フラグメントは、自動ペプチド合成装置を用いて合成することができる。

10

#### 【0183】

他の実施形態において、最小認識単位は、ペプチドライブラリーから同定することができる。そうしたペプチドは、コンビナトリアルライブラリー（例えば、国際特許出願番号PCT/US91/08694およびPCT/US91/04666を参照されたい）、およびファージディスプレイペプチドライブラリー（例えば、Scottら、Science 249:386 (1990); Devlinら、Science 249:404 (1990); Cwirlaら、Science 276: 1696-99 (1997); 米国特許第5,223,409号; 米国特許第5,733,731号; 米国特許第5,498,530号; 米国特許第5,432,018号; 米国特許第5,338,665号; 1994; 米国特許第5,922,545号; 国際出願公開公報WO 96/40987 およびWO 98/15833を参照されたい）から同定して単離することができる。ファージディスプレイペプチドライブラリーにおいて、ランダムなペプチド配列をファージコートタンパク質に融合し、そのペプチドが繊維状ファージ粒子の外部表面上にディスプレイされるようにする。

20

#### 【0184】

最小認識単位すなわちCDR（すなわち、重鎖可変領域にある3つのCDRのうちいずれか1つもしくは複数、および/または軽鎖可変領域にある3つのCDRのうちいずれか1つもしくは複数）であるペプチドは、コンピュータモデリング法によって同定することができるが、その方法は、本明細書に記載のように細胞性ポリペプチドに特異的に結合するペプチド配列を比較して予測するために、使用することができるものである（例えば、Bradleyら、Science 309:1868 (2005); Schueler-Furmanら、Science 310:638 (2005)を参照されたい）。こうしたコンピュータの助けを借りた予測モデリング法は、細胞性ポリペプチドと結合する抗体の、結合アフィニティを変更するのにも有用であると考えられる。最小認識単位および/または1つもしくは複数のCDRの予想される三次元構造を、細胞性ポリペプチドと特異的に結合するウイルス性ポリペプチドの予想三次元構造と比較することによって、モデリング法は、置換可能で、しかも細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドとの結合相互作用により近い、最小認識単位内の残基、および/または1つもしくは複数のCDRの残基を同定する方法を与える。アミノ酸置換は、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド変異体を作製する目的で、本明細書に記載され、当技術分野で日常的に使用されている、多くの変異誘発法のいずれかを用いて、容易に行うことができる。

30

#### 【0185】

ある実施形態において、目的の細胞性ポリペプチドと特異的に結合する抗体（もしくはその抗原結合フラグメント）を認識し、これに特異的に結合する、抗イディオタイプ抗体が与えられる。抗イディオタイプ抗体は、細胞性ポリペプチドと特異的に結合する抗体（もしくはその抗原結合フラグメント）を免疫原として用いて、本明細書に記載の方法によって、ポリクローナル抗体として、またはモノクローナル抗体として作製することができる。抗イディオタイプ抗体またはその抗原結合フラグメントは、また、上記の組換え遺伝子操作法のいずれかによって、またはファージディスプレイ選択によって、作製することができる。本明細書で詳細に与えられる記載にしたがって、また当技術分野で日常的に行われている方法にしたがって、抗イディオタイプ抗体をさらに操作して、キメラもしくはヒト化抗イディオタイプ抗体を与えることもできる。抗イディオタイプ抗体は、抗細胞性

40

50

ポリペプチド抗体の抗原結合部位に特異的に結合することができ、その抗体の細胞性ポリペプチドとの結合を競合的に阻害する。あるいはまた、本明細書で与えられる抗イディオタイプ抗体は、抗細胞性ポリペプチド抗体と細胞性ポリペプチドとの結合を競合的に阻害しないこともある。

#### 【0186】

薬剤には、ペプチド-免疫グロブリン(Ig)定常領域融合ポリペプチドも挙げられるが、これにはペプチド-IgFc融合ポリペプチドが含まれる。ペプチドは、任意の天然に存在する分子もしくは組換え作製分子とすることができる。ペプチド-Ig定常領域融合タンパク質、例えば、ペプチド-IgFc融合ポリペプチド(当技術分野ではペプチボディ(Peptibody)とも称される(例えば、米国特許第6,660,843号を参照されたい))は、目的の細胞性ポリペプチドの活性を変化させる能力を有する、生物学的に活性なペプチドもしくはポリペプチドを、免疫グロブリンの一部、少なくとも1つの定常領域ドメイン(例えば、CH1、CH2、CH3、および/またはCH4)、またはFc部分(CH2-CH3)とインフレイムで融合させて、含有している。Fc部分は本明細書ではFc領域とも称される。

#### 【0187】

ある実施形態において、融合ポリペプチドのペプチド部分は、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドと相互作用する、もしくは結合する能力を有し、加えて、それが細胞性ポリペプチドと結合する際にウイルス性ポリペプチドと同一の生物活性を発揮する能力を有する。特定の実施形態において、ペプチド-Fc融合ポリペプチドの結合は、細胞性ポリペプチドを発現する免疫細胞の免疫応答性を抑制する(阻害する、妨げる、低下させる、または抑止する)。例えば、こうしたペプチドは、それが細胞性ポリペプチドを発現する細胞とウイルス性ポリペプチドとの結合を阻害する、もしくは阻止する能力を測定することによって、同定することができる。あるいはまた、候補ペプチドを、細胞性ポリペプチドを発現する細胞と接触もしくは相互作用させておき、その候補ペプチドがその細胞の生物学的機能の少なくとも1つを抑制もしくは増強する能力を、本明細書に記載され当技術分野でも実施されている方法にしたがって、測定することができる。

#### 【0188】

候補ペプチドは、コンビナトリアルライブラリーのメンバーとして与えられることもあるが、このライブラリーには、複数の反応容器内で実施される、複数のあらかじめ決められた化学反応により調製される合成ペプチドが含まれる。例えば、当業者が精通している標準的なペプチド合成技術によって、さまざまな出発ペプチドを調製することができる。

#### 【0189】

細胞の生物活性を少なくとも1つ変化させるペプチドを、コンビナトリアルライブラリー(例えば、国際特許出願番号PCT/US91/08694およびPCT/US91/04666を参照されたい)から、ならびにファージディスプレイペプチドライブラリー(例えば、Scottら、Science 249:386 (1990); Devlinら、Science 249:404 (1990); Cwirlaら、Science 276: 1696-99 (1997); 米国特許第5,223,409号; 米国特許第5,733,731号; 米国特許第5,498,530号; 米国特許第5,432,018号; 米国特許第5,338,665号; 1994; 米国特許第5,922,545号; 国際出願公開番号WO 96/40987およびWO 98/15833を参照されたい)から、同定して単離することができる。ファージディスプレイペプチドライブラリーでは、ランダムなペプチド配列がファージコートタンパク質に融合されており、そのペプチドは繊維状ファージ粒子の外部表面上に提示される。典型的には、提示されたペプチドを、目的のリガンドもしくは結合分子と接触させて、そのリガンドもしくは結合分子とペプチドとを相互作用させておき、未結合のファージを除去して、結合したファージを溶出した後、アフィニティ精製および増幅を複数回連続して行うことによって濃縮する。目的のリガンドもしくは結合分子もしくは標的分子(例えば、本明細書において同定され、記載される細胞性ポリペプチド)に対して最大の親和性を有するペプチドを配列決定して、鍵となる残基を同定することができるが、この残基は1つもしくは複数の構造的に関連したペプチドファミリーの中で、ペプチドを同定することができる。ペプチド配列の比較は、そうしたペプチド内のどの残基を変異誘発によって安全に置換し、または欠失させることができるかを示すこともできる

。その後、これらのペプチドを、スクリーニングすることができる別途のペプチドライブラリーに組み入れることができ、最適な親和性を有するペプチドを同定することができる。

#### 【0190】

細胞の少なくとも1つの生物活性を変化させることができ、したがって免疫疾患もしくは障害、またはウイルス感染症の治療および/または予防に有用となりうるペプチドを同定するための、さらに別の方法には、(1)タンパク質-タンパク質相互作用の構造解析、例えば細胞性ポリペプチドの重要残基の位置付けを識別して決定するために、細胞性ポリペプチド標的の結晶構造(例えば、Jia, Biochem. Cell Biol. 75:17-26 (1997)を参照されたい)を解析することであって、これはペプチドをデザインするのに有用であると思われる(例えば、Takasakiら、Nature Biotech. 15: 1266-70 (1997)を参照されたい)、(2)ペプチドグリカン結合リボタンパク質と融合させたペプチドであって、大腸菌(*E. coli*)のような細菌の外部表面上に提示される前記ペプチドを含有する、ペプチドライブラリー、(3)ポリペプチドの翻訳を中断させてRNA結合ペプチドを生成させることにより、ペプチドライブラリーを作製すること、ならびに(4)1つもしくは複数のプロテアーゼでポリペプチドを消化することによりペプチドを生成させることがあるが、それらに限定されない(例えば、米国特許第6,660,843号、第5,773,569号、第5,869,451号、第5,932,946号、第5,608,035号、第5,786,331号、第5,880,096号、も参照されたい)。ペプチドは、3から75アミノ酸、3から60アミノ酸、3から50アミノ酸、3から40アミノ酸、3から30アミノ酸、3から20アミノ酸、または3から10アミノ酸までの間の、任意の数のアミノ酸を含有することができる。細胞の生物学的活性を変化させる能力、例えば、免疫細胞の免疫応答性を変化させる(一例としてある実施形態では、免疫細胞の免疫応答性を抑制し、また他のある実施形態では免疫細胞の免疫応答性を増強する)能力を有するペプチドは、さらに誘導体化して、ペプチド-Ig定常領域融合タンパク質を構築するのに有用なアミノ酸(例えば、連結配列となるアミノ酸、またはスペーサー配列となるアミノ酸)を付加または挿入することもできる。

#### 【0191】

ペプチド-Ig定常領域融合ポリペプチド(ペプチド-IgFc融合ポリペプチドを含む)を構築するために使用することができるペプチドは、細胞性ポリペプチドと結合するウイルス性ポリペプチドから誘導することができる。ペプチドは、さまざまなプロテアーゼのいずれか1つもしくは複数を用いたタンパク質分解消化によって、ウイルス性ポリペプチドからランダムに生成させ、単離した後、それが細胞の少なくとも1つの生物活性を変化させる能力について分析することができる。ウイルス性ポリペプチドのペプチドは、本明細書に記載され当技術分野でも実施されている組換え法を用いて作製することもできる。ランダムに作製されたペプチドを用いて、本明細書および当技術分野に記載されているように、ペプチドコンビナトリアルライブラリーまたはファージライブラリーを調製することもできる。あるいはまた、細胞性ポリペプチドと相互作用する、ウイルス性ポリペプチドの部分のアミノ酸配列を、細胞性ポリペプチドのコンピュータモデリング、もしくはそのポリペプチドの一部、例えば、細胞外部分のコンピュータモデリングによって、および/またはX線結晶構造解析によって、決定することができる(X線結晶構造解析には、細胞性ポリペプチド(もしくはその断片)のみの結晶、または細胞性ポリペプチド-ウイルス性ポリペプチド(もしくは細胞性ポリペプチドおよび/またはウイルス性ポリペプチドの断片)複合体の結晶の、調製および解析を含めることができる)。

#### 【0192】

本明細書に詳細に記載されるように、免疫グロブリンのFcポリペプチド(もしくは部分もしくは領域)は、重鎖CH2ドメインおよびCH3ドメイン、ならびにCH1とCH2の間に位置するヒンジ領域の一部もしくは全体を含有している。従来は、Fcフラグメントは免疫グロブリンのパパイン消化によって誘導され、免疫グロブリンのヒンジ領域を包含していた。本明細書で言及されるFc領域もしくはFcポリペプチドは、共有結合(例えば、特にジスルフィド結合)および非共有結合により二量体もしくは多量体型を形成するように、結合もし

くは会合させることができる単量体ポリペプチドである。Fcポリペプチドの単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、免疫グロブリンクラス（例えば、IgG、IgA、IgE）またはサブクラス（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2）に応じてさまざまである。免疫グロブリンのFc部分は、免疫グロブリンの一定のエフェクター機能を仲介する。Fc領域に関連するエフェクター機能をおおまかに3つに分類すると、(1)古典的補体カスケードの活性化、(2)エフェクター細胞との相互作用、および(3)免疫グロブリンの局在化、がある。現在、Fcポリペプチド、および任意の1つもしくは複数の定常領域ドメイン、ならびに少なくとも1つの定常領域ドメインを含有する融合タンパク質は、当業者が精通している分子生物学の組換え技術によって、容易に調製することができる。

#### 【0193】

Fcポリペプチドは好ましくは、動物種に由来するヌクレオチドおよびコード化アミノ酸配列を用いて調製されるが、ペプチド-IgFc融合ポリペプチドはその動物に使用することを目的とする。ある実施形態において、Fcフラグメントは、ヒト起源のものであって、例えば、ヒトIgG1およびIgG2といった任意の免疫グロブリンクラスに由来するものとすることができる。

#### 【0194】

本明細書に記載のFcポリペプチドは、Fcポリペプチド変異体を包含する。こうしたFcポリペプチド変異体のあるものは、別のFcポリペプチドとジスルフィド結合を形成する、1つもしくは複数のシステイン残基（例えば、ヒンジ領域内の1つもしくは複数のシステイン残基）が、セリンのような別のアミノ酸で置換されており、2つのFcポリペプチド間に形成されるジスルフィド結合の数が減少する。Fcポリペプチド変異体の別の例として、Fcポリペプチドがレベルの低下したエフェクター機能を有するように、エフェクター機能に関連する1つもしくは複数のアミノ酸を置換した変異体がある。例えば、Fc領域のアミノ酸を置換して、補体カスケードの成分との結合を減少させる、もしくは抑止する（例えば、Duncanら、Nature 332:563-64 (1988); Morganら、Immunology 86:319-24 (1995)を参照されたい）；Fcポリペプチドの、免疫細胞により発現されるFc受容体との結合能力を低下させる、もしくはなくす；または抗体依存性細胞傷害作用を変化させることができる。

#### 【0195】

他のFc変異体には、軽微な変化のみ、例えば、限定ではなく例証として、共有結合の化学的修飾、挿入、欠失、および/または置換（これにはさらに保存的置換を含めることができる）を有する、既知のFcポリペプチド配列の類似アミノ酸配列が含まれる。互いに類似したアミノ酸配列は、配列相同性を有する相当な領域を共有していると考えられる。同様に、Fc変異体をコードするヌクレオチド配列は、実質的に類似したヌクレオチド配列を含むことができ、軽微な変化のみ、例えば、限定ではなく例証として、共有結合の化学的修飾、挿入、欠失、および/または置換（これにはさらに遺伝暗号の縮重によるサイレント変異を含めることができる）を有することができる。互いに類似したヌクレオチド配列は、配列相同性を有する相当な領域を共有していると考えられる。

#### 【0196】

Fcポリペプチド、もしくは少なくとも1つの免疫グロブリン定常領域、またはその一部は、目的のペプチドもしくはポリペプチドと融合させたとき、少なくともある程度は、分解を防止する、および/または半減期を増加させる媒体もしくは担体成分として機能し、毒性を低下させ、免疫原性を低下させ、および/またはペプチドの生物活性を増加させるが、これは例えば二量体もしくは他の多量体を形成することによる（例えば、米国特許第6,018,026号；第6,291,646号；第6,323,323号；第6,300,099号；第5,843,725号を参照されたい）。（例えば、米国特許第5,428,130号；米国特許第6,660,843号；米国特許出願公開番号2003/064480；2001/053539；2004/087778；2004/077022；2004/071712；2004/057953/ 2004/053845/ 2004/044188；2004/001853；2004/082039も参照されたい）。ウイルス性ポリペプチドと結合する、および/または細胞の少なくとも1つの生物活性を変化させるペプチドと、結合もしくは融合させることができる、Fcポリペプチドのような免疫グロ

10

20

30

40

50

ブリン定常領域の代わりとなる成分としては、例えば直鎖状ポリマー（例として、ポリエチレングリコール、ポリリジン、デキストランなど；例えば、米国特許第4,289,872号；国際特許出願公開番号WO 93/21259を参照されたい）；脂質；コレステロール類（ステロイドなど）；炭水化物またはオリゴ糖がある。

【0197】

ウイルス性ポリペプチド（特に、本明細書に記載のビルレンス形質を少なくとも1つ有するウイルス性ポリペプチド）が結合する細胞性ポリペプチドを作製するための製造法が本明細書で与えられる。例えば、細胞性ポリペプチドを製造する工程（または方法）は、本明細書に記載のいずれか1つの方法によって、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することを含む。細胞性ポリペプチドのアミノ酸配列を決定した後で、細胞性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を、遺伝暗号に基づく原則に従って決定することができる。あるいはまた、プライマーデザイン、ハイブリダイゼーション、核酸の単離、クローニングおよび増幅、ならびに配列決定を含む標準的な分子生物学の技術を使用することによって、細胞性ポリペプチドをコードする、細胞のゲノムDNAもしくはmRNAのヌクレオチド配列を決定することができる。分子生物学分野で知られており、本明細書にも記載されている、組換え発現ベクターを調製するための周知の方法および原理にしたがって、細胞性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドを、組換え発現構築物（すなわちベクター）に組み込むことができる。ベクターは、細胞性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に機能的に連結されたプロモーター、ならびに当業者が精通している他の調節エレメント（例えば、エンハンサーもしくは転写開始部位）も含有する。次にこのベクターを宿主細胞（例えば、原核生物、真核生物、昆虫、酵母、または他の適当な宿主細胞）に導入することができるが、それは例えば、宿主細胞を組換え発現ベクターでトランスフェクトする、または形質転換することによる。細胞性ポリペプチドを発現させるのに十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって宿主細胞を培養した後、細胞性ポリペプチドを宿主細胞培養物から、または宿主細胞から、単離することができる。

【0198】

ウイルス性ポリペプチドと特異的に結合する細胞性ポリペプチドをコードする核酸分子を、本明細書に記載のように、核酸の切り出し、連結、形質転換、およびトランスフェクションのためのさまざまな既知の手順にしたがって、増幅して発現させることができる。したがって、ある実施形態において、細胞性ポリペプチドの発現は、大腸菌（*Escherichia coli*）のような原核生物宿主細胞で行うことが好ましいと考えられる（例えば、Pluckthunら、*Methods Enzymol.* 178:497-515 (1989)を参照されたい）。他の特定の実施形態では、細胞性ポリペプチドの発現は、酵母（例えば、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）、およびメタノール資化酵母（*Pichia pastoris*））；動物細胞（哺乳類細胞を含む）；または植物細胞を含めた、真核生物宿主細胞で行うことが好ましいといえる。適当な動物細胞の例としては、骨髄腫、HEK293、COS、またはCHO細胞があるがそれらに限定されない。植物細胞の例としては、タバコ、トウモロコシ、ダイズ、およびイネ細胞がある。当業者に知られており、しかも本明細書に基づいた方法によって、特定の宿主系において外来配列を発現させるために、核酸ベクターをデザインし、次に細胞性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を挿入することができる。調節エレメントは、個別の宿主に応じてさまざまとなる。

【0199】

免疫疾患または障害を含む、本明細書に記載の疾患または障害を有する、もしくはそれを発症するリスクのある患者、またはウイルス感染症に罹患した、もしくはウイルス感染症を発症するリスクのある患者の治療に有用な、薬剤を生産するための製造法も、本明細書で与えられる。ある実施形態において、この製造法は、(a)本明細書に記載され当技術分野で実施されている方法にしたがって、免疫疾患もしくは障害、またはウイルス感染症といった、疾患もしくは障害を治療するための薬剤を同定することを含む。例えば、薬剤の同定は、本明細書に記載の方法にしたがって、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞

性ポリペプチドを同定することを含むが、この場合細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドとの相互作用は免疫細胞の免疫応答性を变化させる。薬剤を同定する方法は、細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドとを相互作用させるのに十分な条件下で、かつ十分な時間にわたって、細胞性ポリペプチド、もしくは細胞性ポリペプチドを含有する細胞；ウイルス性ポリペプチド；および候補薬剤を接触させることを含むが、この薬剤は、本明細書に詳細に記載されている。次に、候補薬剤の存在下での、ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合レベルを測定し、候補薬剤の非存在下での、ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合レベルと比較する。ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合を阻害する（または妨害する、減少させる、最小限に抑える、もしくは阻止する）候補薬剤は、ウイルス性ポリペプチドを模したもので、それと同様に作用することができ、したがって細胞性ポリペプチドの少なくとも1つの生物活性に影響を及ぼすことができる。こうした生物活性には、細胞性ポリペプチドを含有する免疫細胞の免疫応答性を变化させること（例えば、特定の実施形態では免疫細胞の免疫応答性を抑制することであり、他の特定の実施形態では免疫細胞の免疫応答性を増強することである）が含まれるが、それに限定されない。したがって、こうした薬剤は、免疫疾患もしくは障害を治療するのに有用である。次に、薬剤は、薬剤を作製するために当技術分野で知られている方法にしたがって生産される。

10

#### 【0200】

薬剤は、本明細書に記載の任意の作用物質、例えば、抗体もしくはその抗原結合フラグメント；小分子；アプタマー；アンチセンスポリヌクレオチド；低分子干渉RNA（siRNA）；およびペプチド-IgFc融合ポリペプチドとすることができる。特定の実施形態において、薬剤は抗体もしくはその抗原結合フラグメントであり、大規模製造に適した、本明細書に記載の方法によって製造することができる。例えば、製造法には、バッチ細胞培養があるが、これは適切な培養条件を維持するように監視され、制御される。抗体もしくはその抗原結合フラグメントの精製は、本明細書に記載され、当技術分野で知られており、国内外の規制当局の指針に適合した方法にしたがって、実行することができる。

20

#### 【0201】

心血管疾患もしくは障害、代謝疾患もしくは障害、増殖性疾患もしくは障害、または免疫疾患もしくは障害を含めた、疾患もしくは障害を治療または予防するのに有用である可能性のある、本明細書に記載の方法にしたがって同定された薬剤（例えば、標的の細胞性ポリペプチドと結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメントであるが、それに限らない）を、患者への投与のために医薬用として（すなわち生理学的に）適する添加剤と組み合わせる（すなわち、ともに製剤する）ことができる。医薬組成物は、生理学的に許容される添加剤（製薬上許容される、または適合する添加剤もしくは担体）（すなわち、有効成分の活性と相互作用しない、毒性のない材料）を追加して含有する、無菌の水性もしくは非水性溶液、懸濁液もしくは乳濁液とすることができる。こうした組成物は、固体、液体、または気体（エアロゾル）の形をとることができる。あるいはまた、本明細書に記載の組成物を凍結乾燥物として製剤することができるが、当技術分野で公知の技法を用いて化合物をリボソーム内に封入してもよい。医薬組成物は、また、生物学的に活性または不活性の他の成分を含有することができる。こうした成分には、バッファー（例えば、中性緩衝食塩水、またはリン酸緩衝食塩水）、糖質（例えば、ブドウ糖、マンノース、ショ糖、またはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド、もしくはグリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、EDTAもしくはグルタチオンなどのキレート剤、安定化剤、色素、香料添加剤、および懸濁化剤、および／または防腐剤があるが、それらに限定されない。

30

40

#### 【0202】

医薬組成物用の、当業者に公知の適当な添加剤もしくは担体のいずれかを、本明細書に記載の組成物に用いることができる。治療に使用するための添加剤はよく知られており、例えば、Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro編、1985). に記載されている。概して、添加剤の種類は、投与法に基づいて選択される。医

50



薬組成物は、適切な投与法のいずれに対しても、製剤することができる。

【0203】

医薬分野の当業者が判断するように、治療（または予防）すべき疾患に適した方法で、医薬組成物を投与することができる。適切な用量、ならびに適当な投与期間および頻度は、患者の状態、患者の疾患のタイプおよび重症度、個別の活性成分の種類、および投与法といった要因によって決まってくる。一般に、適切な用量および治療計画は、治療および/または予防の効果（例えば、完全寛解もしくは部分寛解の回数の増加、または無病生存期間および/または全生存期間の延長、または症状の重症度の低下、といった臨床転帰の改善）をもたらすのに十分な量の組成物を与える。予防に使用するためには、用量は、免疫疾患もしくは障害といった疾患を予防し、疾患の発症を遅らせ、または疾患の重症度を下げるのに十分でなければならない。

10

【0204】

最適用量は、一般に、実験モデルおよび/または臨床試験によって決定することができる。最適用量は、患者の体格、体重、または血液容量に左右される可能性がある。概して、投与量中に含まれる、本明細書に記載の抗体もしくはその抗原結合フラグメントのようなポリペプチドの量、または投与量中に含まれるDNAにより *in situ* で生成される前記ポリペプチドの量は、患者の体重kgあたり約0.01  $\mu$ g から約1000  $\mu$ g までの範囲にある。有効な治療をもたらすのに十分な最小投与量を使用することが、通常、好ましい。一般に、治療もしくは予防の有効性について、治療もしくは予防すべき疾患に適したアッセイを用いて患者をモニターすることができるが、このアッセイは当業者によく知られている。適当な用量サイズは、患者の体格に応じて変化するであろうが、典型的には、10~60 kgの患者に対して約1 ml から約500 ml までの範囲である。

20

【0205】

ビジネス方法

免疫疾患および障害を含めた、疾患および障害を治療するために、治療用生物活性剤として使用することができる薬剤を同定し、前臨床試験および臨床試験でその薬剤をテストして評価した後、その薬剤を医療専門家に販売する方法およびシステムが本明細書で与えられる。治療薬を販売するシステムおよび方法には、(1) 科学的方法、これは、ウイルスのビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドを同定して解析するための、コンピュータシステムおよび方法を含むことができる；(2) ウイルス性ビルレンス因子と結合する細胞性ポリペプチドを同定するための科学的方法、この細胞性ポリペプチドは、したがって治療薬の標的となる；(3) ウイルス性ポリペプチドの細胞性ポリペプチドとの結合を阻害し、したがって、細胞性ポリペプチドの少なくとも1つの生物活性を変化させる薬剤を同定して解析するための科学的方法；(4) 薬剤の臨床開発のための方法およびシステム；(5) 薬剤を必要とする患者の治療のために、薬剤を医療専門家に販売すること、があるが、それらに限定されない。

30

【0206】

ある実施形態において、ウイルスのビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドを同定すること；ウイルスのビルレンス因子が結合する細胞性ポリペプチドを同定すること（この場合、ウイルスのビルレンス因子と細胞性ポリペプチドとの結合は、細胞性ポリペプチドが関与している細胞の生物活性の少なくとも1つを変化させる）；細胞性ポリペプチドとウイルス性ポリペプチドとの結合を阻害する薬剤を同定し、それによって少なくとも1つの細胞生物活性を変化させる薬剤を同定すること；ならびに少なくとも1つの前臨床研究を立案して実行することを含む、ビジネス方法が与えられる。他の特定の実施形態において、ビジネス方法は、ヒト被験者において少なくとも1つの臨床試験を立案して実行し、その薬剤のヒトにおける安全性プロファイルを判断することをさらに含む。ビジネス方法はまた、疾病または内科的疾患の治療（予防を含む）のためにそうした薬剤を必要としているヒト患者において、薬剤の有効性を評価するための、少なくとも1つの臨床試験の立案および実行をさらに含むことができる。この方法はさらに加えて、医療専門家、または医療専門家へ薬剤を供給する流通事業体への薬剤の販売を含むことができる。

40

50

## 【0207】

具体的な実施形態において、少なくとも1つの生物学的効果とは免疫応答性であり、細胞は免疫細胞であって、薬剤は、免疫細胞の免疫応答性を变化させる。したがって、ウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの結合を阻害する薬剤は、免疫細胞の免疫応答性を变化させる能力も有するものである。本明細書に詳細に記載されるように、薬剤としては、(a)抗体、もしくはその抗原結合フラグメント；(b)ウイルス性ポリペプチド/Fcポリペプチド融合タンパク質；(c)ペプチド/Fcポリペプチド融合タンパク質；(d)Fcポリペプチドに融合された、細胞性ポリペプチドのドメイン、もしくは少なくとも8アミノ酸からなるその断片；(e)小分子；(f)低分子干渉PNA (siRNA)；(g)アンチセンスポリヌクレオチド；および(h)アプタマーが挙げられるが、それらに限定されない。

10

## 【0208】

本明細書に記載のように、薬剤による細胞の少なくとも1つの生物活性の変化が、その薬剤がヒト被験者において疾病もしくは内科的疾患の治療に有用であることを示すのかどうかを判断するため、ビジネス方法は、少なくとも1つの前臨床研究を立案して実行することを含む。前臨床研究は、薬剤の治療濃度域（すなわち、薬剤の有効性と安全性の関係）の決定に寄与する実験を包含する。細胞において少なくとも1つの毒性作用を誘導する薬剤の濃度を決定するために、細胞培養研究において、手順を立案して、実施もしくは実行することができる。毒性作用は、細胞において望ましくない作用を意味するものと理解される。例えば、細胞の生存率を高め、生存期間を長くする能力、または正常な生物活性もしくは機能を維持する能力について薬剤を調べている場合には、毒性作用として、アポトーシスの誘導、構造的な細胞の形態もしくは完全性の異常な変化、または特定の細胞タイプにとって正常とは見なされない、もしくは細胞の増殖能力を变化させる、何らかの細胞経路の誘導および維持が挙げられる。癌もしくは悪性腫瘍を治療する能力、および/または抗増殖剤として作用する能力について薬剤を調べている場合には、アポトーシスおよび細胞死の誘導は望ましい作用であり、こうした分析は薬剤の潜在的な有効性を示すことになる。毒性分析のために立案して実行することができる前臨床研究には、動物での研究が含まれる。細胞培養法および/または動物モデルを用いて行うことができる他の前臨床研究の例には、催奇性の判定；男性および女性生殖器系への影響、例えば子孫の誕生への薬剤の影響など；薬物動態解析、および安定性研究がある。

20

## 【0209】

前臨床研究には、薬剤の有効性を示して評価する細胞培養および動物実験も含まれる。免疫疾患もしくは障害、例えば、自己免疫疾患または炎症性疾患もしくは障害、心血管疾患もしくは障害、代謝疾患もしくは障害、または増殖性疾患もしくは障害の治療に有用な薬剤を、本明細書に記載の、当業者が用いる数多くの動物モデルのいずれか1つにおいて、測定して評価することができる（例えば、Tanejaらによる総説、*Nat. Immunol.* 2:781-84 (2001)；Lam-Tseら、*Springer Semin. Immunopathol.* 24:297-321 (2002)を参照されたい）。例えば、受容体チロシンキナーゼをコードする3つの遺伝子Tyro3、Mer、およびAxlをノックアウトしたマウスは、慢性関節リウマチおよびSLEなどの自己免疫疾患のいくつかの症状を示す（Lu et al., *Science* 293:228-29 (2001)）。自然発生ループス様疾患のマウスモデルが、NZB/WF1ハイブリッドマウスを用いて報告されている（例えば、Drakeら、*Immunol. Rev.* 144:51-74 (1995)を参照されたい）。動物の発病、調節、および/または疾患からの動物の保護に影響を及ぼす薬剤および分子を調べることを可能にするI型糖尿病の動物モデルは、MHCトランスジェニック（Tg）マウスを使用する。HLA-DQ8トランスジーン（HLA-DQ8はヒト1型糖尿病の支配的な素因遺伝子である）およびHLA-DQ6トランスジーン（これは糖尿病防御的である）を発現するマウスをRIP(ラットインスリンプロモーター).B7-1-Tgマウスと交配させて、自然発生的に糖尿病を発症するHLA-DQ8 RIP.B7-1トランスジェニックマウスを得た（Wakelandら、*Curr. Opin. Immunol.* 11:701-707 (1999)；Wenら、*J. Exp. Med.* 191:97-104 (2000)を参照されたい）。（また、Brondumら、*Horm. Metab. Res.* 37 Suppl 1:56-60 (2005)も参照されたい）。

30

40

## 【0210】

50

慢性関節リウマチの治療に有用な薬剤の特性を明らかにするために使用することができる動物モデルには、コラーゲン誘導関節炎モデル（例えば、Kakimoto, Chin. Med. Sci. J. 6:78-83 (1991); Myersら, Life Sci. 61:1861-78 (1997)を参照されたい）および抗コラーゲン抗体誘導関節炎モデル（例えば、Kakimoto、上記、を参照されたい）がある。免疫疾患に適用可能な他の動物モデルには、実験的自己免疫性脳脊髄炎モデル（実験的アレルギー性脳脊髄炎モデルとも呼ばれる）、多発性硬化症の動物モデル；I型およびII型インターフェロン受容体が欠損し、かつ組換え活性化遺伝子2を欠損したAGR129マウスを使用する乾癬モデル（Zenzら、Nature 437:369-75 (2005); Boymanら、J. Exp. Med. 199:731-36 (2004); 2004年2月23日オンライン発行）；および炎症性腸疾患のためのTNBS（2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸）マウスモデルがある。心血管疾患のための数多くの動物モデルが利用可能であり、van Vlijmenら、J Clin. Invest. 93:1403-10 (1994); Kiriazisら、Annu. Rev. Physiol. 62:321-51 (2000); Babuら、Methods Mol. Med. 112:365-77 (2005)に記載のモデルなどがある。

10

#### 【0211】

本明細書に記載のように、ビジネス方法は、薬剤による細胞の少なくとも1つの生物活性の変化が、その薬剤がヒト被験者における疾病もしくは内科的疾患の治療に有用である（すなわち、安全かつ有効である）ことを表しているのかどうかを判断するために、少なくとも1つの臨床研究を立案して実行することを含む。臨床研究は、法律および規則（21 U.S.C.（連邦食品医薬品化粧品法（The Federal Food, Drug, and Cosmetics Act））ならびに21 C.F.R.、なかでも21 C.F.R. § § 312, 314, 316, 50, 54, 56, 58, および20を参照されたい）、ならびに臨床研究を立案、実行、評価し、その結果を報告するために食品医薬品局（FDA）から提供された指針書にしたがって、当業者により実施される。ある実施形態において、ビジネス方法は、少なくとも1つの第I相臨床試験、少なくとも1つの第II相臨床試験、および少なくとも1つの第III相臨床試験の立案および実行を含む。別の実施形態において、その方法は、少なくとも1つの第I相臨床試験、および少なくとも1つの第II相臨床試験の立案および実行を含み、もう1つの実施形態では、ビジネス方法は、少なくとも1つの第I相臨床試験の立案および実行を含む。

20

#### 【0212】

第I相臨床試験には、典型的には、ヒト被験者における薬剤の安全性を評価する研究の立案および実行が含まれる。第I相試験もしくは第II相試験には、用量増加試験を含めることができる。ある特定の場合には、第I相試験は、薬剤投与を受けることから何らかの臨床的利益を得る可能性のある患者群で行うことができる。第I相試験は、薬剤が人体においてどのように吸収、代謝、および排泄されるかを判断するために、さらに加えて副作用を評価するために、立案される。第I相臨床試験の立案には、新薬治験（IND）実施申請資料の作成、および評価承認のためのFDAへの提出が含まれる。INDの内容、およびINDの内容に含まれる実施される研究は、例えば、薬剤、治療指標、ならびに、臨床医もしくは他の医療専門家にその治療薬について情報を与える適切なin vivo（すなわち、動物実験）およびin vitro（細胞培養、ならびに他の生物学的および化学的アッセイ）前臨床研究によって決定される。

30

#### 【0213】

第II相試験には、疾患もしくは病的状態を有する患者において、（1つもしくは複数の）特定の徴候に対する薬物の有効性に関する予備的データを得るために実施される、初期の対照臨床試験が含まれる。この第II相試験はまた、薬物に関連する、一般的な短期的副作用およびリスクを判断するのに役立つ。第II相試験は、一般に、通常数百人が含まれる比較的少人数の患者において、十分にコントロールし、厳密に監視して、実施される。第III相試験は、拡大された対照および非対照試験である。こうした試験は、薬物の有効性を示唆する予備的な証拠が第II相で得られた後に行われ、薬物の利点とリスクの関係を総合的に評価するのに必要とされる、有効性および安全性に関する追加の情報を集めることを目的とする。第III相試験はまた、その結果を一般集団に当てはめて、その情報を医師への表示物で伝達するための適切な基準を与える。第III相試験は、通常、数百人から数

40

50

千人が関わる。

【0214】

各臨床試験の立案および実行は、臨床試験プロトコルデザイン（試験対象患者基準および除外基準、主要および副次的評価項目決定のための統計的デザインおよび分析；副作用の分析、および有害事象を報告するためのプロトコル；薬剤および適応症に関するバックグラウンド；患者情報（バックグラウンドおよびモニタリング）；臨床投与プロトコルなどが挙げられるがそれらに限定されない）；研究評価（臨床プロトコルにおいて概要が示されたすべての測定パラメータに関する統計分析；有害事象の統計分析および分類；重篤な有害事象の体験談；および他のFDAから要求された概要が挙げられるがそれらに限定されない）；ならびに結論を含む。立案、結果、および結論について、FDAと公式のみならず非公式にも協議することができ、これは法令により要求されている。臨床試験の立案および実行には、臨床試験の立案および実行に関する、当業者が精通しているさらに別の方法およびシステムを含めることができる。

10

【0215】

本明細書に記載のビジネス方法は、個別の薬剤に応じて、FDAの下部組織（CDERおよびCBDR）の指針に規定されるように、新薬承認申請（New Drug Application(NDA)）または生物学的製剤製造許可申請（Biological License Application (BLA)）を準備すること、ならびに医薬品の販売承認を得るためのFDAに対するプレゼンテーションを、さらに含むことができる。したがって、ビジネス方法は薬剤の販売をさらに含むことができる。薬剤を医療専門家（医師もしくは薬剤師を含むがこれに限定されない）に直接販売することができるが、市販の医薬品および生物製剤の流通業者に販売してもよく、こうした業者が、その後医療専門家に医薬品を販売する。場合によっては、医薬品は小売り、および卸売りの店頭で消費者に直接販売することができる。

20

【0216】

本明細書に記載のビジネス方法は、ウイルス性ポリペプチド、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチド、および／または薬剤を製造および使用する権利を、製薬会社により、別の生物薬剤会社、研究もしくは医療機関、大きな製薬会社、またはジェネリック医薬品製造会社に対してライセンス供与することを含むことができる。前記のウイルス性ポリペプチド、細胞性ポリペプチド、および薬剤のそれぞれを製造および使用する権利は、権利の売り渡しもしくは譲渡、または権利のライセンス供与を含むことができる。ウイルス性ポリペプチド、細胞性ポリペプチド、および／または薬剤を別の団体に売り渡す、またはライセンス供与する事業体は、それぞれ売り手会社、またはライセンス供与機関と呼ばれ、ウイルス性ポリペプチド、細胞性ポリペプチド、および／または薬剤を売り渡す、またはライセンス供与する相手の団体は、取得会社と呼ばれる。「会社」という用語は、国内、または国の州もしくは行政区分内で合法的に組織されていると考えられるビジネス事業体、もしくは政府機関、もしくは他の公的機関のいずれかを表すが、これは営利団体でも非営利団体でもよい。

30

【0217】

ある特定の実施形態において、取得会社とライセンス供与機関との間のビジネス協定は、ウイルス性ポリペプチド、細胞性ポリペプチド、および／または薬剤に対する知的所有権、ならびに特定の関連技術情報およびノウハウも取得した、取得会社を与えることができる。取得会社は、取得会社とライセンス供与機関が同意した他の対価に加えて、前払い金、進行中の研究開発費用、ロイヤルティ、目標達成報奨金（例えば、取得企業が、臨床開発、収益の発生、および画期的な技術的成功の1つもしくは複数の段階を開始および／または完了した時点での支払い）のいずれかを組み合わせて、ライセンス機関に支払うことができる。決済は、現金、株式、および／または資産（他の薬剤、ウイルス性ポリペプチド、および／または細胞性ポリペプチドを含む）取引、または他の合意に基づく支払いの形をとることができる。その見返りとして、ライセンス供与機関は、取得会社に、ウイルス性ポリペプチド、細胞性ポリペプチド、および／または薬剤に関連する知的所有権の独占的もしくは非独占的ライセンスを供与する、またはウイルス性ポリペプチド、細胞性

40

50

ポリペプチド、および／または薬剤に関連する知的所有権を譲渡することができる。この権利は、全体として、または特定の分野（例えば、特定の適応症に対する薬剤の使用）について、または特定の地域について、付与されることがある。

【0218】

特定の実施形態において、ライセンス供与機関は生物医薬品会社であり、他の特定の実施形態では、取得機関が生物医薬品会社である。他の実施形態において、生物医薬品会社はウイルス性ポリペプチド、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチド、および／または細胞の少なくとも1つの生物活性を変化させる薬剤を同定するための実験を実施する。ある実施形態において、薬剤は免疫細胞の免疫反応性を変化させる。

【0219】

疾病もしくは内科的疾患を治療するための治療薬の選択を導くための方法も本明細書で与えられる。その方法は、ウイルスに感染した宿主内でウイルスの病原性を高めるウイルス性ポリペプチドに関する情報を受け取ること；そのウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定すること（このウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの結合は細胞の少なくとも1つの生物活性を変化させる）；このウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの結合を阻害する1つもしくは複数の薬剤を同定すること；この1つもしくは複数の薬剤の、細胞の少なくとも1つの生物学的作用を変化させる能力を分類すること（この少なくとも1つの生物学的作用の変化は、宿主において、疾病もしくは内科的疾患を発症するリスクを減じ、または疾病もしくは内科的疾患の少なくとも1つの症状を軽減する）；ならびに、細胞の少なくとも1つの生物学的作用を変化させる薬剤の能力の分類を医学研究者に提供して、前臨床的および臨床的方法でテストするための薬剤の選択を支援すること、そしてそれによって疾患もしくは障害を治療するための治療薬の選択を導くことを含む。特定の実施形態において、少なくとも1つの生物学的作用は免疫応答性であり、細胞は免疫細胞である。

【0220】

少なくとも1つの薬剤の、疾患の発症リスクを減少させる能力は、患者が疾患もしくは障害を有すると疑われた時から、または疾患もしくは障害を発症するリスクがあると判断された時から、患者が疾患もしくは障害の少なくとも1つの症状もしくは続発症を示す時までの時間を増やす、もしくは長くする、少なくとも1つの薬剤（または複数の薬剤）の能力を含む。少なくとも1つの症状を軽減することは、疾患もしくは障害の症状（もしくは続発症）の強さ、発現、または増悪を減少させる、改善する、さもなければ最小限に抑える薬剤の能力を包含する。薬剤は、疾患もしくは障害の発現を予防することもできる。

【0221】

本明細書に記載されるように、細胞の少なくとも1つの生物学的作用を変化させる1つもしくは複数の薬剤の能力を、実験モデルおよび／または臨床試験によって測定することができるが、この場合少なくとも1つの生物学的作用を変化させることは、宿主において、疾病もしくは内科的疾患の発現リスクを低下させ、または疾病もしくは内科的疾患の少なくとも1つの症状を軽減する。医薬組成物は、医学分野の当業者によって決定されるように、治療（もしくは予防）すべき疾患に適した方法で投与することができる。患者もしくは宿主の状態、患者の疾患のタイプおよび重症度、個別の活性成分型、および投与の方法といったさまざまな要因によって、適切な投与量、ならびに適当な投与期間および投与頻度を決定することができる。一般に、適切な用法および治療計画は、治療および／または予防の利益（臨床転帰の改善など、例えば完全もしくは部分寛解の回数の増加、無病生存および／または全生存の延長、または症状の重さの軽減）をもたらすのに十分な量の組成物を規定する。予防用には、投与量は、免疫疾患もしくは障害を含めた疾患もしくは内科的疾患に付随する症状の発現を予防し、遅らせ、または症状の重さを軽減するのに十分でなければならない。

【0222】

別の実施形態において、疾患もしくは障害を治療する治療薬を販売するためのビジネス方法が提供される。ビジネス方法は、ウイルスに感染した宿主内でウイルスの病原性を高

10

20

30

40

50

めるウイルス性ポリペプチドに関する情報を受け取ること、ならびにそのウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定することを含むが、このウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの結合は細胞の少なくとも1つの生物活性を変化させるものである。特定の実施形態において、少なくとも1つの生物活性は免疫応答性であり、細胞は免疫細胞である。その方法はさらに、ウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの結合を阻害し、かつ細胞の少なくとも1つの生物活性を変化させる、1つもしくは複数の薬剤を同定することを含むことができる。本明細書に記載のように、少なくとも1つの生物学的作用が変化するとき、被験者（もしくは患者もしくは宿主）において、疾病もしくは内科的疾患を発現するリスクは低下し、または疾病もしくは内科的疾患の少なくとも1つの症状が軽減される。こうした方法は、医療専門家もしくは医療介護者、医療専門家に医薬品を販売する流通業者、または疾患もしくは障害の治療を必要とする患者に、薬剤を販売することさらに含むことができる。

10

#### 【0223】

望ましい結果を達成するようウイルス性ポリペプチドの選択を導くためのシステムも、本明細書において与えられる。そのシステムは、コンピュータデバイスを含み、これは複数のウイルス性ポリペプチドをコードする複数のポリヌクレオチド配列からなる知識ベースを含んでいる。システムはまた、ウイルスのビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドを、ウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に関して一般に受け入れられた情報に基づいて評価および選択するための、複数の規則からなる第2の知識ベースを有する。システムはさらに、標的のウイルス性ビルレンス因子および望ましい結果に関する情報を、前記コンピュータデバイスに与える手段；ならびにウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定するために使用することができるウイルス性ポリペプチドをコードする、少なくとも1つのポリヌクレオチド配列を同定、および分類もしくはランク付けするための手段を、コンピュータデバイス内に含む。

20

#### 【0224】

望ましい結果を達成するようウイルス性ポリペプチドの選択を導くコンピュータプログラム製品も検討される。コンピュータプログラム製品は、コンピュータが使用できるストレージ媒体を含むが、このストレージ媒体は、コンピュータ可読プログラムコード手段をその媒体において実施させるものである。このコンピュータ可読プログラムコード手段は、複数のウイルス性ポリペプチドをコードする複数のポリヌクレオチド配列からなる1つの知識ベース、ならびに、ウイルス性ビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドを、ウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に関する情報に基づいて評価および選択するための、複数の規則からなる第2の知識ベースを作成するための、コンピュータ可読プログラムコード手段を含む。コンピュータプログラム製品はまた、標的のウイルスビルレンス因子、および望ましい結果に関する情報をコンピュータデバイスに与えるためのコンピュータ可読プログラムコード手段；ならびに、ウイルス性ポリペプチドが結合する細胞性ポリペプチドを同定するために使用することができる、標的ウイルスビルレンス因子を同定、および分類もしくはランク付けするためのコンピュータ可読プログラムコード手段を含むことができるが、この場合、ウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの結合は少なくとも1つの細胞生物活性を変化させる。

30

40

#### 【0225】

ビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドと細胞性ポリペプチドとの結合を阻害する少なくとも1つの薬剤の能力を分類することは、さまざまな技法およびアッセイに関して、科学的方法分析、化学組成分析、および/または生物学的比較分析からの結果を解析すること、ならびに予測される効果（すなわち、細胞内で少なくとも1つの生物活性を変化させる能力）にしたがって、それらを分類することを含む。その結果には、さまざまなアッセイ結果およびデータのプロットング、数値スコアもしくは数値を、1つもしくは複数の予測される効果に基づいて、さまざまな結果およびデータに割り当てること、ならびに、望ましい効果もしくは転帰に基づく、さまざまなアッセイ結果およびデータのランク付けを含めることができる。それに加えて、生物学的反応解析は、有効性測定の適切な

50

アッセイ対照および方法をデザインすることを含む。アッセイからの結果およびデータを、予測される効力および特異性などの、さまざまな異なる要因のいずれかにしたがって分類することに関わる、さまざまなチャート、グラフ、グラフィックモデル、および他の文書を作成して保存することができる。

#### 【0226】

本明細書に記載の方法およびシステムは、コンピュータもしくは関連ソフトウェアの助けを借りることなく実施することもできる。しかしながら、ある特定の実施形態では、本明細書に記載の方法およびシステムは、1つもしくは複数の記載された解析を成し遂げるためにコンピュータおよびソフトウェアを使用して実施される。例えば、コンピュータおよびソフトウェアは、ウイルスに感染した宿主においてウイルスの病原性を高めるウイルス性ポリペプチドに関する情報を受け取るために使用することができる。ある実施形態において、デバイスは少なくとも1つの知識ベースを有する。例えば、1つの知識ベースは、複数のウイルス性ポリペプチドをコードする、複数の異なるポリヌクレオチド配列からなる。本明細書に記載の方法に有用な、もう1つの知識ベースは、ウイルス性ビルレンス因子であるウイルス性ポリペプチドを評価および選択するための複数の規則を含む。この規則には、複数のポリヌクレオチド配列から同定されたウイルス性ポリペプチドが、本明細書で詳細に記載されるウイルス性ポリペプチドのビルレンス形質を少なくとも1つ含んでいるかどうかが含まれる。

10

#### 【0227】

情報の受取は、例えば、メソッドデータプロセッシングシステムもしくはコンピュータプログラム製品などの、多くのさまざまな形で行うことができる。さらに、本明細書に記載の方法およびシステムは、ハードウェア形態のみ、ソフトウェア形態のみ、またはソフトウェアとハードウェア態様を組み合わせた形態を含むことができる。その上、本方法は、コンピュータ可読プログラムコード手段をその媒体中で実施させる、コンピュータ使用可能ストレージ媒体に関するコンピュータプログラム製品を提供することができる。ハードディスク、CD-ROM、光学記憶装置、および磁気記憶装置などの任意の適当なコンピュータ可読媒体を使用することができるが、これらに限定されない。

20

#### 【0228】

ビジネス方法、および本明細書に記載の治療薬の選択方法は、さらに、目録作成および文書作成を含むことができるが、これは、文書化および情報検索のために、さまざまなソースおよび解析からの全アウトプットをソートし、シリアル化し、および/または記憶することを含む。ある実施形態において、アウトプットは、整理され、レンダリングされて、医療専門家、医学研究者、または他の医療介護者に届けられる最終文書となる。文書はさらに、予測、予測モデル、デザイン、および一連のカスタム製品を含むことができる。したがって、ある実施形態において、本発明の方法およびシステムは、結果を整理すること、ならびに、顧客もしくはユーザー（すなわち、医療専門家、医学研究者、もしくは介護者など）のためにこれらの結果を順に並べて目録を作成することを含む。

30

#### 【0229】

特定の実施形態において、コンピュータもしくは他のプログラム可能なデータ処理装置は、解析を行うのに有用な情報および/または規則を含む1つもしくは複数の知識ベースを有する。ある実施形態において、コンピュータもしくは他のプログラム可能なデータ処理装置は、ウイルス性ポリペプチドをコードする遺伝子もしくはポリヌクレオチド配列を決定するもしくは得るための手段を包含するが、これは前記配列に関する情報をさまざまなフォーマットのいずれかで取得することに基づくものであって、多くの利用可能なデータベース（公開データベースもしくは購入可能なデータベース）のいずれか1つからの、配列それ自体、遺伝子および生物の名前、または配列識別番号のエントリーが含まれる。

40

#### 【0230】

別の実施形態において、知識ベースは、いろいろな結果を得るために指定されるさまざまな生物学的アッセイまたは情報、例えば、ウイルス性ポリペプチドの発現レベルの測定、感染細胞による発現後のウイルス性ポリペプチドの局在化、ウイルス性ポリペプチドの

50

1 つもしくは複数のアミノ酸の置換、欠失もしくは挿入によるウイルスの病原性への影響の測定、またはウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列のウイルスゲノム内の位置に関する情報に適した一群のアッセイ、ならびに他のアッセイおよび情報を含む。こうした知識ベースはさらに、望ましい結果に関するユーザーの入力に基づいて実行しうる生物学的アッセイを決定するためのエキスパートルールも含むことができる。

#### 【0231】

他の実施形態において、知識ベースは、ポリヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載のウイルス性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列）の構造的特性を決定するためのエキスパートルール、例えば、本明細書に記載のプログラムにおいて与えられるルールを含む。関連する実施形態において、知識ベースは、細胞もしくはゲノム環境において試薬の生物学的相互作用を同定および/または予測するために、ポリヌクレオチド配列を別のデータベース、例えば、ヒトゲノムデータベースと比較するためのエキスパートルールを含む。

10

#### 【0232】

したがって、ある実施形態において、ウイルスビルレンス因子をコードするポリヌクレオチド、標的の細胞性ポリペプチド、およびウイルスビルレンス因子と細胞性ポリペプチドとの相互作用を変化させる薬剤に関する情報、ならびに望ましい結果、例えば、細胞の生物活性（一例として、免疫細胞の免疫応答性）の変化を、薬剤に関する知識ベースを備えたコンピュータにインプットし、そのコンピュータが望ましい結果に基づいて適切な薬剤を選択する。つぎに、コンピュータは、疾病もしくは内科的疾患を治療するのに適した薬剤を、同定されたウイルス性ポリペプチドおよび細胞性ポリペプチド標的および薬剤に基づいて、可能性のある薬剤の化学組成の分析、ならびに細胞もしくはゲノム環境といった生物系での可能性のある相互作用の分析のためのエキスパートルールを用いてデザインする。その後、薬剤はいくつかの基準を用いてランク付けされ、関係書類が作成される。

20

#### 【0233】

本明細書に記載されるように、内科的疾患もしくは障害には、免疫疾患もしくは障害、心血管疾患もしくは障害、代謝疾患もしくは障害、または増殖性疾患もしくは障害がある。免疫疾患もしくは障害には、自己免疫疾患または炎症性疾患があるが、それに限定されない。免疫疾患もしくは障害の例としては、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、移植片対宿主病、敗血症、糖尿病、乾癬、アテローム性動脈硬化、シェーグレン症候群、進行性全身性硬化症、強皮症、急性冠症候群、虚血再灌流、クローン病、子宮内膜症、糸球体腎炎、重症筋無力症、特発性肺線維症、喘息、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、血管炎、および炎症性自己免疫性筋炎があるが、それに限定されない。心血管疾患の例には、アテローム性動脈硬化、心内膜炎、高血圧、および末梢性虚血性疾患がある。

30

#### 【0234】

下記の実施例は、本明細書に記載の実施形態を説明する目的で提示されるのであって、本発明の範囲を限定すると見なされるべきではない。

#### 【実施例1】

#### 【0235】

#### A41Lと結合する免疫細胞上で発現されるRPTPの同定

この実施例は、A41Lと結合する細胞表面ポリペプチドを同定するための方法を記載する。

40

#### 【0236】

牛痘A41L融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する組換え発現ベクターを、タンデムアフィニティ精製（TAP）法（TAPタグ法とも呼ばれる）のために構築した（例えば、Rigautら、Nat. Biotech. 17:1030-32 (1999); Puigら、Methods 24:218-29 (2001); Knueselら、Mol. Cell. Proteomics 2:1225-33 (2003)も参照されたい）。標準的な分子生物学およびアフィニティ精製の技法にしたがって、A41LCRFCと称される構築物を調製し、融合ポリペプチドを発現させて単離した。この構築物の概略図を図1に示す。A4

50



1LCRFC構築物は、ヒト成長ホルモンリーダーペプチドのC末端と融合させた牛痘ウイルス由来の成熟A41Lコード配列をコードするヌクレオチド配列を含んでいた。CRFCタンデムアフィニティタグをA41LのC末端に融合させた。CRFCタグは、ヒトインフルエンザウイルス赤血球凝集素ペプチド、HAエピトープ、アミノ酸YPYDVDYA（配列番号1、これは配列番号2に記載のヌクレオチド配列によってコードされる）を含んでいたが、これに対する抗体は市販されており、それによって、蛍光活性化セルソーティング（FACS）もしくは免疫プロット法といった免疫化学的方法による発現融合ポリペプチドの検出が可能となった。HAエピトープのカルボキシル末端に、プロテインCタグ、アミノ酸EDQVDPRLIDGK（配列番号4、これは配列番号5に記載のヌクレオチド配列によってコードされる）を融合させたが、これはヒトプロテインCの重鎖に由来するものである。プロテインCタグのカルボキシル末端にヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ部位、アミノ酸LEVLFQGP（配列番号16、これは配列番号17に記載のヌクレオチド配列によってコードされる）を融合させ；HRV3Cプロテアーゼ部位のカルボキシル末端に、ヒトIgGのFc部分のムテイン誘導体を融合させた。

#### 【0237】

TAPタグ法を説明する概略図を図2に示す。プロテインAと結合させたA41LCRFC融合ポリペプチド10 $\mu$ gを、5 $\times$ 10<sup>6</sup>個の単球から調製された細胞溶解物とともにインキュベートした。A41Lと結合もしくは相互作用する細胞性ポリペプチドを同定するために、さまざまな種類の正常細胞および腫瘍細胞を使用することができるが、こうした細胞には、（活性化もしくは非活性化）B細胞およびT細胞、マクロファージ、上皮細胞、線維芽細胞、ならびにRaji（B細胞リンパ腫）、THP-1（急性単球性白血病）、およびJurkat（T細胞白血病）などの細胞株が含まれる。

#### 【0238】

A41LCRFC／細胞溶解物複合体を洗浄した後、HRV3Cプロテアーゼによる切断に供し、このプロテアーゼはA41Lおよび会合タンパク質を遊離した。塩化カルシウム（1M）を、放出されたA41L／細胞溶解物複合体に添加した後、これを抗プロテインCタグアフィニティ樹脂に加えた。塩化カルシウムは、抗CタグとCタグエピトープとの相互作用のために必要とされる。抗プロテインCタグアフィニティ樹脂に結合した複合体を、塩化カルシウムを含むバッファーで洗浄した後、EGTAを用いたカルシウムのキレート化により溶出した。その結果得られた溶出物をトリプシンで消化し、A41Lおよびその会合タンパク質を同定するために、消化されたA41L複合体を直接タンデム質量分析に供した。

#### 【0239】

トリプシンにより生じたペプチドの配列を質量分析により同定した。こうしたペプチドは、図3A、3Bおよび3Cに示すように、受容体様タンパク質チロシンホスファターゼであるLAR、RPTP-、およびRPTP-の一部としてそれぞれ同定された。

#### 【実施例2】

#### 【0240】

#### A41L-Fc融合ポリペプチドの調製

この実施例は、A41L-Fc融合ポリペプチドおよびA41L-ムテインFc融合ポリペプチドの発現のための、組換え発現ベクターの調製を記載する。

#### 【0241】

組換え発現ベクターは、分子生物学分野で当業者によってルーチンに行われている方法にしたがって調製した。A41L-FcをコードするポリヌクレオチドおよびA41L-ムテインFcをコードするポリヌクレオチドを、ベクターpDC409（配列番号41）のマルチクローニング部位にクローニングした（例えば、米国特許第6,512,095号および米国特許第6,680,840号、ならびにこれらに引用された参考文献を参照されたい）。A41L-Fcポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号32に示し、A41L-ムテインFcポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号31に示す（図6参照）。ムテインFc（ヒトIgG1）ポリペプチド（配列番号23）をコードするヌクレオチド配列を図24に示す。10から20 $\mu$ gのそれぞれの発現プラスミドを、直径10cmの標準的な組織培養プレートで約80%コンフルエントとなるまで増殖させたHEK293T細胞

またはCOS-7細胞 (American Type Tissue Collection (ATCC), Manassas, VA) にトランスフェクトした。トランスフェクションは、Lipofectamine™ Plus™ (Invitrogen社, Carlsbad, CA) を用いて行った。トランスフェクトされた細胞を48時間培養した後、細胞培養物から上清を回収した。標準的な手順にしたがって、プロテインAセファロースアフィニティクロマトグラフィーによって、A41L融合タンパク質を精製した。

#### 【実施例3】

#### 【0242】

#### 融合ポリペプチドのためのアフィニティタグの調製

この実施例は、さまざまなアフィニティタグの発現のための、組換え発現ベクターの調製を記載する。

#### 【0243】

融合タンパク質、例えば、ウイルスのビルレンス遺伝子によりコードされたビルレンス因子ポリペプチドもしくはその一部を含む融合タンパク質を、例えばタンデムアフィニティ精製 (TAP) による、検出および/または単離のためのアフィニティタグにインフレイムで融合させる。融合ポリペプチドは2つ以上のアフィニティタグを含有することができる。融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターは、分子生物学分野で当業者によく知られ、ルーチンに使用されている方法および技術によって調製される (実施例2も参照されたい)。本明細書に記載のように、融合タンパク質は、さらに少なくとも1つのプロテアーゼ部位を有することができる。融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを、市販業者および製造業者から入手可能な、いくつもの組換え発現ベクターに挿入することができる。例えば、制限酵素部位を導入もしくは除去し、または調節エレメントを導入もしくは除去して、ベクターを、本明細書に記載のポリペプチドの挿入にさらに適合させることができる。ベクターの例としては、CMVプロモーターを含むpCDNA™3.1 (配列番号39) (Invitrogen社) (例えば、米国特許第5,168,062号および第5,385,839号を参照されたい) ; pSL9、レンチウイルス発現プラスミド (配列番号40) ; pDC409 (配列番号41) ; およびpAAV、アデノ随伴ウイルス発現プラスミド (例えば、Stratagene社, La Jolla, CAを参照されたい) (例えば、配列番号42) があるが、それらに限定されない。

#### 【0244】

融合タンパク質に含めることができるポリペプチドおよびペプチド配列の例を図4に示す。発現構築物は、成長ホルモン (GH) シグナルペプチド配列 (配列番号12) (配列番号14に示すポリヌクレオチド配列によってコードされる) を含んでいる。ある実施形態において、配列は制限酵素部位を含み、例えば、SpeIおよびAsp718がシグナルペプチド (配列番号13) のC末端に付加されて、シグナルペプチド配列にポリペプチド成分を融合させることが可能となる (制限酵素部位を有するGHをコードするヌクレオチド配列: 配列番号15)。

#### 【0245】

本明細書に記載のように、融合ポリペプチドは、1、2、3、4、もしくは5個以上のアフィニティタグ、および1つまたは複数のプロテアーゼ部位を含む。ペプチドスペーサー配列が、任意の2つのポリペプチド成分の間、例えば、2つのアフィニティタグの間、もしくはアフィニティタグとプロテアーゼ部位の間、またはビルレンス因子ポリペプチドオープンリーディングフレーム (ORF) とアフィニティタグもしくはプロテアーゼ部位との間に含まれていてもよい。ペプチドスペーサー配列は、制限酵素の切断部位もしくは認識部位であるヌクレオチド配列によってコードされていることがあるが、必ずしもそうでないこともある。アフィニティタグの例には、2つ以上のポリペプチドを有するアフィニティタグの組合せが含まれる。例えば、HACタグは、HAエピトープタグ、C-TAGおよび2XSBPを含んでおり、これらは融合タンパク質においてどのような順序で存在していてもよい (例えば、配列番号35はHACタグのアミノ酸配列を示すが、この中でHAエピトープはC-TAGに融合されたアフィニティタグのアミノ末端にあり、C-TAGは2XSBPに融合されている; 配列番号36はHACタグをコードするヌクレオチド配列を与える)。

## 【0246】

アフィニティタグの組合せである別のアフィニティタグは、本明細書においてCRFCタグと呼ばれる（実施例1を参照されたい）。CRFCタグは、HAエピトープタグ、C-TAG、ヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ部位、およびFcポリペプチドを組み合わせたものである。典型的なポリペプチド配列が配列番号37に提示され、CRFCタグをコードするヌクレオチド配列は配列番号38に示される。アフィニティタグの組合せを含めて、本明細書に記載のアフィニティタグを有する融合ポリペプチドは、ウイルスビルレンス因子と相互作用する標的細胞性ポリペプチド、またはその一部をタンデムアフィニティ精製するために使用される。

## 【0247】

前記から当然のことながら、説明目的で本発明の具体的な実施形態を記載したが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、さまざまな修正を行うことができる。当業者は、日常的な実験しか使わずに、本明細書に記載の本発明の具体的な実施形態に相当する多くの均等物を認識し、または確認することができる。こうした均等物は、下記の請求の範囲に含まれるものとする。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0248】

【図1】タンデムアフィニティ精製(TAP)に使用されるA41L融合ポリペプチドの発現用の組換え発現構築物(A41LCRFC)によりコードされるA41L融合ポリペプチドの概略図である。コードされる融合ポリペプチドは牛痘ウイルス由来の成熟A41L（そのアミノ末端でヒト成長ホルモンリーダーペプチド(GHリーダー)のカルボキシ末端に融合される)を含む。A41Lのカルボキシ末端にはタンデムアフィニティタグ(CRFC)が融合されており、これはヒトインフルエンザウイルス赤血球凝集素(HA)エピトープ(YPYDVDA、配列番号1)とインフレームでプロテインCタグ(EDQVDPRLIDGK(配列番号4)、ヒトプロテインCの重鎖に由来する)；ヒトライノウイルスHRV3Cプロテアーゼ部位(HRV3C切断部位)(LEVLFGQP(配列番号16))；およびヒトIgG免疫グロブリンのFc部分のムテイン誘導体(ムテインFc)を含んでいた。

【図2】A41Lと結合する細胞性ポリペプチドを同定するためのTAP法の概略図である。

【図3A】タンデムアフィニティ精製(TAP)およびLC/MS/MS解析により同定されたLARのペプチドを示す。TAP後にLC/MS/MSで同定された、LAR（配列番号43）内のペプチドの配列（太字体）を示す。

【図3B】タンデムアフィニティ精製(TAP)およびLC/MS/MS解析により同定されたRPTP-のペプチドを示す。TAP後にLC/MS/MSで同定された、RPTP-（配列番号18）内のペプチドの配列（太字体）を示す。

【図3C】タンデムアフィニティ精製(TAP)およびLC/MS/MS解析により同定されたRPTP-のペプチドを示す。TAP後にLC/MS/MSで同定された、RPTP-（配列番号19）内のペプチドの配列（太字体）を示す。

【図4】タンデムアフィニティ精製法に使用することができる各種の融合タンパク質構築物の概略図である。各構築物のアミノ末端にはヒト成長ホルモン(GH)シグナルペプチドを示してある。ORF（オープンリーディングフレーム）はコードされたウイルスビルレンス因子をさし、これは完全長のポリペプチドであってもその一部分であってもよい。アフィニティタグポリペプチドには、HA、ヒトインフルエンザウイルス赤血球凝集素ペプチド（赤血球凝集素エピトープともいう）；CBP、カルモジュリン結合タンパク質；SBP、ストレプトアビジン結合タンパク質；2XSBP、ストレプトアビジン結合タンパク質のタンデムリピート；ムテインFc、ムテイン免疫グロブリンFcポリペプチド；C-TAG、ヒトプロテインCの重鎖由来のプロテインC-タグ；Softag<sup>TM</sup>ペプチド；およびZZ、IgG結合ZZポリペプチドが含まれる。プロテアーゼ部位としては、Rhino、ヒトライノウイルス3C（HRV3C）プロテアーゼ部位；およびTEV、タバコエッチウイルスプロテアーゼ部位が含まれる。

【図5】ウイルスビルレンス因子のオープンリーディングフレーム（ウイルスORF）にインフレームで融合されたCRFCアフィニティタグを用いたタンデムアフィニティ精製の概略図である。CRFCタグには、そのアミノ末端から、HA（赤血球凝集素ペプチド（赤血球凝集

10

20

30

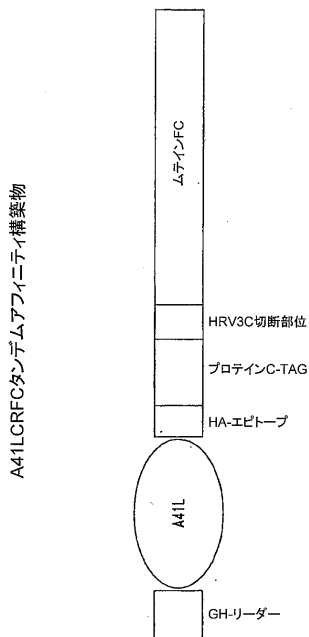
40

50

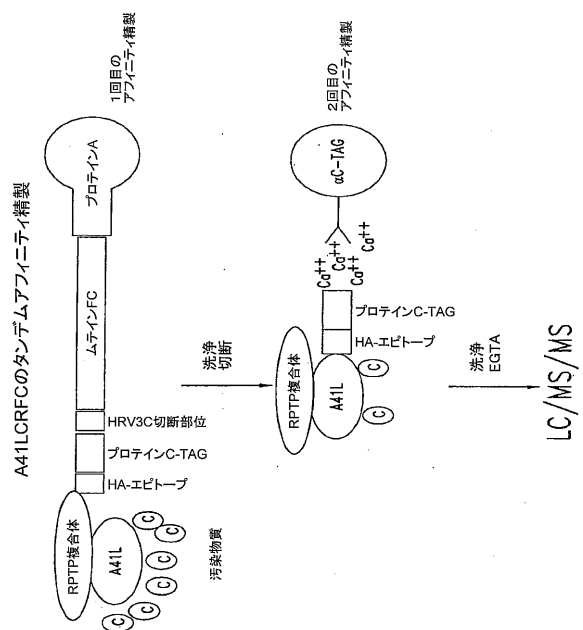
素エピトープともいう); C-TAG; HRV3Cプロテアーゼ部位; および免疫グロブリンFcポリペプチド(野生型FcポリペプチドまたはムテインFcポリペプチドのいずれでもよい)が含まれる。

【図6】(i) A41Lシグナルペプチド配列、A41Lポリペプチド、およびヒトIgG1 Fcポリペプチド(A41L/Fc)を含むA41L/Fc融合ポリペプチド(配列番号32)と、(ii)ヒト成長ホルモンシグナルペプチド配列、A41Lポリペプチド変異体、およびムテインFcポリペプチド(A41L/ムテインFc)を含むA41L/ムテインFc融合ポリペプチド(配列番号31)とのアミノ酸配列アライメントを示す。コンセンサス配列(配列番号44)も示してある。垂直の点線はA41Lポリペプチドのアミノ末端とカルボキシ末端を示す。

【図1】



【図2】



## 【 図 3 A 】

LAR

MAPEAPAGRTMVLPLVPLVLMGLVAGAHGDSKPVFIKVPEDQTLGSGGVA  
FVCQATGEPKPRITWMMKGKVSQRFEVIEDDAGSVLRQPLRVQRDE  
AIYECTAT NSLGEINTSA KLSVLEEEQL PGFPSSIDMG PQLKVVEKAT  
TATMLCAAG NPDPSEISWFKDPLVPDPATSNRIKQLRSG ALQIESSEES  
DQKQECVAT NSAGTRYAP ANLYRVRRV APRFSIPSS  
QEVMPGGSVN LTCVAVGAPMPYKVMWGAEELTKEDEMPV  
GRNVLELSNV VRSANYTCVA ISSLGMEAT AQVTVKALPKPIDLVVTET  
TATSVTLTWD SGNSEPTVYGIQYRAAGTE GPFEQVGDVA TTRYISIGGLS  
PFSEYAFRVL AVNSIGRGP SEAVRARTGEQAPSSPPRRV  
QARMLASTM LVQWEPPEEPNGLVRGYRVY YTPDSRRPPN  
AWHKHNTDAG LLTTVGSLLP GITYSLRVLAVTAVGDGPPSPTIQVKTQQG  
VPAQPADFAQ EVESDTRIQLSWLLPPQERI IMYELVYVAA  
EDEDQKHVT  
FDPTSSYTLDELKPDITLYRFQLAARSMDMGVGFPTTIEARTAQSTPSAPP  
QKVMCVSMGS TTVRVSWVPP PADSRNGVIT QYSVAYEAVD  
GEDRGHVV D GISREHSSWD LVGLEKWTYRVVRAHTDV  
GPGPESSPV LVRTDEDVPSG PPRKVEVEPL NSTAVHYWK  
LPVPSKHGQIRGYQVTVYR LENGEPRGLP IIQDVMLAEAQETISGLTP  
ETTSYVTVA YTTKGDSARS KPIVTTTGA VPGRPTMMISTAMNTALLQ  
WHPPKELPGE LLGYRLQYCR ADEARPNTID FGKDDQHFTV  
TGLHKGTTYI FRLAAKNRAG LGEEFEKEIR TEPDLSPGFP QNLHVTGLT  
STTELAWDPP VLAERNRII SYTVVFRDIN SQEQLNITT DTRFTLTGLK  
PDITYDIKVRWATSKGSGPL SPISQSRIMP VEQVFAKNFR VAAAMKTSVL  
LSWEVPSDYK SAVPFKILYN QGSVEVDGHS MRKLIADLP  
NTEYSFVLNM RGSAGGLQH LVSIRTAAPL LPHKPLPASA YIEDGRFOLS  
MPHVQDPSLV SDDPVEMRRL NYQTPGMRDH PPIPTDLAD NIERLKANDG  
LKFQSEYESI DPGQQTWEN SNLEVNPKPN RYANVIAYDH SRVILTSIDG  
VPGSDYINAN YIDGYRKQNA YIATQGPLE TMGDFWRMVV  
EQRTATVMM TRLEEKSRVK CDQYVARGT ETCGLIQVTL LDTVELATY  
VRTFALHKS SSEEKRLQF QFMAWPHGV PEYPTILAF  
LRRVKACNPL DAGPMVHCSAGVGR TGC FIVIDAM LERMHEKTV  
DIYGHVTCMRSQRYMVQTEDQYVFIHEALLEAATCGHTEVPARNLYAHQ  
KLQGVPPGESVTAMELEFKLASSKAHTRSFISANLPCNKFNRLVNIMPYE  
LTRVQLQPIRGV EGS DYINASF LDGYRQKQAY IATQGPLEAS  
TEDFWRLWE HNSTIVMLT KLEMGREKQ HQYVPAERSA  
RYQYFVDDPM  
AEVNMPPQYILREFKVT DARDGQSRTIRGVFTLDWPEQGVPKTGEGFIDFI  
QYHKTKEQFGQDGPITVHCSAGVGRGTGFTLTVLRLERM RYEGVDMFQ  
TVKTLRTQRPAMVQTEDQYQCYRAALEYL GSFHDYAT

## 【 図 3 B 】

PTP-σ

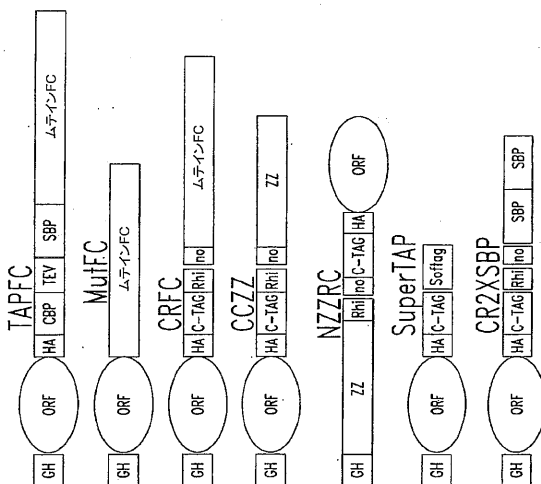
MAPTWGPGMV SVVGPMLLV VLLVGCGAAE EPPRIKEPK  
DQIGVSGGVA SFVCQATGDP KPRVTWNKKG KKVNSQRFT  
IEFDESAGAV LRIQPLRTP DENVYECVAG NSVGEITVHA KLTVLREDQL  
PSGFPNIDMG PQLKVVERTR TATMLCAAG NPDPSEITWFK DFLVPDPSAS  
NGRIKQLRSD QAFSHLPTGA LQIESSEETD QKGYECVATN  
SAGVRYSSPA NLYVRALLKL RRVAPRFSIL PMSHEIMPGG NVNITCVAVG  
SPMPYKWMQ GAEDLTPEDD MPVGRNVLEL TDVCKDSANYT  
CVAMSSSLGI EAVAQITVKS LPKAPGTPMV TENTATSITI TWDSGNPDV  
SYVYIEYKSK SQDGPYQIKE DITTRYISIG GLSPNSEYEI WVS AVNSIGQ  
GPPSESVTR TGEQAPASAP RNVQARMLSA TTMIVQWEEP  
VEPNGLIRGY RVYITMEPEH PVGNWQKHNV DDSLTTVGS  
LLEDETYTVR VLAFTSVGDG PLSDPIQVKT QQGVPGQPMN  
LRAEARETS ILSWSPPRQ ESIIKYLLEF REGDHRGREG RTFDPTTSYV  
VEDLKPNTEY AFRLAARSQ GLGAFTPVVR QRTLQSKPSA  
PPQDVKCVSV RSTAILVSWR PPPETHNGA LVGYSVRYR  
LGSEDPPEKE VNGIPPTTQ ILLEALEKWT QYRITVAHT EVGPGPESSP  
VVVRTDEDVP SAPPRKVEAE ALNATAIRVL WRSPAPGRQH  
QIRGYQVHY VRMEGAEARG PPRIKDVMLA DAQWETDDTA  
EYEMVITNLQ PETAYSITVA AYTMKGDGAR SKPKVVVTKG AVLGRPTLSV  
QQTPGEGSLA RWEPPAGTAE DQVLGYRLQF GREDSTPLAT  
LEFPSEDRY TASGVHKGAT YVFRLAARS GGLGEEAAEV LSIPEDTPRG  
HPQILEAGN ASAGTVLLRW LPPVPAERN AVIKYTVAVR EAGALPARE  
TELPAAAEFG AENALTQGL KPDATYDLQV RAHTRGPGP  
FSPVRYRTE LRDQVSPKFN KVKMIMKTSV LLSWEFPDNY NSPTPYKIY  
NGLTLDVDRG TTKLTHLK PHTFYNFVLT NRGSSLGGLQ QTVTAWTAFN  
LLNGKPSVAP KPDADGFMV YLPDGGQSPVP VQSVFVIMVP LRKSRGQGL  
TFLGSPEDMD LEELIQDISR LQRRSLRHSR QLEVPRPIYA ARFSVLPPTF  
HPGQKQYQG FDNRGLEPH RYVFLVAVL QKSEPTFAAS  
PFSDPFLDN PDPQIVDGE EGLWVGVPV LAVFICIV IAILLYKNKP  
DSKRKIDSEPR TKCLLNADL APHHPKDPVE MRRINFQTPD  
SGLRSPLEP GFHFESMLSH PPIADMAE HTERLKANDS LKLSQYESI  
DPGQQTWEH SNLEVNPKPN RYANVIAYDH SRVILQPIEG IMGSDYINAN  
YIDGYRQNA YIATQGPLE TFGDFWRMVV EQESATVMM  
TRLEEKSRK CDQYWPNRGT ETYGFIVTL LQTLATFC VRTFSLHKN  
SSEKREVRQF QFTAWPDHGV PEYPTPLAF LRRVKCNPP  
DAGPMVHCS AGVGRGTGCF VIDAMLERIK PEKTVDVYGH VTLMSQRNY  
MVQTEDQYSF IHEALLEAVG CGNTEVPARS LYAYIQKLAQ VEPGEHVTGM  
ELEFKRLANS KAHTSRFISA NLPCNKFNRL VNIMPYEST RVCLQPIRGV  
EGSDYINASF IDGYRQKQAY IATQGPLET TEDFWRLWE HNSTIVMLT  
KLEMGREKQ HQYVPAERSA RYQYFVDDPM AEVNMPPQYIL  
REFKVT DARDGQSRTIRGVFTLDWPEQGVVP KSGEGFIDFI  
QYHKTKEQF GQDGPISVHC SAGVGRGTGV ILSLVLERM RYEGVDFIQ  
TVKMLRTQRP AMVQTEDEYQ FCYQAALEYL GSFHDYAT

## 【 図 3 C 】

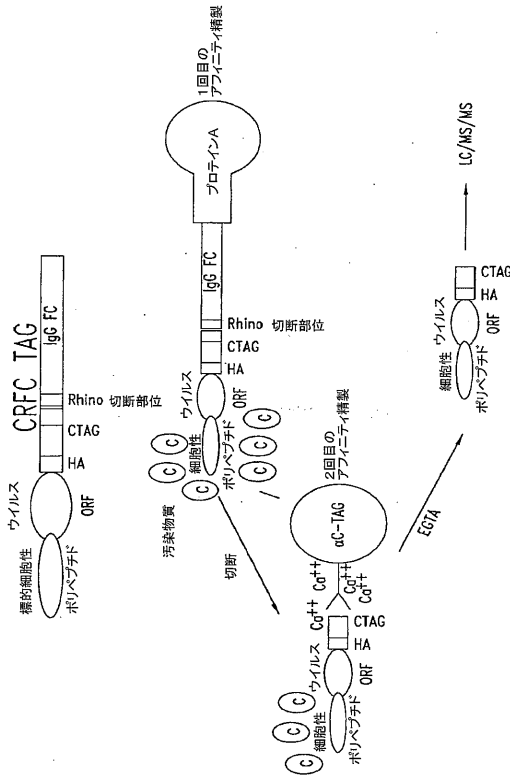
PTP-δ

MVHVARLLLLLFFLRDAETPPRFTRTPVDQTVSGGVASFCQATGDP  
PKIWNKKGKVSQNRFEVIEDDGSGLVLRQPLRTP RDEAIYECVA  
SNNVGEISVS TRTLVREDQ IPRGFPTIDM GPQLKVERT RTATMLCAAS  
GNPDPEITWF KDFLPVDTSN NNGRIKQLRS GRVFKRLNRR ALQIEQSEES  
DQKQECVAT NSAGTRYAP ANLYRVVETP QVRRVPPRS  
IPLNDHEIMP GGSVNITCVA VGSMPYKVMW MLGAEDLTPE DDMPIGRNV  
ELNDVRQSAN YTCVAMSTLG VIEAIAQTV KALPKPGTP VTESTATSI  
TLTWDSGNPE PVSYIYIHK PKNSEELYKE IDGVATTRYV VAGLSYPSDY  
EFRRVAVNNI GRGPPSEPL TQTSQAPSS APRDVQARM LSTTILVQWK  
EPEEPNGCIQ GYRVYTMDP TQHVNNWMKH NVADSQITTI  
GNLVQKQTSY VKVLAFTSIG DGPLSSDIQ ITQTVGPGQP LNFKAPESE  
TSILLSWTPP RSDTIANEY VYKDGEGHEE QRITIEPGTS YRLQGLKPN  
LYFRRLAARS PQGLGASTAE ISARTMQSKP SAPPQDISCT SPSSITSLVS  
WQPPPEVEKQ GIITEYSIKY TAVDGEDDKP HEILGIPSDT TKYLLEQLEK  
WTEYRITVTA HTDVGPGPES LSVLIRTNED VPSGPPRKVE VEAVNSTSVK  
VSWRSPVPNK QHGQIRGYQV HYVRMENGEP KGQPMKLDVM  
LADAQWEDD TTEHDMISS LQPETSYSLT VTAYTTKGDG ARSKPKLVST  
TGAVPGKPL VINHTQMNTA LIQWHPPVD TFGPLQGYRLK  
FGRKDMLEPT TLEFSEKEDH FTATDIHKGA SYVFRLSARN KVGFGEEVMK  
EISIPPEVPT GPPQNLHSEG TTSTSVQLSW QPPVLAERNG IITKYTLTYR  
DINILPLPME QLIVPADTTM TLTGLKPDIT YDVKVRAHTS KGPGPYSPV  
QFRTLVPDQV FAKNFHVKA VPKTSVLLSWE IPENYNSAMP FKILYDDGKM  
VEEVDRATQ KLIVNLKPEK SYFVLTNRG NSAGGLQHRV TAKTAPDVL  
TKPAFIGKTN LDGMITVQLP EVPANENIKG YHIVPLKK SRGKFIKPE  
SPDEMELDEL LKEISRRKRS IRYGREVELK PYIAAHFDVL PTEFTLGD  
HYGGFTNKQL QSGQYVFFV LAVMEHAESK MYATSPYSDP  
VVSMDLDPQ ITDEEGLW VVGVPVAVV IICIVAIL YKRAESDS  
RKSSIPNNKE IPSHPTDPV ELRRLNFQTP GMASHPIPI LELADHIER  
KANDNLKFSQ EYESIDPGQ FTWEHSNLEV NPKPNRYANV IAYDHSRVL  
SAIEGIPGSD YVNANYIDGY RKQNAIYATQ GSPETFGDF WRMIWEQRSA  
TVVMMTKLEE RSRVKCDQYV PSRGTEHGL VQVTLTDTVE  
LATYCVRTFA LYKNGSSEKR EVRQFQTAW PDHGVPEHPT  
PFLAFRLRVK TCNPPDAGPM VVHCSAGVGR TGC FIVIDAM LERIKHEKTV  
DIYGHVTLMR AQRNMYVQTE DQYFIHDAL LEAVTCGNTE VPARNLYAYI  
QKLTQIETGE NVTGMELEFK RLASSKAHTS RFISANLPCN KFNRLVNIM  
PYESTRVLQ PIRGVEGSDY INASFDIGYR QOKAYIATQG PLAETEDFW  
RMLWEHNSTI VMLTKLREM GREKCHQYWP AERSARYQYF  
VYDPMAYNM PQYILREFKV TDARDGQSRTIRGVFTLDWPEQGVVP  
EQGVPKSGEG FIDFIQVHK TKEQFGQDGP ISVHCSAGV RTGVFTLSI  
VLMRYEYGV VDFIQTVKML RTQRPAMVQT EDQYQFSYRA  
ALEYLSFDH YAT

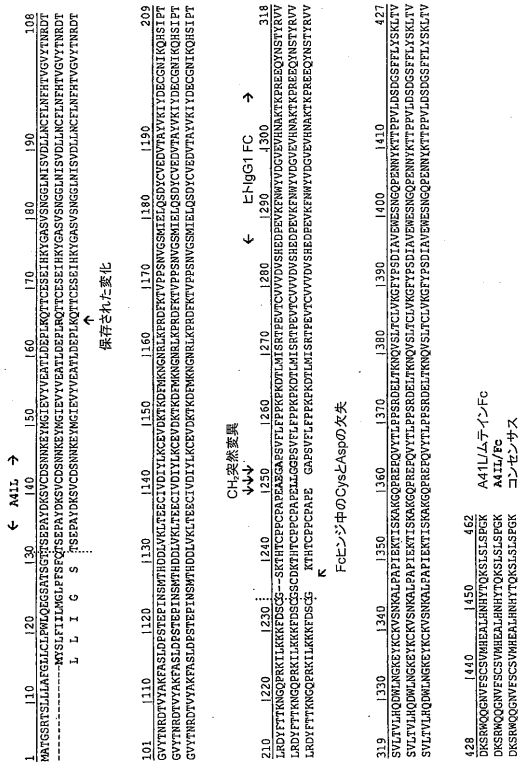
## 【 図 4 】



【図 5】



【図 6】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/007340

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
INV. G01N33/569

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)  
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/002526 A (HARVARD COLLEGE [US]; YOU JIANXIN [US]; HOWLEY PETER M [US]) 13 January 2005 (2005-01-13) the whole document page 125	1
X	US 2005/106663 A1 (BRAMAN JEFFREY C [US] ET AL BRAMAN JEFFREY C [US] ET AL) 19 May 2005 (2005-05-19) the whole document paragraphs [0088], [0098], [0123] - [0127] claims 17-22	1

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

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document 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
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 July 2007

Date of mailing of the international search report

02/10/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Jenkins, Gareth

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/007340

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 830 020 A1 (UNIV VICTOR SEGALEN BORDEAUX 2 [FR]) 28 March 2003 (2003-03-28) the whole document claims 31-38 page 10, line 31 - page 11, line 2 page 32, lines 7,8 figure 1	1
E	WO 2007/041317 A (VIRAL LOGIC SYSTEMS TECHNOLOGY [US]; SMITH CRAIG A [US]; WILEY STEVEN) 12 April 2007 (2007-04-12) the whole document page 153 - page 165	1
X	ENGELHARDT OTHMAR G ET AL: "Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 79, no. 9, May 2005 (2005-05), pages 5812-5818, XP002442790 ISSN: 0022-538X the whole document page 5812, column 2, paragraph 4 - page 5813, column 1, paragraph 3 figure 3	1
X	SU JIN ET AL: "Myxoma virus M1L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 80, no. 3, February 2006 (2006-02), pages 1140-1151, XP002442791 ISSN: 0022-538X the whole document page 1142, column 1	1
X	ZHANG S M ET AL: "HBx protein of hepatitis B virus (HBV) can form complex with mitochondrial HSP60 and HSP70" ARCHIVES OF VIROLOGY, vol. 150, no. 8, August 2005 (2005-08), pages 1579-1590, XP002442792 ISSN: 0304-8608 the whole document page 1581 page 1588, paragraph 3	1

-/--



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/007340

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PUIG OSCAR ET AL: "The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification" METHODS : A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY, ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, NY, US, vol. 24, no. 3, July 2001 (2001-07), pages 218-229, XP002205606 ISSN: 1046-2023 the whole document</p>	1
A	<p>DZIEMBOWSKI A ET AL: "Recent developments in the analysis of protein complexes" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 556, no. 1-3, 2 January 2004 (2004-01-02), pages 1-6, XP004483196 ISSN: 0014-5793 the whole document</p>	1
A	<p>RIGAUT G ET AL: "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 17, no. 10, October 1999 (1999-10), pages 1030-1032, XP002179540 ISSN: 1087-0156 the whole document</p>	1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2007/007340**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 2-52, 57, 58  
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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
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 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:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-52, 57, 58

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/US2007 /007340

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 2-52,57,58

Invention 1 contains in excess of 50 dependent claims. There are so many dependent claims, and they are drafted in such a way that the claims as a whole are not in compliance with the provisions of clarity and conciseness of Article 6 PCT, as they erect a smoke screen in front of the skilled reader when assessing what should be the subject-matter to search. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search (PCT Guidelines 9.19).

The extent of the search was consequently limited to claim 1, which appears to comprise a reasonable definition of what is understood to be the invention for which protection is sought.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/US2007/007340

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-52,57,58

Method of identifying cellular targets of virus proteins  
according to claim 1.  
---

2. claim: 53

Method of identifying cellular targets of virus proteins  
according to claim 53.  
---

3. claims: 54,55

Method of identifying cellular targets of virus proteins  
according to claim 54.  
---

4. claim: 56

Method of identifying cellular targets of virus proteins  
according to claim 56.  
---

5. claims: 59-61

Some method of using structurally undefined antibodies.  
---

6. claims: 62-63

Some method of using structurally undefined agents.  
---

7. claims: 64-68

Method of guiding selection of a therapeutic target.  
---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/007340

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005002526	A	13-01-2005	NONE	
US 2005106663	A1	19-05-2005	US 2005158711 A1 WO 2005049639 A2	21-07-2005 02-06-2005
FR 2830020	A1	28-03-2003	NONE	
WO 2007041317	A	12-04-2007	NONE	

## 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 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 6
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 K 39/235 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 S	
A 6 1 K 39/245 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 39/275 (2006.01)	A 6 1 K 39/235	
A 6 1 K 39/29 (2006.01)	A 6 1 K 39/245	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	A 6 1 K 39/275	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/29	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	
	C 0 7 K 19/00	
	C 1 2 P 21/00 C	

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

(72)発明者 スミス, クレイグ, エー.

アメリカ合衆国 9 8 1 9 9 ワシントン州, シアトル, 3 9 ティーエイチ アベニュー ウェスト 2 8 5 4

(72)発明者 ウィリー, スティーブン

アメリカ合衆国 9 8 1 0 7 ワシントン州, シアトル, 6 5 ティーエイチ ストリート ノースウェスト 3 0 1 0

F ターム(参考) 2G045 AA34 CB01 CB21 DA36

4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10 CA11  
DA02 DA03 EA04 FA02 FA10 FA18 GA11 GA18 HA03 HA08  
HA09 HA12 HA14

4B063	QA01	QA13	QA18	QQ08	QQ20	QQ42	QQ52	QQ79	QR08	QR16
	QR32	QR33	QR35	QR42	QR48	QR56	QR57	QR59	QR62	QR63
	QR66	QR69	QR77	QR82	QS03	QS05	QS12	QS16	QS17	QS24
	QS25	QS28	QS34	QS36	QX02	QX10				
4B064	AG01	CA10	CA19	CC24	CE12	DA13				
4C085	AA13	BA01	BA77	BA78	BA85	BA89	DD62			
4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA04	NA14	ZA02	ZA36	ZA42	ZA51
	ZA59	ZA66	ZA81	ZA89	ZA94	ZA96	ZB07	ZB08	ZB11	ZB35
	ZC21	ZC35								
4H045	AA30	BA10	BA15	BA16	BA41	BA70	BA71	CA01	CA11	CA40
	EA20	EA22	EA50	FA72	FA74	GA26				