

(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2004-536585

(P2004-536585A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 123 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-587582 (P2002-587582)	(71) 出願人	591027064
(86) (22) 出願日	平成14年5月9日 (2002.5.9)		エール・ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月10日 (2003.11.10)		アメリカ合衆国コネチカット州ニューヘブ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/014915		ン、カリッジ・ストリート 451
(87) 国際公開番号	W02002/090520	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開日	平成14年11月14日 (2002.11.14)		弁理士 社本 一夫
(31) 優先権主張番号	60/289,738	(74) 代理人	100076691
(32) 優先日	平成13年5月9日 (2001.5.9)		弁理士 増井 忠次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100075270
(31) 優先権主張番号	60/289,815		弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成13年5月9日 (2001.5.9)	(74) 代理人	100080137
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 千葉 昭男
(31) 優先権主張番号	60/289,866	(74) 代理人	100096013
(32) 優先日	平成13年8月29日 (2001.8.29)		弁理士 富田 博行
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 トル／インターロイキン－1 受容体アダプタータンパク質 (T I R A P)

(57) 【要約】

T I R A P ポリペプチドおよびポリヌクレオチド、並びに組換え技術によって、こうしたポリペプチドを産生する方法を開示する。やはり開示するのは、療法、およびこのための診断アッセイにおいて、T I R A P ポリペプチドおよびポリヌクレオチドを利用する方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

配列番号 3 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターであって、適合する宿主細胞に存在する、前記発現ベクター。

【請求項 3】

組換え宿主細胞産生法であって、前記宿主細胞が、適切な培養条件下で、前記ポリペプチドを産生するように、請求項 2 の前記発現ベクターを宿主細胞に導入する工程を含んでなる、前記方法。

10

【請求項 4】

請求項 3 の方法によって産生される、組換え宿主細胞。

【請求項 5】

細胞が前記ポリペプチドを発現する、請求項 4 の組換え宿主細胞の膜。

【請求項 6】

ポリペプチド産生法であって、前記ポリペプチドの産生に十分な条件下で、請求項 4 の組換え宿主細胞を培養し、そして培養から前記ポリペプチドを回収することを含んでなる、前記方法。

【請求項 7】

配列番号 3 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

20

【請求項 8】

配列番号 3 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に完全に相補的なポリヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

配列番号 1 のヌクレオチド配列に完全に相補的なポリヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

配列番号 3 に示すアミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチド。

【請求項 11】

配列番号 3 のアミノ酸配列からなる、請求項 10 のポリペプチド。

30

【請求項 12】

請求項 10 のポリペプチドに免疫特異的な抗体。

【請求項 13】

配列番号 1 の配列を含んでなるヌクレオチド配列を発現することによって得ることが可能なポリペプチド。

【請求項 14】

配列番号 5 のヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 15】

配列番号 9 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

40

【請求項 16】

配列番号 9 に示すアミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチド。

【請求項 17】

配列番号 2 のヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 18】

配列番号 4 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターであって、適合する宿主細胞に存在する、前記発現ベクター。

【請求項 19】

組換え宿主細胞産生法であって、前記宿主細胞が、適切な培養条件下で、前記ポリペプチ

50

ドを産生するように、請求項 18 の前記発現ベクターを宿主細胞に導入する工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 20】

請求項 19 の方法によって産生される、組換え宿主細胞。

【請求項 21】

細胞が前記ポリペプチドを発現する、請求項 20 の組換え宿主細胞の膜。

【請求項 22】

ポリペプチド産生法であって、前記ポリペプチドの産生に十分な条件下で、請求項 20 の組換え宿主細胞を培養し、そして培養から前記ポリペプチドを回収することを含んでなる、前記方法。

10

【請求項 23】

配列番号 4 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 24】

配列番号 4 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に完全に相補的なポリヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 25】

配列番号 2 のヌクレオチド配列に完全に相補的なポリヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 26】

配列番号 4 に示すアミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチド。

20

【請求項 27】

配列番号 4 のアミノ酸配列からなる、請求項 26 のポリペプチド。

【請求項 28】

請求項 26 のポリペプチドに免疫特異的な抗体。

【請求項 29】

配列番号 2 の配列を含んでなるヌクレオチド配列を発現することによって得ることが可能なポリペプチド。

【請求項 30】

配列番号 5 のヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

30

【請求項 31】

配列番号 9 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 32】

配列番号 9 に示すアミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチド。

【請求項 33】

配列番号 11 のアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 34】

配列番号 11 に示すアミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチド。

40

【請求項 35】

a . TLR4 の少なくとも TIRAP 結合ドメインを含んでなるポリペプチドを提供し ;
b . TIRAP ポリペプチド、または TLR4 結合ドメインを含んでなる他のポリペプチドを提供し ;
c . 候補化合物を提供し ;
d . 候補化合物を、TLR4 の TIRAP 結合ドメインを含んでなるポリペプチドおよび TIRAP ポリペプチドまたは他のポリペプチドと近接して配置し ; そして
e . 候補化合物が、TLR4 の TIRAP 結合ドメインを含んでなるポリペプチド、あるいは TIRAP ポリペプチドまたは他のポリペプチドいずれかの結合と競合するかどうかを決定する

50

工程を含んでなる、薬剤スクリーニング法。

【請求項 36】

T L R 4 の T I R A P 結合ドメインが T L R 4 を含んでなり、そして T I R A P ポリペプチドまたは他のポリペプチドが配列番号 9 に示すポリペプチドを含んでなる、請求項 35 の薬剤スクリーニング法。

【請求項 37】

T L R 4 の T I R A P 結合ドメインが T L R 4 を含んでなり、そして T I R A P ポリペプチドまたは他のポリペプチドが配列番号 10 に示すポリペプチドを含んでなる、請求項 35 の薬剤スクリーニング法。

【請求項 38】

細胞において、T I R A P シグナル伝達を遮断する方法であって、前記細胞に阻害量の T I R A P 阻害剤を投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項 39】

前記 T I R A P 阻害剤がポリペプチドである、請求項 38 の方法。

【請求項 40】

前記 T I R A P 阻害剤がペプチド模倣体 (m i m e t i c) である、請求項 38 の方法。

【請求項 41】

前記ポリペプチドが配列番号 9、11 および 12 に示すアミノ酸配列群から選択されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 39 の方法。

【請求項 42】

融合タンパク質であって、T I R A P 阻害性ポリペプチド、および前記融合タンパク質を細胞に搬送するのに有用な第二のポリペプチドを含んでなる、前記融合タンパク質。

【請求項 43】

前記の第二のポリペプチドがアンテナペディアを含んでなる、請求項 42 の融合タンパク質。

【請求項 44】

T L R 4 の M y D 8 8 独立シグナル伝達を阻害するペプチドまたは小分子に関してスクリーニングすることを含んでなる、T I R A P 活性アンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項 45】

T I R A P の T L R 4 への結合を阻害するペプチドまたは小分子に関してスクリーニングすることを含んでなる、T I R A P 活性アンタゴニストのスクリーニング方法。

【請求項 46】

T L R 4 の M y D 8 8 独立シグナル伝達を活性化するペプチドまたは小分子に関してスクリーニングすることを含んでなる、T I R A P 活性アゴニストのスクリーニング方法。

【請求項 47】

T L R 4 の T I R A P 結合部位に結合するペプチドまたは小分子に関してスクリーニングすることを含んでなる、T I R A P 活性アゴニストのスクリーニング方法。

【請求項 48】

候補 T I R A P アンタゴニストと、T L R 4 ポリペプチドまたはその T I R A P 結合ドメイン、および T I R A P またはその T L R 4 結合ドメインを、いずれかの順序で連続して、または同時に接触させ、そして候補アンタゴニストが、T I R A P またはその T L R 4 結合ドメインと、T L R 4 ポリペプチドまたはその T I R A P 結合ドメインの結合を阻害するかどうかを決定することを含んでなる、請求項 44 の方法。

【請求項 49】

突然変異体が T L R 4 に結合するが、T L R 4 の M y D 8 8 独立シグナル伝達を誘導しないように、T L R 4 結合ドメインに少なくとも 1 つの突然変異を有する T I R A P を含んでなる、T I R A P アンタゴニスト。

【請求項 50】

突然変異体が T I R A P に結合し、そして T I R A P の T L R 4 への結合を妨げるが、T L R 4 の M y D 8 8 独立シグナル伝達を誘導しないように、T L R 4 結合ドメインに少な

10

20

30

40

50

くとも1つの突然変異を有するTIRAPを含んでなる、TIRAPアンタゴニスト。

【請求項51】

ヒトTIRAPで判断された場合のアミノ酸118～131の領域に少なくとも1つの突然変異を含んでなる、請求項49のTIRAPアンタゴニスト。

【請求項52】

TIRAPの結合ドメインが、125位に、プロリンからヒスチジンへの突然変異を有する、請求項51のTIRAPアンタゴニスト。

【請求項53】

TIRAP発現と関連する疾患状態を治療する方法であって、ポリペプチドがTLR4に結合するが、TLR4のMyD88独立シグナル伝達を誘導しないように、TLR4結合ドメインに突然変異を有するポリペプチドを、内部投与することを含んでなる、前記方法。

10

【請求項54】

TIRAPのTLR4への結合を阻害する小分子である、TIRAPアンタゴニスト。

【請求項55】

TIRAPアンタゴニストを内部投与することを含んでなる、動物において、免疫応答を変調する方法。

【請求項56】

TIRAPをコードするポリヌクレオチドにアンチセンスであるポリヌクレオチドを内部投与することを含んでなる、動物において、免疫応答を変調する方法。

20

【請求項57】

内因性トルノインターロイキン-1受容体アダプタータンパク質遺伝子における破壊を含んでなる、トランスジェニック・ノックアウト非ヒトであって、ここにおいて、前記破壊は、ターゲティング構築物が前記非ヒトのゲノムに安定して組み込まれるように、胚性幹細胞において、DNAターゲティング構築物との相同組換えによってそのゲノムに導入されている、前記非ヒト。

【請求項58】

非ヒトがマウスである、請求項57のトランスジェニック・ノックアウト非ヒト。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

30

【0001】

(発明の背景)

薬剤発見法は、「機能的ゲノミクス」、すなわちハイスループットのゲノムまたは遺伝子に基づく生物学を含むため、現在、抜本的な改革を経験しつつある。このアプローチは、ポジショナルクローニングに基づく、より初期のアプローチに迅速に取って代わっている。生物学的機能または遺伝子疾患である表現型が同定され、そしてこれはその後、遺伝子マップ位置に基づいて、関与する遺伝子にさかのぼられるであろう。

【0002】

機能的ゲノミクスは、現在利用可能な多くの分子生物学データベースから、潜在的な目的の遺伝子配列を同定する、バイオインフォマティクスの多様なツールに非常に頼る。免疫

40

【0003】

生得的な免疫認識の戦略は、微生物代謝の恒常的な、そして保存される産物の検出に基づく。多くの代謝経路および個々の遺伝子産物は、微生物にユニークであり、そして宿主細胞には欠けている。認識のこれらの標的は、異なる種の微生物間で、絶対的には同一でないが、遺伝子産物は、共通の分子パターンの背景で見出すことが可能であり、これは、典型的には、既定のクラスの微生物間で非常に保存されており、そして不変である。生得的な免疫認識の標的は、保存された分子パターンであるため、これらは、病原体関連分子パ

50

ターン (P A M P) と呼ばれる。

【 0 0 0 4 】

トル (T o l l) 様受容体 (T L R) ファミリーの最近の発見および性質決定は、生得免疫の分野に新たな関心を引き起こしてきている。T L R s は、動物免疫において、ユニークでそして重要な機能を有する、パターン認識受容体である。T L R s は、典型的には、細胞外ロイシンリッチ反復ドメインおよび細胞内 T I R (トル / インターロイキン - 1 受容体) ドメインによって特徴付けられる、膜貫通受容体である。T I R ドメインは、保存されるタンパク質 - タンパク質相互作用モジュールであり、そして宿主防御に役割を果たす。言い換えると、T L R は、微生物認識および獲得免疫応答の調節に重要な役割を果たす。

10

【 0 0 0 5 】

哺乳動物種には少なくとも 1 0 の T L R s があり、そして各々が、生得免疫認識において、別個の機能を有する。T L R s は、主に、リガンド特異性、アクセサリー分子の使用、発現プロファイルおよびシグナル伝達経路の相違に関して、互いに異なる。

【 0 0 0 6 】

ヒト T L R 4 は、最初に同定され、そして機能的に性質決定された哺乳動物トルであった。T L R 4 は、P A M P リポ多糖 (L P S)、並びに、当業者に明らかな他の P A M P のシグナル伝達受容体として機能する。

【 0 0 0 7 】

T L R s によるシグナル伝達経路の活性化は、炎症性サイトカイン、ケモカイン、M H C および同時刺激分子を含む、宿主防御において機能する、多様な遺伝子の誘導を導く。哺乳動物 T L R s はまた、誘導性一酸化窒素シンターゼ、および微生物病原体を直接破壊可能な抗菌ペプチドなどの多数のエフェクター分子も誘導する。

20

【 0 0 0 8 】

トルおよびインターロイキン - 1 受容体 (I L - 1 R) ファミリーのすべてのメンバーに共有されるようであるシグナル伝達経路には、4 つの本質的な構成要素：アダプター T R A F 6、M y D 8 8 およびトリップ (T o l l i p) およびプロテインキナーゼ I R A K が含まれる。M y D 8 8 は、2 つのタンパク質相互作用ドメイン：N 末端死ドメインおよび C 末端 T I R ドメインを含有する。M y D 8 8 の T I R ドメインは、T L R および I L - 1 R の T I R ドメインと関連し、一方、死ドメインは、I R A K の死ドメインと相互作用する。

30

【 0 0 0 9 】

M y D 8 8 発現が抑制されている細胞では (すなわち M y D 8 8 ノックアウトマウスでは)、マクロファージおよび樹状細胞は、それぞれ、T L R 4、T L R 2 および T L R 9 を通じてシグナル伝達する L P S、M A L P - 2 または C p G で刺激した際、サイトカイン I L - 1、T N F -、I L - 6 および I L - 1 2 を産生しない。その結果、M y D 8 8 ノックアウトマウスは、内毒素ショックに耐性である。さらに、正常な骨髄由来樹状細胞 (B M D C) を L P S または C p G で刺激した際、これらは、多量の I L - 1 2 を産生し、そして M H C および同時刺激分子の細胞表面発現を上方制御する。しかし、M y D 8 8 欠損 B M D C では、L P S または C p G での刺激は、I L 1 2 または I L - 6 を産生しない。

40

【 0 0 1 0 】

さらに、R N A 依存プロテインキナーゼ (P K R) 欠損細胞は、L P S 刺激に応答して、c - J u n N 末端キナーゼ (J N K) および p 3 8 M A P キナーゼ (p 3 8) を活性化することができない。T L R 4 は L P S の下流のシグナルに必要であるため、これは、P K R が T L R 4 シグナル伝達経路の構成要素であることを示す。リン酸化 P K R は、L P S で刺激した野生型マクロファージで検出可能であるが、リン酸化 P K R はまた、L P S で刺激した M y D 8 8 欠損マクロファージでも検出されてきている。興味深いことに、M y D 8 8 欠損マクロファージ由来の P K R は、より遅い動力学で活性化された。

【 0 0 1 1 】

50

いくつかの細胞性応答が、MyD88欠損細胞で完全に無効にされているが、TLR4はなお、NF- κ BおよびMAPキナーゼを活性化可能であり、しかし、TLR9またはTLR2はこれらを活性化可能でない。この相違は、TLR4連結に応答して、MyD88独立シグナル伝達を仲介可能な、別のアダプタータンパク質が存在することを示す。

【0012】

したがって、TLR4機能に関連する疾患を治療する化合物を開発するには、TLR4の下流のMyD88独立シグナル伝達に關与するアダプタータンパク質の構造および機能を決定する必要がある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0013】

（発明の概要）

本発明は、トル（Toll）・インターロイキン-1受容体アダプタータンパク質（TIRAPs）に関し、そして特に、TIRAPポリペプチド群およびTIRAPポリヌクレオチド群、組換え材料およびこれらの産生法に関する。さらなる側面において、本発明はTIRAP阻害剤に関する。別の側面において、本発明は、炎症を治療することおよび免疫応答を誘導するかまたは免疫応答に影響を及ぼすことを含む、こうしたポリペプチドおよびポリヌクレオチドを用いる方法に関する。さらなる側面において、本発明は、本発明に提供される材料を用いて、アゴニストおよびアンタゴニスト/阻害剤を同定する方法、並びに同定された化合物で、TIRAP不均衡に関連する状態を治療する方法に関する。さらなる側面において、本発明は、TIRAPポリヌクレオチドを含んでなるトランスジェニック哺乳動物に関する。

20

【課題を解決するための手段】

【0014】

（発明の説明）

上に簡潔に記載したように、いくつかの細胞性応答が、MyD88欠損細胞で完全に無効にされているが、TLR4はなお、NF- κ BおよびMAPキナーゼを活性化可能であり、しかし、TLR9またはTLR2はこれらを活性化可能でない。具体的には、NF- κ BおよびMAPシグナル伝達経路の詳細な解析によって、病原体関連分子パターン（PAMP）LPSが、MyD88欠損細胞において、NF- κ B、JNK、p38およびERKの活性化を誘導するが、CpGまたはMALP-2はこれらの活性化を誘導しないことが立証されている。これらのシグナル伝達経路の活性化は、遅延された動力学で起こり、そしてサイトカイン遺伝子発現の誘導には不十分であった。

30

【0015】

さらに、LPSまたはCpGで刺激されたMyD88欠損BMDCsは、IL-12またはIL-6を産生しない。しかし、BMDCsは、LPSで処理した際、MHCおよび同時刺激分子（CD80およびCD86など）の発現を上方制御するように誘導可能であるが、CpGで刺激した際は、誘導可能でない。この結果は、MyD88独立シグナル伝達経路が、樹状細胞成熟に十分であるが、サイトカインIL-6およびIL-12の誘導には、MyD88依存シグナル伝達経路が必要であることを立証する。さらに、インターロイキン-18の生物学的に活性な型へのカスパーゼ-1プロセッシングは、MyD88と独立に、TLR4によって誘導可能である。

40

【0016】

これらの相違は、TLR4連結に応答して、MyD88独立シグナル伝達を仲介可能な、別のアダプタータンパク質が存在することを示す。本明細書において、TLR4連結に応答してMyD88独立シグナル伝達を仲介するアダプタータンパク質は、「TIRAP」（トル/インターロイキン-1受容体アダプタータンパク質）と称されるであろう。

【0017】

特に、本発明のポリペプチドには、それぞれ、配列番号1および2に示す配列を含んでなる、ヒトおよびマウスポリヌクレオチドにコードされる単離ポリペプチドが含まれる。本

50

発明のポリペプチドは、MyD88を含む、トルノインターロイキン-1受容体アダプタータンパク質ファミリーのメンバーであると考えられる。したがって、この遺伝子は、樹状細胞成熟と共に、細胞におけるNF- κ B、JNK、p38およびERK活性化を誘導するかまたは阻害する、別の機構を提示するため、興味深い。

【0018】

当業者が理解するように、TLR4は、感染および細胞損傷を含む、多くの生理学的応答に関与する。例えば、上に示すように、TLR4はPAMP LPSを認識する。TLR4はまた、炎症反応、そして特に、細胞壊死が誘導する炎症にも関連付けられてきている。したがって、TLR4のシグナル伝達経路に影響を及ぼし、そして/または関与する分子の発見および性質決定は、上述の状態と共に、当業者に認識されるであろう他の状態の有効な治療の開発のために重要である。

10

【0019】

一般的なTIRAPおよびTIRAP阻害剤ポリヌクレオチドおよびポリペプチド

第一の側面において、本発明は、TIRAPポリヌクレオチドおよびTIRAPポリペプチドに関する。具体的には、配列番号1および2に示すポリヌクレオチドは、それぞれ、本発明のトルノインターロイキン-1受容体アダプタータンパク質を含んでなる、配列番号3（ヒト）および4（マウス）に示すポリペプチドをコードする。TIRAPをコードするヒトおよびマウスポリヌクレオチドは、非常に相同である（図1を参照されたい）。具体的には、1つの態様において、ヒトおよびマウスTIRAPポリヌクレオチドおよびポリペプチドの比較は、タンパク質レベルで少なくとも73%の同一性、およびポリヌクレオチドレベルで83%の同一性を示す。したがって、本開示に基づいて、ヒトおよびマウスTIRAPポリヌクレオチド両方、並びにそれにコードされるポリペプチドは、本明細書に記載するように、同様の目的に使用可能であることが理解されるであろう。配列番号1～4に示すポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、全長TIRAP分子であり、そして以下、一般的に、TIRAPまたはTIRAPポリヌクレオチド、TIRAPペプチドおよびTIRAPポリペプチドと称される。別に明記しない限り、「TIRAP」は、「TIRAPポリペプチド」と同義であり、そしてトルノインターロイキン-1受容体アダプタータンパク質、および同一の生物学的機能を有する、すなわちその活性化にตอบสนองしてMyD88独立シグナル伝達を変調する、他のポリペプチドを指すよう意味する。配列番号3および4に示すポリペプチドの特性はまた、以下、以下に説明するような「TIRAP活性」または「TIRAPポリペプチド活性」または「TIRAPの生物学的活性」と称される。

20

30

【0020】

以下に説明するように、TIRAPポリヌクレオチドおよびポリペプチドに相同性を有する、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、TIRAPポリペプチドおよびポリヌクレオチドと同様の生物学的機能/特性を有すると予期される。具体的には、本発明の好ましいTIRAPポリペプチドは、TLR4のTIRAP結合ドメインに結合可能である点で、TIRAP活性を有する。こうしたTIRAPポリペプチドは、したがって、例えば以下に記載するように、薬剤スクリーニングに有用である。本発明のTIRAPポリペプチドにはまた、TLR4の活性化に際して、MyD88独立応答、例えばNF- κ BおよびMAPキナーゼ活性化をシグナル伝達するポリペプチドも含まれる。

40

【0021】

TIRAPポリペプチドおよびTIRAPポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの性質決定は、TIRAPポリペプチドが仲介するシグナル伝達を阻害することによって、TLR4のMyD88独立経路及びMyD88依存経路の両方を阻害する化合物の発見を導いた。TIRAP活性を阻害する、こうした化合物は、炎症および敗血症ショックを防止するかまたは減少させるのに、そして特に、少なくとも部分的に、細胞壊死が誘導する炎症のために生じる、移植片拒絶の防止を補助するのに、有用である。

【0022】

したがって、第二の側面において、本発明は、TIRAP阻害剤に関する。具体的には、

50

配列番号 9 および 10 に示すポリペプチドは、それぞれ、ヒトおよびマウス T I R A P 阻害剤ポリペプチドである。これらのポリペプチドは、本明細書において、T I R A P 阻害剤または T I R A P 突然変異ペプチドまたは T I R A P 阻害剤ポリペプチドと称される。各 T I R A P 阻害剤の特性は、以下、「T I R A P 阻害剤活性」と称される。配列番号 5 (天然存在) および配列番号 6 (縮重) に示すポリヌクレオチドは、配列番号 9 に示すヒト T I R A P 阻害剤ポリペプチドをコードし、そして配列番号 7 (天然存在) および配列番号 8 (縮重) に示すポリヌクレオチドは、配列番号 10 に示すマウス T I R A P 阻害剤ポリペプチドをコードする。配列番号 5 ~ 8 は、T I R A P 阻害剤ポリヌクレオチドと称され、そして配列番号 9 および 10 に示す配列は、T I R A P 阻害剤ポリペプチドと称される。

10

【0023】

以下にさらに説明するように、T I R A P 阻害剤ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに相同性を有する、本発明の好ましい阻害剤ポリペプチドおよび阻害剤ポリヌクレオチドは、T I R A P 阻害剤ポリペプチドおよびポリヌクレオチドと同様の生物学的機能/特性を有すると予期される。本明細書において、本発明の好ましい T I R A P 阻害剤ポリペプチドは、以下により詳細に記載するように、T L R 4 の活性化にもかかわらず、T L R 4 を発現している細胞において、M y D 独立応答、例えば N F - B および M A P キナーゼ活性化、並びに M y D 依存応答両方を阻害することが可能であるという点で、T I R A P 阻害剤活性を有する。

【0024】

20

最後に、配列番号 11 は、アンテナペディアおよび T I R A P 阻害剤ポリペプチドの融合タンパク質の機能する例である。具体的には、配列番号 11 は、アンテナペディアおよび配列番号 10 に示す T I R A P 阻害剤の融合タンパク質である。配列番号 11 に示すポリペプチドはまた、T I R A P 活性を阻害するため、T I R A P 阻害剤融合タンパク質の特性はまた、「T I R A P 阻害剤活性」と称することも可能である。この特別な態様は、表題「融合タンパク質」以下に、より詳細に記載される。

【0025】

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドの構造

本発明のポリペプチドは、「成熟」タンパク質の形であることが可能であるし、または「融合タンパク質」以下に記載するように、融合タンパク質、例えば配列番号 11 などのコンジュゲート化タンパク質の一部であることが可能である。分泌またはリーダー配列、プロ配列、多数ヒスチジン残基などの精製を補助する配列、または組換え産生中の安定性のためのさらなる配列を含有する、さらなるアミノ酸配列を含むことがしばしば好適である。

30

【0026】

本発明にはまた、同様の特性を持つ別の残基によって置換される、保存的アミノ酸置換によって、参照ポリペプチドと異なるポリペプチドである、前述のポリペプチドの変異体も含まれる。典型的なこうした置換は、A l a、V a l、L e u および I l e 間；S e r および T h r 間；酸性残基 A s p および G l u 間；A s n および G l n 間；並びに塩基性残基 L y s および A r g 間；または芳香族残基 P h e および T y r 間である。特に好ましいのは、いくつか、5 ~ 10、1 ~ 5、1 ~ 3、1 ~ 2 または 1 アミノ酸が、いずれかの組み合わせで、置換され、欠失され、または付加されている変異体である。

40

【0027】

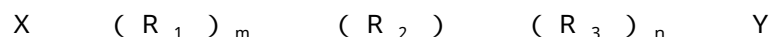
こうしたポリペプチドには、配列番号 3、4、9、10 および 11 の全長に渡って、配列番号 3、4、9、10 および 11 のものに、少なくとも 70 % の同一性、好ましくは少なくとも 80 % の同一性、より好ましくは少なくとも 90 % の同一性、さらにより好ましくは少なくとも 95 % の同一性、最も好ましくは少なくとも 97 ~ 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離ポリペプチドが含まれる。こうしたポリペプチドには、配列番号 3、4、9、10 および 11 に示すポリペプチドを含んでなるポリペプチドと共に、配列番号 3、4、9、10 および 11 に示すポリペプチドからなるポリペプチドが含

50

まれる。

【0028】

本発明はまた、式：



(式中、アミノ末端で、Xは水素、金属または修飾ポリペプチドに関して本明細書に記載する他の部分いずれかであり、そしてカルボキシ末端で、Yは水素、金属または以下に記載する修飾を含む修飾ポリペプチドの他の部分いずれかであり、 R_1 および R_3 は、アミノ酸残基または修飾アミノ酸残基いずれかであり、 m は1～1000の間の整数またはゼロであり、 n は1～1000の間の整数またはゼロであり、そして R_2 は上述のような本発明のアミノ酸配列またはその修飾型である)のポリペプチドからなるかまたは該ポリペプチドを含んでなる、ポリペプチドも含む。上記式において、 R_2 は、そのアミノ末端アミノ酸残基が、その左側で R_1 に共有結合し、そしてそのカルボキシ末端アミノ酸残基が、その右側で R_3 に共有結合するように、配向される。 R_1 または R_3 いずれかに示すアミノ酸残基の伸展いずれかは、 m および n が1より大きい場合、ヘテロポリマーまたはホモポリマーいずれかであることが可能であり、好ましくはヘテロポリマーである。 m が1～50、100または500の間の整数であり、そして n が1～50、100または500の間の整数である、本発明の他の態様が提供される。

10

【0029】

本発明のポリペプチドは、適切な方式いずれかで調製可能である。こうしたポリペプチドには、単離天然に生じたポリペプチド、組換え的に産生したポリペプチド、合成的に産生したポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせによって産生したポリペプチドが含まれる。こうしたポリペプチドを調製する手段は、当該技術分野によく理解されている。

20

【0030】

本発明のポリヌクレオチドには、配列番号1、2、および5～8の1つの全長に渡って、配列番号1および2に示すポリヌクレオチド、または配列番号5～8に示すポリヌクレオチドに、少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチドが含まれる。これに関連して、少なくとも97%の同一性を有するポリヌクレオチドが非常に好ましく、一方、少なくとも98～99%の同一性を有するものが、さらに非常に好ましく、そして少なくとも99%の同一性を有するものが、最も非常に好ましい。こうしたポリヌクレオチドには、配列番号1および2に示すポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドと共に、配列番号1および2に示すポリヌクレオチドからなるポリヌクレオチドが含まれる。こうしたポリヌクレオチドにはまた、配列番号5～8に示すポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドと共に、配列番号5～8に示すポリヌクレオチドからなるポリヌクレオチドも含まれる。

30

【0031】

上述のように、本発明はまた、TIRAPポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびTIRAP阻害剤をコードするポリヌクレオチド両方にも関する。当業者が理解するように、配列番号3、4、9、10に示すポリペプチドの1つをコードするヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号1、2、5および7に示す配列をコードするポリペプチドと同一であることが可能であり、または遺伝暗号の重複(縮重)の結果として、やはり配列番号3、4、9、および10のポリペプチドをコードする、配列番号1、2、5および7に示すものの以外の配列であることも可能である。

40

【0032】

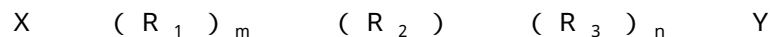
こうしたポリヌクレオチドには、配列番号3、4、9、10および11の全長に渡って、配列番号3、4、9、10および11のアミノ酸配列に、少なくとも70%の同一性、好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、さらにより好ましくは少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、単離ポリヌクレオチドが含まれる。これに関連して、配列番号3、

50

4、9、10および11に示すポリペプチドに、少なくとも97%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが非常に好ましく、一方、配列番号3、4、9、10および11に示すポリペプチドに、少なくとも98~99%の同一性を有するポリペプチドをコードするものが、さらに非常に好ましく、そして配列番号3、4、9、10および11に示すポリペプチドに、少なくとも99%の同一性を有するポリペプチドをコードするものが、最も非常に好ましい。

【0033】

本発明はまた、式：



(式中、分子の5'端で、Xは水素、金属または修飾ヌクレオチド残基であり、あるいはYと共に共有結合を明示し、そして分子の3'端で、Yは水素、金属または修飾ヌクレオチド残基であり、あるいはXと共に共有結合を明示し、 R_1 および R_3 の各発生は、独立に、核酸残基または修飾核酸残基いずれかであり、 m は1~3000の間の整数またはゼロであり、 n は1~3000の間の整数またはゼロであり、そして R_2 は上述のような本発明の核酸配列または修飾核酸配列である)のポリヌクレオチドからなるかまたは該ポリヌクレオチドを含んでなる、ポリヌクレオチドも含む。上記のポリヌクレオチドの式において、 R_2 は、その5'端核酸残基が、その左側で R_1 に結合し、そしてその3'端核酸残基が、その右側で R_3 に結合するように、配向される。 R_1 および/または R_2 いずれかに示される核酸残基の伸展いずれかは、 m および/または n が1より大きい場合、ヘテロポリマーまたはホモポリマーいずれかであることが可能であり、好ましくはヘテロポリマーである。特定の態様において、XおよびYが、共に共有結合を明示する場合、上記式のポリヌクレオチドは、閉じた、環状ポリヌクレオチドであり、これは、二本鎖ポリヌクレオチドであることが可能であり、この場合、式は第一の鎖を示し、これに対して第二の鎖が相補的である。別の態様において、 m および/または n は、1~1000の間の整数である。 m が1~50、100または500の間の整数であり、そして n が1~50、100または500の間の整数である、本発明の他の態様が提供される。

10

20

【0034】

本発明はまた、上述のポリヌクレオチドすべてに相補的なポリヌクレオチドも提供する。

【0035】

TIRAP阻害剤

上述のように、配列番号9~11はTIRAP阻害剤である。配列番号9および10に示すポリペプチドは、それぞれ、TIRAPポリペプチド、配列番号3および4に示すポリペプチドの結合ドメインの突然変異型である。

30

【0036】

典型的なTIRAP阻害剤は、1)小分子模倣体(mimetic)、または2)以下により詳細に示すような、それ自体が配列番号1および2の突然変異断片である、配列番号5~8に示すポリヌクレオチドにコードされるポリペプチド、または3)上述のような、TIRAP阻害剤活性を有する別のポリペプチドであることが可能である。

【0037】

好ましくは、本発明の有効なTIRAP阻害剤ポリペプチドは、コードされる突然変異を持たないTIRAPポリペプチドに比較して、コードされる、(図1に示す、マウスTIRAPで判断された場合の)アミノ酸145位のヒスチジンからプロリンへの突然変異、または(やはり図1に示し、そして図中でP125Hと称する、ヒトTIRAPで判断された場合の)アミノ酸125位のプロリンからヒスチジンへの突然変異を有する。突然変異は、当業者によく理解される技術を用いて、達成可能である。

40

【0038】

適切な位でのヒスチジンからプロリンへの突然変異は、TIRAP阻害剤が、TLR4の細胞質ドメインに結合するのを可能にするが、それでもTLR4の下流シグナル伝達(MyD88依存およびMyD88独立シグナル伝達両方)を阻害することが見出されている。

50

【0039】

細胞受容体シグナル伝達の特定の理論に帰することなく、T I R A P 阻害剤、並びに、T I R A P 阻害剤活性を有する、T I R A P 阻害剤またはT I R A P 阻害剤模倣体に十分に相同な他のポリペプチドが、T L R 4 に結合すると考えられる。この結合を概念的に図7に例示する。ひとたび結合したら、T I R A P 阻害剤は、M y D 8 8 依存経路と共に、M y D 8 8 独立経路両方を通じて、T L R 4 シグナル伝達を阻害する。

【0040】

前の段落に示唆するように、T I R A P 阻害剤ポリペプチドに、適切な構造的類似性を有する、典型的には2 k D 未満の分子量を持つ有機化合物もまた、T I R A P 阻害剤として使用可能である。例えば、小分子模倣体が使用可能である。当業者が理解するように、小分子模倣体は、特定のタンパク質と適切に会合し、そして応答を引き出すのに必要な空間的コンホメーションを提供する、化学的に合成した化合物である。したがって、本発明はまた、T I R A P シグナル伝達を阻害するための、小分子模倣体の使用も含んでなる。

10

【0041】

融合タンパク質

本発明のさらなる側面はまた、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにも関する。融合タンパク質技術の例は、国際特許出願第W O 9 4 / 2 9 4 5 8 号および第W O 9 4 / 2 2 9 1 4 号に見出すことが可能である。

【0042】

本発明のこの特定の態様は、T I R A P 阻害剤ポリペプチド、またはその活性部分もしくは活性断片、およびアンテナペディヤなどの細胞膜輸送タンパク質を含んでなる、融合タンパク質に関する。当業者が理解するように、療法的に有効になるように、細胞膜を渡ってタンパク質を搬送するのは、困難である可能性がある。ウイルスまたはウイルス断片を用いて、細胞にタンパク質を輸送することが可能であるが、この技術は、普遍的には認可されていない。ショウジョウバエ *D r o s o p h i l a* から得られるアンテナペディヤは、該タンパク質のヒト型と実質的に同一であり、そしてしたがって、ヒトで使用する際、あるとしてもわずかしかな抗原性応答がない。タンパク質は、アンテナペディヤの一部（例えばA n t p 1 6）を用いて輸送することが可能であるが、こうした方法は、典型的には、小さいタンパク質にしか適していない。

20

【0043】

T I R A P 阻害剤活性を有する融合タンパク質の多くの態様が想定されるが、こうした態様の1つの機能する例が、配列番号11に示され、該配列は、アンテナペディヤおよび配列番号10に示すT I R A P 阻害剤の融合体に相当する。配列番号9および10に示すT I R A P 阻害剤が、アンテナペディヤにコンジュゲート化し、そして細胞膜を渡って輸送されるのに適したサイズであることが見出されている。具体的には、T I R A P 阻害剤にひとたびコンジュゲート化されると、アンテナペディヤは、ポリペプチドが細胞内で療法的に活性になり、そしてT I R A P 阻害剤活性を示すように、細胞膜を渡るT I R A P 阻害剤の輸送を促進する。

30

【0044】

異常な状態を治療する方法

さらなる側面において、本発明は、T I R A P ポリペプチド活性の過剰発現または過少発現いずれかに関する、例えば炎症などの異常な状態を治療する方法を提供する。好ましくは、本発明の実施は、T I R A P 活性をアンタゴナイズするかまたはアゴナイズして、炎症性反応を防止するかまたは治療することを含んでなるであろう。

40

【0045】

T I R A P ポリペプチドの活性が過剰である場合、いくつかのアプローチが利用可能である。1つのアプローチは、T I R A P の機能を阻害する必要がある被験者に、上述のようなT I R A P 阻害剤またはT I R A P 阻害剤模倣体（アンタゴニスト）を、所望により、薬学的に許容しうるキャリアーと組み合わせて、例えば1）阻害分子をT I R A P 自体に結合させて、それによってT I R A P 機能を阻害することによって、または2）T I R A

50

P 阻害剤を TLR4 に結合させることにより、TLR4 への TIRAP の結合を遮断して、そしてそれにより潜在的に MyD88 依存および独立シグナル伝達両方を阻害することによって、ポリペプチドの機能を阻害するのに有効な量で、投与することを含んでなる。

【0046】

さらに別のアプローチにおいて、内因性 TIRAP ポリペプチドをコードする遺伝子の発現は、発現遮断技術を用いて阻害可能である。既知の技術は、内部生成されるかまたは別個に投与されるかいずれかのアンチセンス配列の使用を伴う（例えば O'Conner, J Neurochem (1991) 56:560、Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, フロリダ州ボカレイトン (1988) を参照されたい）。あるいは、該遺伝子と三重らせんを形成するオリゴヌクレオチドを供給可能である（例えば、Lee ら, Nucleic Acids Res (1979) 6:3073; Cooney ら, Science (1988) 241:456; Der van ら, Science (1991) 251:1360 を参照されたい）。これらのオリゴマーは、それ自体を投与することが可能であるし、また適切なオリゴマーを *in vivo* で発現させることが可能である。

10

【0047】

TIRAP およびその活性の過少発現に関連する異常な状態を治療するため、やはりいくつかのアプローチが利用可能である。1つのアプローチは、被験者に、本発明のポリペプチドを活性化する化合物、すなわちアゴニストの療法的有効量を、薬学的に許容しうるキャリアー（次のセクションに、以下、記載される）と組み合わせて投与して、それによって異常な状態を緩和することを含んでなる。あるいは、遺伝子治療を使用して、被験者において、適切な細胞による TIRAP の内因性産生を達成することが可能である。例えば、上に論じるように、本発明のポリヌクレオチドを複製不全レトロウイルスベクターにおける発現用に操作することが可能である。その後、レトロウイルス発現構築物を単離し、そして本発明のポリペプチドをコードする RNA を含有するレトロウイルスプラスミドベクターを形質導入したパッケージング細胞に、該レトロウイルス発現構築物を導入して、パッケージング細胞がここで、目的の遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生するようにすることが可能である。細胞を *in vivo* で操作し、そしてポリペプチドの発現を *in vivo* で操作するため、これらの産生細胞を被験者に投与することが可能である。遺伝子治療の概説には、Human Molecular Genetics, T Strachan および A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996) 中の第20章、Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches（およびそこに引用される参考文献）を参照されたい。別のアプローチは、適切な薬学的キャリアーと組み合わせて、本発明のポリペプチドの療法量を投与することである。

20

30

【0048】

薬学的適用

さらなる側面において、本発明は、本発明のポリペプチドの可溶性型などのポリペプチド、アゴニスト/アンタゴニスト、ペプチドまたは小分子化合物の療法的有効量を、薬学的に許容しうるキャリアーまたは賦形剤と組み合わせて含んでなる、薬剤組成物を提供する。こうしたキャリアーには、限定されるわけではないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの組み合わせが含まれる。本発明はさらに、本発明の前述の組成物の1以上の成分を充填した、1以上の容器を含んでなる、薬学的パックおよびキットに関する。本発明のポリペプチドおよび他の化合物は、単独で、または療法化合物などの他の化合物と組み合わせて、使用することが可能である。

40

【0049】

組成物は、例えば、全身性または経口経路による投与経路に対して適応されるであろう。

50

全身性投与の好ましい型には、典型的には静脈内注射による、注射が含まれる。皮下、筋内、または腹腔内などの他の注射経路が使用可能である。全身性投与の別の手段には、胆汁酸またはフシジン酸または他の界面活性剤などの浸透剤を用いた、経粘膜 (transmucosal) および経皮投与が含まれる。さらに、本発明のポリペプチドまたは他の化合物を溶腸または被包処方で処方することが可能であるならば、経口投与もまた、可能でありうる。これらの化合物の投与はまた、軟膏、パスタ剤、ゲル等の形で、局所および/または局在性であることも可能である。

【0050】

必要な投薬量範囲は、本発明のペプチドまたは他の化合物 (小分子模倣体など) の選択、投与経路、処方の性質、被験者の状態の性質、および主治医の判断に応じる。しかし、適切な投薬量は、典型的には、 $0.1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 被験者の範囲である。しかし、多様な化合物が入手可能であり、そして多様な経路の投与では効率が異なることを考慮すると、必要な投薬量には広い変動が予想されるはずである。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与より、より多い投薬量を必要とすると予想されるであろう。これらの投薬量レベルの変動は、当該技術分野によく理解されるように、最適化のための標準的な経験的ルーチンを用いて、調整可能である。

10

【0051】

治療に用いるポリペプチドはまた、上述のように、「遺伝子治療」としばしば称される治療様式で、被験者において、内因性に生成可能である。したがって、例えば、被験者由来の細胞を、*ex vivo* で、ポリペプチドをコードする DNA または RNA などのポリヌクレオチドで、そして例えばレトロウイルスプラスミドベクターの使用によって、操作することが可能である。その後、細胞を被験者に導入する。

20

【0052】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、これを用いて、同様の相同性を持つさらなる配列を同定するのに有用な情報供給源を形作る。コンピュータ読み取り可能媒体に配列を保存し、そしてその後、保存したデータを用いて、GCCなどの公知の検索ツールを用い、配列データベースを検索して、最も容易にこれを行う。したがって、さらなる側面において、本発明は、配列番号 1、2 および 5 ~ 8 の配列を含んでなるポリヌクレオチドを保存したコンピュータ読み取り可能媒体を提供する。

【0053】

ポリペプチドおよびポリヌクレオチド産生法

本発明のポリヌクレオチドは、標準的クローニングおよびスクリーニング技術を用いて得ることが可能である。本発明のポリヌクレオチドはまた、ゲノム DNA ライブラリーなどの天然供給源からも得ることが可能であり、また公知で、そして商業的に入手可能な技術を用いて、合成することも可能である。本発明のポリペプチドはまた、公知で、そして商業的に入手可能な技術を用いて、合成することも可能である。

30

【0054】

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え産生に用いる場合、ポリヌクレオチドは、成熟ポリペプチドのためのコード配列を単独で含むことが可能であるし、またはリーダーまたは分泌配列、プレ、またはプロまたはプレプロタンパク質配列、あるいは他の融合ペプチド部分をコードするものなどの他のコード配列と、同じ読み枠で、成熟ポリペプチドのためのコード配列を含むことが可能である。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をコードすることが可能である。本発明のこの側面の特定の好ましい態様において、マーカー配列は、pQEベクター (Qiagen, Inc.) に提供され、そして Gentz ら, Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86:821-824 に提供されるような、ヘキサ-ヒスチジンペプチドであるか、または HA タグである。ポリヌクレオチドはまた、転写される非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位および mRNA を安定化する配列などの、非コード 5' および 3' 配列も含有することが可能である。

40

【0055】

50

本発明のさらなる態様には、配列番号 3 および 4 のアミノ酸配列を含んでなり、そしていずれかの組み合わせで、いくつかの、例えば 5 ~ 10、1 ~ 5、1 ~ 3、1 ~ 2、または 1 アミノ酸残基が置換されているか、欠失されているかまたは付加されている、ポリペプチド変異体をコードするポリヌクレオチドが含まれる。

【0056】

配列番号 1、2 および 5 ~ 8 に含有されるヌクレオチド配列に同一であるか、または十分に同一であるポリヌクレオチドを、cDNA およびゲノムDNA に対するハイブリダイゼーションプローブとして、または核酸増幅 (PCR) 反応のプライマーとして使用して、本発明のポリペプチドをコードする全長 cDNA クローンおよびゲノムクローンを単離し、そして配列番号 1、2 および 5 ~ 8 と高い配列類似性を有する、他の遺伝子 (ヒト以外の種由来の相同体およびオルソログをコードする遺伝子を含む) の cDNA クローンおよびゲノムクローンを単離することが可能である。典型的には、これらのヌクレオチド配列は、対照の配列に 70 % 同一であり、好ましくは 80 % 同一であり、より好ましくは 90 % 同一であり、最も好ましくは 95 % 同一である。プローブまたはプライマーは、一般的に、少なくとも 15 ヌクレオチド、好ましくは少なくとも 30 ヌクレオチドを含んでなるであろうし、そして少なくとも 50 ヌクレオチドを有することが可能である。特に好ましいプローブは、30 ~ 50 の間のヌクレオチドを有するであろう。

10

【0057】

ヒト以外の種由来の相同体およびオルソログを含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号 1、2 または 5 ~ 8 あるいはその断片の配列を有する標識プローブを用いて、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、適切なライブラリー (一般的な当業者に理解されるとおり) をスクリーニングし; そして前記ポリヌクレオチド配列を含有する全長 cDNA およびゲノムクローンを単離する工程を含んでなる方法によって、得ることが可能である。こうしたハイブリダイゼーション技術は当業者に公知である。好ましいストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には: 50 % ホルムアミド、5 x SSC (150 mM NaCl、15 mM クエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5 x デンハルト溶液、10 % デキストラン硫酸、および 20 マイクログラム / ml 変性剪断サケ精子 DNA を含んでなる溶液中、摂氏 42 度で一晩インキュベーションし; その後、0.1 x SSC 中、約 65 °C で、フィルターを洗浄することが含まれる。したがって、本発明はまた、配列番号 1、2 または 5 ~ 8 あるいはその断片の配列を有する標識プローブを用いて、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、適切なライブラリーをスクリーニングすることによって得ることが可能なポリヌクレオチドも含む。

20

30

【0058】

当業者は、多くの場合、ポリペプチドをコードする領域が cDNA の 5' 端で短く切断されている点で、単離 cDNA 配列が不完全であることを認識するであろう。これは、逆転写酵素のプロセッシビティー (processivity) (重合反応中、酵素がテンプレートに付着したままである能力の測定値) が本質的に低く、第一鎖 cDNA 合成中、mRNA テンプレートの DNA コピーを完成させるのに失敗する結果である。

【0059】

全長 cDNA を得るか、または短い cDNA を伸長するのに利用可能であり、そして当業者に公知である、いくつかの方法があり、例えば、cDNA 端の迅速増幅 (RACE) 法に基づくものがある (例えば Frohman ら, PNAS USA 85, 8998 - 9002, 1988 を参照されたい)。Marathon (登録商標) 技術 (Clontech Laboratories Inc.) に例示される技術の最近の修飾法は、例えば、より長い cDNA に関する検索を、有意に単純化してきている。Marathon (登録商標) 技術では、選択した組織から抽出した mRNA から cDNA を調製し、そして「アダプター」配列を各端に連結する。次いで、核酸増幅 (PCR) を行って、遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーおよびアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いて、cDNA の「欠失した」5' 端を増幅する。その後、「

40

50

入れ子 (nested) プライマー、すなわち増幅産物内にアニーリングするよう設計されたプライマー (典型的には、アダプター配列中のさらなる 3' にアニーリングするアダプター特異的プライマー、および既知の遺伝子配列中のさらなる 5' にアニーリングする遺伝子特異的プライマー) を用いて、PCR 反応を反復する。その後、DNA 配列決定によって、この反応の産物を解析し、そして存在する cDNA に産物を直接連結して完全な配列を生じるか、または 5' プライマーを設計するために新規の配列情報を用いて、別個の全長 PCR を行うことによって、全長 cDNA を構築することが可能である。

【0060】

本発明の組換えポリペプチドは、当該技術分野に公知の方法によって、発現系を含んでなる遺伝子操作した宿主細胞から調製可能である。したがって、さらなる側面において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド類を含んでなる発現系、こうした発現系で遺伝子操作した宿主細胞、および組換え技術による本発明のポリペプチドの産生に関する。無細胞翻訳系もまた使用し、本発明の DNA 構築物由来の RNA を用いて、こうしたタンパク質を産生することも可能である。

10

【0061】

組換え産生のため、宿主細胞を遺伝子操作して、本発明のポリヌクレオチドの発現系またはその一部を取り込ませることが可能である。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、Davis ら, Basic Methods in Molecular Biology (1986) および Sambrook ら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー (1989) などの、多くの標準的実験室マニュアルに記載される方法によって、達成可能である。好ましいこうした方法には、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション、トランスベクション、マイクロインジェクション、陽イオン性脂質仲介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレイプ・ローディング (scrape loading)、弾道導入または感染が含まれる。

20

【0062】

適切な宿主の代表的な例には、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌 (E. coli)、ストレプトミセス属 (Streptomyces) および枯草菌 (Bacillus subtilis) 細胞などの細菌細胞；酵母細胞およびアスペルギルス属 (Aspergillus) 細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ S2 およびスポドプテラ属 (Spodoptera) Sf9 細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293 および Bowes 黒色腫細胞などの動物細胞；並びに植物細胞が含まれる。

30

【0063】

非常に多様な発現系、例えば染色体、エピソームおよびウイルス由来の系、例えば細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入要素由来、酵母染色体要素由来、バキュロウイルス、SV40 などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鳥類ポックスウイルス、偽狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスなどのウイルス由来のベクター、並びにコスミドおよびファージミドなどの、プラスミドおよびバクテリオファージ遺伝子要素に由来するものなど、これらの組み合わせに由来するベクターが使用可能である。発現系に、発現を制御すると共に生じさせる調節領域を含有させてもよい。一般的に、宿主において、ポリヌクレオチドを維持するか、増殖させるか、または発現させて、ポリペプチドを産生することが可能な系またはベクターいずれかが使用可能である。例えば Sambrook ら, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (上記) に示されるものなどの、多様な周知のそして日常的な技術いずれかによって、適切なヌクレオチド配列を発現系に挿入することが可能である。適切な分泌シグナルを望ましいポリペプチドに取り込んで、翻訳されたタンパク質を小胞体腔、細胞膜周辺空間または細胞外環境に分泌するの

40

50

を可能に示す。これらのシグナルは、ポリペプチドに対して内因性であることが可能であるし、またはこれらは異種シグナルであることが可能である。

【0064】

本発明のポリペプチドをスクリーニングアッセイ（以下に記載する）で使用するために発現しようとするならば、ペプチドを細胞内で産生するか、または培地に分泌させることが可能である。細胞内で産生した場合、ポリペプチドを回収する前に、細胞をまず、溶解しなければならない。ペプチドは膜結合であることが可能であり、例えば、膜タンパク質の細胞質ドメインに融合させることが可能であり、またはペプチドを形質膜にターゲティングするであろうパルミトイル化などの脂質修飾を経るであろう、配列モチーフを含有することが可能である。ポリペプチドが培地に分泌される場合、ポリペプチドを回収し、そして精製するため、培地を回収することが可能である。

10

【0065】

硫酸アンモニウム若しくはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンおよび陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含む、周知の方法によって、組換え細胞培養から、本発明のポリペプチドを回収し、そして精製することが可能である。最も好ましくは、精製には高性能液体クロマトグラフィーを使用する。単離およびまたは精製中に、ポリペプチドが変性している場合は、タンパク質を再フォールディングする公知の技術を使用して、活性コンホメーションを再生することが可能である。

20

【0066】

TI RAPおよびTI RAP阻害剤に関するスクリーニング技術

上述のように、TI RAPは、多くの疾患状態、特に炎症、敗血症ショックおよび壊死が誘導する炎症を含む、多くの生物学的機能で役割を果たす。したがって、TI RAPポリペプチドの機能を刺激するかまたは阻害する化合物を同定するスクリーニング法を考案するのが望ましい。したがって、さらなる側面において、本発明は、TI RAPの機能を刺激するかまたは阻害する化合物を同定する化合物スクリーニング法を提供する。一般的に、アゴニストまたはアンタゴニストを療法および予防目的に使用可能である（上述）。多様な供給源、例えば細胞、無細胞調製、化学薬品ライブラリーおよび天然産物混合物から、適切な化合物を同定可能である。

30

【0067】

スクリーニング法は、本発明のポリペプチドもしくは小分子模倣体への、または本発明のポリペプチドを所持する細胞もしくは膜への、またはその融合タンパク質への候補化合物の結合を、候補化合物に直接または間接的に会合させた標識によって、単純に測定することが可能である。あるいは、スクリーニング法は、標識競合剤との競合を伴うことが可能である。さらに、これらのスクリーニング法は、ポリペプチドを所持する細胞に適した検出系を用いて、候補化合物が、ポリペプチドの活性化または阻害によって生成されるシグナルを生じるかどうかを試験することが可能である。

【0068】

活性化の阻害剤は、一般的に、既知のアゴニストの存在下でアッセイし、そしてアゴニストによる活性化に対する候補化合物の存在の影響を観察する。アゴニストまたは阻害剤の非存在下で、候補化合物がポリペプチドの活性化の阻害を生じるかどうかを試験することによって、逆アゴニストまたは阻害剤に関するスクリーニング方法において、恒常的に活性であるポリペプチドを使用することが可能である。さらに、スクリーニング方法は、単に、本発明のポリペプチドを含有する溶液と候補化合物を混合して混合物を形成し、混合物中のTI RAP活性を測定し、そして混合物のTI RAP活性を標準に比較する工程を、含んでなることが可能である。言い換えると、スクリーニング方法は、TLR4の少なくともTI RAP結合ドメインを含んでなるポリペプチド、TI RAPポリペプチドまたはTLR4結合ドメインを含んでなる他のポリペプチド、および候補化合物を提供し、TLR4のTI RAP結合ドメインを含んでなるポリペプチド、およびTI RAPポリペ

40

50

チド若しくは他のポリペプチドと、候補化合物を近接して配置し、そして候補化合物が、T L R 4 の T I R A P 結合ドメインを含んでなるポリペプチド、あるいはT I R A P ポリペプチドまたは他のポリペプチドのいずれかの結合と競合するかどうかを決定する工程を含んでなる。

【0069】

当業者が理解するように、ポリペプチドのFc部分およびT I R A P ポリペプチドから作成するものなどの融合タンパク質はまた、ハイスループットスクリーニングアッセイでも使用して、本発明のポリペプチドのアンタゴニストを同定することも可能である(D. Bennettら, J Mol Recognition, 8:52-58(1995); およびK. Johanssonら, J. Biol Chem, 270:9459-9471(1995)を参照されたい)。

10

【0070】

潜在的なポリペプチドアンタゴニストの例には、抗体、またはいくつかの場合、場合によっては該ポリペプチドの、リガンド、基質、受容体、酵素などに緊密に関連するオリゴヌクレオチドまたはタンパク質、例えばリガンド、基質、受容体、酵素などの断片;あるいは本発明のポリペプチドに結合するが、ポリペプチドの活性が妨げられるように、応答を引き出さない小分子が含まれる。

【0071】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体はまた、細胞において、mRNAおよびポリペプチドの産生に対して、添加された化合物の影響を検出するスクリーニング法を設定するのにも使用可能である。例えば、当該技術分野に知られる標準法によって、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いて、分泌されたまたは細胞に関連するレベルのポリペプチドを測定するために、ELISAアッセイを構築することが可能である。これを用いて、適切に操作された細胞または組織からのポリペプチドの産生を阻害するかまたは増進することが可能な剤を発見することが可能である。

20

【0072】

したがって、別の側面において、本発明は、本発明のポリペプチドに対する、アゴニスト、アンタゴニスト、他のリガンドおよび受容体、基質、酵素など;あるいはこうしたポリペプチドの産生を減少させるかまたは増進する化合物を同定するためのスクリーニングキットであって:

30

(a) 本発明のポリペプチド;

(b) 本発明のポリペプチドを発現する組換え細胞;

(c) 本発明のポリペプチドを発現する細胞膜;または

(d) 本発明のポリペプチドに対する抗体;

を含んでなり、該ポリペプチドが好ましくは配列番号3または4のものである、前記スクリーニングキットに関する。こうしたキットのいずれかにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)が実質的な構成要素を構成しうると認識されるであろう。

【0073】

当業者には、本発明のポリペプチドがまた:

(a) まず、ポリペプチドの三次構造を決定し;

40

(b) アゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤の、ありうる反応性部位(類)または結合部位(類)の三次元構造を推定し;

(c) 推定される結合部位または反応性部位と結合するかまたは反応すると予測される候補化合物を合成し;そして

(d) 候補化合物が、実際にアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤であるかどうかを試験する

ことによって、該ポリペプチドのアゴニスト、アンタゴニストまたは阻害剤を、構造に基づいて設計するための方法において、使用可能であることも容易に認識されるであろう。

【0074】

さらに、これが、通常、反復過程であろうことも認識されるであろう。

50

【0075】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの抗原性特性

本発明のポリペプチドまたはその断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞はまた、本発明のポリペプチドに免疫特異的な抗体を産生する免疫原として使用することも可能である。用語「免疫特異的」は、抗体が、先行技術の他の関連するポリペプチドに対する親和性より、本発明のポリペプチドに実質的に高い親和性を有することを意味する。

【0076】

本発明のポリペプチドに対して生成された抗体は、ポリペプチドまたはエピトープ所持断片、類似体または細胞を、動物、好ましくは非ヒト動物に、日常的なプロトコルを用いて投与することによって、得ることが可能である。モノクローナル抗体調製のため、連続する細胞株培養によって産生される抗体を提供するいかなる技術も使用可能である。例には、ハイブリドーマ技術 (Kohler, G. および Milstein, C., Nature (1975) 256: 495 - 497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor, Immunology Today (1983) 4: 72) および EBV - ハイブリドーマ技術 (Cole, MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77 - 96, Alan R. Liss, Inc., 1985) が含まれる。

10

【0077】

米国特許第 4, 946, 778 号に記載されるものなどの、一本鎖抗体を産生するための技術を適応させて、本発明のポリペプチドに対する一本鎖抗体を産生することも可能である。また、トランスジェニックマウス、または他の哺乳動物を含む生物を用いて、ヒト化抗体を発現することも可能である。

20

【0078】

上述の抗体を使用して、ポリペプチドを発現するクローンを単離するかまたは同定することが可能であり、あるいはアフィニティークロマトグラフィーによって、ポリペプチドを精製することが可能である。

【0079】

さらなる側面において、本発明は、本発明のポリペプチド、またはその断片、および多様なサブクラスの免疫グロブリン (IgG、IgM、IgA、IgE) の重鎖または軽鎖の定常部の多様な部分を含んでなる、遺伝子操作した可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとして好ましいのは、ヒト IgG、特に IgG1 の重鎖の定常部であり、この場合、融合はヒンジ領域で行われる。特定の態様において、Fc 部分は、単純に、血液凝固因子 Xa で切断可能な切断配列の取り込みによって、除去可能である。さらに、本発明は、遺伝子操作によるこれらの融合タンパク質調製法に、そして例えば薬剤スクリーニングのためのその使用に関する。

30

【0080】

トランスジェニック細胞および哺乳動物

本発明の核酸およびアミノ酸を用いて、TIRAP 機能研究のための有用なツールである、組換え細胞およびトランスジェニック非ヒト哺乳動物を産生することが可能である。すなわち、本発明の外因性核酸、または本明細書では導入遺伝子とも称するが、これを、細胞に導入し、そしてその後、該細胞を用いて、非ヒトトランスジェニック哺乳動物を生成する。導入遺伝子を導入する細胞は、好ましくは胚性幹 (ES) 細胞である。しかし、本発明は、本発明の導入遺伝子を含んでなる ES 細胞のみに限定されると解釈してはならないし、また、トランスジェニック動物を産生するのに用いる細胞のみに限定されると解釈してもならない。むしろ、本発明のトランスジェニック細胞には、限定されるわけではないが、導入遺伝子を含んでなるトランスジェニック動物由来の細胞、トランスジェニック ES 細胞由来のキメラ動物由来の導入遺伝子を含んでなる細胞、および非ヒトトランスジェニック哺乳動物を生成するのに使用可能であるか、または使用不能である、導入遺伝子を含んでなる他のものいずれかが含まれる。

40

【0081】

50

さらに、導入遺伝子を含んでなる細胞、すなわち組換え細胞の目的は、トランスジェニック動物の生成に限定されると解釈してはならないことに注目することが重要である。むしろ、本発明は、TIRAPをコードする核酸が導入されたいかなる細胞種も含むと解釈すべきであり、こうした細胞種には、限定なしに、TIRAPをコードする単離核酸を含んでなる、原核細胞および真核細胞が含まれる。

【0082】

細胞が真核細胞である場合、本発明の導入遺伝子が導入されており、そして望ましい遺伝子にコードされるタンパク質がもはやそこから発現されていない場合に利益が得られる、いかなる真核細胞であることも可能である。こうした利益には、*in vitro*で実験室において、または細胞が存在する哺乳動物において、望ましい遺伝子の発現の欠如を研究することが可能な系、導入された遺伝子欠失を含んでなる細胞を研究、診断および療法ツールとして使用可能である系、並びに哺乳動物において、選択した疾患状態に対する新規診断および療法ツールの開発に有用な動物モデルを生成する系が提供されているという事実が含まれることが可能である。

10

【0083】

あるいは、本発明は、本発明の導入遺伝子を導入し、そして該細胞において、以前には存在しなかったか、または発現されていなかった、あるいは現在、導入遺伝子が導入される前とは異なるレベルまたは状況下で、望ましい遺伝子にコードされるタンパク質が発現されている場合に利益が得られる、真核細胞を含む。こうした利益には、*in vitro*で実験室において、または細胞が存在する哺乳動物において、望ましい遺伝子の発現を研究することが可能な系、導入された遺伝子を含んでなる細胞を研究、診断および療法ツールとして使用可能である系、並びに哺乳動物において、選択した疾患状態に対する新規診断および療法ツールの開発に有用な動物モデルを生成する系が提供されているという事実が含まれることが可能である。

20

【0084】

TIRAPをコードする単離核酸を発現している、こうした細胞を用いて、より高いレベルのTIRAPが、低レベルのTIRAP発現および/または活性に関連する疾患、障害または状態を治療するかまたは緩和するのに有用である可能性がある、細胞、組織、または全動物にTIRAPを提供することが可能である。こうした疾患、障害または状態には、限定されるわけではないが、腸腫瘍、家族性腺腫様ポリープ症、結腸癌、過敏性腸疾患、炎症性腸疾患、糖尿病、肥満、舌癌、乳癌、肺癌等が含まれることが可能である。したがって、本発明には、TIRAP発現、翻訳、および/または活性を増加させるかまたは誘導する、ここで、TIRAP発現、タンパク質レベル、および/または活性の増加が、疾患、障害または状態を治療するかまたは軽減するのに有用でありうる、TIRAP発現細胞が含まれる。

30

【0085】

一般の当業者は、本明細書に提供する開示に基づいて、本発明の「ノックイン」または「ノックアウト」ベクターが、それぞれ、置換されるかまたは欠失される、核酸の2つの部分に相同な、少なくとも2つの配列を含んでなることを認識するであろう。2つの配列は、遺伝子に隣接する配列に相同であり；すなわち、1つの配列は、TIRAPをコードする核酸のコード配列の5'部分の領域またはその近傍の領域と相同であり、そして他方の配列は、第一のものよりさらに下流である。当業者は、本明細書に提供する開示に基づいて、本発明が、いかなる特定の隣接核酸配列にも限定されないことを認識するであろう。その代わり、ターゲティングベクターは、それぞれ、哺乳動物ゲノムから、TIRAPまたはその断片をコードする核酸のいくつかまたはすべてを取り除く（すなわち「ノックアウト」ベクター）か、あるいは該ゲノムに、該核酸を挿入する（すなわち「ノックイン」ベクター）2つの配列を含んでなることが可能である。ターゲティングベクターの重大な特徴は、該ベクターが、TIRAPをコードする核酸のすべてまたは一部が哺乳動物染色体から欠失されるか、または該染色体のある位置に挿入されるように、相同組換えによる欠失/挿入が生じることを可能にするため、「ノックアウト」ベクターの場合、反対に向

40

50

かって位置する、すなわちTIRAPオープンリーディングフレーム(ORF)の5'端および3'端に位置する、2つの配列の十分な部分を含んでなることである。

【0086】

導入遺伝子、並びにノックインおよびノックアウトターゲティングベクターの設計は、当該技術分野に周知であり、そしてSambrookら(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク)、およびAusubelら(1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, ニューヨーク)等の、標準的専門書に記載される。ターゲティングベクターで使用しようとするTIRAPコード領域に隣接するかまたは該領域内部の上流および下流部分は、既知の方法に基づいて、そしてマウスおよびヒトTIRAP両方の核酸およびアミノ酸配列を含む、本明細書に提供する開示に基づき、本明細書に開示する解説にしたがって、容易に選択可能である。これらの配列があれば、一般の当業者は、本発明の導入遺伝子およびノックアウトベクターを構築可能であろう。

10

【0087】

本発明は、例えばneo^R遺伝子をコードし、それによって、細胞がG418の存在下で増殖する能力により、TIRAPをコードする核酸またはその一部が欠失していて、そしてネオマイシン耐性遺伝子で置換されている、トランスジェニック細胞の選択を可能にする核酸などの、選択可能マーカをコードする核酸を含んでなる、ノックアウトターゲティングベクターをさらに含む。しかし、本発明は、選択可能マーカとしてネオマイシン耐性に限定されると解釈してはならない。むしろ、当該技術分野に周知の他の選択可能マーカをノックアウトターゲティングベクターで用いて、TIRAP遺伝子が欠失しており、そして/または不活性化され、そして選択した選択可能マーカをコードする核酸によって置換されている、組換え細胞の選択を可能にすることが可能である。選択可能マーカを選択し、そしてベクターに組み込む方法は、当該技術分野に周知であり、そして例えば、Sambrookら(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク)、およびAusubelら(1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, ニューヨーク)に記載される。

20

30

【0088】

本明細書に記載するように、本発明には、ゲノムの望ましい部位に挿入され、それによって、望ましい内因性標的遺伝子のコード領域を欠失させる、外因性核酸を含んでなる、非ヒトトランスジェニック哺乳動物、すなわちノックアウト・トランスジェニック哺乳動物が含まれる。さらに、本発明には、ゲノムの部位にTIRAPをコードする外因性核酸が挿入されている、トランスジェニック非ヒト哺乳動物、すなわち「ノックイン」トランスジェニック哺乳動物が含まれる。挿入されるノックイン導入遺伝子は、例えば、タグポリペプチド、通常は細胞に存在しない、または典型的にはTIRAPに機能可能であるように連結されていない、TIRAPをコードする核酸に機能可能であるように連結されているプロモーター/制御領域をコードする、多様な核酸を含んでなることが可能である。

40

【0089】

本発明の非ヒトトランスジェニック哺乳動物の生成は、好ましくは、本明細書に記載する方法を用いて達成する。しかし、本発明は、いかなる点でも、この方法の使用のみに限定されると解釈してはならず、他の方法を用いて、望ましいノックアウト哺乳動物を生成することが可能である。

【0090】

非ヒトトランスジェニック哺乳動物を生成する好ましい方法において、本発明の導入遺伝子を含んでなるES細胞を生成し、そしてその後、該細胞を用いて、本質的にNagyおよびRossant(1993, Gene Targeting, A Practi

50

cal Approach 中, pp. 146 - 179, Joyner 監修, IRL Press) に記載されるノックアウト動物を生成する。ES細胞は、宿主胚盤胞に注入するか、または分割球段階の胚と凝集させることによって、胚環境に戻したならば、正常な胚性細胞として振る舞う。このように戻した際、細胞は、胚のすべての細胞系譜に沿って発生する完全な潜在能力を有する。したがって、ES細胞を得て、望ましいDNAを導入し、そしてその後、成熟哺乳動物細胞に発生させるために、該細胞を胚環境に戻すことが可能であり、ここで望ましいDNAを発現させることが可能である。

【0091】

トランスジェニックマウスを生成するための正確なプロトコルが、NagyおよびRosant (1993, Gene Targeting, A Practical Approach, Joyner 監修 IRL Press 中, pp. 146 - 179) 10
に開示され、そしてしたがって、本明細書には繰り返さない。望ましいDNAを導入するためのES細胞のトランスフェクションまたは形質導入は、例えば、Sambrookら (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク)、およびAusubelら (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, ニューヨーク) に記載されるものなどの、標準的プロトコルを用いて達成される。好ましくは、Sorianoら (1991, Cell 64: 693 - 702) に記載 20
されるように、本発明の導入遺伝子内に含有される望ましいDNAをES細胞にエレクトロポレーションし、そして細胞を増殖させる。

【0092】

トランスジェニック技術におけるいずれかの数の標準的技術によって、哺乳動物受精卵への単離核酸の導入を達成する (Hoganら, 1986, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY)。最も一般的には、マイクロインジェクションによって、核酸を胚に導入する。

【0093】

ひとたび核酸を卵に導入したら、卵を短い期間インキュベーションして、そしてその後、Hoganら (1986, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY) に記載されるように、卵を得たのと同じ種の偽妊娠哺乳動物に移す。典型的には、実験あたり、多くの卵に注入し、そして卵のおよそ3分の2がこの処置で生き残る。その後、約20の生存卵を偽妊娠動物に移し、そして通常、こうして移した生存卵の4～10が生存仔に発生するであろう。 30

【0094】

本明細書に記載する方法で、いかなる哺乳動物TIRAP遺伝子を用いて、そのTIRAP遺伝子のすべてまたは一部の欠失を含んでなる導入遺伝子を宿する、トランスジェニック哺乳動物またはトランスジェニック細胞を産生することも可能である。好ましくは、ヒトTIRAP (配列番号1) またはマウスTIRAP (配列番号2) もまた用いる。 40

【0095】

本発明のトランスジェニック哺乳動物は、哺乳動物のいかなる種であることも可能である。したがって、本発明は、キメラ核酸をコードするトランスジェニック哺乳動物であって、マウス、ハムスター、ラット、ウサギ、ブタ、ヒツジおよびウシを含む、前記哺乳動物の生成を含むと解釈すべきである。トランスジェニックマウスの生成に関して、本明細書に記載する方法は、いかなる哺乳動物種を用いても、同様に適用可能である。好ましくは、本発明のトランスジェニック哺乳動物はげっ歯類であり、そしてさらにより好ましくは、本発明のトランスジェニック哺乳動物はマウスである。例えば、Lukkarienenら (1997, Stroke 28: 639 - 645) は、トランスジェニックマウスの生成を可能にする遺伝子構築物が、また、ラットを含む、他のトランスジェニックげっ 50

歯類の生成も可能にすることを解説する。同様に、1つの種の動物の遺伝子座における無接合体 (n u l l i z y g o u s) 突然変異は、第一の種に非常に相同な遺伝子座を有する別の種の動物において、反復可能である。

【0096】

本発明のトランスジェニック哺乳動物を同定するため、サザンブロットハイブリダイゼーション、PCR、および/またはRT-PCRなどの標準的技術を用いて、単離核酸の存在に関して、仔を調べる。本明細書に記載する通常の技術を用いて、哺乳動物の細胞および組織における核酸の発現もまた、評価する。さらに、本明細書に開示するように(例えばウェスタンブロット解析)、または当該技術分野に公知のタンパク質検出標準法を用いて、トランスジェニック動物の循環血液におけるTIRAPの存在または非存在を測定することが可能である。

10

【0097】

本明細書において用いる用語として、「トランスジェニック細胞」ともみなされる、本発明のトランスジェニック哺乳動物から得た細胞は、本明細書の別の箇所に記載するTIRAP(+/-)および(-/-)トランスジェニック非ヒト哺乳動物から得られるものなどの細胞を含み、結腸癌、家族性腺腫様ポリープ症、過敏性腸疾患、炎症性腸疾患、腸腫瘍、乳癌、舌癌、糖尿病、および肥満などの、TIRAP発現のレベル改変と関連すると考えられる哺乳動物の疾患および症状、並びに、TIRAP発現のレベル改変と関連する他の疾患、障害または状態いずれかをモデリングするのに有用な系である。さらに、結腸癌、家族性腺腫様ポリープ症、過敏性腸疾患、炎症性腸疾患、腸腫瘍、乳癌、舌癌、糖尿病、および肥満などの、腫瘍増殖および他の腸異常と関連する経路(類)のマーカーとして、TIRAP発現レベルはまた、こうした疾患、障害または状態の評価における有用な示標でもある。

20

【0098】

特に適切なのは、本明細書に記載する非ヒトノックアウトまたはノックイン・トランスジェニック哺乳動物の組織由来の細胞であり、ここでTIRAP遺伝子を含んでなる導入遺伝子が発現されるか、または多様な組織におけるTIRAPの発現を阻害する。例えば、こうした細胞が由来する細胞種には、(1)TIRAP(+/+), (+/-)および(-/-)非ヒトトランスジェニック生産(live born)哺乳動物、(2)TIRAP(+/+), (-/-)または(+/-)胎児動物、並びに(3)TIRAP(+/+), (-/-)および(+/-)胎児および生産哺乳動物から得られる胎盤細胞株の線維芽細胞、内皮細胞、脂肪細胞、および筋芽細胞が含まれる。

30

【0099】

本明細書に先に頻繁に用いられている特定の用語の理解を容易にするため、以下の定義を提供する。

「抗体」は、本明細書において、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、およびヒト化抗体と共にFab断片を含み、Fabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含む。

【0100】

「単離された」は、天然状態から「ヒトの手によって」改変されることを意味する。「単離された」組成物または物質が天然に存在する場合、これは、その元来の環境から変化しているかまたは取り除かれているか、あるいは両方である。例えば、生存動物に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離されて」いないが、天然状態の同時に存在する材料から分離された、同一のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、用語が本明細書で使用される際、「単離されて」いる。

40

【0101】

「ポリヌクレオチド」は、一般的に、未修飾RNAまたはDNAあるいは修飾RNAまたはDNAであることが可能な、ポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドいずれかを指す。「ポリヌクレオチド」には、限定なしに、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、並びに一

50

本鎖および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、あるいはより典型的には二本鎖であるか、または一本鎖および二本鎖領域の混合物であることが可能な、DNAおよびRNAを含んでなるハイブリッド分子が含まれる。さらに、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNAあるいはRNAおよびDNA両方を含んでなる、三本鎖領域を指す。用語「ポリヌクレオチド」はまた、1以上の修飾塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性のため、または他の理由のため修飾された主鎖を持つDNAまたはRNAも含む。「修飾」塩基には、例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどの例外的な塩基が含まれる。多様な修飾をDNAおよびRNAに行うことが可能であるし；したがって、「ポリヌクレオチド」は、典型的に天然に見られるような、ポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的修飾型と共に、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学型を含む。「ポリヌクレオチド」はまた、しばしばオリゴヌクレオチドと称される、比較的短いポリヌクレオチドも含む。

10

【0102】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合によって互いに連結される、2以上のアミノ酸を含んでなる、ペプチドまたはタンパク質いずれか、すなわちペプチドアイソスターを指す。「ポリペプチド」は、一般的にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと称される短い鎖、および一般的にタンパク質と称されるより長い鎖両方を指す。ポリペプチドは、遺伝子にコードされる20のアミノ酸以外のアミノ酸を含有してもよい。ポリペプチドには、翻訳後プロセッシングなどの天然プロセスによるか、または当該技術分野に公知の化学的修飾技術によるか、いずれかで修飾されたアミノ酸配列が含まれる。こうした修飾は、基本的な教科書に、そしてより詳細なモノグラフと共に、膨大な研究文献によく記載される。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ末端またはカルボキシ末端を含む、ポリペプチドのどこで起こることも可能である。同じ種類の修飾が、既定のポリペプチドのいくつかの部位で、同じかまたは異なる度合いで存在することが可能であることが認識されるであろう。また、既定のポリペプチドは、多くの種類の修飾を含有することが可能である。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果、分岐していることが可能であり、そして分岐を伴いまたは伴わずに、環状であることが可能である。環状、分岐および分岐環状ポリペプチドは、翻訳後天然過程から生じることが可能であるし、または合成法によって作成可能である。修飾には、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環状化、ジスルフィド結合形成、ジメチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのアミノ酸のタンパク質へのトランスファーRNA仲介付加、およびユビキチン化が含まれる（例えばPROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 第2版, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, ニューヨーク, 1993; World, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, 1-12ページ, POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson 監修, Academic Press, ニューヨーク, 1983中; Seiftera, "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth Enzymol (1990) 182: 626-646およびRattanら, "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663: 48-62を参照されたい)。

20

30

40

50

【0103】

「変異体」は、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチドと異なるが、本質的な特性を保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、別の参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なる。変異体のヌクレオチド配列の変化は、参照ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を改変する可能性もあるし、またはしない可能性もある。ヌクレオチド変化は、以下に論じるように、参照配列にコードされるポリペプチドにおいて、アミノ酸置換、付加、欠失、融合および一部切除 (truncation) を生じることが可能である。ポリペプチドの典型的な変異体は、アミノ酸配列が、別の参照ポリペプチドと異なる。一般的に、参照ポリペプチドおよび変異体の配列が、全体で緊密に類似であり、そして多くの領域で同一であるように、相違が限定される。変異体および参照ポリペプチドは、いずれかの組み合わせの1以上の置換、付加、欠失によって、アミノ酸配列が異なることが可能である。置換または挿入アミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされるものである可能性も、またはない可能性もある。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子変異体などの天然存在であることも可能であるし、または天然に存在することが知られていない変異体であることも可能である。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非天然存在変異体は、突然変異誘発技術によって、または直接合成によって、作成することが可能である。

10

【0104】

「同一性」は、当該技術分野に知られるように、場合によって、配列を比較することによって決定されるような、2以上のポリペプチド配列または2以上のポリヌクレオチド配列間の関係である。当該技術分野において、「同一性」はまた、場合によって、こうした配列のストリング間のマッチによって決定されてもよい、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列関連性の度合いも意味する。「同一性」は、限定されるわけではないが、Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 監修, Oxford University Press, ニューヨーク, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 監修, Academic Press, ニューヨーク, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M. および Griffin, H. G. 監修, Humana Press, ニュージャージー, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 並びに Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J. 監修, M Stockton Press, ニューヨーク, 1991; 並びに Carillo, 30 H. および Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988) に記載されるものを含む、既知の方法によって、容易に計算可能である。同一性を決定する方法は、試験する配列間の最大のマッチを生じるように設計される。さらに、同一性を決定する方法は、公共に利用可能なコンピュータプログラムにおいて、体系化されている。2つの配列間の同一性を決定するコンピュータプログラム法には、限定されるわけではないが、GCGプログラムパッケージ (Devereux, J. ら, Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTN、および FASTA (Atschul, S. F. ら, J Mol. Biol. 215:403-410 (1990)) が含まれる。BLAST X プログラムは、NCBI および他の供給源から、公共に入手可能である (BLAST Manual, Atschul, S. ら, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Atschul, S. ら, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990))。公知のスミス・ウォーターマンアルゴリズムもまた、同一性を決定するのに使用可能である。

20

30

40

【0105】

50

ポリペプチド配列比較のためのパラメーターには以下が含まれる：

１）アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch, J. Mol Biol . 48:443-453 (1970)

比較マトリックス：HentikoffおよびHentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)
のBLOSSUM62

ギャップペナルティ：12

ギャップ長ペナルティ：4

これらのパラメーターを用いる、有用なプログラムは、遺伝学コンピュータグループ、ウィスコンシン州マディソンから、「gap」プログラムとして公共に入手可能である。前述のパラメーターは、ペプチド比較のためのデフォルトパラメーターである（末端ギャップに対するペナルティなし、を伴う）。 10

【0106】

ポリヌクレオチド比較に関するパラメーターには、以下が含まれる：

１）アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch, J. Mol Biol . 48:443-453 (1970)

比較マトリックス：マッチ = +10、ミスマッチ = 0

ギャップペナルティ：50

ギャップ長ペナルティ：3

遺伝学コンピュータグループ、ウィスコンシン州マディソンから、「gap」プログラムとして入手可能。これらは、核酸比較のためのデフォルトパラメーターである。 20

【0107】

場合による、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドに関する「同一性」の好ましい意味を以下の（１）および（２）に提供する。

（１）ポリヌクレオチド態様は、配列番号１または２の参照配列に少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含んでなる単離ポリヌクレオチドをさらに含み、前記ポリヌクレオチド配列は、配列番号１または２の参照配列と同一であるか、あるいは、参照配列に比較した際に、特定の整数までのヌクレオチド改変を含むことが可能であり、ここで、前記改変は少なくとも１つのヌクレオチド欠失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入からなる群より選択され、そして前記改変は、参照ヌクレオチド配列の5'末端もしくは3'末端位で、または末端位の間のどこかで、参照配列中のヌクレオチドの間に個々に点在するか、または参照配列内の１以上の隣接基に生じることが可能であり、そして前記ヌクレオチド改変数は、配列番号１または２のヌクレオチド総数に、同一性パーセントを定義する整数を乗じて、100で割り、そしてその後、配列番号１の前記ヌクレオチド総数からその積を減じることによって、あるいは： 30

$$N_n = X_n - (X_n * y)$$

（式中、 N_n はヌクレオチド改変数であり、 X_n は配列番号１または２のヌクレオチド総数であり、 y は50%では0.50、60%では0.60、70%では0.70、80%では0.80、85%では0.85、90%では0.90、95%では0.95、97%では0.97、または100%では1.00であり、そして*は、乗法演算子記号であり、そして式中、 X_n および y の整数でないいかなる積も、これを X_n から減じる前に、最も近い整数に四捨五入する）によって、決定可能である。配列番号３または４のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の改変は、このコード配列に、ナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト突然変異を生成可能であり、そしてそれによって、こうした改変後に、ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを改変可能である。 40

【0108】

例えば、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号３または４の参照配列と同一であることが可能であり、すなわち100%同一であることも可能であるし、または参照配列に比較した際、同一性パーセントが100%未満の同一性であるように、アミノ酸改変の特 50

定の整数までを含むことも可能である。こうした改変は、少なくとも1つの核酸欠失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入からなる群より選択され、そして前記改変は、参照ポリヌクレオチド配列の5'末端もしくは3'末端位で、または末端位の間のどこかで、参照配列中の核酸の間に個々に点在するか、または参照配列内の1以上の隣接基に生じることが可能である。配列番号3または4のアミノ酸総数に、同一性パーセントを定義する整数を乗じて、100で割り、そしてその後、配列番号3または4の前記アミノ酸総数からその積を減じることによって、あるいは：

$$N_n = X_n - (X_n * y)$$

(式中、 N_n はアミノ酸改変数であり、 X_n は配列番号3または4のアミノ酸総数であり、 y は、例えば70%では0.70、80%では0.80、85%では0.85などであり、 $*$ は、乗法演算子記号であり、そして式中、 X_n および y の整数でないいかなる積も、これを X_n から減じる前に、最も近い整数に四捨五入する) によって、既定の同一性パーセントに対する核酸改変数を決定する。

10

【0109】

(2) ポリペプチド態様は、配列番号3または4のポリペプチド参照配列に少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するポリペプチドを含んでなる単離ポリヌクレオチドをさらに含み、前記ポリペプチド配列は、配列番号3または4の参照配列と同一であるか、あるいは、参照配列に比較した際に、特定の整数までのアミノ酸改変を含むことが可能であり、ここで、前記改変は少なくとも1つのアミノ酸欠失、保存的置換および非保存的置換を含む置換、または挿入からなる群より選択され、そして前記改変は、参照ポリペプチド配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端位で、または末端位の間のどこかで、参照配列中のアミノ酸の間に個々に点在するか、または参照配列内の1以上の隣接基に生じることが可能であり、そして前記アミノ酸改変数は、配列番号3または4のアミノ酸総数に、同一性パーセントを定義する整数を乗じて、100で割り、そしてその後、配列番号3または4の前記アミノ酸総数からその積を減じることによって、あるいは：

20

$$N_a = X_a - (X_a * y)$$

(式中、 N_a はアミノ酸改変数であり、 X_a は配列番号3または4のアミノ酸総数であり、 y は50%では0.50、60%では0.60、70%では0.70、80%では0.80、85%では0.85、90%では0.90、95%では0.95、97%では0.97、または100%では1.00であり、そして $*$ は、乗法演算子記号であり、そして式中、 X_a および y の整数でないいかなる積も、これを X_a から減じる前に、最も近い整数に四捨五入する) によって、決定可能である。

30

【0110】

例えば、本発明のポリペプチド配列は、配列番号3または4の参照配列と同一であることが可能であり、すなわち100%同一であることも可能であるし、または同一性パーセントが100%未満の同一性であるように、参照配列に比較した際、アミノ酸改変の特定の整数までを含むことも可能である。こうした改変は、少なくとも1つのアミノ酸欠失、保存的置換および非保存的置換を含む置換、または挿入からなる群より選択され、そして前記改変は、参照ポリペプチド配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端位で、または末端位の間のどこかで、参照配列中のアミノ酸の間に個々に点在するか、または参照配列内の1以上の隣接基に生じることが可能である。配列番号3または4のアミノ酸総数に、同一性パーセントを定義する整数を乗じて、100で割り、そしてその後、配列番号3または4の前記アミノ酸総数からその積を減じることによって、あるいは：

40

$$N_a = X_a - (X_a * y)$$

(式中、 N_a はアミノ酸改変数であり、 X_a は配列番号3または4のアミノ酸総数であり、 y は、例えば70%では0.70、80%では0.80、85%では0.85などであり、そして $*$ は、乗法演算子記号であり、そして式中、 X_a および y の整数でないいかなる積も、これを X_a から減じる前に、最も近い整数に四捨五入する) によって、既定の同一性%に対するアミノ酸改変数を決定する。

50

【0111】

「融合タンパク質」は、2つの、しばしば関連しない、融合遺伝子またはその断片にコードされるタンパク質を指す。1つの例において、EP-A-0464は、免疫グロブリン分子の定常部の多様な部分を、別のヒトタンパク質またはその一部と共に含んでなる、融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質の一部として免疫グロブリンFc領域を使用すると、療法および診断における使用に好適であり、例えば薬物動態特性改善を生じる（例えばEP-A 0232 262を参照されたい）。一方、いくつかの使用では、融合タンパク質を発現させ、検出し、そして精製した後、Fc部分を欠失可能であることが望ましいであろう。

【0112】

「小分子」または「小分子化合物」は、典型的には約2キロダルトン(KD)未満である合成有機化合物を指す。

用語「導入遺伝子(transgene)」は、本明細書において、哺乳動物細胞、特に生存動物の哺乳動物細胞のゲノムに人工的に挿入されているか、または挿入されようとしている遺伝子材料を記載するのに用いられる。導入遺伝子を用いて細胞を形質転換し、これは、外因性DNAの取り込みに続いて、永続的かまたは一過性の遺伝子変化、好ましくは永続的な遺伝子変化が、細胞において誘導されることを意味する。永続的な遺伝子変化は、一般的に、細胞ゲノムへのDNAの導入によって達成される。安定な組込みのためのベクターには、プラスミド、レトロウイルスおよび他の動物ウイルス、YAC等が含まれる。興味深いのは、トランスジェニック哺乳動物、例えばウシ、ブタ、ヤギ、ウマ等であり、そして特にげっ歯類、例えばラット、マウス等である。

【0113】

トランスジェニック動物には、その細胞、特に生殖細胞のすべてまたは一部に、染色体外要素として存在するか、または安定に組み込まれている、外因性核酸配列が含まれる。別に示さない限り、トランスジェニック動物には生殖系列配列に安定な変化が含まれると仮定されるであろう。動物の最初の構築中、「キメラ」または「キメラ動物」が生成され、その中で、細胞のサブセットのみが改変されたゲノムを有する。キメラは、主に、望ましいトランスジェニック動物を生成するため、交配目的のために用いられる。キメラの交配によってヘテロ接合体改変を有する動物が生成される。典型的には、オスおよびメスヘテロ接合体を交配して、ホモ接合体動物を生成する。

【0114】

本発明において、「ノックアウト」は、目的の内因性遺伝子の1つまたは両方の対立遺伝子において、部分的または完全な機能損失を有し、内因性遺伝子から改変された遺伝子配列および機能を持つ、導入された導入遺伝子を有する「ノックイン」とは対照的である。天然存在遺伝子を実効無効にして、そして改変型が導入されるように、この2つを組み合わせることが可能である。ノックアウトでは、好ましくは、標的遺伝子発現は、検出不能であるか、または重要でないようにされている。TIRAP遺伝子のノックアウトは、発現が検出不能であるか、または重要でないレベルでしか存在しないように、TIRAPの機能が実質的に減少していることを意味する。これは、コード配列の破壊の導入、例えば1以上の停止コドンの挿入、DNA断片の挿入など、コード配列の欠失、コード配列に対する停止コドンでの置換などを含む、多様な機構によって達成可能である。いくつかの場合では、外因性導入遺伝子配列は、最終的に、ゲノムから欠失され、天然配列に対する純粋な変化が残る。異なるアプローチを用いて、ノックアウトを達成することが可能である。非コード領域、特にプロモーター領域、3'制御配列、エンハンサーの欠失、または遺伝子発現を活性化する遺伝子の欠失を含む、天然遺伝子のすべてまたは一部の染色体欠失を誘導可能である。機能的ノックアウトはまた、天然遺伝子の発現を遮断するアンチセンス構築物の導入によっても達成可能である（例えばLiおよびChen(1996)Cell 85:319-329を参照されたい）。ノックアウトにはまた、コンディショナルノックアウト、例えば標的遺伝子改変を促進する物質に動物を曝露した際に、標的遺伝子改変が起こるもの、標的遺伝子部位で組換えを促進する酵素を導入するもの（例えばCr

10

20

30

40

50

e - l o x系におけるC r e)、または標的遺伝子改変を出生後に指示する他の方法が含まれる。

【0115】

本明細書に引用される、限定されるわけではないが特許および特許出願を含む、すべての刊行物は、個々の刊行物が各々、具体的に、そして個々に、完全に示されるかのように、本明細書に示されるように、本明細書に援用される。

【実施例】

【0116】

本発明は、以下の実験的实施例に言及して、さらに詳細に記載される。これらの実施例は、例示目的のためのみに提供され、そして別に明記しない限り、限定することを意図しない。したがって、本発明は、いかなる点でも、以下の実施例に限定されると解釈してはならず、むしろ、本明細書に提供する解説の結果明らかになる、変動いずれかおよびすべてを含むと解釈すべきである。

【0117】

(実施例1)

T I R A Pは、T L R 4シグナル伝達経路の構成要素であるが、I L - 1 Rシグナル伝達経路の構成要素ではない。

【0118】

N F - Bのプロモーター活性に対する多様なT I R A P構築物の影響を決定するため、293T細胞に、2.0 μgの示すT I R A P構築物および0.1 μgのN F - B依存ルシフェラーゼレポーター遺伝子を同時トランスフェクションした。p c D N A 3は、空のベクター対照であり；T I R A Pは、全長T I R A Pタンパク質をコードするベクターであり；T I R A P Nは、T I R A PのN末端ドメインをコードするベクターであり；T I R A P Cは、T I R A PのC末端ドメインをコードするベクターであり；そしてT I R A P P 1 2 5 Hは、アミノ酸125位にプロリンからヒスチジンへの突然変異を含有する、T I R A P突然変異型をコードするベクターである。トランスフェクション24時間後に細胞を採取し、そして標準的ルシフェラーゼアッセイにおける解析のため、溶解した。ルシフェラーゼ活性は、モックトランスフェクション細胞に比較した倍誘導として表す(図2A)。T I R A P構築物がN F - Bプロモーターの強い活性化を生じた(ルシフェラーゼ活性のおよそ80倍の誘導)一方；T I R A P N、T I R A P C、またはT I R A P P 1 2 5 Hの存在下では、有意なプロモーター活性は観察されなかった。これらの結果に基づいて、全長T I R A PはN F - Bプロモーターを活性化するが、試験したT I R A Pの突然変異型は該プロモーターを活性化しない。これらの結果は、T I R A PがT L R 4シグナル伝達経路の構成要素であることをさらに示唆する。

【0119】

T I R A P P 1 2 5 Hがドミナントネガティブとして機能するかどうか決定するため、293T細胞に、T I R A P P 1 2 5 HまたはM y D 8 8 D N (T I R A P P 1 2 5 Hと同じ位で、プロリンからヒスチジンへの突然変異を含有するM y D 8 8を発現するベクター)いずれかの増加する濃度(50 ng、250 ng、1.0 μg)を伴い、または伴わず、0.25 μgのベクターのみ(p c D N A)またはC D 4 / T L R 4 (T L R 4の恒常的活性型を発現するベクター)、並びにN F - B依存ルシフェラーゼレポーター遺伝子をトランスフェクションした。興味深いことに、T I R A P P 1 2 5 Hは、C D 4 / T L R 4によって仲介されるN F - Bの活性化を強く阻害した(図2B)。この阻害は、用量依存性であり、そしてM y D 8 8 D NによるC D 4 / T L R 4の阻害に匹敵した。これらの結果は、T L R 4が仲介するN F - B活性化をT I R A P P 1 2 5 Hが阻害することを示唆する。特に、同じ位でのM y D 8 8突然変異は、過剰発現されている際でも、なおN F - Bを活性化することが可能であり、T I R A PおよびM y D 8 8 T I R Dメインの機能に相違がある可能性があることを示す。

【0120】

T L R 4と異なり、I L - 1 RまたはT L R 9はいずれも、M y D 8 8の非存在下ではN

10

20

30

40

50

F - Bを誘導不能である(Kawai 1999; Schnare 2000; Adache 1998)。MyD88独立シグナル伝達経路において、TIRAPが推定上のアダプターである可能性を評価するため、IL-1RおよびTLR9によって誘導されたNF - B活性を阻害する能力に関して、TIRAP P125Hを試験した。293T細胞に、増加する濃度(10 ng、50 ng、200 ng)のTIRAP P125Hプラスミドを伴い、または伴わず、ベクターのみ(pcDNA3)、IL-1R(0.1 μg)、およびIL-1R AcP(0.1 μg)[Medzhitov博士: IL-1R AcP構築物がコードするものを示されたい]プラスミドcDNA、並びにNF - B依存ルシフェラーゼレポーター遺伝子を同時トランスフェクションした。TIRAP P125Hは、同時トランスフェクションされたIL-1RおよびIL-1R AcP(図2C)によるか、またはIL-1Bサイトカインによるか、いずれによって誘導されたNF - B活性も阻害しなかった。

10

【0121】

TLR9は、過剰発現されている際には、NF - B活性を誘導しないが、リガンドCpG DNAを添加された際は、誘導する。TIRAPが、TLR9トランスフェクション細胞のCpG刺激によって誘導されるNF - B活性化を阻害するかどうかを決定するため、293T細胞に、増加する濃度(100 ng、250 ng)のTIRAP P125HまたはMyD88Nいずれかを伴い、または伴わず、ベクターのみ(pcDNA3)、TLR9(50 ng)をトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後、TLR9トランスフェクション試料に、最終濃度3 μMでCpGオリゴヌクレオチドを添加し、そして採取前に、さらに14時間インキュベーションした。CpG DNAがMyD88欠損細胞において、NF - Bを活性化する能力(Schnare 2000)と一致して、MyD88 DNがCpGシグナル伝達を阻害したが、TIRAP P125Hは、TLR9トランスフェクション細胞のCpG刺激によって誘導されるNF - B活性化を阻害しなかった(図2D)。したがって、TIRAPは、TLR4の下流で機能するようであるが、IL-1RまたはTLR9の下流では機能しないようであり、そして、TLR4下流のMyD88独立経路のアダプターである可能性がある。

20

【0122】

(実施例2)

野生型TIRAPはTLR4と同時に免疫沈降するが、TIRAP P125HはTLR4と同時免疫沈降しない。

30

【0123】

TLR4シグナル伝達経路におけるTIRAPの役割に関して、生化学的コンホメーションを得るため、同時免疫沈降実験を用いて、TIRAP - TLR4タンパク質相互作用を評価した。1.5 μgのFlagタグ化TIRAP(Flag TIRAP)またはP125H突然変異を含有するその突然変異誘導体(Flag TIRAP PH)の存在下または非存在下で、4.5 μgの、外部ドメインを欠く、Mycタグ化TLR4欠失構築物(Myc TLR4 wt)またはその突然変異誘導体(Myc TLR4 P714H)で、293T細胞を同時トランスフェクションした。トランスフェクション24時間後に調製した溶解物を、抗Flag M2アガロースビーズと一晚インキュベーションして、Flag TIRAPまたはFlag TIRAP P125Hおよびいかなる関連タンパク質も免疫沈降した。免疫複合体を洗浄し、SDS - PAGE電気泳動によって分離し、そしてその後、同時免疫沈降したTLR4を探すために抗myc抗体で、あるいはFlag TIRAPまたはFlag TIRAP P125Hの免疫沈降を確認するために抗Flag抗体で、免疫プロットすることによって、解析した。SDS - PAGEおよび免疫プロットによって、総細胞溶解物(35 μg / 試料)を同様に解析して、すべての試料に適切なタンパク質が同等に発現されていることを確認した。これらの実験によって、TLR4が実際に、TIRAPと同時に免疫沈降することが明らかになった(図3A)。突然変異の結果としてシグナル伝達不能であり、そしてしたがって、c3H / HeJマウスをLPSに非応答性にするTLR4突然変異体、TLR4 P714Hもまた、TL

40

50

R 4 と同時免疫沈降する。対照的に、T I R A P P 1 2 5 H は、T L R 4 と同時免疫沈降できず、T I R ドメインのこの保存される領域が、T I R A P と T L R 4 の T I R ドメインとの相互作用を仲介することが示唆される（図 3 A）。

【 0 1 2 4 】

同様に、T I R A P および M y D 8 8 間の相互作用を調べた。1 . 5 μ g の H A タグ化 T I R A P (H A T I R A P) のみを、あるいは 1 . 5 μ g の F l a g タグ化 M y D 8 8 (F l a g M y D 8 8)、F l a g タグ化 T I R A P (F l a g - T I R A P)、または F l a g タグ化 T I R A P P 1 2 5 H (F l a g T I R A P P H) いずれかと組み合わせ、2 9 3 T 細胞にトランスフェクションした。免疫沈降、および免疫複合体解析と共に総細胞溶解物の解析を、上述のように行った。T I R A P が M y D 8 8 と相互作用しないことが立証され（図 3）、これらのアッセイによって検出される T I R ドメイン相互作用の特異性が立証された。T I R A P はまた、I R A K [M e d z h i t o v 博士：これを詳述されたい] と会合できず、T I R A P が M y D 8 8 依存シグナル伝達経路で、いかなる役割も持たない可能性があることが示唆された。しかし、T I R A P は、それ自体と同時免疫沈降可能であり（図 3 B）、T I R A P が、T L R 4 および M y D 8 8 を含む、多くの他の T I R ドメイン含有タンパク質での場合のように、ホモ二量体化することが可能であることを示す。i n v i t r o グルタチオン S トランスフェラーゼ (G S T) プルダウンアッセイを用いて、T I R A P および T L R 4 の T I R ドメイン間の直接相互作用もまた、検出された。

10

【 0 1 2 5 】

20

(実施例 3)

P K R は、L P S および C p G シグナル伝達経路の構成要素であり、そして T I R A P と同時免疫沈降する。

【 0 1 2 6 】

インターフェロンに制御される d s R N A 結合プロテインキナーゼ P K R を欠く細胞が、L P S 刺激に応答して J N K および p 3 8 を活性化できないことが最近立証された (G o h 2 0 0 0)。T L R 4 は L P S 下流のすべてのシグナルに必要であるため、この結果報告は、P K R が T L R 4 シグナル伝達経路の構成要素であることを示唆した。P K R が M y D 8 8 依存経路または独立経路のどちらで機能するかを決定するため、野生型および M y D 8 8 欠損マクロファージにおいて、L P S 刺激後、P K R 活性化を評価した。この目的に向けて、野生型または M y D 8 8 欠損マウスいずれか由来の骨髓由来マクロファージを、L P S (1 0 n g / m l) または C p G (1 0 μ M) いずれかで、示す時間、刺激して、その後、P B S で洗浄し、そして T N T 溶解緩衝液中で溶解した。P K R は、活性化に際して、スレオニン残基上でリン酸化されるため、リン酸化 P K R を特異的に認識する抗体を用いて、S D S - P A G E 電気泳動によって分離した溶解物 (4 0 μ g / 試料) を免疫プロットすることによって、P K R の活性化をアッセイした。L P S 刺激した野生型マクロファージにおいて、活性化され、リン酸化された P K R が検出可能であった (図 4 A)。興味深いことに、リン酸化された P K R はまた、L P S で刺激した M y D 8 8 欠損マクロファージでも検出されたが、これらの細胞では、有意に少ない割合の P K R がリン酸化される。さらに、M y D 8 8 欠損細胞は、N F - κ B および J N K 活性化の遅延した動力学と同様、P K R をより遅い動力学で活性化する。これらの観察は、L P S 刺激に
40

【 0 1 2 7 】

P K R および T I R A P が相互作用するかどうかを決定するため、3 . 5 μ g の H A P K R キナーゼ死 (K D) 突然変異体または 1 . 5 μ g の F l a g T I R A P いずれかを

50

トランスフェクションした 293T 細胞由来の溶解物を、上述のような免疫沈降解析、その後、SDS-PAGE、および示す抗体を用いた免疫ブロットに供した。PKR を過剰発現すると細胞死が誘導されるため、野生型 PKR でなく PKR KD 突然変異体を用いた。PKR は実際、TIRAP と同時免疫沈降し (図 4B)、上で確立された、PKR および TIRAP の間の連関がさらに支持された。

【0128】

TIRAP が、PKR を直接制御しない可能性があるため、TIRAP および 2 つの他のタンパク質、p58 および PACT 間の相互作用を解析した。p58 は、PKR 活性を負に制御するテトラトリコペプチド反復含有タンパク質であり (Lee 1994)、そして PACT は、細胞ストレスに応答して、PKR を活性化する、dsRNA 結合ドメイン含有タンパク質である (Patel 19980)。p58 コードベクター (3.5 μg) または PACT (3.5 μg) いずれかおよび Flag TIRAP (1.5 μg) をトランスフェクションした 293T 細胞由来の溶解物を、免疫沈降解析、その後、SDS-PAGE、および示す抗体を用いた免疫ブロッティングに供した。TIRAP は、p58 および PACT 両方と免疫沈降することが示され (図 4C)、PKR および / またはその制御因子 p58 および PACT が、TIRAP の下流標的である可能性があることが示された。

【0129】

(実施例 4)

細胞透過性 TIRAP 阻害性ペプチドは、LPS が誘導する NF- κ B 活性化、PKR リン酸化、および JNK リン酸化を阻害するが、CpG が誘導するものは阻害しない。

【0130】

TIRAP 機能をさらに解明するため、TIRAP 阻害のするための別の方法を探求した。TIRAP P125H 突然変異体が、ドミナントネガティブとして機能し、そしてモはや TLR4 と相互作用不能であるという事実によって、この突然変異した残基が、上流受容体と相互作用する能力を含む TIRAP 活性に重要であることが示された。したがって、野生型 TIRAP のこの領域に対応するペプチドは、TLR4 との相互作用に関して TIRAP と競合することによって、TIRAP の部位特異的阻害剤として作用可能である。この可能性を試験するため、細胞アッセイに有用な細胞透過性ペプチドをまず、構築した。mTIRAP のこの領域に対応する合成ペプチドを、アンテナペディア由来のペプチドの C 末端に連結した。アンテナペディアペプチドは、細胞培養に外因性に添加された際、細胞膜を横断することが可能であり、そして、細胞に融合ペプチドを搬送するビヒクルとして働くことが可能である (Derossi 1998)。NF- κ B 依存ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (RAW B) を安定にトランスフェクションした RAW マクロファージ細胞株を、示す濃度の TIRAP 阻害性ペプチドまたは 50 μM の対照ペプチドいずれかで、1 時間、前処理し、その後、LPS (10 ng/ml) で 5 時間刺激した後、レポーターアッセイのために採取した。試料は、2 つ組で処理し、そして刺激した。TIRAP ペプチドでの RAW B 細胞株の前処理は、LPS が誘導する NF- κ B 活性化を強力に阻害した (図 5A)。しかし、溶媒、DMSO、または TIRAP 配列が反転されている対照ペプチドでの前処理に際しては、NF- κ B 活性化に対していかなる影響も観察されなかった (図 5A)。

【0131】

I κ B- κ 分解に対する TIRAP の影響を決定するため、以下の実験を行った。未処理の RAW 細胞、または 40 μM の TIRAP ペプチドで、1 時間、前処理した RAW 細胞いずれかを、示す時間、未刺激で放置するか、または LPS (10 ng/ml) で刺激した後、TNF 溶解緩衝液中での溶解のため採取した。SDS-PAGE 電気泳動によって溶解物 (30 μg / 試料) を分離し、その後、抗 I κ B- κ 分解を用いて免疫ブロットした。上に立証する NF- κ B 活性化における遮断と一致して、LPS 刺激は、TIRAP ペプチドで前処理した RAW 細胞において、I κ B- κ 分解を誘導しなかった (図 5B)。

【0132】

TIRAP突然変異ペプチドが、CpGが刺激するシグナル伝達を阻害するかどうかを決定するため、示す濃度のTIRAPペプチドでRAW B細胞を前処理し、そしてLPS (10 ng/ml) またはCpG (10 μM) いずれかで5時間刺激した後、レポーターアッセイのために採取した。重要なことに、TIRAPペプチドでのRAW細胞の前処理は、CpGが誘導するNF- B活性化 (図5C) またはCpGが誘導するIL-1 B分解どちらも阻害せず、また該ペプチドは、293細胞において、IL-1 Bサイトカインに仲介されるNF- B活性化も阻害しなかった。

【0133】

TIRAP突然変異ペプチドが、LPSまたはCpGに誘導されるPKRおよびJNKリン酸化を阻害するかどうか決定するため、未処理のRAW細胞、または40 μMのTIRAPペプチドで前処理したRAW細胞いずれかを、示す時間、未刺激で放置するか、あるいはLPS (10 ng/ml) またはCpG (10 μM) いずれかで刺激した後、採取し、そして溶解した。SDS-PAGE、その後、リン酸化PKRおよびJNKを特異的に認識する抗体での免疫ブロットによって、溶解物 (30 μg/試料) を解析した。さらに、TIRAPペプチドはまた、RAW細胞において、LPSによって誘導されるPKRリン酸化も阻害したが、対照ペプチドはこれを阻害せず、TIRAPペプチドは、CpGに誘導されるものは阻害せず (図5D)、PKRがTIRAP下流で機能する可能性を支持した。

10

【0134】

これらのデータは、TIRAP P125Hドミナントネガティブ構築物を利用する一過性トランスフェクションアッセイの結果と一致し、そしてこれらは、TIRAPがTLR4の下流で機能するが、TLR9またはIL-1Rの下流で機能しないという仮説を強く支持する。さらに、TIRAPペプチドが、CpGが誘導する影響を阻害しないという事実は、TIRAPペプチドが、細胞傷害性を引き起こすことによって、または他の細胞過程と非特異的に干渉することによって、LPSシグナル伝達を阻害するという可能性を排除する。

20

【0135】

(実施例5)

TIRAPは樹状細胞成熟を調節する。

30

マクロファージにおけるLPS応答性を仲介する際のTIRAPの重要な役割を考慮して、LPSが誘導するDC成熟におけるTIRAPの役割を調べた。MyD88欠損DCが、LPS刺激に応答して同時刺激分子を上方制御する能力を保持するため、TIRAPはこれらの事象において、重要である可能性がある (Kaisho 2001)。同時刺激分子B7.1およびB7.2の発現に対するTIRAPの影響を決定するため、野生型およびMyD88-/- DCに対してフローサイトメトリーを行った。DCは、未刺激である (陰影) か、LPS (10 ng/ml) またはCpG (10 μM) で刺激される (黒い線) か、あるいはLPSまたはCpGでの刺激前にTIRAPペプチド (10 μM) で前処理される (点線) か、いずれかであった。実際、TIRAPペプチドは、野生型およびMyD88欠損DC両方において、LPSが誘導するB7.1およびB7.2分子の上方制御を無効にした (図6A)。しかし、該ペプチドは、CpGが誘導するDC成熟には、まったく影響を及ぼさなかった (図6A)。

40

【0136】

サイトカイン産生に対するTIRAPペプチドの影響を決定するため、LPSまたはCpGでの刺激前に、TIRAPペプチドを伴い、または伴わずに、DCを処理し (上述のとおり)、そしてIL-12およびIL-6の産生を測定した。TIRAPペプチドを添加すると、LPSでの刺激に応答したIL-12およびIL-6サイトカインの産生が阻害されたが、CpGでの刺激に応答する産生は阻害されなかった (図6B)。

【0137】

最後に、T細胞増殖に対するTIRAPペプチドの影響を評価した。LPSでの刺激前に

50

、T I R A P ペプチドを伴い、または伴わずに処理したD C による、C D 4 T 細胞増殖の刺激を、多様な濃度のE ペプチドの存在下で行った。1 H 3 . 1 T C R トランスジェニックT 細胞 (I - A に結合しているE ペプチドに特異的) とインキュベーションする前に、D C を固定した。4 8 時間培養の最後の2 4 時間、³ H - チミジン取り込みによって、増殖を測定した。野生型またはM y D 8 8 欠損マウスいずれか由来の、T I R A P ペプチドで処理したD C は、T 細胞増殖を誘導不能であった (図6 C)。これらのデータは、T I R A P がD C 成熟を誘導する経路を活性化可能であることを立証し、そしてT I R A P が、M y D 8 8 欠損D C において、L P S が誘導する成熟に関与することを示唆する。これらの結果が示すように、D C がL P S 刺激に応答して、サイトカインを産生し、同時刺激分子を上方制御し、そして未処置 (n a i v e) T 細胞をプライミングする能力 10
に対して、T I R A P が重要であるようである。

【0138】

(実施例 6)

T I R A P ノックアウトマウスの生成

ターゲティング構築物を作成するため、R T - P C R によって、7 . 4 k b のマウスT I R A P 遺伝子をクローニングし、そしてp E a s y F l o x ベクターにサブクローニングした。その後、当該技術分野において標準的な技術を用いて、p E a s y F l o x ベクター中で、7 3 0 b p コード配列の6 1 0 b p をコードする、マウスT I R A P 遺伝子の第二のエクソンをネオマイシンで置換した。3 . 7 k b の5 ' 隣接配列および3 . 1 k b の3 ' 隣接配列が、マウスT I R A P 遺伝子座での相同組換えを指示するというのが、 20
我々の現在の理解である。

【0139】

その後、エレクトロポレーションによって、胚性幹細胞にターゲティング構築物をトランスフェクションし、そしてG 4 1 8 およびガンシクロビルを用いて選択した。相同組換えによってターゲティング構築物を組み込んだクローンを同定するため、サザン解析によってクローンをスクリーニングした。その後、偽妊娠母に注入するため、2 つの陽性クローンを選択した。

【0140】

これらの注入クローンから、2 つの非常にキメラであるオスマウスが発生し、これをメス同腹仔と交配した。その後、サザン解析のため、仔から尾のD N A を得た。2 匹のマウス 30
から生殖系列伝達を得た。最後に、これらの2 匹のF 1 マウスを交配して、ホモ接合体T I R A P ノックアウトマウスを生成し、これは、期待されるメンデル頻度で生まれた。

【0141】

(実施例 7)

T L R リガンドへのT I R A P ノックアウトマウス細胞の曝露

図8 は、実施例6 に記載する方式で産生した、T I R A P ノックアウトマウス由来の細胞における、欠損B 細胞増殖を図式的に示す。野生型およびT I R A P ノックアウトマウスから、脾臓細胞を採取し、計数し、そして約1 0 0 , 0 0 0 細胞 / 1 0 0 m l で、9 6 ウェルプレートに蒔いた。L P S (2 0 μ g / m l 最終濃度から出発) およびB L P (3 0 0 n g / m l 最終濃度から出発) の連続希釈を、脾臓細胞に添加した。3 6 時間後、放射 40
性³ H チミジンを各ウェルに添加した。1 2 時間後、ベータ計測装置の使用によって、増殖中のB 細胞への³ H チミジンの取り込みを評価した。図8 に示す結果が示すように、細胞に取り込まれた³ H チミジン量、そしてしたがってB 細胞の増殖は、野生型マウス脾臓細胞に比較した際、T I R A P ノックアウトマウス脾臓細胞において、有意に減少した。

【0142】

図9 は、実施例6 に記載する方式で産生した、T I R A P ノックアウトマウス由来の樹状細胞によるサイトカイン産生を図式的に示す。野生型およびT I R A P ノックアウトマウスから、骨髓由来細胞を採取し、そして2 4 ウェルプレート中、G M - C S F を補った完全R P M I 中で、5 日間培養した。第5 日、細胞を計数し、そして約1 0 0 , 0 0 0 細胞 / m l で2 4 ウェルプレートに再度蒔き、そしてL P S (1 0 n g / m l) またはB L P 50

(100 ng/ml)で一晩刺激した。刺激の24時間後、ELISAのために上清を採取した。

【0143】

ELISA解析のため、適切な捕捉抗体、すなわちIL-6またはTNF- α でプレートをコーティングし、洗浄し、そしてその後、多様な試料由来の上清でコーティングした。一晩インキュベーションした後、上清を洗い流し、そして適切なビオチン・コンジュゲート化検出抗体を添加した。その後、ストレプトアビジン-HRPを添加し、その後、その基質を添加した。ELISAプレート読み取り装置を用いて、比色変化を監視した。それぞれの組換えサイトカインを用いて作成した標準と比較することによって、上清中のサイトカイン濃度の定量化を行った。図9に示す結果が示すように、樹状細胞によるサイトカイン産生量は、野生型マウス樹状細胞に比較した際、TIRAPノックアウトマウス樹状細胞で、有意に減少した。

10

【図面の簡単な説明】

【0144】

【図1】図1は、ヒトおよびマウスTIRAPの配列並列である。

【図2A】図2A~2Dを含んでなる図2は、TIRAPがTLR4シグナル伝達経路の構成要素であるが、IL-1Rシグナル伝達経路の構成要素でないことを立証する、一連のグラフである。y軸上、ルシフェラーゼ活性を倍誘導または相対光単位(RLU)として示す。x軸は、トランスフェクション構築物を示す：pcDNA3(対照ベクター)；TIRAP(全長TIRAPをコードする)；TIRAP-N(TIRAPのN末端ドメインをコードする)；TIRAP-C(TIRAPのC末端ドメインをコードする)；TIRAP-P125H(アミノ酸125に突然変異を含有するTIRAPをコードする)；CD4/TLR4(CD4の恒常的活性化型をコードする)；MyD88-DN(MyD88のドミナントネガティブ突然変異体をコードする)；IL-1R/AcP(IL-1受容体および受容体アクセサリタンパク質をコードする)；TLR9(全長TLR9をコードする)。構築物の下の陰影付きの三角形は、増加する量のその構築物を添加したことを示す。

20

【図2B】図2A~2Dを含んでなる図2は、TIRAPがTLR4シグナル伝達経路の構成要素であるが、IL-1Rシグナル伝達経路の構成要素でないことを立証する、一連のグラフである。y軸上、ルシフェラーゼ活性を倍誘導または相対光単位(RLU)として示す。x軸は、トランスフェクション構築物を示す：pcDNA3(対照ベクター)；TIRAP(全長TIRAPをコードする)；TIRAP-N(TIRAPのN末端ドメインをコードする)；TIRAP-C(TIRAPのC末端ドメインをコードする)；TIRAP-P125H(アミノ酸125に突然変異を含有するTIRAPをコードする)；CD4/TLR4(CD4の恒常的活性化型をコードする)；MyD88-DN(MyD88のドミナントネガティブ突然変異体をコードする)；IL-1R/AcP(IL-1受容体および受容体アクセサリタンパク質をコードする)；TLR9(全長TLR9をコードする)。構築物の下の陰影付きの三角形は、増加する量のその構築物を添加したことを示す。

30

【図2C】図2A~2Dを含んでなる図2は、TIRAPがTLR4シグナル伝達経路の構成要素であるが、IL-1Rシグナル伝達経路の構成要素でないことを立証する、一連のグラフである。y軸上、ルシフェラーゼ活性を倍誘導または相対光単位(RLU)として示す。x軸は、トランスフェクション構築物を示す：pcDNA3(対照ベクター)；TIRAP(全長TIRAPをコードする)；TIRAP-N(TIRAPのN末端ドメインをコードする)；TIRAP-C(TIRAPのC末端ドメインをコードする)；TIRAP-P125H(アミノ酸125に突然変異を含有するTIRAPをコードする)；CD4/TLR4(CD4の恒常的活性化型をコードする)；MyD88-DN(MyD88のドミナントネガティブ突然変異体をコードする)；IL-1R/AcP(IL-1受容体および受容体アクセサリタンパク質をコードする)；TLR9(全長TLR9をコードする)。構築物の下の陰影付きの三角形は、増加する量のその構築物を添加した

40

50

ことを示す。

【図 2 D】図 2 A ~ 2 D を含んでなる図 2 は、T I R A P が T L R 4 シグナル伝達経路の構成要素であるが、I L - 1 R シグナル伝達経路の構成要素でないことを立証する、一連のグラフである。y 軸上、ルシフェラーゼ活性を倍誘導または相対光単位 (R L U) とし示す。x 軸は、トランスフェクション構築物を示す：p c D N A 3 (対照ベクター) ; T I R A P (全長 T I R A P をコードする) ; T I R A P N (T I R A P の N 末端ドメインをコードする) ; T I R A P C (T I R A P の C 末端ドメインをコードする) ; T I R A P P 1 2 5 H (アミノ酸 1 2 5 に突然変異を含有する T I R A P をコードする) ; C D 4 / T L R 4 (C D 4 の恒常的活性化型をコードする) ; M y D 8 8 D N (M y D 8 8 のドミナントネガティブ突然変異体をコードする) ; I L - 1 R / A c P (I L - 1 受容体および受容体アクセサリタンパク質をコードする) ; T L R 9 (全長 T L R 9 をコードする) 。構築物の下の陰影付きの三角形は、増加する量のその構築物を添加したことを示す。

10

【図 3 A】図 3 A および 3 B を含んでなる図 3 は、T I R A P と T L R 4 および M y D 8 8 の同時免疫沈降を立証する、一对の免疫プロット画像である。示すように、各々、M y c、F l a g、または赤血球凝集素 (H A) タグをさらにコードする、T L R 4 の野生型部分 (T L R 4 w t)、その突然変異誘導体 (T L R 4 m u t)、野生型 T I R A P (T I R A P)、P 1 2 5 H 突然変異を含有する突然変異 T I R A P (T I R A P P H)、または野生型 M y D 8 8 (M y D 8 8) をコードする構築物の存在下 (+) または非存在下 (-) で、細胞にトランスフェクションした。免疫沈降 (I P) または免疫プロット (I B) に用いた抗体を、各プロットの左に示す。

20

【図 3 B】図 3 A および 3 B を含んでなる図 3 は、T I R A P と T L R 4 および M y D 8 8 の同時免疫沈降を立証する、一对の免疫プロット画像である。示すように、各々、M y c、F l a g、または赤血球凝集素 (H A) タグをさらにコードする、T L R 4 の野生型部分 (T L R 4 w t)、その突然変異誘導体 (T L R 4 m u t)、野生型 T I R A P (T I R A P)、P 1 2 5 H 突然変異を含有する突然変異 T I R A P (T I R A P P H)、または野生型 M y D 8 8 (M y D 8 8) をコードする構築物の存在下 (+) または非存在下 (-) で、細胞にトランスフェクションした。免疫沈降 (I P) または免疫プロット (I B) に用いた抗体を、各プロットの左に示す。

【図 4 A】図 4 A ~ 4 C を含んでなる図 4 は、P K R が T I R A P と同時免疫沈降し、そして P K R が L P S および C p G シグナル伝達経路の構成要素であることを立証する、一連の免疫プロット画像である。(A) 野生型 (W T) または M y D 8 8 欠損 (M y D 8 8 - / -) マウスいずれか由来の骨髓由来マクロファージを、L P S または C p G いずれかで、示す時間 (分) 刺激し、そしてリン酸化 P K R (P K R - P) を特異的に認識する抗体を用いて、免疫プロットを行った。(B および C) 示すように、F l a g タグ化 T I R A P をコードする構築物および P K R の H A タグ化キナーゼ死突然変異体 (H A P K R K D) または p 5 8 をコードする構築物いずれかを細胞にトランスフェクションした。免疫沈降 (I P) または免疫プロット (I B) に用いた抗体を、各プロットの左に示し、そして右の矢印は、示すタンパク質の位置を示す。

30

【図 4 B】図 4 A ~ 4 C を含んでなる図 4 は、P K R が T I R A P と同時免疫沈降し、そして P K R が L P S および C p G シグナル伝達経路の構成要素であることを立証する、一連の免疫プロット画像である。(A) 野生型 (W T) または M y D 8 8 欠損 (M y D 8 8 - / -) マウスいずれか由来の骨髓由来マクロファージを、L P S または C p G いずれかで、示す時間 (分) 刺激し、そしてリン酸化 P K R (P K R - P) を特異的に認識する抗体を用いて、免疫プロットを行った。(B および C) 示すように、F l a g タグ化 T I R A P をコードする構築物および P K R の H A タグ化キナーゼ死突然変異体 (H A P K R K D) または p 5 8 をコードする構築物いずれかを細胞にトランスフェクションした。免疫沈降 (I P) または免疫プロット (I B) に用いた抗体を、各プロットの左に示し、そして右の矢印は、示すタンパク質の位置を示す。

40

【図 4 C】図 4 A ~ 4 C を含んでなる図 4 は、P K R が T I R A P と同時免疫沈降し、そ

50

してP K RがL P SおよびC p Gシグナル伝達経路の構成要素であることを立証する、一連の免疫プロット画像である。(A)野生型(W T)またはM y D 8 8欠損(M y D 8 8^{-/-})マウスいずれかが由来の骨髓由来マクロファージを、L P SまたはC p Gいずれかで、示す時間(分)刺激し、そしてリン酸化P K R(P K R - P)を特異的に認識する抗体を用いて、免疫プロットを行った。(BおよびC)示すように、F l a gタグ化T I R A Pをコードする構築物およびP K RのH Aタグ化キナーゼ死突然変異体(H A P K R K D)またはp 5 8をコードする構築物いずれかを細胞にトランスフェクションした。免疫沈降(I P)または免疫プロット(I B)に用いた抗体を、各プロットの左に示し、そして右の矢印は、示すタンパク質の位置を示す。

【図5 A】図5 A ~ 5 Dを含んでなる図5は、T I R A Pによって、L P Sが誘導するN F - B活性化、P K Rリン酸化、およびJ N Kリン酸化の阻害が起こるが、C p Gが誘導するものの阻害が起きないことを示す、一連のプロットである。(A)T I R A PペプチドはL P Sが誘導するN F - B活性化を阻害したが、逆配列ペプチドは該活性化を阻害しなかった。T I R A Pまたは対照ペプチドいずれかで、1時間、前処理したR A W B細胞を、L P S(10 n g / m l)で5時間刺激した。試料は、2つ組で刺激した。(B)T I R A PペプチドでR A W細胞を前処理すると、L P Sが誘導するI B - 分解が遮断される。示すように、T I R A Pペプチドで前処理したR A W細胞を、示す時間、未刺激で放置するか、またはL P S(10 n g / m l)で刺激した。溶解物(30 μ g / 試料)をS D S - P A G Eで分離した後、抗I B - 抗体で免疫プロットしてI B - 分解を評価した。(C)T I R A Pペプチドは、L P Sが誘導するN F - B活性を阻害したが、C p Gが誘導する該活性は阻害しなかった。示すように、T I R A Pペプチドで前処理したR A W B細胞を、L P SまたはC p Gいずれかで刺激し、そしてレポーターアッセイのため採取した。(D)T I R A Pペプチドは、L P Sによって誘導されるP K RおよびJ N Kリン酸化を阻害したが、C p Gによって誘導されるものは阻害しなかった。示すように、未処理のR A W細胞、または40 μ MのT I R A Pペプチドで前処理したR A W細胞を、L P SまたはC p Gいずれかで刺激した。溶解物(30 μ g / 試料)をS D S - P A G Eによって、その後、リン酸化P K Rまたはリン酸化J N Kを特異的に認識する抗体で免疫プロットすることによって、解析した。

【図5 B】図5 A ~ 5 Dを含んでなる図5は、T I R A Pによって、L P Sが誘導するN F - B活性化、P K Rリン酸化、およびJ N Kリン酸化の阻害が起こるが、C p Gが誘導するものの阻害が起きないことを示す、一連のプロットである。(A)T I R A PペプチドはL P Sが誘導するN F - B活性化を阻害したが、逆配列ペプチドは該活性化を阻害しなかった。T I R A Pまたは対照ペプチドいずれかで、1時間、前処理したR A W B細胞を、L P S(10 n g / m l)で5時間刺激した。試料は、2つ組で刺激した。(B)T I R A PペプチドでR A W細胞を前処理すると、L P Sが誘導するI B - 分解が遮断される。示すように、T I R A Pペプチドで前処理したR A W細胞を、示す時間、未刺激で放置するか、またはL P S(10 n g / m l)で刺激した。溶解物(30 μ g / 試料)をS D S - P A G Eで分離した後、抗I B - 抗体で免疫プロットしてI B - 分解を評価した。(C)T I R A Pペプチドは、L P Sが誘導するN F - B活性を阻害したが、C p Gが誘導する該活性は阻害しなかった。示すように、T I R A Pペプチドで前処理したR A W B細胞を、L P SまたはC p Gいずれかで刺激し、そしてレポーターアッセイのため採取した。(D)T I R A Pペプチドは、L P Sによって誘導されるP K RおよびJ N Kリン酸化を阻害したが、C p Gによって誘導されるものは阻害しなかった。示すように、未処理のR A W細胞、または40 μ MのT I R A Pペプチドで前処理したR A W細胞を、L P SまたはC p Gいずれかで刺激した。溶解物(30 μ g / 試料)をS D S - P A G Eによって、その後、リン酸化P K Rまたはリン酸化J N Kを特異的に認識する抗体で免疫プロットすることによって、解析した。

【図5 C】図5 A ~ 5 Dを含んでなる図5は、T I R A Pによって、L P Sが誘導するN F - B活性化、P K Rリン酸化、およびJ N Kリン酸化の阻害が起こるが、C p Gが誘導するものの阻害が起きないことを示す、一連のプロットである。(A)T I R A Pペ

チドはLPSが誘導するNF- κ B活性化を阻害したが、逆配列ペプチドは該活性化を阻害しなかった。TIRAPまたは対照ペプチドいずれかで、1時間、前処理したRAW B細胞を、LPS(10 ng/ml)で5時間刺激した。試料は、2つ組で刺激した。(B)TIRAPペプチドでRAW細胞を前処理すると、LPSが誘導するI κ B-分解が遮断される。示すように、TIRAPペプチドで前処理したRAW細胞を、示す時間、未刺激で放置するか、またはLPS(10 ng/ml)で刺激した。溶解物(30 μ g/試料)をSDS-PAGEで分離した後、抗I κ B-抗体で免疫ブロットしてI κ B-分解を評価した。(C)TIRAPペプチドは、LPSが誘導するNF- κ B活性を阻害したが、CpGが誘導する該活性は阻害しなかった。示すように、TIRAPペプチドで前処理したRAW B細胞を、LPSまたはCpGいずれかで刺激し、そしてレポーターアッセイのため採取した。(D)TIRAPペプチドは、LPSによって誘導されるPKRおよびJNKリン酸化を阻害したが、CpGによって誘導されるものは阻害しなかった。示すように、未処理のRAW細胞、または40 μ MのTIRAPペプチドで前処理したRAW細胞を、LPSまたはCpGいずれかで刺激した。溶解物(30 μ g/試料)をSDS-PAGEによって、その後、リン酸化PKRまたはリン酸化JNKを特異的に認識する抗体で免疫ブロットすることによって、解析した。

【図5D】図5A~5Dを含んでなる図5は、TIRAPによって、LPSが誘導するNF- κ B活性化、PKRリン酸化、およびJNKリン酸化の阻害が起こるが、CpGが誘導するものの阻害が起きないことを示す、一連のブロットである。(A)TIRAPペプチドはLPSが誘導するNF- κ B活性化を阻害したが、逆配列ペプチドは該活性化を阻害しなかった。TIRAPまたは対照ペプチドいずれかで、1時間、前処理したRAW B細胞を、LPS(10 ng/ml)で5時間刺激した。試料は、2つ組で刺激した。(B)TIRAPペプチドでRAW細胞を前処理すると、LPSが誘導するI κ B-分解が遮断される。示すように、TIRAPペプチドで前処理したRAW細胞を、示す時間、未刺激で放置するか、またはLPS(10 ng/ml)で刺激した。溶解物(30 μ g/試料)をSDS-PAGEで分離した後、抗I κ B-抗体で免疫ブロットしてI κ B-分解を評価した。(C)TIRAPペプチドは、LPSが誘導するNF- κ B活性を阻害したが、CpGが誘導する該活性は阻害しなかった。示すように、TIRAPペプチドで前処理したRAW B細胞を、LPSまたはCpGいずれかで刺激し、そしてレポーターアッセイのため採取した。(D)TIRAPペプチドは、LPSによって誘導されるPKRおよびJNKリン酸化を阻害したが、CpGによって誘導されるものは阻害しなかった。示すように、未処理のRAW細胞、または40 μ MのTIRAPペプチドで前処理したRAW細胞を、LPSまたはCpGいずれかで刺激した。溶解物(30 μ g/試料)をSDS-PAGEによって、その後、リン酸化PKRまたはリン酸化JNKを特異的に認識する抗体で免疫ブロットすることによって、解析した。

【図6A】図6A~6Cを含んでなる図6は、TIRAPが樹状細胞成熟を誘導することを示す、一連のグラフである。(A)野生型およびMyD88^{-/-}樹状細胞(DC)をLPSまたはCpGで誘導し、そしてフローサイトメトリーを用いて、同時刺激分子B7.1およびB7.1の発現に関して解析した。(B)TIRAPペプチドの存在下または非存在下で、未処理の細胞(なし)、またはLPSもしくはCpGで処理した細胞において、サイトカインIL-12およびIL-6の産生を測定した。(C)未処理の野生型DC(なし)、LPSのみで処理したもの(LPS)、または増加する量のTIRAPペプチドの存在下、LPSで処理したもの(LPS+TIRAPペプチド)において、T細胞増殖を測定した。cpm $\times 10^3$ として示す、細胞への³H-チミジンの取り込みによって、T細胞増殖を測定した。

【図6B】図6A~6Cを含んでなる図6は、TIRAPが樹状細胞成熟を誘導することを示す、一連のグラフである。(A)野生型およびMyD88^{-/-}樹状細胞(DC)をLPSまたはCpGで誘導し、そしてフローサイトメトリーを用いて、同時刺激分子B7.1およびB7.1の発現に関して解析した。(B)TIRAPペプチドの存在下または非存在下で、未処理の細胞(なし)、またはLPSもしくはCpGで処理した細胞におい

て、サイトカイン I L - 1 2 および I L - 6 の産生を測定した。(C) 未処理の野生型 D C (なし)、L P S のみで処理したもの (L P S)、または増加する量の T I R A P ペプチドの存在下、L P S で処理したもの (L P S + T I R A P ペプチド) において、T 細胞増殖を測定した。c p m $\times 10^3$ として示す、細胞への ^3H - チミジンの取り込みによって、T 細胞増殖を測定した。

【図 6 C】図 6 A ~ 6 C を含んでなる図 6 は、T I R A P が樹状細胞成熟を誘導することを示す、一連のグラフである。(A) 野生型および M y D 8 8 $^{-/-}$ 樹状細胞 (D C) を L P S または C p G で誘導し、そしてフローサイトメトリーを用いて、同時刺激分子 B 7 . 1 および B 7 . 1 の発現に関して解析した。(B) T I R A P ペプチドの存在下または非存在下で、未処理の細胞 (なし)、または L P S もしくは C p G で処理した細胞において、サイトカイン I L - 1 2 および I L - 6 の産生を測定した。(C) 未処理の野生型 D C (なし)、L P S のみで処理したもの (L P S)、または増加する量の T I R A P ペプチドの存在下、L P S で処理したもの (L P S + T I R A P ペプチド) において、T 細胞増殖を測定した。c p m $\times 10^3$ として示す、細胞への ^3H - チミジンの取り込みによって、T 細胞増殖を測定した。

【図 7】図 7 は、T I R A P および阻害性 T I R A P ペプチドの機能に関する提唱される機構を示す図である。水平の黒線は、細胞外空間 (線の上) を細胞内空間 (線の下) と区別する。T L R 4、T I R A P、M y D 8 8、および阻害性 T I R A P ペプチドを図式的に示す。実線の矢印は、示すタンパク質 (N F - κ B、A P - 1、および p 3 8) の活性化を示し、一方、点線は、これらのタンパク質の活性化が阻害されることを示す。

【図 8】図 8 は、 ^3H チミジンに曝露された、T I R A P ノックアウトマウス由来の細胞における、不十分な B 細胞増殖を図式的に示す。白抜き正方形および黒いひし形は、それぞれ、T I R A P ノックアウトマウス K 0 1 および K 0 2 からの結果を示し、そして白抜き三角形は、野生型 (W T) 対照を表す。B 細胞増殖の測定値として、ベータ放射カウンタは、時間に渡る放射能放出数を計測することによって、B 細胞に取り込まれた ^3H チミジン量を測定した。

【図 9】図 9 は、T I R A P ノックアウトマウス由来の樹状細胞による不十分なサイトカイン産生を図式的に示す。黒いバーおよびストライプのバーは、それぞれ、T I R A P ノックアウトマウス K 0 1 および K 0 2 からの結果を示し、そして白抜きのバーは、野生型 (W T) 対照を表す。サイトカイン産生の測定値として、B 細胞を L P S および B L P で刺激し、そして I L - 6 および T N F - α 捕捉抗体、並びに適切なビオチンコンジュゲート化検出抗体を用いた E L I S A のため採取した。

【 図 2 A 】

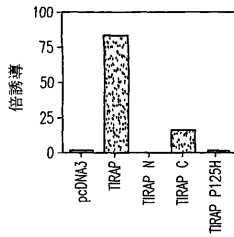


FIG. 2A

【 図 2 B 】

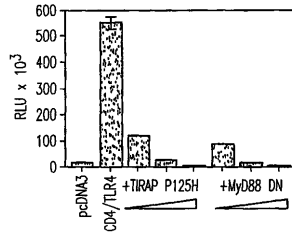


FIG. 2B

【 図 2 C 】

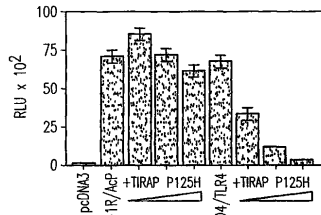


FIG. 2C

【 図 5 A 】

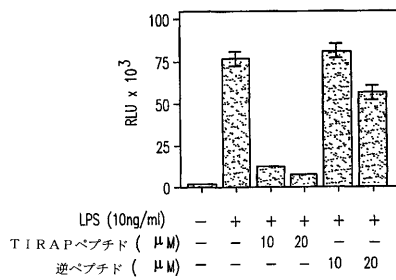


FIG. 5A

【 図 5 B 】

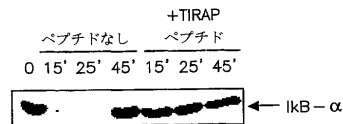


FIG. 5B

【 図 5 C 】

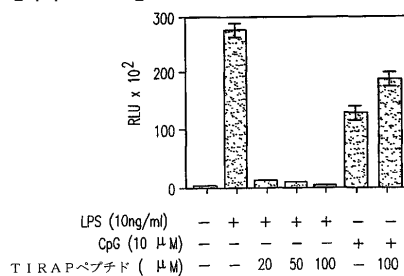


FIG. 5C

【 図 2 D 】

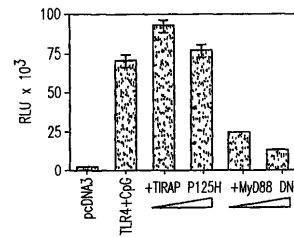


FIG. 2D

【 図 4 A 】

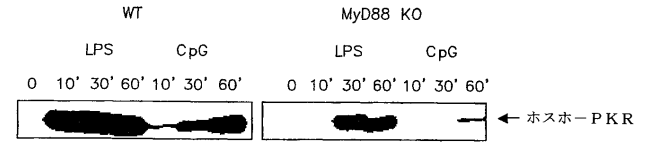


FIG. 4A

【 図 4 C 】

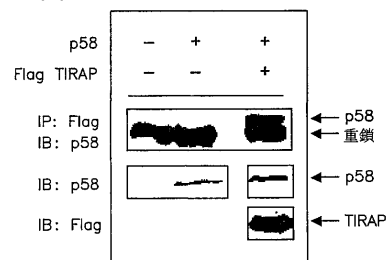


FIG. 4C

【 図 5 D 】

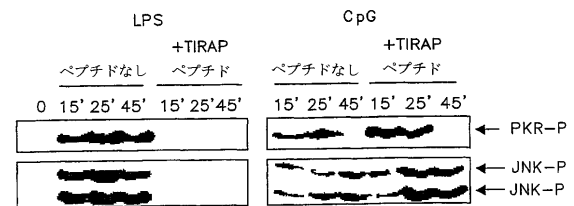


FIG. 5D

【図 6 A】

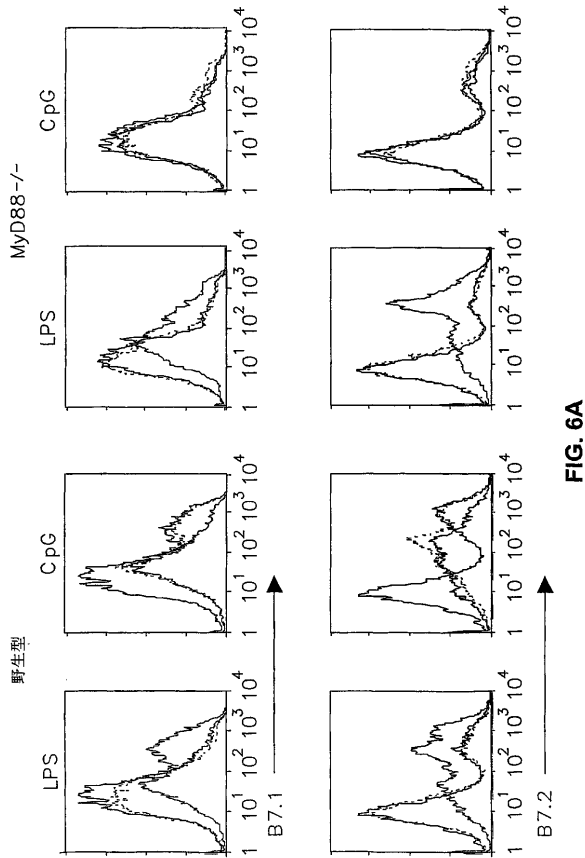


FIG. 6A

【図 6 B】

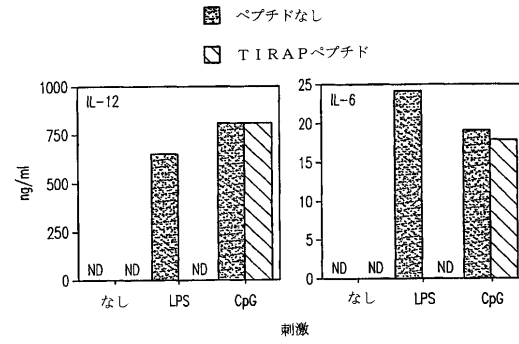


FIG. 6B

【図 6 C】

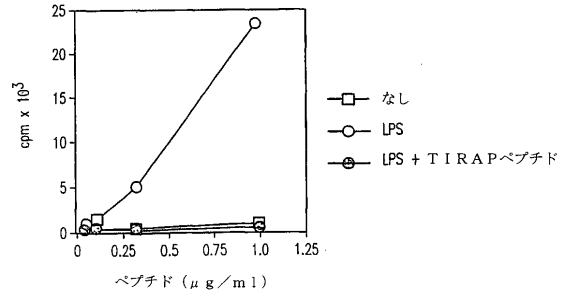
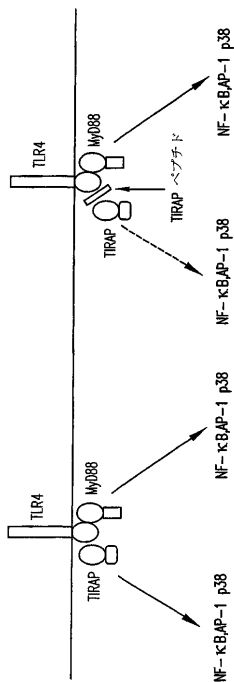
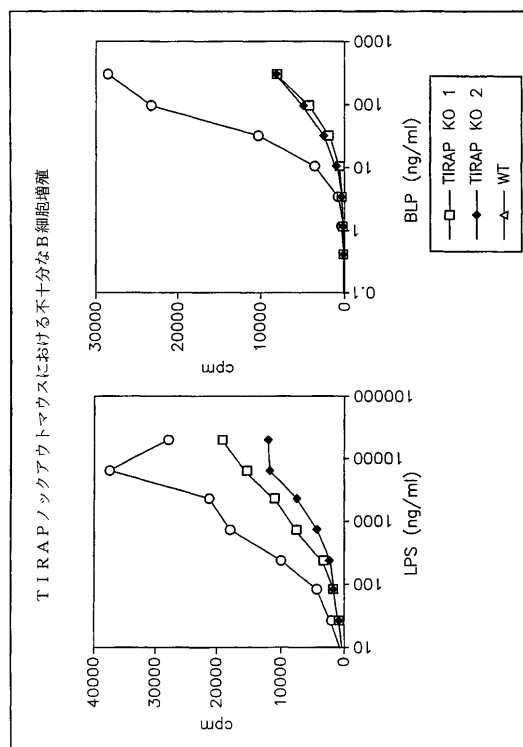


FIG. 6C

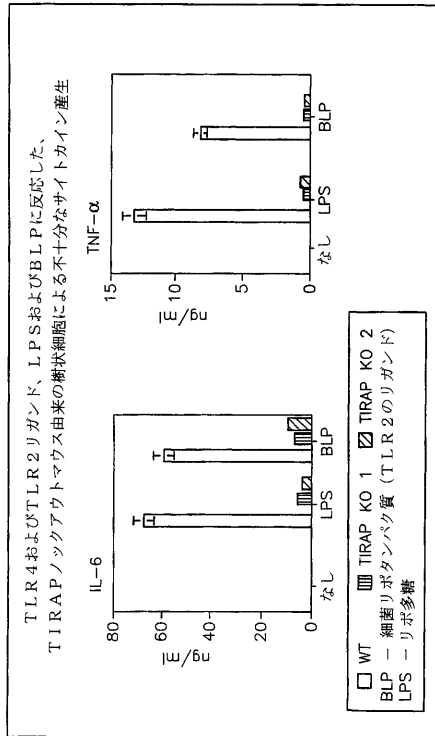
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/090520 A2

- (51) International Patent Classification: C12N (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/US02/14915
- (22) International Filing Date: 9 May 2002 (09.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/289,738 9 May 2001 (09.05.2001) US
60/289,815 9 May 2001 (09.05.2001) US
60/289,866 29 August 2001 (29.08.2001) US
10/011,398 19 March 2002 (19.03.2002) US
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant: YALE UNIVERSITY [US/US]; 451 College Street, New Haven, CT 06520 (US).
- (72) Inventors: MEDZHITOV, Ruslan; 310 Cedar Street, New Haven, CT 06520-8011 (US). HORNG, Tiffany; 100H Howe Street, Apt. 412, New Haven, CT 06511 (US). BARTON, Gregory; 62 Woodbine Street, Hamden, CT 06517 (US).
- (74) Agents: HALLIDAY, Christopher, L. et al.; Morgan, Lewis & Bockius LLP, 1701 Market Street, Philadelphia, PA 19103 (US).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: TOLL-INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ADAPTOR PROTEIN (TIRAP)

h TIRAP 1 M A S S T S L P A P G S R P K K P L G K M A D W F R Q T L L K K P K K R N S P 40
m TIRAP 1 M A S S S S V R A S S S P S K K P R D Q A D W T K Q A L L K K P K K M P T S Q 40

h TIRAP 41 E S T S S D A S G P T S Q D - - - - L P E S L S S V T E - - - - - 55
m TIRAP 41 E S H L Y S C S Q T A T Q D G L S P S S C S S P P S H S S P E S S P S S C S S 55

h TIRAP 67 - - - E Q L P P T H A S D S G S L R W S W D Y D Y C W C H S E S D L Y A A 100
m TIRAP 67 S G M S P T S P T M V D S S S S G R W S W D Y D Y G V U H S E E Q C E A A 100

h TIRAP 101 G D L W S Y L L G S I A S L R C F L D L R D A A R G A T N G L L C Q A L L S S 140
m TIRAP 101 G E V S Y L L G S D I A S L R C F L D L R D A A P G A L V S E L L C G A L L S S 140

h TIRAP 141 H C R V L C T P G F L D R W C K Y Q M L G A L T E A P G A E G C T I P L L S 180
m TIRAP 141 H C R V P L C T P G F L R D P W C K Y Q M L G A L T E A P A S E G C T I P L L S 180

h TIRAP 181 G L S R A A Y P P E L R F M Y Y V D G R G P D G D F R S V K E A V M R C K L L Q 220
m TIRAP 201 G L S R A A Y P P E C R F M Y Y V D G R G P D G D T Y D Z K E A V I H Y L E T L 240

h TIRAP 221 E G C G E R D S A T V S D L L 221
m TIRAP 241 S 241

(57) Abstract: TIRAP polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing TIRAP polypeptides and polynucleotides in therapy, and diagnostic assays for such.

WO 02/090520 A2

WO 02/090520

PCT/US02/14915

Toll/Interleukin-1 Receptor Adapter Protein (TIRAP)

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 The drug discovery process is currently undergoing a fundamental revolution as it embraces "functional genomics," that is, high throughput genome- or gene-based biology. This approach is rapidly superceding earlier approaches based on positional cloning. A phenotype, that is a biological function or genetic disease, would be identified and this would then be tracked back to the responsible gene, based on its genetic map position.

10 Functional genomics relies heavily on the various tools of bioinformatics to identify gene sequences of potential interest from the many molecular biology databases now available. There is a continuing need to identify and characterize further genes and their related polypeptides/proteins, as targets for drug discovery with the potential for affecting immune response.

15 The strategy of innate immune recognition is based on the detection of constitutive and conserved products of microbial metabolism. Many metabolic pathways and individual gene products are unique to microorganisms and absent from host cells. Although these targets of recognition are not absolutely identical between different species of microbes, the gene products may be found in the context of a common molecular pattern, which is typically highly conserved and invariant among microbes of a given class. Because the targets of innate immune recognition are conserved molecular patterns, they are called pathogen associated molecular patterns (PAMPs).

25 The recent discovery and characterization of the Toll-like receptor (TLR) family have incited new interest in the field of innate immunity. TLRs are pattern recognition receptors that have a unique and critical function in animal immunity. TLRs typically are transmembrane receptors characterized by an extracellular leucine rich repeats domain and an intracellular TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor) domain. The TIR domain is a conserved protein-protein interaction module and plays a role in host defense. In other words, TLRs play a critical role in microbial recognition and control of adaptive immune responses.

30

WO 02/090520

PCT/US02/14915

In mammalian species, there are at least ten (10) TLRs, and each has a distinct function in innate immune recognition. The TLRs mainly differ from one another with regard to ligand specificity, the use of accessory molecules, expression profiles and differences in signal transduction pathways.

5 Human TLR4 was the first identified and functionally characterized mammalian Toll. TLR4 functions as the signal transducing receptor for the PAMP lipopolysaccharide (LPS) as well as other PAMPs, which are apparent to one skilled in the art.

10 Activation of signal transduction pathways by TLRs leads to the induction of a variety of genes that function in host defense including inflammatory cytokines, chemokines, MHC and co-stimulatory molecules. Mammalian TLRs also induce multiple effector molecules such as inducible nitric oxide synthetase and antimicrobial peptides that can directly destroy microbial pathogens.

The signaling pathway, which appears to be shared by all members
15 of the Toll and Interleukin-1 Receptor (IL-1R) families, includes four essential components: the adapters TRAF6, MyD88 and Tollip and a protein kinase, IRAK. MyD88 contains two protein interaction domains: an N-terminal death domain and a C-terminal TIR domain. The TIR domain of MyD88 associates with the TIR domain of TLR and the IL-1R, while the death domain interacts with the death
20 domain of IRAK.

In cells wherein MyD88 expression has been suppressed (i.e. in MyD88 knockout mice), macrophages and dendritic cells do not produce cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-12 when stimulated with LPS, MALP-2 or CpG, which signal through TLR4, TLR2 and TLR9, respectively. Consequently, MyD88
25 knockout mice are resistant to endotoxic shock. Furthermore, when normal bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) are stimulated with LPS or CpG, they produce large amounts of IL-12 and upregulate cell surface expression of MHC and co-stimulatory molecules. However, in MyD88 deficient BMDCs, stimulation with LPS or CpG does not produce IL12 or IL-6.

30 Additionally, RNA-dependent protein kinase (PKR)-deficient cells fail to activate c-Jun N-terminal Kinase (JNK) and p38 MAP Kinase (p38) in response to LPS stimulation. As TLR4 is required for signals downstream of LPS,

WO 02/090520

PCT/US02/14915

this indicates that PKR is a component of the TLR4 signaling pathway. Although phosphorylated PKR can be detected in LPS stimulated wild-type macrophages, phosphorylated PKR has also been detected in LPS stimulated MyD88-deficient macrophages. Interestingly, PKR from the MyD88-deficient macrophages was
5 activated with slower kinetics.

Although some cellular responses are completely abolished in MyD88-deficient cells, TLR4, but not TLR9 or TLR2, can still activate NF- κ B and MAP kinases. This difference indicates that another adapter protein exists that can mediate MyD88-independent signaling in response to TLR4 ligation.

10 Thus, there is a need to determine the structure and function of the adapter protein involved in the MyD88 independent signaling downstream of TLR4 to develop compounds to treat diseases related to TLR4 function.

SUMMARY OF THE INVENTION

15 The present invention relates to Toll Interleukin-1 Receptor Adapter Proteins (TIRAPs), and in particular TIRAP polypeptides and TIRAP polynucleotides, recombinant materials and methods for their production. In yet a further aspect, the present invention relates to TIRAP inhibitors. In another aspect, the invention relates to methods for using such polypeptides and polynucleotides,
20 including the treatment of inflammation and inducing or affecting immune response. In a further aspect, the invention relates to methods for identifying agonists and antagonists/inhibitors using the materials provided by the invention, and treating conditions associated with TIRAP imbalance with the identified compounds. In yet a further aspect, the invention relates to transgenic mammals
25 comprising TIRAP polynucleotides.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a sequence alignment of human and mouse TIRAP.

Figure 2, comprising Figures 2A through 2D, is a series of graphs
30 which demonstrate that TIRAP is a component of the TLR4 signaling pathway, but not of the IL-1R signaling pathway. On the y axis, luciferase activity is expressed

WO 02/090520

PCT/US02/14915

as fold induction or relative light units (RLU). The x axis shows the transfected constructs: pcDNA3 (control vector); TIRAP (encodes full length TIRAP); TIRAP N (encodes N-terminal domain of TIRAP); TIRAP C (encodes C-terminal domain of TIRAP); TIRAP P125H (encodes TIRAP containing mutation at amino acid 125); CD4/TLR4 (encodes constitutively active form of CD4); MyD88 DN (encodes dominant negative mutant of MyD88); IL-1R/AcP (encodes IL-1 receptor and receptor accessory protein); TLR9 (encodes full length TLR9). Shaded triangles below the constructs indicate that increasing amounts of that construct was added.

Figure 3, comprising Figures 3A and 3B, is a pair of images of immunoblots demonstrating co-immunoprecipitation of TIRAP with TLR4 and MyD88. Cells were transfected in the presence (+) or absence (-) of constructs encoding a wild-type portion of TLR4 (TLR4 wt), a mutant derivative thereof (TLR4 mut), wild-type TIRAP (TIRAP), a mutant TIRAP containing a P125H mutation (TIRAP PH), or wild-type MyD88 (MyD88), wherein each construct further encodes a Myc, Flag, or hemagglutinin (HA) tag, as indicated. Antibodies used for immunoprecipitation (IP) or immunoblot (IB) are indicated to the left of each blot.

Figure 4, comprising Figures 4A through 4C, is a series of images of immunoblots demonstrating that PKR co-immunoprecipitates with TIRAP and is a component of LPS and CpG-signaling pathways. (A) Bone marrow-derived macrophages from either wild-type (WT) or MyD88-deficient (*MyD88^{-/-}*) mice were stimulated for the indicated time periods (minutes) with either LPS or CpG, and immunoblots were performed using an antibody that specifically recognizes phosphorylated PKR (PKR-P). B and C Cells were transfected with constructs encoding Flag-tagged TIRAP and either a construct encoding an HA-tagged kinase dead mutant of PKR (HA PKR KD) or p58, as indicated. Antibodies used for immunoprecipitation (IP) or immunoblot (IB) are indicated to the left of each blot, and arrows on the right show the location of the indicated proteins.

Figure 5, comprising Figures 5A through 5D, is a series of blots depicting inhibition of LPS- but not CpG-induced NF- κ B activation, PKR phosphorylation, and JNK phosphorylation by TIRAP. (A) TIRAP peptide, but not a reverse sequence peptide, inhibited LPS-induced NF- κ B activation. RAW κ B

WO 02/090520

PCT/US02/14915

cells pretreated for 1h with either the TIRAP or control peptide were stimulated with LPS (10 ng/ml) for 5h. Samples were stimulated in duplicate. (B) Pretreatment of RAW cells with TIRAP peptide blocks LPS-induced IκB-α degradation. RAW cells pretreated with the TIRAP peptide as indicated were either

5 left unstimulated or stimulated with LPS (10 ng/ml) for the indicated time periods. Lysates (30 μg/sample) were resolved by SDS-PAGE followed by immunoblotting with an anti- IκB-α antibody to assess IκB-α degradation. (C) TIRAP peptide inhibited LPS- but not CpG-induced NF-κB activity. RAW κB cells pretreated with the TIRAP peptide as indicated were stimulated with either LPS or CpG and

10 harvested for reporter assay. (D) TIRAP peptide inhibited PKR and JNK phosphorylation induced by LPS but not CpG. RAW cells either untreated or pretreated with 40 μM of the TIRAP peptide were stimulated with either LPS or CpG as indicated. Lysates (30 μg/sample) were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with antibodies that specifically recognize phosphorylated PKR

15 or phosphorylated JNK.

Figure 6, comprising Figure 6A through 6C, is a series of graphs indicating that TIRAP induces dendritic cell maturation. (A) Wild-type and MyD88^{-/-} dendritic cells (DCs) were induced with LPS or CpG and analyzed for expression of the costimulatory molecules B7.1 and B7.1 using flow cytometry.

20 (B) Production of the cytokines, IL-12 and IL-6, was measured in cells that were untreated (none) or treated with LPS or CpG in the presence or absence of TIRAP peptide. (C) T cell proliferation was measured in wild-type DCs that were untreated (none), treated with LPS alone (LPS), or treated with LPS in the presence of increasing amounts of TIRAP peptide (LPS+TIRAP peptide). T cell

25 proliferation was measured by incorporation of ³H-thymidine into cells, expressed as cpm x 10³.

Figure 7 is a diagram depicting a proposed mechanism for the function of TIRAP and an inhibitory TIRAP peptide. The horizontal black line differentiates the extracellular space (above the line) from the intracellular space

30 (below the line). TLR4, TIRAP, MyD88, and an inhibitory TIRAP peptide are shown schematically. Solid arrows indicate activation of the indicated proteins (NF-κB, AP-1, and p38), whereas a dotted line indicates that activation of these proteins is inhibited.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

Figure 8 graphically represents deficient B cell proliferation in cells from TIRAP knock-out mice which were exposed to 3H thymidine. The open square and black diamond denote the results from TIRAP knock-out mice K01 and K02, respectively, and the open triangle represents a wild-type (WT) control. As a measure of B cell proliferation, a beta radiation counter determined the amount 3H thymidine incorporated into B cells by counting the number of radioactive emissions over time.

Figure 9 graphically represents deficient cytokine production by dendritic cells from TIRAP knock-out mice. The black and striped bars denote the results from TIRAP knock-out mice K01 and K02, respectively, and the open bar represents a wild-type (WT) control. As a measure of cytokine production, B cells were stimulated with LPS and BLP and harvested for ELISA, using IL-6 and TNF- α capture antibodies and appropriate biotin-conjugated detection antibodies.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

As described briefly above, some cellular responses are completely abolished in MyD88-deficient cells, yet TLR4, but not TLR9 or TLR2, can still activate NF- κ B and MAP kinases. Specifically, a detailed analysis of the NF- κ B and MAP signaling pathways demonstrates that the pathogen associated molecular pattern (PAMP) LPS, but not CpG or MALP-2, induces activation of NF- κ B, JNK, p38 and ERK in MyD88 deficient cells. Activation of these signaling pathways occurred with delayed kinetics and was insufficient for the induction of cytokine gene expression.

Furthermore, MyD88 deficient BMDCs stimulated with LPS or CpG do not produce IL-12 or IL-6. However, BMDCs can be induced to upregulate expression of MHC and co-stimulatory molecules (such as CD80 and CD86), when treated with LPS, but not when stimulated with CpG. This result demonstrates that a MyD88 independent signaling pathway is sufficient for dendritic cell maturation, whereas the MyD88-dependent signaling pathway is required for the induction of cytokines IL-6 and IL-12. In addition, caspase-1 processing of Interleukin-18 into its biologically active form can be induced by TLR4, independently of MyD88.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

These differences indicate that another adapter protein exists that can mediate MyD88-independent signaling in response to TLR4 ligation. As used herein, the adapter protein that mediates MyD88 independent signaling in response to TLR4 ligation will be referred to as "TIRAP" (Toll/Interleukin-1 Receptor Adapter Protein).

In particular, polypeptides of the present invention include isolated polypeptides encoded by the human and mouse polynucleotides comprising the sequences set forth in SEQ ID NO:1 and 2, respectively. Polypeptides of the present invention are believed to be members of the Toll/Interleukin-1 Receptor Adapter Protein family including MyD88. This gene is therefore of interest because it presents an alternative mechanism to induce or inhibit dendritic cell maturation as well as activation of NF- κ B, JNK, p38 and ERK in cells.

As one of skill in the art understands, TLR4 is involved in numerous physiological responses, including infection and cell damage. For example, as indicated above TLR4 recognizes the PAMP LPS. TLR4 has also been implicated in inflammation responses, and in particular cellular necrosis induced inflammation. Accordingly, the discovery and characterization of molecules that affect and/or are involved in the signal pathways of TLR4 is important for the development of effective treatments for the above-described conditions as well as other conditions which will be appreciated by one of skill in the art.

TIRAP and TIRAP Inhibitor Polynucleotides and Polypeptides Generally

In a first aspect, the present invention relates to TIRAP polynucleotides and TIRAP polypeptides. Specifically, the polynucleotides set forth in SEQ ID NO:1 and 2 encode the polypeptides set forth in SEQ ID NO:3 (human) and 4 (mouse), respectively, which comprise the Toll Interleukin-1 Receptor Adapter Protein of the present invention. The human and mouse polynucleotides encoding TIRAP are highly homologous (See Figure 1). Specifically, in one embodiment, a comparison of human and mouse TIRAP polynucleotides and polypeptides indicates at least 73% identity at the protein level and 83% identity at the polynucleotide level. Thus it will be understood, based on the present disclosure, that both human and mouse TIRAP polynucleotides and the polypeptides encoded thereby can be used for similar purposes, as described herein.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

The polynucleotides and polypeptides set forth in SEQ ID NOS: 1-4 are the full length TIRAP molecules and are hereinafter referred to generally as TIRAP or TIRAP polynucleotides, TIRAP peptides and TIRAP polypeptides. Unless otherwise specified, "TIRAP" is synonymous with "TIRAP polypeptide," and is

5 meant to refer to the Toll Interleukin-1 Receptor Adapter Protein and other polypeptides that have the same biological function, i.e., that modulate MyD88 independent signaling in response to their activation. The properties of the polypeptides set forth in SEQ ID NO:3 and 4 are also hereinafter referred to as "TIRAP activity" or "TIRAP polypeptide activity" or "biological activity of

10 TIRAP," as explained below.

Preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention having homology to TIRAP polynucleotides and polypeptides as explained below, are expected to have similar biological functions/properties to TIRAP polypeptides and polynucleotides. Specifically, preferred TIRAP polypeptides of the present

15 invention have TIRAP activity in that they can bind to the TIRAP binding domain of TLR4. Such TIRAP polypeptides are therefore useful for drug screening, e.g., as described below. the TIRAP polypeptides of the invention also include such polypeptides that, upon activation of TLR4, signal a MyD88 independent response, e.g., activation of NF- κ B and MAP kinases.

20 The characterization of the TIRAP polypeptide and the polynucleotide encoding the TIRAP polypeptide has led to the discovery of compounds that inhibit both the MyD88 independent pathway as well as the MyD88 dependent pathway of TLR4 by inhibiting TIRAP polypeptide mediated signaling. Such compounds that inhibit TIRAP activity are useful to prevent or

25 reduce inflammation and septic shock, and in particular to assist in the prevention of graft rejection, which occurs, at least in part, because of cellular necrosis induced inflammation.

Therefore, in a second aspect, the present invention relates to TIRAP inhibitors. Specifically, the polypeptides set forth in SEQ ID NOS: 9 and 10 are

30 human and mouse, respectively, TIRAP inhibitor polypeptides. These polypeptides are referred to herein as TIRAP inhibitors or TIRAP mutant peptides or TIRAP inhibitor polypeptides. The properties of each of the TIRAP inhibitors are hereinafter referred to as "TIRAP inhibitor activity." The polynucleotide set forth

WO 02/090520

PCT/US02/14915

in sequences SEQ ID NO: 5 (naturally occurring) and SEQ ID NO: 6 (degenerate) encode the human TIRAP inhibitor polypeptide set forth in SEQ ID NO: 9, and the polynucleotide set forth in sequences SEQ ID NO: 7 (naturally occurring) and SEQ ID NO: 8 (degenerate) encode the mouse TIRAP inhibitor polypeptide set forth in
 5 SEQ ID NO: 10. The SEQ ID NOS: 5-8 are referred to as TIRAP inhibitor polynucleotides and the sequences set forth in SEQ ID NOS: 9 and 10 are referred to as TIRAP inhibitor polypeptides.

Preferred inhibitor polypeptides and inhibitor polynucleotides of the present invention, having homology to TIRAP inhibitor polypeptides and
 10 polynucleotides as explained further below, are expected to have similar biological functions/properties to TIRAP inhibitor polypeptides and polynucleotides. As used herein, preferred TIRAP inhibitor polypeptides of the present invention have TIRAP inhibitor activity in that they can, notwithstanding activation of TLR4, inhibit both the MyD88 independent response, e.g., activation of NF- κ B and MAP
 15 kinases and the MyD88 dependent response in cells expressing TLR4, as described in more detail below.

Lastly, SEQ ID NO: 11 is a functional example of a fusion protein of Antennapedia and a TIRAP inhibitor polypeptide. Specifically, SEQ ID NO: 11 is a fusion protein of Antennapedia and the TIRAP inhibitor set forth in SEQ ID
 20 NO: 10. Because the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 11 also inhibits TIRAP activity, the properties of the TIRAP inhibitor fusion protein are also referred to as "TIRAP inhibitor activity." This particular embodiment is described in more detail below under the heading "Fusion Proteins."

The Structure of Polypeptides and Polynucleotides of the Present Invention

25 The polypeptides of the present invention may be in the form of the "mature" protein or may be a part of a conjugated protein such as a fusion protein, e.g., SEQ ID NO: 11, as described below under "Fusion Proteins." It is often advantageous to include an additional amino acid sequence which contains secretory or leader sequences, pro-sequences, sequences which aid in purification
 30 such as multiple histidine residues, or an additional sequence for stability during recombinant production.

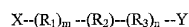
WO 02/090520

PCT/US02/14915

The present invention also includes variants of the aforementioned polypeptides, that is polypeptides that vary from the reference polypeptide by conservative amino acid substitutions, whereby a residue is substituted by another with like characteristics. Typical such substitutions are among Ala, Val, Leu and Ile; among Ser and Thr; among the acidic residues Asp and Glu; among Asn and Gln; and among the basic residues Lys and Arg; or aromatic residues Phe and Tyr. Particularly preferred are variants in which several, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 or 1 amino acids are substituted, deleted, or added in any combination.

Such polypeptides include isolated polypeptides comprising an amino acid sequence which has at least 70% identity, preferably at least 80% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, most preferably at least 97-99% identity, to that of SEQ ID NOS: 3, 4, 9, 10 and 11 over the entire length of SEQ ID NOS: 3, 4, 9, 10 and 11. Such polypeptides include a polypeptide comprising the polypeptide set forth in SEQ ID NOS: 3, 4, 9, 10 and 11, as well as a polypeptide consisting of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 3, 4, 9, 10 and 11.

The invention also includes a polypeptide consisting of or comprising a polypeptide of the formula:



wherein, at the amino terminus, X is hydrogen, a metal or any other moiety described herein for modified polypeptides, and at the carboxyl terminus, Y is hydrogen, a metal or any other moiety for modified polypeptides, including the modifications described below, R_1 and R_3 are any amino acid residue or modified amino acid residue, m is an integer between 1 and 1000 or zero, n is an integer between 1 and 1000 or zero, and R_2 is an amino acid sequence of the invention or modified forms thereof, as described above. In the formula above, R_2 is oriented so that its amino terminal amino acid residue is at the left, covalently bound to R_1 , and its carboxy terminal amino acid residue is at the right, covalently bound to R_3 . Any stretch of amino acid residues denoted by either R_1 or R_3 , where m and/or n is greater than 1, may be either a heteropolymer or a homopolymer, preferably a heteropolymer. Other embodiments of the invention are provided where m is an

WO 02/090520

PCT/US02/14915

integer between 1 and 50, 100 or 500, and n is an integer between 1 and 50, 100, or 500.

Polypeptides of the present invention can be prepared in any suitable manner. Such polypeptides include isolated naturally occurring polypeptides, 5 recombinantly produced polypeptides, synthetically produced polypeptides, or polypeptides produced by a combination of these methods. Means for preparing such polypeptides are well understood in the art.

Polynucleotides of the present invention include isolated polynucleotides comprising a nucleotide sequence which has at least 70% identity, 10 preferably at least 80% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, the polynucleotides set forth in SEQ ID NOS: 1 and 2 or the polynucleotides set forth in SEQ ID NOS: 5-8 over the entire length of one of SEQ ID NOS: 1, 2, and 5-8. In this regard, polynucleotides which have at least 97% identity are highly preferred, while those with at least 98-99% identity 15 are more highly preferred, and those with at least 99% identity are most highly preferred. Such polynucleotides include a polynucleotide comprising the polynucleotides set forth in SEQ ID NO: 1 and 2 as well as the polynucleotide consisting of the polynucleotides set forth in SEQ ID NO: 1 and 2. Such polynucleotides also include polynucleotides comprising the polynucleotides set 20 forth in SEQ ID NO: 5-8 as well as the polynucleotides consisting of the polynucleotides set forth in SEQ ID NO: 5-8.

As described above, the present invention also relates to both TIRAP polypeptide encoding polynucleotides and TIRAP inhibitor encoding polynucleotides. As one of skill in the art understands, a nucleotide sequence 25 encoding one of the polypeptides set forth in SEQ ID NOS: 3, 4, 9, 10 may be identical to the polypeptide encoding sequence set forth in SEQ ID NOS: 1, 2, 5 and 7, respectively, or it may be a sequence other than the one set forth in SEQ ID NOS: 1, 2, 5, and 7 which, as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of SEQ ID NOS: 3, 4, 9, and 10.

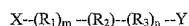
Such polynucleotides include isolated polynucleotides comprising a 30 nucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 70% identity, preferably at least 80% identity, more preferably at least 90% identity, yet more

WO 02/090520

PCT/US02/14915

preferably at least 95% identity, to the amino acid sequences of SEQ ID NOS: 3, 4, 9, 10 and 11, over the entire length of SEQ ID NOS: 3, 4, 9, 10 and 11. In this regard, polynucleotides encoding polypeptides which have at least 97% identity to the polypeptides set forth in SEQ ID NOS: 3, 4, 9, 10 and 11 are highly preferred, while those that encode polypeptides with at least 98-99% identity to the polypeptides set forth in SEQ ID NOS: 3, 4, 9, 10 and 11 are more highly preferred, and those that encode polypeptides which have at least 99% identity to the polypeptides set forth in SEQ ID NOS: 3, 4, 9, 10 and 11 are most highly preferred.

The invention also includes a polynucleotide consisting of or comprising a polynucleotide of the formula:



wherein, at the 5' end of the molecule, X is hydrogen, a metal or a modified nucleotide residue, or together with Y defines a covalent bond, and at the 3' end of the molecule, Y is hydrogen, a metal, or a modified nucleotide residue, or together with X defines the covalent bond, each occurrence of R_1 and R_3 is independently any nucleic acid residue or modified nucleic acid residue, m is an integer between 1 and 3000 or zero, n is an integer between 1 and 3000 or zero, and R_2 is a nucleic acid sequence or modified nucleic acid sequence of the invention, as described herein. In the polynucleotide formula above, R_2 is oriented so that its 5' end nucleic acid residue is at the left, bound to R_1 , and its 3' end nucleic acid residue is at the right, bound to R_3 . Any stretch of nucleic acid residues denoted by either R_1 and/or R_2 , where m and/or n is greater than 1, may be either a heteropolymer or a homopolymer, preferably a heteropolymer. Where, in a particular embodiment, X and Y together define a covalent bond, the polynucleotide of the above formula is a closed, circular polynucleotide, that can be a double-stranded polynucleotide wherein the formula shows a first strand to which the second strand is complementary. In another embodiment m and/or n is an integer between 1 and 1000. Other embodiments of the invention are provided where m is an integer between 1 and 50, 100 or 500, and n is an integer between 1 and 50, 100, or 500.

The invention also provides polynucleotides that are complementary to all the above-described polynucleotides.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

TIRAP Inhibitors

As set forth above, SEQ ID NOS: 9-11 are TIRAP inhibitors. The polypeptides set forth in SEQ ID NOS: 9 and 10 are mutated forms of the binding domain of the polypeptides set forth in SEQ ID NO: 3 and 4, respectively, the

5 TIRAP polypeptide.

A typical TIRAP inhibitor may be 1) a small molecule mimetic or 2) a polypeptide encoded by the polynucleotides set forth in SEQ ID NO: 5-8, which are themselves mutated fragments of SEQ ID NO: 1 and 2, as described in more detail below or 3) another polypeptide having TIRAP inhibitor activity, as

10 described above.

Preferably, an effective TIRAP inhibitor polypeptide of the present invention has an encoded histidine to proline mutation at amino acid position 145 (as measured in mouse TIRAP, shown in Figure 1), or the proline to histidine mutation at amino acid position 125 (as measured in human TIRAP, also shown in

15 Figure 1 and referenced in the Figures as P125H) relative to the TIRAP polypeptide which does not have the encoded mutation. The mutation may be accomplished using techniques well understood to those of skill in the art.

It has been found that the histidine to proline mutation at the appropriate position enables a TIRAP inhibitor to bind to the cytoplasmic domain of TLR4, yet inhibit downstream signaling of TLR4 (both MyD88 dependent and

20 MyD88 independent signaling).

Without ascribing to a particular theory of cellular receptor signaling, it is believed that TIRAP inhibitors, as well as other polypeptides that are sufficiently homologous to TIRAP inhibitors or TIRAP inhibitor mimetics which

25 have TIRAP inhibitor activity, bind to TLR4. This binding is conceptually illustrated in Fig. 7. Once bound, the TIRAP inhibitor inhibits TLR4 signaling through both the MyD88 dependent pathway as well as the MyD88 independent pathway.

As suggested in the preceding paragraph, an organic compound,

30 typically with a molecular weight under 2 KD, having appropriate structural similarity to a TIRAP inhibitor polypeptide may be also used as a TIRAP inhibitor. For example, a small molecule mimetic may be used. As one of skill in the art

WO 02/090520

PCT/US02/14915

understands, small molecule mimetics are chemically synthesized compounds that provide the spatial conformation necessary to properly associate to a particular protein and elicit a response. Therefore, the present invention also comprises the use of a small molecule mimetic to inhibit TIRAP signaling.

5 **Fusion Proteins**

A further aspect of the invention also relates to polynucleotides encoding fusion proteins. Examples of fusion protein technology can be found in International Patent Application Nos. WO94/29458 and WO94/22914.

This particular embodiment of the present invention relates to fusion proteins comprising a TIRAP inhibitor polypeptide, or an active portion or active fragment thereof, and a cellular membrane transport protein, such as Antennapedia. As one of skill in the art understands, delivering proteins across the cell membrane so they become therapeutically active can be difficult. Viruses or virus fragments can be used to transport proteins into cells, but this technology is not universally approved. Antennapedia, obtained from the fruit fly *Drosophila*, is virtually identical to the human form of the protein and thus, there is little, if any, antigenic response in human use. Even though proteins can be transported using a part of Antennapedia (e.g., Antp16), such a method is typically only suitable for small proteins.

Although many embodiments of fusion proteins having TIRAP inhibitor activity are envisioned, one functional example of such an embodiment is set forth in SEQ ID NO: 11, which represents a fusion of Antennapedia and the TIRAP inhibitor set forth in SEQ ID NO: 10. It has been found that the TIRAP inhibitors set forth in SEQ ID NOS: 9 and 10 are of the appropriate size to be conjugated to Antennapedia and transported across cellular membranes. Specifically, once conjugated to a TIRAP inhibitor Antennapedia facilitates transport of the TIRAP inhibitor across the cellular membrane so that the polypeptide become therapeutically active within the cell and exhibits TIRAP inhibitor activity.

30 **Methods of Treating Abnormal Conditions**

In a further aspect, the present invention provides methods of treating abnormal conditions such as, for instance, inflammation, related to either an

WO 02/090520

PCT/US02/14915

excess of, or an under-expression of, TIRAP polypeptide activity. Preferably, the practice of this invention would comprise antagonizing or agonizing TIRAP activity to prevent or treat an inflammatory response.

If the activity of the TIRAP polypeptide is in excess, several approaches are available. One approach comprises administering to a subject in need thereof a TIRAP inhibitor or TIRAP inhibitor mimetic (antagonist) as hereinabove described, optionally in combination with a pharmaceutically acceptable carrier, in an amount effective to inhibit the function of the polypeptide, such as, for example, by 1) binding an inhibitory molecule to TIRAP itself, thereby inhibiting TIRAP function, or 2) by blocking the binding of TIRAP to TLR4 by binding a TIRAP inhibitor to TLR4 and thereby potentially inhibit both MyD88 dependent and independent signaling.

In still another approach, expression of the gene encoding an endogenous TIRAP polypeptide can be inhibited using expression-blocking techniques. Known techniques involve the use of antisense sequences, either internally generated or separately administered (see, for example, O'Connor, J Neurochem (1991) 56:560 in Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, Fla. (1988)). Alternatively, oligonucleotides which form triple helices with the gene can be supplied (see, for example, Lee et al., Nucleic Acids Res (1979) 6:3073; Cooney et al., Science (1988)241:456; Dervan et al., Science (1991)251:1360). These oligomers can be administered per se or the relevant oligomers can be expressed in vivo.

For treating abnormal conditions related to an under-expression of TIRAP and its activity, several approaches are also available. One approach comprises administering to a subject a therapeutically effective amount of a compound which activates a polypeptide of the present invention, i.e., an agonist in combination with a pharmaceutically acceptable carrier (described below in the next section), to thereby alleviate the abnormal condition. Alternatively, gene therapy may be employed to effect the endogenous production of TIRAP by the relevant cells in the subject. For example, a polynucleotide of the invention may be engineered for expression in a replication defective retroviral vector, as discussed above. The retroviral expression construct may then be isolated and introduced into a packaging cell transduced with a retroviral plasmid vector containing RNA

WO 02/090520

PCT/US02/14915

encoding a polypeptide of the present invention such that the packaging cell now produces infectious viral particles containing the gene of interest. These producer cells may be administered to a subject for engineering cells in vivo and expression of the polypeptide in vivo. For an overview of gene therapy, see Chapter 20, Gene

5 Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches, (and references cited therein) in Human Molecular Genetics, T Strachan and A P Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996). Another approach is to administer a therapeutic amount of a polypeptide of the present invention in combination with a suitable pharmaceutical carrier.

10 **Pharmaceutical Applications**

In a further aspect, the present invention provides for pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of a polypeptide, such as the soluble form of a polypeptide of the present invention, agonist/antagonist peptide or small molecule compound, in combination with a pharmaceutically

15 acceptable carrier or excipient. Such carriers include, but are not limited to, saline, buffered saline, dextrose, water, glycerol, ethanol, and combinations thereof. The invention further relates to pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the invention. Polypeptides and other compounds of the present

20 invention may be employed alone or in conjunction with other compounds, such as therapeutic compounds.

The composition will be adapted to the route of administration, for instance by a systemic or an oral route. Preferred forms of systemic administration include injection, typically by intravenous injection. Other injection routes, such as

25 subcutaneous, intramuscular, or intraperitoneal, can be used. Alternative means for systemic administration include transmucosal and transdermal administration using penetrants such as bile salts or fusidic acids or other detergents. In addition, if a polypeptide or other compounds of the present invention can be formulated in an enteric or an encapsulated formulation, oral administration may also be possible.

30 Administration of these compounds may also be topical and/or localized, in the form of salves, pastes, gels, and the like.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

The dosage range required depends on the choice of peptide or other compounds (such as a small molecule mimetic) of the present invention, the route of administration, the nature of the formulation, the nature of the subject's condition, and the judgment of the attending practitioner. Suitable dosages, however, are typically in the range of 0.1-100 µg/kg of subject. Wide variations in the needed dosage, however, are to be expected in view of the variety of compounds available and the differing efficiencies of various routes of administration. For example, oral administration would be expected to require higher dosages than administration by intravenous injection. Variations in these dosage levels can be adjusted using standard empirical routines for optimization, as is well understood in the art.

Polypeptides used in treatment can also be generated endogenously in the subject, in treatment modalities often referred to as "gene therapy" as described above. Thus, for example, cells from a subject may be engineered with a polynucleotide, such as a DNA or RNA, to encode a polypeptide ex vivo, and for example, by the use of a retroviral plasmid vector. The cells are then introduced into the subject.

Polynucleotide and polypeptide sequences form a valuable information resource with which to identify further sequences of similar homology. Storing the sequence in a computer readable medium and then using the stored data to search a sequence database using well known searching tools, such as GCC most easily facilitates this. Accordingly, in a further aspect, the present invention provides for a computer readable medium having stored thereon a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NOS: 1, 2 and 5-8.

25 **Methods of Production of Polypeptides and Polynucleotides**

Polynucleotides of the present invention may be obtained, using standard cloning and screening techniques. Polynucleotides of the invention can also be obtained from natural sources such as genomic DNA libraries or can be synthesized using well known and commercially available techniques. Polypeptides of the invention can also be synthesized using well known and commercially available techniques.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

When polynucleotides of the present invention are used for the recombinant production of polypeptides of the present invention, the polynucleotide may include the coding sequence for the mature polypeptide, by itself, or the coding sequence for the mature polypeptide in reading frame with other coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro-protein sequence, or other fusion peptide portions. For example, a marker sequence, which facilitates purification of the fused polypeptide, can be encoded. In certain preferred embodiments of this aspect of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86:821-824, or is an HA tag. The polynucleotide may also contain non-coding 5' and 3' sequences, such as transcribed, non-translated sequences, splicing and polyadenylation signals, ribosome binding sites and sequences that stabilize mRNA.

Further embodiments of the present invention include polynucleotides encoding polypeptide variants which comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO:3 and 4 and in which several, for instance from 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 1 to 2 or 1, amino acid residues are substituted, deleted or added, in any combination.

Polynucleotides which are identical or sufficiently identical to a nucleotide sequence contained in SEQ ID NO: 1, 2 and 5-8 may be used as hybridization probes for cDNA and genomic DNA or as primers for a nucleic acid amplification (PCR) reaction, to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding polypeptides of the present invention and to isolate cDNA and genomic clones of other genes (including genes encoding homologs and orthologs from species other than human) that have a high sequence similarity to SEQ ID NO: 1, 2 and 5-8. Typically these nucleotide sequences are 70% identical, preferably 80% identical, more preferably 90% identical, most preferably 95% identical to that of the referent. The probes or primers will generally comprise at least 15 nucleotides, preferably, at least 30 nucleotides and may have at least 50 nucleotides. Particularly preferred probes will have between 30 and 50 nucleotides.

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs and orthologs from species other than human, may be obtained by a process which comprises the steps of screening an appropriate library (as

WO 02/090520

PCT/US02/14915

understood by one of ordinary skill in the art) under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO:1, 2 or 5-8 or a fragment thereof; and isolating full-length cDNA and genomic clones containing said polynucleotide sequence. Such hybridization techniques are well known to the skilled artisan. Preferred stringent hybridization conditions include overnight incubation at 42 degrees Celsius in a solution comprising: 50% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 microgram/ml denatured, sheared salmon sperm DNA; followed by washing the filters in 0.1 x SSC at about 65 degree C. Thus the present invention also includes polynucleotides obtainable by screening an appropriate library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO: 1, 2 or 5-8 or a fragment thereof.

The skilled artisan will appreciate that, in many cases, an isolated cDNA sequence will be incomplete, in that the region coding for the polypeptide is cut short at the 5' end of the cDNA. This is a consequence of reverse transcriptase, an enzyme with inherently low processivity (a measure of the ability of the enzyme to remain attached to the template during the polymerization reaction), failing to complete a DNA copy of the mRNA template during 1st strand cDNA synthesis.

There are several methods available and well known to those skilled in the art to obtain full-length cDNAs, or extend short cDNAs, for example those based on the method of Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) (see, for example, Frohman et al., PNAS USA 85, 8998-9002, 1988). Recent modifications of the technique, exemplified by the Marathon © technology (Clontech Laboratories Inc.) for example, have significantly simplified the search for longer cDNAs. In the Marathon © technology, cDNAs have been prepared from mRNA extracted from a chosen tissue and an 'adapter' sequence ligated onto each end. Nucleic acid amplification (PCR) is then carried out to amplify the 'missing' 5' end of the cDNA using a combination of gene specific and adapter specific oligonucleotide primers. The PCR reaction is then repeated using 'nested' primers, that is, primers designed to anneal within the amplified product (typically an adapter specific primer that anneals further 3' in the adapter sequence and a gene specific primer that anneals further 5' in the known gene sequence). The products of this reaction can then be analyzed by DNA sequencing and a full-length cDNA

WO 02/090520

PCT/US02/14915

constructed either by joining the product directly to the existing cDNA to give a complete sequence, or carrying out a separate full-length PCR using the new sequence information for the design of the 5' primer.

Recombinant polypeptides of the present invention may be prepared
5 by processes well known in the art from genetically engineered host cells comprising expression systems. Accordingly, in a further aspect, the present invention relates to expression systems which comprise a polynucleotide or polynucleotides of the present invention, to host cells which are genetically engineered with such expression systems and to the production of polypeptides of
10 the invention by recombinant techniques. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention.

For recombinant production, host cells can be genetically engineered to incorporate expression systems or portions thereof for polynucleotides of the
15 present invention. Introduction of polynucleotides into host cells can be effected by methods described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) and Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Preferred such methods include, for instance, calcium
20 phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transvection, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction or infection.

Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as streptococci, staphylococci, E. coli, Streptomyces and Bacillus subtilis
25 cells; fungal cells, such as yeast cells and Aspergillus cells; insect cells such as Drosophila S2 and Spodoptera Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 and Bowes melanoma cells; and plant cells.

A great variety of expression systems can be used, for instance, chromosomal, episomal and virus-derived systems, e.g., vectors derived from
30 bacterial plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl

WO 02/090520

PCT/US02/14915

pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids. The expression systems may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, any

5 system or vector which is able to maintain, propagate or express a polynucleotide to produce a polypeptide in a host may be used. The appropriate nucleotide sequence may be inserted into an expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for example, those set forth in Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (supra). Appropriate

10 secretion signals may be incorporated into the desired polypeptide to allow secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, the periplasmic space or the extracellular environment. These signals may be endogenous to the polypeptide or they may be heterologous signals.

If a polypeptide of the present invention is to be expressed for use in

15 screening assays (described below), the peptide may be produced intracellularly or secreted into the medium. If produced intracellularly, the cells must first be lysed before the polypeptide is recovered. The peptide may be membrane bound, for example, it may be fused with the cytoplasmic domain of a membrane protein, or it may contain sequence motifs which will undergo a lipid modification, such as

20 palmitoylation, that will target the peptide to the plasma membrane. If the polypeptide is secreted into the medium, the medium can be recovered in order to recover and purify the polypeptide.

Polypeptides of the present invention can be recovered and purified

from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium

25 sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography is employed for purification. Well-known techniques for refolding proteins may be employed to regenerate

30 active conformation when the polypeptide is denatured during isolation and or purification.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

Screening Techniques for TIRAP and TIRAP Inhibitors

As described above, TIRAP plays a role in many biological functions, including many disease states, in particular inflammation, septic shock and necrosis induced inflammation. It is therefore desirable to devise screening methods to identify compounds which stimulate or which inhibit the function of the TIRAP polypeptide. Accordingly, in a further aspect, the present invention provides for a method of screening compounds to identify those which stimulate or which inhibit the function of TIRAP. In general, agonists or antagonists may be employed for therapeutic and prophylactic purposes (described above).

Appropriate compounds may be identified from a variety of sources, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, and natural product mixtures.

The screening method may simply measure the binding of a candidate compound to a polypeptide of the present invention, or a small molecule mimetic, or to cells or membranes bearing a polypeptide of the present invention, or a fusion protein thereof by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound. Alternatively, the screening method may involve competition with a labeled competitor. Further, these screening methods may test whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide, using detection systems appropriate to the cells bearing the polypeptide.

Inhibitors of activation are generally assayed in the presence of a known agonist and the effect on activation by the agonist by the presence of the candidate compound is observed. Constitutively active polypeptides may be employed in screening methods for inverse agonists or inhibitors, in the absence of an agonist or inhibitor, by testing whether the candidate compound results in inhibition of activation of the polypeptide. Further, the screening methods may simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide of the present invention, to form a mixture, measuring TIRAP activity in the mixture, and comparing TIRAP activity of the mixture to a standard. In other words, the screening method comprises the steps of providing a polypeptide comprising at least the TIRAP-binding domain of TLR4, a TIRAP polypeptide or other polypeptide that comprises a TLR4 binding domain, and a candidate compound, placing the candidate compound into proximity with the

WO 02/090520

PCT/US02/14915

polypeptide comprising the TIRAP-binding domain of TLR4 and the TIRAP polypeptide or other polypeptide, and determining whether the candidate compound competes with the binding of either of the polypeptide comprising the TIRAP-binding domain of TLR4 or the TIRAP polypeptide or other polypeptide.

5 As one skilled in the art understands, fusion proteins, such as those made from a portion of a polypeptide and a TIRAP polypeptide can also be used for high-throughput screening assays to identify antagonists for the polypeptide of the present invention (see D. Bennett et al., J Mol Recognition, 8:52-58 (1995); and K. Johanson et al., J. Biol Chem, 270:9459-9471 (1995)).

10 Examples of potential polypeptide antagonists include antibodies or, in some cases, oligonucleotides or proteins which are closely related to the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptide, e.g., a fragment of the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc.; or small molecules which bind to the polypeptide of the present invention but do not elicit a response,
15 so that the activity of the polypeptide is prevented.

The polynucleotides, polypeptides and antibodies of the present invention may also be used to configure screening methods for detecting the effect of added compounds on the production of mRNA and polypeptide in cells. For example, an ELISA assay may be constructed for measuring secreted or cell
20 associated levels of polypeptide using monoclonal and polyclonal antibodies by standard methods known in the art. This can be used to discover agents which may inhibit or enhance the production of polypeptide from suitably manipulated cells or tissues.

Thus, in another aspect, the present invention relates to a screening
25 kit for identifying agonists, antagonists, other ligands and receptors, substrates, enzymes, etc. for polypeptides of the present invention; or compounds which decrease or enhance the production of such polypeptides, which comprises:
(a) a polypeptide of the present invention;
(b) a recombinant cell expressing a polypeptide of the present invention;
30 (c) a cell membrane expressing a polypeptide of the present invention; or
(d) antibody to a polypeptide of the present invention;
which polypeptide is preferably that of SEQ ID NO:3 or 4.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component.

- It will be readily appreciated by the skilled artisan that a polypeptide of the present invention may also be used in a method for the structure-based design of an agonist, antagonist or inhibitor of the polypeptide, by:
- 5 (a) determining in the first instance the three-dimensional structure of the polypeptide;
 - (b) deducing the three-dimensional structure for the likely reactive or binding site(s) of an agonist, antagonist or inhibitor;
 - 10 (c) synthesizing candidate compounds that are predicted to bind to or react with the deduced binding or reactive site; and
 - (d) testing whether the candidate compounds are indeed agonists, antagonists or inhibitors.

It will be further appreciated that this will normally be an iterative process.

Antigenic Properties of the Polynucleotides and Polypeptides of the Present Invention

The polypeptides of the invention or their fragments or analogs thereof, or cells expressing them, can also be used as immunogens to produce antibodies immunospecific for polypeptides of the present invention. The term

20 "immunospecific" means that the antibodies have substantially greater affinity for the polypeptides of the invention than their affinity for other related polypeptides in the prior art.

Antibodies generated against polypeptides of the present invention may be obtained by administering the polypeptides or epitope-bearing fragments, analogs or cells to an animal, preferably a non-human animal, using routine protocols. For preparation of monoclonal antibodies, any technique which provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. Examples include

25 the hybridoma technique (Kohler, G. and Milstein, C., Nature (1975) 256:495-497), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., Immunology Today (1983) 4:72) and the EBV-hybridoma technique (Cole et al.,

30

WO 02/090520 PCT/US02/14915
MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R.
Liss, Inc., 1985).

Techniques for the production of single chain antibodies, such as those described in U.S. Pat. No. 4,946,778, can also be adapted to produce single chain antibodies to polypeptides of this invention. Also, transgenic mice, or other organisms, including other mammals, may be used to express humanized antibodies.

The above-described antibodies may be employed to isolate or to identify clones expressing the polypeptide or to purify the polypeptides by affinity chromatography.

In a further aspect, the present invention relates to genetically engineered soluble fusion proteins comprising a polypeptide of the present invention, or a fragment thereof, and various portions of the constant regions of heavy or light chains of immunoglobulins of various subclasses (IgG, IgM, IgA, IgE). Preferred as an immunoglobulin is the constant part of the heavy chain of human IgG, particularly IgG1, where fusion takes place at the hinge region. In a particular embodiment, the Fc part can be removed simply by incorporation of a cleavage sequence which can be cleaved with blood clotting factor Xa. Furthermore, this invention relates to processes for the preparation of these fusion proteins by genetic engineering, and to the use thereof for, for example, drug screening.

Transgenic Cells and Mammals

The nucleic and amino acids of the invention can be used to produce recombinant cells and transgenic non-human mammals which are useful tools for the study of TIRAP function. That is, the exogenous nucleic acid, or transgene as it is also referred to herein, of the invention is introduced into a cell, and the cell is then used to generate the non-human transgenic mammal. The cell into which the transgene is introduced is preferably an embryonic stem (ES) cell. However, the invention should not be construed to be limited solely to ES cells comprising the transgene of the invention nor to cells used to produce transgenic animals. Rather, a transgenic cell of the invention includes, but is not limited to, any cell derived from a transgenic animal comprising a transgene, a cell comprising the transgene

WO 02/090520

PCT/US02/14915

derived from a chimeric animal derived from the transgenic ES cell, and any other comprising the transgene which may or may not be used to generate a non-human transgenic mammal.

Further, it is important to note that the purpose of transgene-
 5 comprising, *i.e.*, recombinant, cells should not be construed to be limited to the generation of transgenic mammals. Rather, the invention should be construed to include any cell type into which a nucleic acid encoding TIRAP is introduced, including, without limitation, a prokaryotic cell and a eukaryotic cell comprising an isolated nucleic acid encoding TIRAP.

10 When the cell is a eukaryotic cell, the cell may be any eukaryotic cell which, when the transgene of the invention is introduced therein, and the protein encoded by the desired gene is no longer expressed therefrom, a benefit is obtained. Such a benefit may include the fact that there has been provided a system in which lack of expression of the desired gene can be studied *in vitro* in the
 15 laboratory or in a mammal in which the cell resides, a system wherein cells comprising the introduced gene deletion can be used as research, diagnostic and therapeutic tools, and a system wherein animal models are generated which are useful for the development of new diagnostic and therapeutic tools for selected disease states in a mammal.

20 Alternatively, the invention includes a eukaryotic cell which, when the transgene of the invention is introduced therein, and the protein encoded by the desired gene is expressed therefrom where it was not previously present or expressed in the cell or where it is now expressed at a level or under circumstances different than that before the transgene was introduced, a benefit is obtained. Such
 25 a benefit may include the fact that there has been provided a system in the expression of the desired gene can be studied *in vitro* in the laboratory or in a mammal in which the cell resides, a system wherein cells comprising the introduced gene can be used as research, diagnostic and therapeutic tools, and a system wherein animal models are generated which are useful for the development of new
 30 diagnostic and therapeutic tools for selected disease states in a mammal.

Such cell expressing an isolated nucleic acid encoding TIRAP can be used to provide TIRAP to a cell, tissue, or whole animal where a higher level of TIRAP can be useful to treat or alleviate a disease, disorder or condition associated, with low level of TIRAP expression and/or activity. Such diseases, disorders or

WO 02/090520

PCT/US02/14915

conditions can include, but are not limited to, intestinal tumors, familial adenomatous polyposis, colon cancer, irritable bowel disease, inflammatory bowel disease, diabetes, obesity, tongue cancer, breast cancer, lung cancer, and the like. Therefore, the invention includes a cell expressing TIRAP to increase or induce TIRAP expression, translation, and/or activity, where increasing TIRAP expression, protein level, and/or activity can be useful to treat or alleviate a disease, disorder or condition.

One of ordinary skill would appreciate, based upon the disclosure provided herein, that a "knock-in" or "knock-out" vector of the invention comprises at least two sequences homologous to two portions of the nucleic acid which is to be replaced or deleted, respectively. The two sequences are homologous with sequences that flank the gene; that is, one sequence is homologous with a region at or near the 5' portion of the coding sequence of the nucleic acid encoding TIRAP and the other sequence is further downstream from the first. One skilled in the art would appreciate, based upon the disclosure provided herein, that the present invention is not limited to any specific flanking nucleic acid sequences. Instead, the targeting vector may comprise two sequences which remove some or all (*i.e.*, a "knock-out" vector) or which insert (*i.e.*, a "knock-in" vector) a nucleic acid encoding TIRAP, or a fragment thereof, from or into a mammalian genome, respectively. The crucial feature of the targeting vector is that it comprise sufficient portions of two sequences located towards opposite, *i.e.*, 5' and 3', ends of the TIRAP open reading frame (ORF) in the case of a "knock-out" vector, to allow deletion/insertion by homologous recombination to occur such that all or a portion of the nucleic acid encoding TIRAP is deleted from or inserted into a location on a mammalian chromosome.

The design of transgenes and knock-in and knock-out targeting vectors is well-known in the art and is described in standard treatises such as Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), and in Ausubel et al. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York), and the like. The upstream and downstream portions flanking or within the TIRAP coding region to be used in the targeting vector may be easily selected based upon known methods and following the teachings disclosed herein based on the disclosure provided herein including the nucleic and amino acid sequences of both mouse and human TIRAP.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

Armed with these sequences, one of ordinary skill in the art would be able to construct the transgenes and knock-out vectors of the invention.

The invention further includes a knock-out targeting vector comprising a nucleic acid encoding a selectable marker such as, for example, a nucleic acid encoding the *neo^R* gene thereby allowing the selection of transgenic a cell where the nucleic acid encoding TIRAP, or a portion thereof, has been deleted and replaced with the neomycin resistance gene by the cell's ability to grow in the presence of G418. However, the present invention should not be construed to be limited to neomycin resistance as a selectable marker. Rather, other selectable markers well-known in the art may be used in the knock-out targeting vector to allow selection of recombinant cells where the TIRAP gene has been deleted and/or inactivated and replaced by the nucleic acid encoding the selectable marker of choice. Methods of selecting and incorporating a selectable marker into a vector are well-known in the art and are describe in, for example, Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), and in Ausubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York).

As noted herein, the invention includes a non-human transgenic mammal comprising an exogenous nucleic acid inserted into a desired site in the genome thereof thereby deleting the coding region of a desired endogenous target gene, *i.e.*, a knock-out transgenic mammal. Further, the invention includes a transgenic non-human mammal wherein an exogenous nucleic acid encoding TIRAP is inserted into a site the genome, *i.e.*, a "knock-in" transgenic mammal. The knock-in transgene inserted may comprise various nucleic acids encoding, for example, a tag polypeptide, a promoter/regulatory region operably linked to the nucleic acid encoding TIRAP not normally present in the cell or not typically operably linked to TIRAP.

The generation of the non-human transgenic mammal of the invention is preferably accomplished using the method which is now described. However, the invention should in no way be construed as being limited solely to the use of this method, in that, other methods can be used to generate the desired knock-out mammal.

In the preferred method of generating a non-human transgenic mammal, ES cells are generated comprising the transgene of the invention and the

WO 02/090520

PCT/US02/14915

- cells are then used to generate the knock-out animal essentially as described in Nagy and Rossant (1993, In: *Gene Targeting, A Practical Approach*, pp. 146-179, Joyner ed., IRL Press). ES cells behave as normal embryonic cells if they are returned to the embryonic environment by injection into a host blastocyst or
- 5 aggregate with blastomere stage embryos. When so returned, the cells have the full potential to develop along all lineages of the embryo. Thus, it is possible, to obtain ES cells, introduce a desired DNA therein, and then return the cell to the embryonic environment for development into mature mammalian cells, wherein the desired DNA may be expressed.
- 10 Precise protocols for the generation of transgenic mice are disclosed in Nagy and Rossant (1993, In: *Gene Targeting, A Practical Approach*, Joyner ed. IRL Press, pp. 146-179). and are therefore not repeated herein. Transfection or transduction of ES cells in order to introduce the desired DNA therein is accomplished using standard protocols, such as those described, for example, in
- 15 Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), and in Ausubel et al. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York). Preferably, the desired DNA contained within the transgene of the invention is electroporated into ES cells, and the cells are propagated as described in Soriano et al. (1991, *Cell* 64:693-702).
- 20 Introduction of an isolated nucleic acid into the fertilized egg of the mammal is accomplished by any number of standard techniques in transgenic technology (Hogan et al., 1986, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY). Most commonly, the nucleic acid is introduced into the embryo by way of microinjection.
- 25 Once the nucleic acid is introduced into the egg, the egg is incubated for a short period of time and is then transferred into a pseudopregnant mammal of the same species from which the egg was obtained as described, for example, in Hogan et al. (1986, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY). Typically, many eggs are injected per experiment, and
- 30 approximately two-thirds of the eggs survive the procedure. About twenty viable eggs are then transferred into pseudopregnant animals, and usually four to ten of the viable eggs so transferred will develop into live pups.
- Any mammalian TIRAP gene may be used in the methods described herein to produce a transgenic mammal or a transgenic cell harboring a transgene

WO 02/090520

PCT/US02/14915

comprising a deletion of all or part of that TIRAP gene. Preferably, human TIRAP (SEQ ID NO:1) or mouse TIRAP (SEQ ID NO: 2) is also used.

The transgenic mammal of the invention can be any species of mammal. Thus, the invention should be construed to include generation of transgenic mammals encoding the chimeric nucleic acid, which mammals include mice, hamsters, rats, rabbits, pigs, sheep and cattle. The methods described herein for generation of transgenic mice can be analogously applied using any mammalian species. Preferably, the transgenic mammal of the invention is a rodent and even more preferably, the transgenic mammal of the invention is a mouse. By way of example, Lukkarinen et al. (1997, Stroke 28:639-645), teaches that gene constructs which enable the generation of transgenic mice also enable the generation of other transgenic rodents, including rats. Similarly, nullizygous mutations in a genetic locus of an animal of one species can be replicated in an animal of another species having a genetic locus highly homologous to the first species.

To identify the transgenic mammals of the invention, pups are examined for the presence of the isolated nucleic acid using standard technology such as Southern blot hybridization, PCR, and/or RT-PCR. Expression of the nucleic acid in the cells and in the tissues of the mammal is also assessed using ordinary technology described herein. Further, the presence or absence of TIRAP in the circulating blood of the transgenic animal can be determined, for example, as disclosed herein (*e.g.*, Western blot analysis), or using standard methods for protein detection that are well-known in the art.

Cells obtained from the transgenic mammal of the invention, which are also considered "transgenic cells" as the term is used herein, encompass such as cells as those obtained from the TIRAP (+/-) and (-/-) transgenic non-human mammal described elsewhere herein, are useful systems for modeling diseases and symptoms of mammals which are believed to be associated with altered levels of TIRAP expression such as colon cancer, familial adenomatous polyposis, irritable bowel disease, inflammatory bowel disease, intestinal tumors, breast cancer, tongue cancer, diabetes, and obesity, and any other disease, disorder or condition associated with an altered level of TIRAP expression. Moreover, as a marker of a pathway(s) associated with tumor proliferation and other intestinal abnormalities such as colon cancer, familial adenomatous polyposis, irritable bowel disease, inflammatory bowel disease, intestinal tumors, breast cancer, tongue cancer,

WO 02/090520

PCT/US02/14915

diabetes, and obesity, TIRAP expression levels are also useful indicators in assessment of such diseases, disorders or conditions.

Particularly suitable are cells derived from a tissue of the non-human knock-out or knock-in transgenic mammal described herein, wherein the transgene comprising the TIRAP gene is expressed or inhibits expression of TIRAP in various tissues. By way of example, cell types from which such cells are derived include fibroblasts, endothelial, adipocyte, and myoblast cells of (1) the TIRAP (+/+), (+/-) and (-/-) non-human transgenic liveborn mammal, (2) the TIRAP (+/+), (-/-) or (+/-) fetal animal, and (3) placental cell lines obtained from the TIRAP (+/+), (-/-) and (+/-) fetus and liveborn mammal.

The following definitions are provided to facilitate understanding of certain terms used frequently hereinbefore.

"Antibodies" as used herein includes polyclonal and monoclonal antibodies, chimeric, single chain, and humanized antibodies, as well as Fab fragments, including the products of an Fab or other immunoglobulin expression library.

"Isolated" means altered "by the hand of man" from the natural state. If an "isolated" composition or substance occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living animal is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein.

"Polynucleotide" generally refers to any polyribonucleotide or polydeoxynucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA. "Polynucleotides" include, without limitation, single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double-stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, "polynucleotide" refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The term "polynucleotide" also includes DNAs or RNAs containing one or more modified bases and DNAs or RNAs with

WO 02/090520

PCT/US02/14915

backbones modified for stability or for other reasons. "Modified" bases include, for example, tritylated bases and unusual bases such as inosine. A variety of modifications may be made to DNA and RNA; thus, "polynucleotide" embraces chemically, enzymatically or metabolically modified forms of polynucleotides as typically found in nature, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells. "Polynucleotide" also embraces relatively short polynucleotides, often referred to as oligonucleotides.

"Polypeptide" refers to any peptide or protein comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, i.e., peptide isosteres. "Polypeptide" refers to both short chains, commonly referred to as peptides, oligopeptides or oligomers, and to longer chains, generally referred to as proteins. Polypeptides may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. Polypeptides include amino acid sequences modified either by natural processes, such as post-translational processing, or by chemical modification techniques which are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature. Modifications may occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present to the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be branched as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched and branched cyclic polypeptides may result from post-translation natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cystine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racemization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition

WO 02/090520

PCT/US02/14915

- of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination (see, for instance, PROTEINS--STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12 in
- 5 POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth Enzymol (1990) 182:626-646 and Rattan et al., "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci (1992) 663:48-62).
- 10 "Variant" refers to a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide, but retains essential properties. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from another, reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference
- 15 polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from another, reference polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the reference polypeptide and the variant are
- 20 closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be a naturally occurring such as an allelic
- 25 variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques or by direct synthesis.

- "Identity," as known in the art, is a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, as the case may
- 30 be, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between polypeptide or polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences. "Identity" can be readily calculated by known methods, including but not limited to

WO 02/090520

PCT/US02/14915

- those described in (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, 30 H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Methods to determine identity are designed to give the largest match between the sequences tested.
- Moreover, methods to determine identity are codified in publicly available computer programs. Computer program methods to determine identity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Atschul, S. F. et al., *J Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990)).
- The BLAST X program is publicly available from NCBI and other sources (BLASTManual, Altschul, S., et al, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Parameters for polypeptide sequence comparison include the

- following:
- 1) Algorithm: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)
Comparison matrix: BLOSSUM62 from Hentikoff and Hentikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10915-10919 (1992)
Gap Penalty: 12
- Gap Length Penalty: 4
- A program useful with these parameters is publicly available as the "gap" program from Genetics Computer Group, Madison Wis. The aforementioned parameters are the default parameters for peptide comparisons (along with no penalty for end gaps).
- Parameters for polynucleotide comparison include the following:
- 1) Algorithm: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)
Comparison matrix: matches=+10, mismatch=0
Gap Penalty: 50

WO 02/090520

PCT/US02/14915

Gap Length Penalty: 3

Available as: The "gap" program from Genetics Computer Group, Madison Wis.

These are the default parameters for nucleic acid comparisons.

A preferred meaning for "identity" for polynucleotides and
 5 polypeptides, as the case may be, are provided in (1) and (2) below.

(1) Polynucleotide embodiments further include an isolated
 polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least a 50, 60, 70,
 80, 85, 90, 95, 97 or 100% identity to the reference sequences of SEQ ID NO:1 or
 2, wherein said polynucleotide sequence may be identical to the reference sequence
 10 of SEQ ID NO:1 or 2 or may include up to a certain integer number of nucleotide
 alterations as compared to the reference sequence, wherein said alterations are
 selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution,
 including transition and transversion, or insertion, and wherein said alterations may
 occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or
 15 anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among
 the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups
 within the reference sequence, and wherein said number of nucleotide alterations is
 determined by multiplying the total number of nucleotides in SEQ ID NO:1 or 2 by
 the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that
 20 product from said total number of nucleotides in SEQ ID NO:1, or:

$$N_n = X_n - (X_n * y),$$

wherein N_n is the number of nucleotide alterations, X_n is the total number of
 nucleotides in SEQ ID NO:1 or 2, y is 0.50 for 50%, 0.60 for 60%, 0.70 for 70%,
 0.80 for 80%, 0.85 for 85%, 0.90 for 90%, 0.95 for 95%, 0.97 for 97% or 1.00 for
 25 100%, and * is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-
 integer product of X_n and y is rounded down to the nearest integer prior to
 subtracting it from X_n . Alterations of a polynucleotide sequence encoding the
 polypeptide of SEQ ID NO:3 or 4 may create nonsense, missense or frameshift
 mutations in this coding sequence and thereby alter the polypeptide encoded by the
 30 polynucleotide following such alterations.

By way of example, a polynucleotide sequence of the present
 invention may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO:3 or 4, that is it

WO 02/090520

PCT/US02/14915

may be 100% identical, or it may include up to a certain integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence such that the percent identity is less than 100% identity. Such alterations are selected from the group consisting of at least one nucleic acid deletion, substitution, including transition and
 5 transversion, or insertion, and wherein said alterations may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference polynucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the nucleic acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. The number of nucleic acid alterations for a given percent identity is
 10 determined by multiplying the total number of amino acids in SEQ ID NO:3 or 4 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from said total number of amino acids in SEQ ID NO: 3 or 4, or:

$$N_n = X_n - (X_n * y),$$

wherein N_n is the number of amino acid alterations, X_n is the total number of amino acids in SEQ ID NO:3 or 4, y is, for instance 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85% etc., $*$ is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of X_n and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from X_n .
 15

(2) Polypeptide embodiments further include an isolated polypeptide comprising a polypeptide having at least a 50,60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 or 100% identity to a polypeptide reference sequence of SEQ ID NO:3 or 4, wherein said polypeptide sequence may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO:3 or 4 or may include up to a certain integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence, wherein said alterations are selected from the
 20 group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion, and wherein said alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one or
 25 more contiguous groups within the reference sequence, and wherein said number of amino acid alterations is determined by multiplying the total number of amino acids in SEQ ID NO:3 or 4 by the integer defining the percent identity divided by 100
 30

WO 02/090520

PCT/US02/14915

and then subtracting that product from said total number of amino acids in SEQ ID NO:3 or 4, or:

$$N_a = X_a - (X_a * y),$$

wherein N_a is the number of amino acid alterations, X_a is the total number of amino acids in SEQ ID NO:3 or 4, y is 0.50 for 50%, 0.60 for 60%, 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85%, 0.90 for 90%, 0.95 for 95%, 0.97 for 97% or 1.00 for 100%, and $*$ is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of X_a and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from X_a .

By way of example, a polypeptide sequence of the present invention may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO:3 or 4, that is it may be 100% identical, or it may include up to a certain integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence such that the percent identity is less than 100% identity. Such alterations are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion, and wherein said alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. The number of amino acid alterations for a given % identity is determined by multiplying the total number of amino acids in SEQ ID NO:3 or 4 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from said total number of amino acids in SEQ ID NO:3 or 4, or:

$$N_a = X_a - (X_a * y),$$

wherein N_a is the number of amino acid alterations, X_a is the total number of amino acids in SEQ ID NO:3 or 4, y is, for instance 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85% etc., and $*$ is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of X_a and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from X_a .

"Fusion protein" refers to a protein encoded by two, often unrelated, fused genes or fragments thereof. In one example, EP-A-0 464 discloses fusion

WO 02/090520

PCT/US02/14915

proteins comprising various portions of constant region of immunoglobulin molecules together with another human protein or part thereof. In many cases, employing an immunoglobulin Fc region as a part of a fusion protein is advantageous for use in therapy and diagnosis resulting in, for example, improved
5 pharmacokinetic properties [see, e.g., EP-A 0232 262]. On the other hand, for some uses it would be desirable to be able to delete the Fc part after the fusion protein has been expressed, detected and purified.

"Small Molecule" or "Small Molecule Compound" refers to a synthetic organic compound that is typically less than about 2 kilodaltons (KD).

10 The term "transgene" is used herein to describe genetic material that has been or is about to be artificially inserted into the genome of a mammalian cell, particularly a mammalian cell of a living animal. The transgene is used to transform a cell, meaning that a permanent or transient genetic change, preferably a permanent genetic change, is induced in a cell following incorporation of
15 exogenous DNA. A permanent genetic change is generally achieved by introduction of the DNA into the genome of the cell. Vectors for stable integration include plasmids, retroviruses and other animal viruses, YACs, and the like. Of interest are transgenic mammals, e.g. cows, pigs, goats, horses, etc., and particularly rodents, e.g. rats, mice, etc.

20 Transgenic animals include an exogenous nucleic acid sequence present as an extrachromosomal element or stably integrated in all or a portion of its cells, especially in germ cells. Unless otherwise indicated, it will be assumed that a transgenic animal includes stable changes to the germline sequence. During the initial construction of the animal, "chimeras" or "chimeric animals" are generated,
25 in which only a subset of cells have the altered genome. Chimeras are primarily used for breeding purposes in order to generate the desired transgenic animal. Animals having a heterozygous alteration are generated by breeding of chimeras. Male and female heterozygotes are typically bred to generate homozygous animals.

In the present invention, "knock-outs" have a partial or complete loss
30 of function in one or both alleles of the endogenous gene of interest, as opposed to "knock-ins" which have an introduced transgene with altered genetic sequence and function from the endogenous gene. The two may be combined, such that the naturally occurring gene is disabled, and an altered form introduced. In a knock-

WO 02/090520

PCT/US02/14915

out, preferably the target gene expression is rendered undetectable or insignificant.

A knock-out of a TIRAP gene means that function of TIRAP has been substantially decreased so that expression is not detectable or only present at insignificant levels.

This may be achieved by a variety of mechanisms, including introduction of a

- 5 disruption of the coding sequence, e.g. insertion of one or more stop codons, insertion of a DNA fragment, etc., deletion of coding sequence, substitution of stop codons for coding sequence, etc. In some cases the exogenous transgene sequences are ultimately deleted from the genome, leaving a net change to the native sequence. Different approaches may be used to achieve the knock-out. A
- 10 chromosomal deletion of all or part of the native gene may be induced, including deletions of the non-coding regions, particularly the promoter region, 3' regulatory sequences, enhancers, or deletions of gene that activate expression of genes. A functional knock-out may also be achieved by the introduction of an anti-sense construct that blocks expression of the native genes (for example, see Li and Cohen
- 15 (1996) Cell 85:319-329). Knock-outs also include conditional knock-outs, for example where alteration of the target gene occurs upon exposure of the animal to a substance that promotes target gene alteration, introduction of an enzyme that promotes recombination at the target gene site (e.g. Cre in the Cre-lox system), or other method for directing the target gene alteration postnatally.

- 20 All publications, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference as if each individual publication were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as though fully set forth.

- 25 The invention is further described in detail by reference to the following experimental examples. These examples are provided for purposes of illustration only, and are not intended to be limiting unless otherwise specified. Thus, the invention should in no way be construed as being limited to the following examples, but rather, should be construed to encompass any and all variations which become evident as a result of the teaching provided herein.

- 30 EXAMPLES

Example 1. TIRAP is a component of the TLR4 signaling pathway, but not of the IL-1R signaling pathways.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

To determine the effect of various TIRAP constructs on the promoter activity of NF- κ B, 293T cells were co-transfected with 2.0 μ g of the indicated TIRAP construct and 0.1 μ g of an NF- κ B-dependent luciferase reporter gene. pcDNA3 is an empty vector control; TIRAP is a vector encoding the full length TIRAP protein; TIRAP N is a vector encoding the N-terminal domain of TIRAP; TIRAP C is a vector encoding the C terminal domain of TIRAP; and TIRAP P125H is a vector encoding a mutant form of TIRAP containing a proline to histidine mutation at amino acid position 125. Cells were harvested 24h post-transfection and lysed for analysis in a standard luciferase reporter assay. Luciferase activity is expressed as fold induction relative to mock transfected cells (Figure 2A). Whereas the TIRAP construct resulted in strong activation of the NF- κ B promoter (approximately 80-fold induction of luciferase activity); no significant promoter activity was observed in the presence of TIRAP N, TIRAP C, or TIRAP P125H. Based on these results, full length TIRAP, but not the mutant forms of TIRAP tested, activates the NF- κ B promoter. These results further suggest that TIRAP is a component of the TLR4 signaling pathway.

To determine whether TIRAP P125H functions as a dominant negative, 293T cells were transfected with 0.25 μ g of vector alone (pcDNA3) or CD4/TLR4 (a vector expressing a constitutively active form of TLR4) with or without increasing concentrations (50 ng, 250 ng, 1.0 μ g) of either TIRAP P125H or MyD88 DN (a vector expressing MyD88 containing a proline to histidine mutation at the same position as TIRAP P125H) and the NF- κ B-dependent luciferase reporter gene. Interestingly, TIRAP P125H strongly inhibited activation of NF- κ B mediated by CD4/TLR4 (Figure 2B). This inhibition was dose-dependent and comparable to the inhibition of CD4/TLR4 by MyD88 DN. These results suggest that TIRAP P125H inhibits TLR4-mediated NF- κ B activation. Notably, a MyD88 mutation at the same position can still activate NF- κ B when overexpressed, indicating that there may be differences in the function of the TIRAP and MyD88 TIR domains.

Unlike TLR4, neither IL-1R nor TLR9 can induce NF- κ B in the absence of MyD88 (Kawai 1999; Schnare 2000; Adache 1998). To assess the possibility that TIRAP is the putative adapter in the MyD88-independent signaling

WO 02/090520

PCT/US02/14915

pathway, we tested TIRAP P125H for its ability to inhibit NF- κ B activity induced by IL-1R and TLR9. 293T cells were co-transfected with either vector alone (pcDNA3), IL-1R (0.1 μ g), and IL-1R AcP (0.1 μ g) [Dr. Medzhitov: Please indicate what the IL-1R AcP construct encodes] plasmid cDNAs, with or without increasing concentrations (10 ng, 50 ng, 200 ng) of TIRAP P125H plasmid and the NF- κ B-dependent luciferase reporter gene. TIRAP P125H did not inhibit NF- κ B activity induced either by co-transfected IL-1R and IL-1R AcP (Figure 2C) or by IL-1 β cytokine.

TLR9 does not induce NF- κ B activity when overexpressed, but does so upon addition of its ligand CpG DNA. To determine whether TIRAP inhibits NF- κ B activation induced by CpG-stimulation of TLR9-transfected cells, 293T cells were transfected with vector alone (pcDNA3), TLR9 (50 ng), with or without increasing concentrations (100 ng, 250 ng) of either TIRAP P125H or MyD88 DN. At twenty-four h post transfection, CpG oligonucleotides were added at 3 μ M final concentration to TLR9-transfected samples and incubated for 14 more hours before harvesting. Whereas MyD88 DN inhibited CpG signaling, consistent with the ability of CpG DNA to activate NF- κ B in MyD88-deficient cells (Schnare 2000), TIRAP P125H did not inhibit NF- κ B activation induced by CpG-stimulation of TLR9-transfected cells (Figure 2D). Thus, TIRAP appears to function downstream of TLR4 but not IL-1R or TLR9, and is likely to be the adapter in the MyD88-independent pathway downstream of TLR4.

Example 2. Wild-type TIRAP but not TIRAP P125H co-immunoprecipitates with TLR4.

To obtain biochemical conformation for a role of TIRAP in the TLR4 signaling pathway, TIRAP-TLR4 protein interactions were evaluated using co-immunoprecipitation experiments. 293T cells were co-transfected with 4.5 μ g of a Myc-tagged TLR4 deletion construct lacking the ectodomain (Myc TLR4 wt) or its mutant derivative (Myc TLR4 P714H) in the presence or absence of 1.5 μ g of Flag-tagged TIRAP (Flag TIRAP) or its mutant derivative containing the P125H mutation (Flag TIRAP PH). Lysates prepared 24h post-transfection were incubated overnight with anti-Flag M2 agarose beads to immunoprecipitate Flag TIRAP or Flag TIRAP P125H and any associated proteins. Immunocomplexes were washed,

WO 02/090520

PCT/US02/14915

separated by SDS-PAGE electrophoresis, and then analyzed by immunoblotting with either anti-myc antibody to look for co-immunoprecipitated TLR4 or anti-Flag antibody to confirm immunoprecipitation of Flag TIRAP or Flag TIRAP P125H. Total cell lysates (35 µg/sample) were likewise analyzed by SDS-PAGE and

5 immunoblotting to confirm equivalent expression of the appropriate proteins in every sample. These experiments revealed that TLR4 does in fact co-immunoprecipitate with TIRAP (Figure 3A). The TLR4 mutant, TLR4 P714H, which cannot signal as a result of the mutation and thus, renders c3H/HeJ mice unresponsive to LPS, also co-immunoprecipitates with TLR4. In contrast, TIRAP

10 P125H failed to co-immunoprecipitate with TLR4, suggesting that this conserved region of the TIR domain mediates interaction of TIRAP with the TIR domain of TLR4 (Figure 3A).

Similarly, the interaction between TIRAP and MyD88 was examined. 293T cells were transfected with 1.5 µg of either HA-tagged TIRAP

15 (HA TIRAP) alone or in combination with 1.5 µg of either Flag-tagged MyD88 (Flag MyD88), Flag-tagged TIRAP (Flag-TIRAP), or Flag-tagged TIRAP P125H (Flag TIRAP PH). Immunoprecipitation and analyses of immunocomplexes as well as total cell lysates were done as described above. It was demonstrated that TIRAP does not interact with MyD88 (Figure 3B), demonstrating the specificity of the TIR

20 domain interactions detected by these assays. TIRAP also failed to associate with IRAK [Dr. Medzhitov: Please spell this out], suggesting that TIRAP may not have any role in the MyD88-dependent signaling pathway. However, TIRAP can be co-immunoprecipitated with itself (Figure 3B), indicating that TIRAP can homodimerize, as is the case with many other TIR domain-containing proteins

25 including TLR4 and MyD88. Direct interactions between TIRAP and the TIR domain of TLR4 was also detected using in vitro glutathione S transferase (GST) pull-down assays.

Example 3. PKR is a component of LPS and CpG-signaling pathways, and co-immunoprecipitates with TIRAP.

30 It was recently demonstrated that cells lacking the interferon-regulated, dsRNA-binding protein kinase, PKR, fail to activate JNK and p38 in response to LPS stimulation (Goh 2000). As TLR4 is required for all signals downstream of LPS, this results report suggested that PKR is a component of the

WO 02/090520

PCT/US02/14915

TLR4 signaling pathway. To determine whether PKR functions in the MyD88-dependent or -independent pathway, PKR activation was evaluated in wild-type and MyD88-deficient macrophages following LPS stimulation. To this end, bone marrow-derived macrophages from either wild-type or MyD88-deficient mice were stimulated for the indicated time periods with either LPS (10 ng/ml) or CpG (10 μ M), then washed in PBS and lysed in TNT lysis buffer. Because PKR is phosphorylated on a threonine residue upon activation, activation of PKR was assayed by immunoblotting lysates (40 μ g/sample), resolved by SDS-PAGE electrophoresis, with an antibody that specifically recognizes phosphorylated PKR. Activated, phosphorylated PKR was detectable in LPS-stimulated wild-type macrophages (Figure 4A). Interestingly, phosphorylated PKR was also detected in LPS-stimulated MyD88-deficient macrophages, although a significantly smaller fraction of PKR is phosphorylated in these cells. In addition, MyD88-deficient cells activate PKR with slower kinetics, similar to the delayed kinetics of NF- κ B and JNK activation. These observations strongly suggest that, in response to LPS stimulation, PKR is activated by MyD88-dependent as well as MyD88-independent mechanisms. If the MyD88-dependent pathway can activate PKR in response to LPS, it is conceivable that PKR may be activated by other TLRs. Therefore, PKR activation in response to CpG stimulation was tested. Indeed, PKR is phosphorylated in response to CpG (Figure 4A), indicating that PKR is a component of the TLR9 pathway as well as the TLR4 pathway.

To determine whether PKR and TIRAP interact, lysates from 293T cells transfected with either 3.5 μ g of an HA PKR kinase dead (KD) mutant or 1.5 μ g of Flag TIRAP were subjected to immunoprecipitation analyses as described above, followed by SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. The PKR KD mutant rather than wild type PKR was used because overexpressing PKR induces cell death. PKR did, in fact, co-immunoprecipitate with TIRAP (Figure 4B), further supporting the link between PKR and TIRAP established above.

Because TIRAP may not regulate PKR directly, the interaction between TIRAP and two other proteins, p58 and PACT, was analyzed. p58 is a tetratricopeptide repeat-containing protein that negatively regulates PKR activity (Lee 1994), and PACT is a dsRNA-binding domain-containing protein that

WO 02/090520

PCT/US02/14915

activates PKR in response to cellular stress (Patel 19980). Lysates from 293T cells transfected with either p58-encoding vector (3.5 μ g) or PACT (3.5 μ g) and Flag TIRAP (1.5 μ g) were subject to immunoprecipitation analyses followed by SDS-PAGE and immunoblotting with the indicated antibodies. TIRAP was shown to immunoprecipitate with both p58 and PACT (Figure 4C), indicating that PKR and/or its regulators p58 and PACT may be downstream targets of TIRAP.

Example 4. The cell permeable TIRAP inhibitory peptide inhibits LPS but not CpG induced NF- κ B activation, PKR phosphorylation, and JNK phosphorylation.

To further elucidate the function of TIRAP, alternative methods of TIRAP inhibition were sought. The fact that the TIRAP P125H mutant functioned as a dominant negative and could no longer interact with TLR4 indicated that the mutated residue is critical for TIRAP activity, including its ability to interact with the upstream receptor. Therefore, a peptide corresponding to this region of wild-type TIRAP may act as a site-specific inhibitor of TIRAP by competing with TIRAP for interaction with TLR4. To test this possibility, a cell-permeable peptide, useful for cellular assays, was first constructed. A synthetic peptide corresponding to this region of mTIRAP was linked to the C-terminus of a peptide derived from antennapedia. The antennapedia peptide can cross cell membranes when added exogenously to cell cultures, and serves as a vehicle to deliver the fusion peptide into the cell (Derossi 1998). A RAW macrophage cell line stably transfected with an NF- κ B-dependent luciferase reporter gene (RAW κ B) was pretreated for 1 hour with the indicated concentrations of either the TIRAP inhibitory peptide or 50 μ M of control peptide, then stimulated for 5 hours with LPS (10 ng/ml) before harvesting for the reporter assay. Samples were treated and stimulated in duplicates. Pretreatment of the RAW κ B cell line with the TIRAP peptide potently inhibited LPS-induced NF- κ B activation (Figure 5A). However, no effect on NF- κ B activation was observed upon pretreatment with either the solvent, DMSO, or a control peptide in which the TIRAP sequence was reversed (Figure 5A).

To determine the effect of TIRAP on I κ B- α degradation, the following experiment was performed. RAW cells, either untreated or pretreated for 1 hour with 40 μ M of the TIRAP peptide, were either left unstimulated or stimulated with LPS (10 ng/ml) for the indicated time periods before harvesting for

WO 02/090520

PCT/US02/14915

lysis in TNT lysis buffer. Lysates (30 µg/sample) were resolved by SDS-PAGE electrophoresis followed by immunoblotting with an anti-IκB-α degradation. Consistent with the block in NF-κB activation demonstrated above, LPS stimulation did not induce IκB-α degradation in RAW cells pretreated with the
5 TIRAP peptide (Figure 5B).

To determine whether a TIRAP mutant peptide inhibits CpG-stimulated signaling, RAW κB cells were pretreated with the indicated concentrations of the TIRAP peptide and stimulated for 5 hours with either LPS (10 ng/ml) or CpG (10 µM) before harvesting for reporter assay. Importantly,
10 pretreatment of RAW cells with the TIRAP peptide did not inhibit either CpG-induced NF-κB activation (Figure 5C) or CpG-induced IκB-α degradation, nor did the peptide inhibit NF-κB activation mediated by IL-1β cytokine in 293 cells.

To determine whether a TIRAP mutant peptide inhibits PKR and JNK phosphorylation induced by LPS or CpG, RAW cells either untreated or
15 pretreated with 40 µM of the TIRAP peptide were either left unstimulated or stimulated with either LPS (10 ng/ml) or CpG (10 µM) for the indicated time periods before harvest and lysis. Lysates (30 µg/sample) were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblotting with antibodies that specifically recognize phosphorylated PKR and JNK. Furthermore, the TIRAP peptide, but not the
20 control peptide, also inhibited PKR phosphorylation induced by LPS, but not CpG, in RAW cells (Figure 5D), supporting the possibility that PKR functions downstream of TIRAP.

These data are consistent with the results from transient transfection assays which utilized the TIRAP P125H dominant negative construct, and they
25 strongly support the hypothesis that TIRAP functions downstream of TLR4, but not TLR9 or IL-1R. Moreover, the fact that the TIRAP peptide does not inhibit CpG-induced effects rules out the possibility that the TIRAP peptide inhibits LPS signaling by causing cytotoxicity or by interfering non-specifically with other cellular processes.

30 Example 5. TIRAP controls dendritic cell maturation.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

In view of the important role for TIRAP in mediating LPS-responsiveness in macrophages, the role of TIRAP in LPS-induced DC maturation was investigated. TIRAP is likely to be critical in these events because MyD88-deficient DCs retain the ability to upregulate costimulatory molecules in response to LPS stimulation (Kaisho 2001). To determine the effect of TIRAP on the expression of the costimulatory molecules B7.1 and B7.2, flow cytometry was performed on wild type and MyD88^{-/-}DC. DCs were either unstimulated (shaded), stimulated with LPS (10 ng/ml) or CpG (10 μ M) (black line), or pretreated with TIRAP peptide (10 μ M) prior to stimulation with LPS or CpG (dashed line). Indeed, the TIRAP peptide abolished LPS-induced upregulation of B7.1 and B7.2 molecules in both wild-type and MyD88-deficient DCs (Figure 6A). However, the peptide had no effect on CpG-induced DC maturation (Figure 6A).

To determine the effects of the TIRAP peptide on cytokine production, DCs were treated with or without TIRAP peptide prior to stimulation with LPS or CpG (as described above), and the production of IL-12 and IL-6 was measured. Addition of TIRAP peptide inhibited production of IL-12 and IL-6 cytokines in response to stimulation with LPS, but not CpG (Figure 6B).

Lastly, the effect of TIRAP peptide on T cell proliferation was evaluated. Stimulation of CD4 T cell proliferation by DCs treated with or without TIRAP peptide prior to stimulation with LPS was performed in the presence of varying concentrations of E α peptide. DCs were fixed prior to incubation with 1H3.1 TCR transgenic T cells (specific for E α peptide bound to I-A). Proliferation was measured by ³H-thymidine incorporation for the last 24h of a 48h culture. TIRAP peptide-treated DCs from either wild-type or MyD88-deficient mice were unable to induce T cell proliferation (Figure 6C). These data demonstrate that TIRAP can activate a pathway that induces DC maturation and suggest that TIRAP is responsible for the LPS-induced maturation in MyD88-deficient DCs. As these results indicate, TIRAP appears to be critical for the ability of DCs to produce cytokines, upregulate costimulatory molecules, and prime naïve T cells in response to LPS stimulation.

Example 6. Generation of TIRAP Knock-Out Mice

WO 02/090520

PCT/US02/14915

To make the targeting construct, 7.4 kb of the mouse TIRAP gene was cloned by RT-PCR and subcloned into a pEasy Flox vector. The second exon of the mouse TIRAP gene, which encodes 610 bp of the 730 bp-coding sequence, was then replaced with neomycin in the pEasy Flox vector using techniques
 5 standard in the art. It is our current understanding that the 3.7 kb of the 5' flanking sequences and 3.1 kb of the 3' flanking sequences direct homologous recombination at the mouse TIRAP locus.

Embryonic stem cells were then transfected with the targeting construct by electroporation, and selected using G418 and gangecyclovir. To
 10 identify clones that have integrated the targeting construct by homologous recombination, clones were screened by Southern analysis. Two positive clones were then chosen for injection into pseudopregnant mothers.

From these injected clones developed two highly chimeric male mice, which were bred with female littermates. Tail DNAs were then obtained
 15 from pups for Southern analysis. Germline transmission was obtained with two mice. Lastly, these two F1 mice were interbred to generate homozygous TIRAP knockout mice, which were born at the expected Mendelian frequency.

Example 7. Exposure of Cells of TIRAP Knock-Out Mice to TLR Ligands

Figure 8 graphically represents deficient B cell proliferation in cells
 20 from the TIRAP knock-out mice produced in the manner described in Example 6. Splenocytes were taken from wild-type and the TIRAP knock-out mice, counted and plated into 96 well plates at about 100,000 cells/100 µl. Serial dilutions of LPS (starting from 20 µg/ml. final concentration) and BLP (starting from 300
 25 ng/ml. final concentration) were added to the splenocytes. Thirty-six hours later, radioactive 3H thymidine was added to each well. The incorporation of 3H thymidine into proliferating B cells was assessed 12 hours later by use of a beta counter. As the results shown Figure 8 indicate, the amount of 3H thymidine incorporated into the cells, and thus the B cells' proliferation, was significantly
 30 reduced in the TIRAP knock-out mice splenocytes as compared to the wild-type mouse splenocytes.

Figure 9 graphically represents cytokine production by dendritic cells from TIRAP knock-out mice produced in the manner described in Example 6.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

Bone marrow-derived cells were taken from the wild-type and TIRAP knock-out mice, and were cultured for five days in complete RPMI supplemented with GM-CSF in 24-well plates. On day 5, the cells were counted and replated into 24-well plates at about 100,000 cells/ml., and stimulated overnight with LPS (10 ng./ml.) or BLP (100 ng./ml.). Twenty-four hours post stimulation, supernatants were harvested for ELISA.

For the ELISA analysis, plates were coated with appropriate capture antibodies, namely IL-6 or TNF- α , washed, and then coated with supernatants from the various samples. After overnight incubation, the supernatant was washed off, and the appropriate biotin-conjugated detection antibody was added. Streptavidin-HRP was then added, followed by its substrate. Colorimetric changes were monitored using an ELISA plate reader. Quantification of cytokine concentrations in supernatants was done by comparison with a standard made using the respective recombinant cytokines. As the results shown Figure 9 indicate, the amount of cytokine production by dendritic cells was significantly reduced in the TIRAP knock-out mice dendritic cells as compared to the wild-type mouse dendritic cells.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

What is claimed is:

1. An isolated polynucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1.
2. An expression vector comprising a polynucleotide that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3 when said expression vector is present in a compatible host cell.
3. A process for producing a recombinant host cell comprising the step of introducing said expression vector of claim 2 into a host cell such that said host cell, under appropriate culture conditions, produces said polypeptide.
4. A recombinant host cell produced by the process of claim 3.
5. A membrane of a recombinant host cell of claim 4, wherein said cell expresses said polypeptide.
6. A process for producing a polypeptide comprising culturing a recombinant host cell of claim 4 under conditions sufficient for the production of said polypeptide and recovering said polypeptide from the culture.
7. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.
8. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that is fully complementary to a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.
9. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that is fully complementary to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1.
10. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:3.
11. The polypeptide of claim 10 consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:3.
12. An antibody immunospecific to the polypeptide of claim 10.
13. A polypeptide obtainable by expressing a nucleotide sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:1.
14. An isolated polynucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:5.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

15. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:9.
16. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:9.
- 5 17. An isolated polynucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:2.
18. An expression vector comprising a polynucleotide that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4 when said expression vector is present in a compatible host cell.
- 10 19. A process for producing a recombinant host cell comprising the step of introducing said expression vector of claim 18 into a host cell such that said host cell, under appropriate culture conditions, produces said polypeptide.
20. A recombinant host cell produced by the process of claim 19.
21. A membrane of a recombinant host cell of claim 20, wherein said cell
- 15 expresses said polypeptide.
22. A process for producing a polypeptide comprising culturing a recombinant host cell of claim 20 under conditions sufficient for the production of said polypeptide and recovering said polypeptide from the culture.
23. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.
- 20 24. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that is fully complementary to a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.
25. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that is fully
- 25 complementary to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:2.
26. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:4.
27. The polypeptide of claim 26 consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:4.
- 30 28. An antibody immunospecific to the polypeptide of claim 26.
29. A polypeptide obtainable by expressing a nucleotide sequence comprising the sequence of SEQ ID NO:2.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

30. An isolated polynucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:5.
31. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:9.
- 5 32. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:9.
33. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:11.
34. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence set forth in SEQ
10 ID NO:11.
35. A drug screening method comprising the steps of
- a. Providing a polypeptide comprising at least the TIRAP-binding domain of TLR4;
 - b. Providing a TIRAP polypeptide or other polypeptide that comprises a
15 TLR4 binding domain;
 - c. Providing a candidate compound;
 - d. Placing the candidate compound into proximity with the polypeptide comprising the TIRAP-binding domain of TLR4 and the TIRAP polypeptide or other polypeptide; and
 - 20 e. Determining whether the candidate compound competes with the binding of either of the polypeptide comprising the TIRAP-binding domain of TLR4 or the TIRAP polypeptide or other polypeptide.
36. The drug screening method of claim 35, wherein the TIRAP-binding domain of TLR4 comprises TLR4 and the TIRAP polypeptide or other polypeptide
25 comprises the polypeptide set forth in SEQ ID NO:9.
37. The drug screening method of claim 35, wherein the TIRAP-binding domain of TLR4 comprises TLR4 and the TIRAP polypeptide or other polypeptide comprises the polypeptide set forth in SEQ ID NO:10.
38. A method for blocking TIRAP signaling in a cell, said method comprising
30 administering to said cell an inhibitory amount of a TIRAP inhibitor.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

39. The method of claim 38, wherein said TIRAP inhibitor is a polypeptide.
40. The method of claim 38, wherein said TIRAP inhibitor is a peptide mimetic.
41. The method of claim 39, wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence selected from the group of amino acid sequences set forth in SEQ ID NOS: 9, 11 and 12.
42. A fusion protein comprising a TIRAP inhibitory polypeptide and a second polypeptide useful for delivery of said fusion protein to a cell.
43. The fusion protein of claim 42, wherein said second polypeptide comprises Antennapedia.
44. A method for screening for antagonists of TIRAP activity which comprises screening for peptides or small molecules that inhibit the MyD88-independent signaling of TLR4.
45. A method of screening for antagonists of TIRAP activity which comprises screening for peptides or small molecules that inhibit binding of TIRAP to TLR4.
46. A method for screening for agonists of TIRAP activity which comprises screening for peptides or small molecules that activate the MyD88-independent signaling of TLR4.
47. A method of screening for agonists of TIRAP activity which comprises screening for peptides or small molecules that bind to the TIRAP binding site of TLR4.
48. The method of claim 44 which comprises contacting a candidate TIRAP antagonist with a TLR4 polypeptide or a TIRAP binding domain thereof and with TIRAP or a TLR4 binding domain thereof, sequentially in any order or simultaneously, and determining whether or not the candidate antagonist inhibits the binding of TIRAP or a TLR4 binding domain thereof with the TLR4 polypeptide or TIRAP binding domain thereof.
49. A TIRAP antagonist which comprises TIRAP having at least one mutation in the TLR4 binding domain thereof such that the mutant binds to TLR4 but does not induce MyD88-independent signaling of TLR4.

WO 02/090520

PCT/US02/14915

50. A TIRAP antagonist which comprises TIRAP having at least one mutation in the TLR4 binding domain thereof such that the mutant binds to TIRAP and prevents TIRAP binding to TLR4 but does not induce MyD88-independent signaling of TLR4.
51. The TIRAP antagonist of claim 49 which comprises at least one mutation in the region of amino acid 118 to 131 as measured in human TIRAP.
52. The TIRAP antagonist of claim 51 wherein the binding domain of TIRAP has a proline to histidine mutation at position 125.
53. A method of treating a disease state associated with TIRAP expression which comprises internally administering a polypeptide having a mutation in the TLR4 binding domain thereof such that the polypeptide binds to TLR4 but does not induce MyD88-independent signaling of TLR4.
54. A TIRAP antagonist which is a small molecule that inhibits binding of TIRAP to TLR4.
55. A method of modulating the immune response in an animal which comprises internally administering a TIRAP antagonist.
56. A method of modulating the immune response in an animal which comprises internally administering a polynucleotide which is anti-sense to a polynucleotide encoding TIRAP.
57. A transgenic knock-out non-human comprising disruption in the endogenous toll/interleukin-1 receptor adapter protein gene, wherein said disruption has been introduced into its genome by homologous recombination with a DNA targeting construct in an embryonic stem cell such that the targeting construct is stably integrated in the genome of said non-human.
58. The transgenic knock-out non-human of claim 57, wherein said non-human is a mouse.

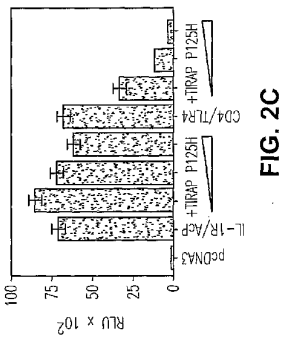
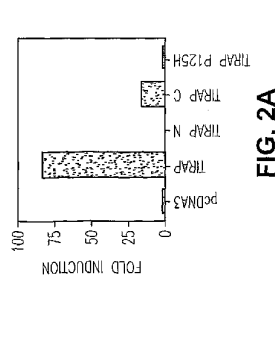
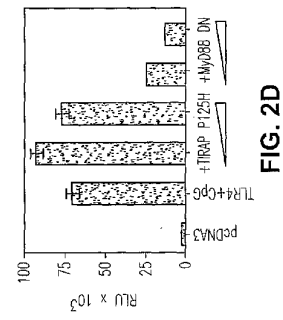
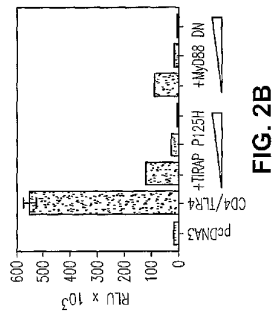
		1/14	
h TIRAP	1	M A S S T S L P A P G S R P K K P L G K M A D W F R Q T L L K K P K K R P N S P	40
m TIRAP	1	M A S S S S V R A S T P S K K P R D K I A D W F R Q A L L K K P K K M P I S Q	40
h TIRAP	41	E S T S S D A S Q P T S Q D I - - - - - L P P S L S S V T S - - - - -	66
m TIRAP	41	E S H L Y D G S Q T A T Q D C L S P S S C S S P P S H S S P E S R S S P S S C S S	80
h TIRAP	67	- - - - - E S L P P T H A S D S G S S - - - - - R W S K D Y D V C V C H S E D L V A A	100
m TIRAP	81	S G M S P T S R P P H V D S S S S S G R W S K D Y D V C V C H S E D L V A A	120
h TIRAP	101	Q D L V S Y L E G S T A S L R C F L Q L R D A T P G A I V S E L C Q A L S S	140
m TIRAP	121	Q E V S Y L E G S Q A S L R C F L Q L R D A P G G A I V S E L C Q A L S R S	160
h TIRAP	141	H C R V L C T P G F L Q D P W C K Y Q M L Q A L T F P G A E D C T I P L L S	180
m TIRAP	161	H C R V L C T P G F L R D P W C K Y Q M L Q A L T F P G A E D C T I P L L S	200
h TIRAP	181	G L S R A Y P P E L R F M Y Y V D C R G P D G G F R Q V K E A V M R C K L L Q	220
m TIRAP	201	G L S R A Y P P E L R F M Y Y V D C R G K D G G F Y Q V K E A V I H Y L E T L	240
h TIRAP	221	E G E G E R D S A T V S D L L	221
m TIRAP	241	S	241

FIG. 1

WO 02/090520

PCT/US02/14915

2/14



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/090520

PCT/US02/14915

3/14

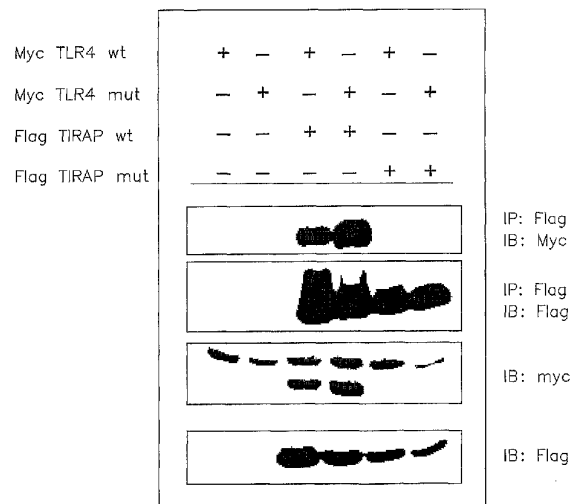


FIG. 3A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

4/14

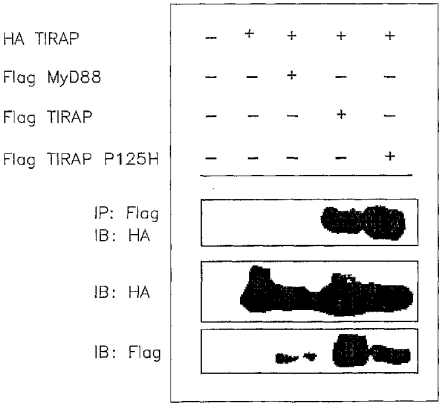


FIG. 3B

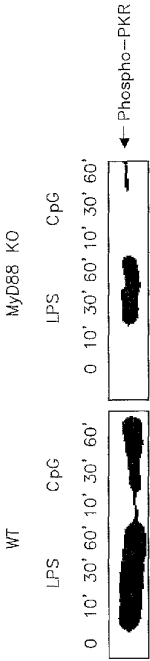


FIG. 4A

WO 02/090520

PCT/US02/14915

6/14

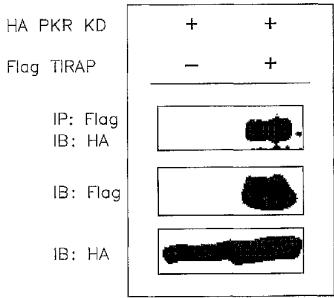


FIG. 4B

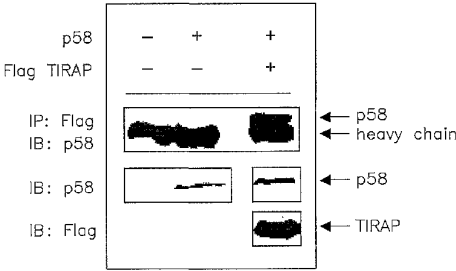
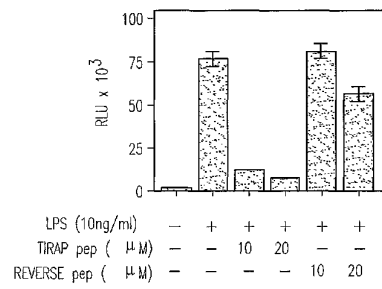
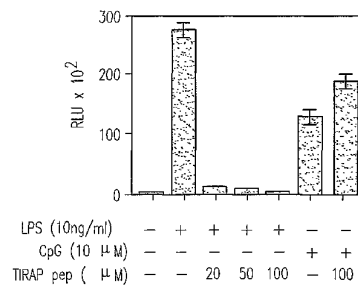


FIG. 4C

WO 02/090520

PCT/US02/14915

8/14**FIG. 5A****FIG. 5C**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

9/14

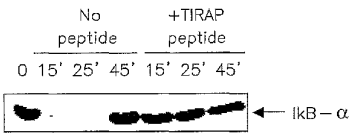


FIG. 5B

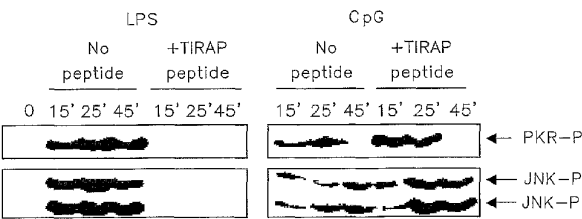


FIG. 5D

WO 02/090520

PCT/US02/14915

10/14

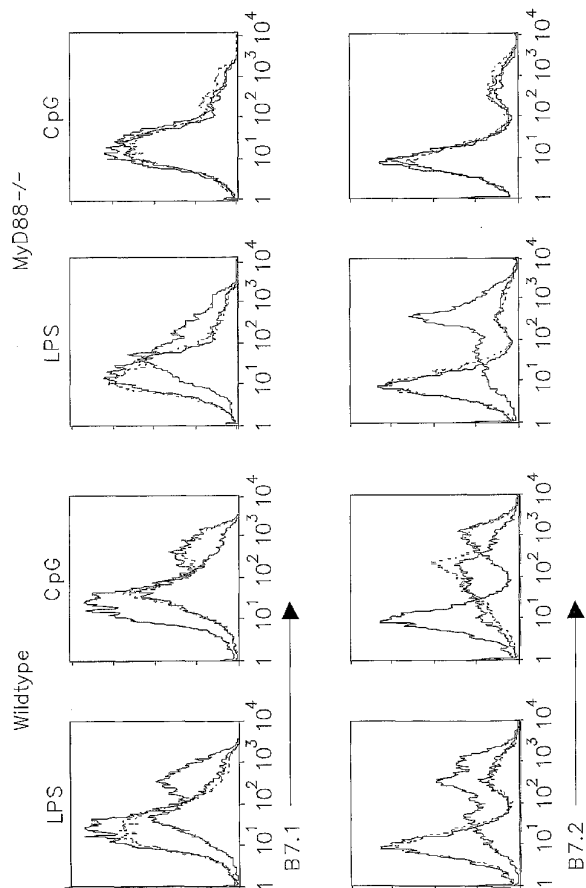


FIG. 6A

WO 02/090520

PCT/US02/14915

11/14

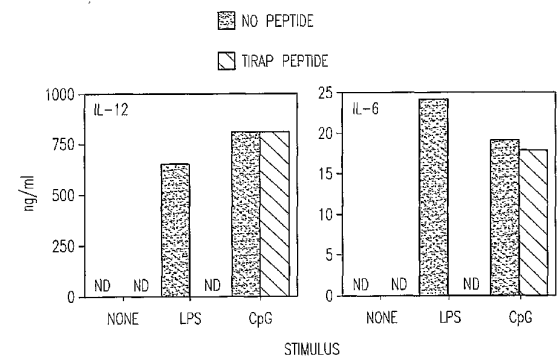
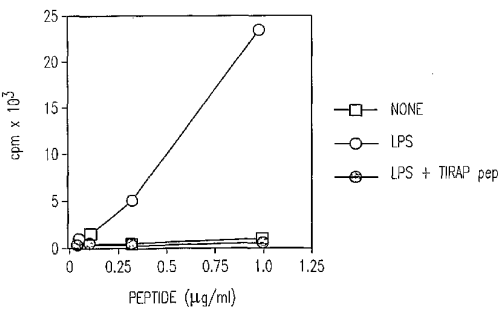


FIG. 6B



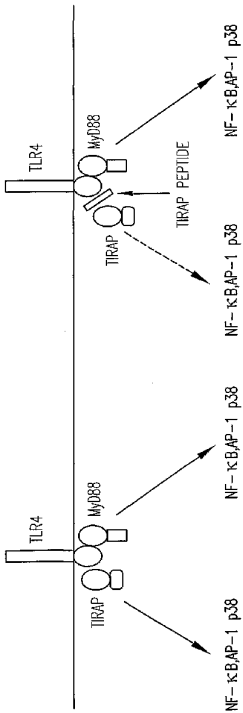


FIG. 7

13/14

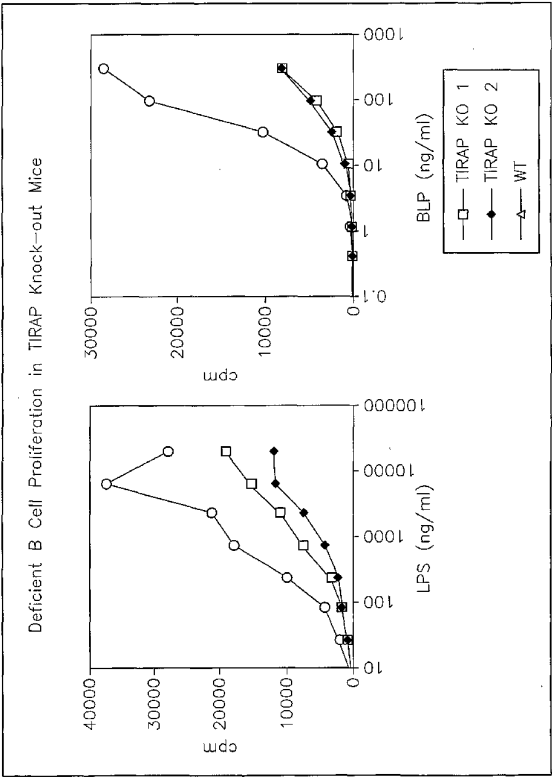


FIG. 8

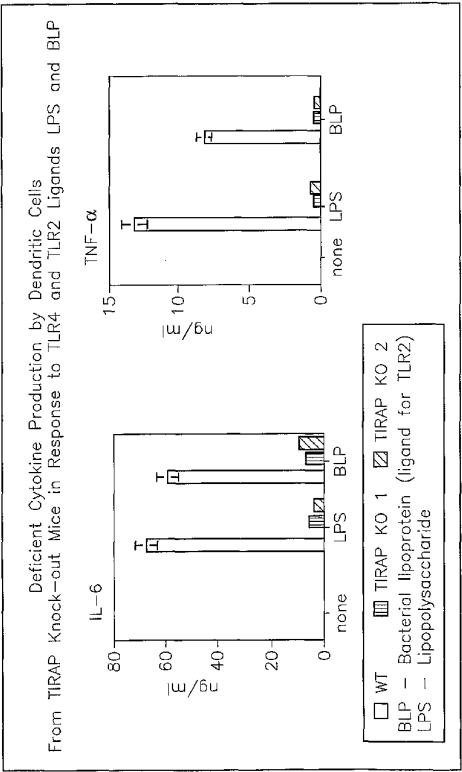


FIG. 9

WO 02/090520

PCT/US02/14915

SEQUENCE LISTING

<110> YALE UNIVERSITY
MEDHITOV, Ruslan
HORNG, Tiffany
BARTON, Gregory

<120> TOLL/INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ADAPTER PROTEIN (TIRAP)

<130> 044574-5101WO

<150> 60/289,738
<151> 2001-05-09

<150> 60/289,815
<151> 2001-05-09

<150> 60/289,866
<151> 2001-05-14

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 708
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> TIRAP polynucleotide

<400> 1
atggcatcat cgacctccct cccagctcct ggctctcggc ctaagaagcc tctaggcaag 60
atggctgact ggctcaggca gacctgctg aagaagccca agaagaggcc caactcccca 120
gaagcacct ccagcgatgc ttcacagcct acctcacagg acagcccact accccaagc 180
ctcagctcag tcagctctcc cagcctgcca cccacacatg cgaagtgaac tggcagtagt 240
cgctggagca aagactatga cgtctgctg tgccacagtg aggaagacct ggtggccgac 300
caggacctgg tctcctactt ggaaggcagc actgcccagc tgcgctgctt cctgcaactc 360
cgggatgcaa ccccaggcgg cgctatagtg tccagctgt gccaggcact gacagtagt 420
cactgcccgg tgcgtctcat cagccggggc ttccctcagg acccctgggt caagtaccag 480
atgctgcagg cctgaccga ggctccaggg gccgagggct gccaccatcc cctgtgtctg 540
ggcctcagca gagctgccta cccacctgag ctccgattca tgtactaagt cgatggcagg 600
ggccttgatg gtggcttttg tcaagtcaa gaagctgtca tgcgttgtaa gctactacag 660
gagggagaag gggaacggga ttcagctaca gtatctgato tactttga 708

<210> 2
<211> 726
<212> DNA
<213> Mus sp.

<220>
<221> misc_feature
<223> TIRAP polynucleotide

WO 02/090520

PCT/US02/14915

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (417)..(417)
<223> n=A,C,T,G

<400> 2
atggcttcat cctcctccgt cccagcctcc tccactccgt ccaagaagcc togagacaag 60
atagctgact gggtcaggca ggctctgttg aagaagccca agaagatgcc gatctcccag 120
gaaagccacc ttatgatggg ttacacagca gccacacagg atggctcttc accctcgagc 180
tgacagctcac ccccgagtca cagtccacc gagagccgta gctcaccctc gagctgcagt 240
tcaggaaagt caccctaccc gccaccaaca cagctggaca gcagcagcag cagcagtggc 300
cgctggagca aagactacga tgtctgcttg tcccacagt agcaggactt ggaggcggcc 360
caggagctgg ttctctactt ggagggtagc caggccagtc tacgctgctt cctgcacctt 420
cgggatgcag ccccggttgg cgccattgtt tcggagctat gccaggcact gagtcgtagt 480
cactgcccgt tgcctgctat cactccaggg ttctctcggg acccctgggt caagtaccag 540
atgctgcagg cctgcacgga ggcgccggcg tcggagggtt gcaccatacc cctgctgtcc 600
ggcctgtcca gagccgcta cccgcgggaa ctccgattca tctactatgt ggatggcaga 660
ggcaaggacg gagggcttta ccaagtcagg gaggtgttta tacactatct ggagacacta 720
agctga 726

```

```

<210> 3
<211> 235
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> TIRAP polypeptide

```

```

<400> 3
Met Ala Ser Ser Thr Ser Leu Pro Ala Pro Gly Ser Arg Pro Lys Lys
1 5 10 15

Pro Leu Gly Lys Met Ala Asp Trp Phe Arg Gln Thr Leu Leu Lys Lys
20 25 30

Pro Lys Lys Arg Pro Asn Ser Pro Glu Ser Thr Ser Ser Asp Ala Ser
35 40 45

Gln Pro Thr Ser Gln Asp Ser Pro Leu Pro Pro Ser Leu Ser Ser Val
50 55 60

Thr Ser Pro Ser Leu Pro Pro Thr His Ala Ser Asp Ser Gly Ser Ser
65 70 75 80

Arg Trp Ser Lys Asp Tyr Asp Val Cys Val Cys His Ser Glu Glu Asp
85 90 95

Leu Val Ala Ala Gln Asp Leu Val Ser Tyr Leu Glu Gly Ser Thr Ala
100 105 110

Ser Leu Arg Cys Phe Leu Gln Leu Arg Asp Ala Thr Pro Gly Gly Ala
115 120 125

Ile Val Ser Glu Leu Cys Gln Ala Leu Ser Ser Ser His Cys Arg Val
130 135 140

```


WO 02/090520

PCT/US02/14915

Leu Leu Ile Thr Pro Gly Phe Leu Gln Asp Pro Trp Cys Lys Tyr Gln
 145 150 155 160
 Met Leu Gln Ala Leu Thr Glu Ala Pro Gly Ala Glu Gly Cys Thr Ile
 165 170 175
 Pro Leu Leu Ser Gly Leu Ser Arg Ala Ala Tyr Pro Pro Glu Leu Arg
 180 185 190
 Phe Met Tyr Tyr Val Asp Gly Arg Gly Pro Asp Gly Gly Phe Arg Gln
 195 200 205
 Val Lys Glu Ala Val Met Arg Cys Lys Leu Leu Gln Glu Gly Glu Gly
 210 215 220
 Glu Arg Asp Ser Ala Thr Val Ser Asp Leu Leu
 225 230 235

<210> 4
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> TIRAP polypeptide

<400> 4
 Met Ala Ser Ser Ser Val Pro Ala Ser Ser Thr Pro Ser Lys Lys
 1 5 10 15
 Pro Arg Asp Lys Ile Ala Asp Trp Phe Arg Gln Ala Leu Leu Lys Lys
 20 25 30
 Pro Lys Lys Met Pro Ile Ser Gln Glu Ser His Leu Tyr Asp Gly Ser
 35 40 45
 Gln Thr Ala Thr Gln Asp Gly Leu Ser Pro Ser Ser Cys Ser Ser Pro
 50 55 60
 Pro Ser His Ser Ser Pro Glu Ser Arg Ser Ser Pro Ser Ser Cys Ser
 65 70 75 80
 Ser Gly Met Ser Pro Thr Ser Pro Pro Thr His Val Asp Ser Ser Ser
 85 90 95
 Ser Ser Ser Gly Arg Trp Ser Lys Asp Tyr Asp Val Cys Val Cys His
 100 105 110
 Ser Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Gln Glu Leu Val Ser Tyr Leu Glu
 115 120 125
 Gly Ser Gln Ala Ser Leu Arg Cys Phe Leu Gln Leu Arg Asp Ala Ala
 130 135 140

WO 02/090520

PCT/US02/14915

Pro Gly Gly Ala Ile Val Ser Glu Leu Cys Gln Ala Leu Ser Arg Ser
 145 150 155 160
 His Cys Arg Val Leu Leu Ile Thr Pro Gly Phe Leu Arg Asp Pro Trp
 165 170 175
 Cys Lys Tyr Gln Met Leu Gln Ala Leu Thr Glu Ala Pro Ala Ser Glu
 180 185 190
 Gly Cys Thr Ile Pro Leu Leu Ser Gly Leu Ser Arg Ala Ala Tyr Pro
 195 200 205
 Pro Glu Leu Arg Phe Met Tyr Tyr Val Asp Gly Arg Gly Lys Asp Gly
 210 215 220
 Gly Phe Tyr Gln Val Lys Glu Ala Val Ile His Tyr Leu Glu Thr Leu
 225 230 235 240

Ser

<210> 5
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> naturally occurring TIRAP inhibitory peptide

<400> 5
 ctgcaactcc gggatgcaac cccaggcggc gctatagtg 39

<210> 6
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <223> degenerate TIRAP polynucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(42)
 <223> Y=C,T; N=A,G,C,T; R=A,G; H=A,C,T; W=A,T; S=G,C

<400> 6
 ytncaarytm gngaygcnac nccngggggn gonathgtnw sn 42

<210> 7
 <211> 42
 <212> DNA

WO 02/090520

PCT/US02/14915

<213> Mus sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> naturally occurring TIRAP inhibitory peptide

<400> 7

ctgcagcttc gggatgcagc cccgggtggc gccattgttt cg

42

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Mus sp.

<220>

<221> misc_feature

<223> degenerate TIRAP polynucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> Y=C,T; N=A,G,C,T; R=A,G; M=A,C; H=A,C,T; W=A,T; S=G,C

<400> 8

ytncaryttn gngaygcngc nccggnggn gcnathgtntw en

42

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> TIRAP inhibitory polypeptide

<400> 9

Leu Gln Leu Arg Asp Ala Thr Pro Gly Gly Ala Ile Val Ser
1 5 10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> TIRAP inhibitory polypeptide

<400> 10

Leu Gln Leu Arg Asp Ala Ala Pro Gly Gly Ala Ile Val Ser
1 5 10

WO 02/090520

PCT/US02/14915

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TIRAP inhibitory peptide
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> TIRAP inhibitory polypeptide

<400> 11
 Val Ser Asp Arg Asp Val Leu Pro Gly Thr Cys Val Trp Ser
 1 5 10

<210> 12
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> TIRAP/Antennapedia fusion protein
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> TIRAP/Antennapedia fusion protein

<400> 12
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

Leu Gln Leu Arg Asp Ala Ala Pro Gly Gly Ala Ile Val Ser
 20 25 30

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
14 November 2002 (14.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/090520 A3(51) International Patent Classification: A01N 63/00,
A61K 48/00, C12N 5/00, 5/02, 15/00, 15/09, 15/63, 15/70,
15/74, C07K 1/00, 14/00, 17/00, C07H 21/04

(21) International Application Number: PCT/US02/14915

(22) International Filing Date: 9 May 2002 (09.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/289,738 9 May 2001 (09.05.2001) US
60/289,815 9 May 2001 (09.05.2001) US
60/289,866 29 August 2001 (29.08.2001) US
10/101,398 19 March 2002 (19.03.2002) US(81) Designated States (*national*): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
— with international search report(71) Applicant: YALE UNIVERSITY [US/US]; 451 College
Street, New Haven, CT 06520 (US).(72) Inventors: MEDZHITOV, Ruslan; 310 Cedar Street,
New Haven, CT 06520-8011 (US). HORNG, Tiffany;
100H Howe Street, Apt. 412, New Haven, CT 06511 (US).
BARTON, Gregory; 62 Woodbine Street, Hamden, CT
06517 (US).(74) Agents: HALLIDAY, Christopher, L. et al.; Morgan,
Lewis & Bockius LLP, 1701 Market Street, Philadelphia,
PA 19103 (US).(88) Date of publication of the international search report:
10 July 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/090520 A3

(54) Title: TOLL/INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ADAPTOR PROTEIN (TIRAP)

(57) Abstract: TIRAP polypeptides and polynucleotides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques are disclosed. Also disclosed are methods for utilizing TIRAP polypeptides and polynucleotides in therapy, and diagnostic assays for such.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/14915															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A01N 63/00;A61K 48/00;C12N 5/00,5/02,15/00,15/09,15/63,15/70,15/74;C07K 1/00,14/00,17/00;C07H 21/04; US CL : 424/93.2;435/320.1,325:530/351,536/23.5;800/21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.2;435/320.1,325:530/351;536/23.5;800/21 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X, P</td> <td>FITZGERALD et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction Nature. September 2001, Vol. 413, pages 78-83.</td> <td>2,3,4,6,7,10,11,16,27</td> </tr> <tr> <td>X, E</td> <td>US 2002/016460 A1 (SIMS et al) 07 November 2002 (07.11.2002), pages 9-11 and 17-18.</td> <td>1,2,3,4,6,7,16,27,28,3 5,36,38,39,41,57-58 38,39,41</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BONNERT et al. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. FEBS Letters. 1997, Vol. 402, pages 81-84.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SIGMUND et al. Viewpoint: Are studies in genetically altered mice out of control? Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000, Vol. 20, pages 1428-1429.</td> <td>57,58</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X, P	FITZGERALD et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction Nature. September 2001, Vol. 413, pages 78-83.	2,3,4,6,7,10,11,16,27	X, E	US 2002/016460 A1 (SIMS et al) 07 November 2002 (07.11.2002), pages 9-11 and 17-18.	1,2,3,4,6,7,16,27,28,3 5,36,38,39,41,57-58 38,39,41	Y	BONNERT et al. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. FEBS Letters. 1997, Vol. 402, pages 81-84.		A	SIGMUND et al. Viewpoint: Are studies in genetically altered mice out of control? Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000, Vol. 20, pages 1428-1429.	57,58
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X, P	FITZGERALD et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction Nature. September 2001, Vol. 413, pages 78-83.	2,3,4,6,7,10,11,16,27															
X, E	US 2002/016460 A1 (SIMS et al) 07 November 2002 (07.11.2002), pages 9-11 and 17-18.	1,2,3,4,6,7,16,27,28,3 5,36,38,39,41,57-58 38,39,41															
Y	BONNERT et al. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. FEBS Letters. 1997, Vol. 402, pages 81-84.																
A	SIGMUND et al. Viewpoint: Are studies in genetically altered mice out of control? Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000, Vol. 20, pages 1428-1429.	57,58															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																	
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Special categories of cited documents:</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*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)</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*Z* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Special categories of cited documents:		*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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	*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*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	*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)	*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	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed				
Special categories of cited documents:																	
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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																
E earlier application or patent published on or after the international filing date	*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																
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)	*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																
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family																
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
Date of the actual completion of the international search 01 April 2003 (01.04.2003)		Date of mailing of the international search report 22 APR 2003															
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Teresa D. Roberts for Brian Whitman Telephone No. (703) 308-0196															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/14915
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	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.: 1-11, 13, 15-29, 34-41, 44-50, 54, 57, 58
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
		<input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/14915

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions, which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-11, 13, 15-27, 29, and 35-37, drawn to an isolated polynucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 (human TIRAP) or SEQ ID NO: 2 (mouse TIRAP); an isolated polypeptide comprising SEQ ID NO: 3 (human) or SEQ ID NO: 4 (mouse), an expression vector comprising SEQ ID NO: 1 or 2, a drug screening method using a polypeptide comprising at least the TIRAP-binding domain of TLR4.

Group II, claim(s) 12, drawn to an antibody immunospecific to the polypeptide comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 3.

Group III, claim(s) 14, drawn to an isolated polynucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 5.

Group IV, claim(s) 28, drawn to an antibody immunospecific to the polypeptide comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4.

Group V, claim(s) 33, 42, and 43, drawn to an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11.

Group VI, claim(s) 34, drawn to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 11.

Group VII, claim(s) 38-41, drawn to a method for blocking TIRAP signaling in a cell comprising administering to the cell an inhibitory amount of a TIRAP inhibitor.

Group VIII, claim(s) 44, 46, and 48, drawn to a method for screening antagonist of TIRAP activity which comprise screening for peptides or small molecules that inhibit or activate the MyD88-independent signaling of TLR4.

Group IX, claim(s) 45 and 47, drawn to a method for screening antagonist of TIRAP activity which comprise screening for peptides or small molecules that inhibit the binding of TIRAP to TLR4.

Group X, claim(s) 49-50 and 54, drawn to a TIRAP antagonist, which comprises TIRAP having at least one mutation in the TLR4 binding domain thereof.

Group XI, claim(s) 53, drawn to a polypeptide method of treating a disease associated with TIRAP expression.

Group XII, claim(s) 55 and 56, drawn to a method of modulating the immune response in an animal which comprises internally administering a TIRAP antagonist.

Group XIII, claim(s) 57 and 58, drawn to a transgenic knockout non-human comprising a disruption in the endogenous toll/interleukin-1 receptor adapter gene.

The inventions listed as Groups I-XIII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of Group I is considered to be an isolated polynucleotide comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2.

The special technical feature of Group II is considered to be an antibody that binds to a polypeptide comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 3.

The special technical feature of Group III is considered to be an isolated polynucleotide sequence comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 5.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/14915

The special technical feature of Group IV is considered to be an antibody that binds to a polypeptide comprising an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 4.

The special technical feature of Group V is considered to be an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11 (fusion protein).

The special technical feature of Group VI is considered to be an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 11.

The special technical feature of Group VII is considered to be a method for blocking TIRAP signaling in a cell comprising administering to the cell an inhibitory amount of a TIRAP inhibitor.

The special technical feature of Group VIII is considered to be a method for screening antagonist of TIRAP activity, which comprises screening for peptide or small molecules that inhibit or activate the MyD88-independent signaling of TLR4.

The special technical feature of Group IX is considered to be a method for screening antagonist of TIRAP activity, which comprises screening for peptide or small molecules that inhibit the binding of TIRAP to TLR4.

The special technical feature of Group X is considered to be a drawn to a TIRAP antagonist, which comprises TIRAP having at least one mutation in the TLR4 binding domain.

The special technical feature of Group XI is considered to be a polypeptide method of treating a disease associated with TIRAP expression.

The special technical feature of Group XII is considered to be a method of modulating the immune response in an animal, which comprises internally administering a TIRAP antagonist.

The special technical feature of Group XIII is considered to be a transgenic knockout non-human comprising a disruption in the endogenous toll/interleukin-1 receptor adapter gene.

Accordingly, Groups I-XIII are not so linked by the same or a corresponding special technical feature as to form a single general inventive concept.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST2.1, STN

search terms: TIRAP, Toll, TLR4, MyD88, antibody, inhibitor, antagonist, interleukin-1 receptor adapter protein gene

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 1/00	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	

(31)優先権主張番号 10/101,398

(32)優先日 平成14年3月19日(2002.3.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 メドツィトフ, ルスラン

アメリカ合衆国コネチカット州06520-8011, ニュー・ヘブン, セダー・ストリート 310

(72)発明者 ホーング, ティファニー

アメリカ合衆国コネチカット州06511, ニュー・ヘブン, エイチ・ハウ・ストリート 100, アpartment 412

(72)発明者 パートン, グレゴリー

アメリカ合衆国コネチカット州06517, ハムデン, ウッドバイン・ストリート 62

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02

4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04 CA07 DA02 DA05 DA11 EA02

EA04 FA02 GA01 GA11 HA01 HA03 HA11

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ05 QQ13 QR33 QR59 QR74 QR80 QS05

QS36 QX02
4B064 AG01 AG27 CA01 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA17
MA01 NA14 ZA662 ZA702 ZB212 ZB262 ZC352 ZC412
4C085 AA13 AA14 CC32 DD88 EE01 GG01
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA66 ZA70
ZB21 ZB26 ZC35 ZC41
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA00 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74