

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3948495号

(P3948495)

(45) 発行日 平成19年7月25日(2007.7.25)

(24) 登録日 平成19年4月27日(2007.4.27)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 M 15/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 F
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	A 6 1 P 11/06
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 M 15/00 Z

請求項の数 14 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平9-510283	(73) 特許権者	ジェネーラ コーポレーション
(86) (22) 出願日	平成8年8月23日(1996.8.23)		アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 プリ
(65) 公表番号	特表平11-514851		マウス ミーティング キャンパス ドラ
(43) 公表日	平成11年12月21日(1999.12.21)		イブ 5110
(86) 国際出願番号	PCT/US1996/012757	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開番号	W01997/008321		レビット ロイ クリフォード
(87) 国際公開日	平成9年3月6日(1997.3.6)	(72) 発明者	アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 アン
審査請求日	平成15年8月11日(2003.8.11)		ブラー マースタングリーン コート 6
(31) 優先権主張番号	60/002,765		60
(32) 優先日	平成7年8月24日(1995.8.24)	(72) 発明者	リー メロー タブリユ.
(33) 優先権主張国	米国(US)		アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ラン
(31) 優先権主張番号	60/023,800		ズマイル クレアモント ロード 106
(32) 優先日	平成8年8月6日(1996.8.6)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 喘息および関連疾患を含むアトピー性アレルギーを治療するための標的としての喘息関連因子

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

喘息関連疾患を軽減させるための組成物であって、該組成物は、インターロイキン9がインターロイキン9レセプターに結合することをブロックする、インターロイキン9またはインターロイキン9レセプターに対して特異的な抗体を含む、組成物。

## 【請求項2】

前記抗体が、インターロイキン9に結合する、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項3】

前記抗体が、インターロイキン9レセプターに結合する、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項4】

前記抗体が、インターロイキン9の活性をダウンレギュレートする、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項5】

前記抗体が、患者における気管支過反応を軽減させる、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項6】

前記抗体が、患者における気管支洗浄液中の好酸球増加を軽減させる、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項7】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

10

20

## 【請求項 8】

前記抗体が、吸入によって投与される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

喘息を処置するための医薬を調製するための、インターロイキン 9 がインターロイキン 9 レセプターに結合することをブロックする、インターロイキン 9 またはインターロイキン 9 レセプターに対して特異的な抗体の、使用。

## 【請求項 10】

さらに薬学的に受容可能なキャリアを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 11】

吸入によって投与される、請求項 10 に記載の組成物。

## 【請求項 12】

請求項 11 に記載の組成物を投与する、吸入装置。

## 【請求項 13】

請求項 11 に記載の組成物の溶液を投与する、用量計付き吸入器。

## 【請求項 14】

請求項 8 に記載の組成物、または請求項 11 に記載の組成物を投与する、乾燥粉末吸入器。

## 【発明の詳細な説明】

関連出願の相互参照

本出願は、1995年 8 月 24日に提出された米国仮出願 (U.S. Provisional Application) 第 60 / 002,765号に関連している。

発明の分野

本発明は、IL-9とそのレセプターとの関係に基づいて、IL-9の活性を調節し、アトピー性アレルギーおよび喘息などの関連疾患を治療することに関する。

発明の背景

炎症は、身体の防御システムが異物を攻撃する複雑なプロセスである。身体が生き残るためには、異物に対する闘いが必要であるが、防御システムには、異物が無害な物であっても危険なものであるとして不適当に反応するものがあるため、引き続いて行われる闘いにおいて、周囲の組織を損傷することになる。

アトピー性アレルギーは、遺伝的な背景によって環境刺激に対する反応が左右されるといふ、環境 - 遺伝的な疾患である。この疾患は、一般的に、遍在する抗原に反応して IgE 抗体を産生するリンパ球の能力を高めるという特徴を有する。これらの抗原による免疫システムの活性化により、アレルギー性炎症が引き起こされ、またこの活性化は、摂食後、皮膚からの浸透、または吸入の後に起こることがある。この免疫活性化が起こった後、引き続いて肺に炎症が起こると、この疾患は、広く喘息と特徴づけられる。この炎症反応には一定の細胞が重要であり、T 細胞および抗原提示細胞、IgE を産生する B 細胞、ならびに、IgE に結合する肥満細胞 / 好塩基球および好酸球が含まれる。これらの炎症細胞は、アレルギー性炎症を起こした部位に蓄積し、これらが放出する有毒な産物が、この疾患に関連する組織破壊の一因となる。

喘息は、気道の炎症性疾患であると一般的には定義されるが、臨床上の症状は、間欠的に空気の流れが閉ざされることに起因する。有病率および重篤度が上昇して行くと考えられている慢性の障害性疾患である<sup>1</sup>。人口の 30 ~ 40% がアトピー性アレルギーを患っており、人口うち小児の 15% および成人の 5% が喘息を患っていると推定される<sup>1</sup>。このため、我々の保健財源にとって非常な重荷となっている。

アトピーおよび喘息に対する感受性のメカニズムは未解明のままである。興味深いことに、ほとんどの人が、同じような環境に曝されているのに、一部の人のみがアトピー性アレルギーや喘息を発症する。「アトピー」として知られている、環境アレルゲンに対するこの過敏性はしばしば、アトピー患者において、アトピーでない人よりも、血清の IgE レベルが上昇するかまたはアレルゲンに対する皮膚検査反応が異常に大きくなることによって

10

20

30

40

50

示される<sup>10</sup>。アトピー性アレルギーと喘息との密接な関係に関する強力な証拠は、ほとんどの喘息患者には、臨床学上および血清学上のアトピーの証拠があるという事実由来している<sup>4-9</sup>。特に、若い喘息患者ほど、アトピーの発症率が高い<sup>10</sup>。さらに、血清の総IgEレベルの上昇に関連した免疫学的因子は、肺機能障害に非常に密接に関係している<sup>3</sup>。

これらの疾患の診断および治療の両方に問題がある<sup>1</sup>。炎症を起こした肺組織を評価することがしばしば困難であるため、炎症のもととなった部位を決定できないことがよくある。気道炎症の発症部位と、誘因となる外部環境因子からの防御に関する知識がないと、炎症プロセスを阻止することはできない。肺の炎症を制御することができないと、肺機能の重大な喪失をもたらされることが、今では一般に認められている。

現行の治療法には、本質的に一連の欠点がある。主要な治療薬である アゴニストは症状を抑える、すなわち、一時的に肺機能を改善させるが、そのもととなる炎症には影響しないため、肺組織は危険にさらされたままである。さらに、アゴニストの定常的な使用は、その効能と安全性を低下させる脱感作をもたらす<sup>2</sup>。もととなる炎症を抑制できる薬剤である抗炎症性ステロイドには、免疫抑制から骨の損傷まで、一連の既知の短所がある<sup>2</sup>。

従来の治療法には付随する問題があるため、それに代わる治療方法が評価されてきた<sup>65-66</sup>。グリコホリンA<sup>64</sup>、サイクロスポリン<sup>65</sup>、およびIL-2の9ペプチド断片<sup>63</sup>はすべて、インターロイキン-2依存型Tリンパ球の増殖と、それによるIL-9の産生<sup>51</sup>を阻害するが、その他にも多くの効果<sup>2</sup>を有することが知られている。例えば、サイクロスポリンは、器官移植後の免疫抑制剤として用いられる。これらの薬剤は、喘息患者の治療において、ステロイドに代わるものの代表であろう<sup>63-66</sup>が、これらは、インターロイキン-2依存型Tリンパ球の増殖と、ホメオスタシスに関連する可能性がある重要な免疫機能を阻害する。当技術分野において必要なことは、喘息の一時的な性質と、これらの重要な免疫機能の下流にあるアレルギーとの密接な関連とを説明する、喘息発症に決定的な経路を同定することである。この経路には通常、生物学的な多様性が存在し、それがないと、このような人は一般的に、アトピー症状を除いては、免疫無防備状態でも病気でもないことから、自然によって、この経路が治療にとって適切な標的であることが示された。

喘息の診断および治療に関して問題があるために、この疾患の複雑な病態生理学が徹底的に調べられているところである。この疾患は均質なものではなく、多様な形態をとりうるため、定義するのは困難であるが、喘息患者に共通する一定の特徴が見られる。このような特徴の例には、血清IgEレベルの上昇、アレルギー投与に対する異常な皮膚検査反応、気管支過反応[BHR]、気管支拡張可逆性、および気道閉塞が含まれる<sup>3-10</sup>。これらの喘息に関連した表現型の発現を、定量的または定性的な規準として調べることができよう。IgEレベルの上昇はまた、様々な刺激に対する強化された気管支収縮反応であるBHRと密接に関連している<sup>4, 6, 8, 9</sup>。BHRは、気道に炎症が起きていることを反映していると考えられており<sup>6, 8</sup>、喘息にとっての危険因子と見なされている<sup>11-12</sup>。BHRは、喘息患者における気管支の炎症とアレルギー体質とを伴う<sup>13-21</sup>。アトピーおよび喘息の症状がない子供においても、BHRは、IgEレベルの上昇と強く関連している<sup>19</sup>。

多くの研究が、アトピーおよび喘息に対する遺伝的な要素を論証している<sup>4, 10, 21</sup>。しかし、これらの疾患は、年齢および性別、ならびにアレルギー、ウイルス感染、および公害物質などのさまざまな環境要因によって有意に影響を受けるため、家族研究は、解釈が難しかった<sup>22-24</sup>。その上、これらの疾患に対する感受性に付随する生化学的な欠損が知られていないため、突然変異遺伝子、およびその異常な遺伝子産物は、それらが生み出す異常な表現型によってのみ認識されうる。したがって、遺伝的要素を単離し特徴を調べる上で重要な第一歩は、それらの遺伝子の染色体上の位置を同定することである。

クックソン(Cookson)らは、遺伝性アトピーに関する遺伝子の位置を初めて説明した<sup>25</sup>。この研究者たちは、アトピーと、11q13.1と名付けられた特定の染色体領域上の単一マーカーとの間にある遺伝的な連鎖の証拠について述べた。後になって、彼らは、この遺伝子座におけるアトピーに関する母性遺伝の証拠を示唆した<sup>26</sup>。アトピーについては、母性遺伝[遺伝的刷り込み]が観察されていたが、それ以前に説明されたことはなかった。し

10

20

30

40

50

かし、この連鎖を確認するための努力は、一般的にうまくいかなかった<sup>27-31</sup>。

最近になって、高親和性IgEレセプターのサブユニットが、染色体の11qにマッピングされ、アトピーに関連した突然変異と推定されるものが、この遺伝子で説明されている<sup>32、33</sup>。しかし、この連鎖は、他人で反復することが難しいため、この遺伝子の重要性と多型性は不明なままである。この推定突然変異が一般的な人々にアトピーを引き起こす原因であるか否かを確認する必要があるが、これまでに集められたデータからは、この多型性がアトピーを頻繁に起こす原因の代表とは考えられない。

血清IgEレベルが、臨床疾患としてのアレルギーおよび喘息の開始と重篤度に非常に密接に関連していることから、血清の総IgEレベルの遺伝的な調節の研究に注意が集中した。過去の研究によって、単一の調節遺伝子の存在が示されて、血清総IgEレベルがメンデル型遺伝するという証拠が示された<sup>34-39</sup>。一方で、別の研究者が、IgEのポリジーンによる遺伝、すなわち、いくつかの関係遺伝子が存在する証拠を発見した<sup>39</sup>。

当業者は、IgEの調節と、喘息に付随する気管支炎の発症または進行にとって重要だと思われる遺伝子をいくつか、染色体5q上に発見している。これらの遺伝子には、IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 [GM-CSF]、マクロファージコロニー刺激因子レセプター [CSF-1R]、線維芽細胞酸性増殖因子 [FGFA] など、いくつかのインターロイキンをコードする遺伝子が含まれる<sup>40</sup>。家族研究から得られた最近の証拠により、血清IgEレベルと、染色体5q上のこれらの候補遺伝子が乗っている領域中のDNAマーカーとの間に遺伝的連鎖があることが示唆される<sup>41、42</sup>。まとめると、これらの研究から、染色体5q上のインターロイキン複合領域の近傍にある1個以上の主要遺伝子が、アトピーと喘息の発症に重要だと考えられる血清IgEで見られる生物学的多様性の相当量を調節していることが示唆される。

また、連鎖 [兄弟姉妹対解析 (sib-pair analyses)] を用いて、以前にBHRに関する遺伝子の位置が同定された<sup>79</sup>。BHRは、アトピーの主要遺伝子と関連していることがわかっているため、血清IgEレベルを調節する上で重要だと報告されている染色体領域を調べた<sup>42</sup>。連鎖解析によって、アトピーに関する候補領域が同定されている。これらの研究から、ヒトの染色体5q31~q33に、アトピーの主要遺伝子が存在することが確認された<sup>42</sup>。

従って、アトピーの主要遺伝子と共遺伝すると思われるBHRに対する感受性をもたらす遺伝子の染色体上の位置を決定するために、BHRと染色体5q上の遺伝子マーカーとの間の連鎖解析を用いて実験を行った<sup>42、79、82</sup>。ヒスタミンに対する反応性によって、BHRを有する人を同定した。喘息関連遺伝子をマッピングするのに有用なマーカーを図1に示す。特に、喘息、気管支過反応、およびアトピーに関する遺伝子候補が、示されたマーカーに対するおおよその位置の [右] に示されている。マップには、インターロイキン遺伝子IL-4、IL-13、IL-5、およびIL-3；細胞分裂周期-25のCDC25；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 [GM-CSF] のCSF2；初期成長反応遺伝子-1のEGR1；細胞抗原14のCD14；2アドレナリン作用性レセプターのADRB2；リンパ球特異的グルココルチコイドレセプターであるGRL1；血小板由来増殖因子レセプターであるPDGFRが含まれている。5q31~q33のバンドは、ほぼIL-4からD5S410まで広がっている。報告されている距離は、性平均した組換え分数である。

用いられた兄弟姉妹対解析により、BHRと、D5S436、D5S658、および染色体5q31~q33の近傍に位置するその他のいくつかのマーカーとの間に連鎖があることの、統計的に有意な証拠が明らかにされた<sup>79</sup>。これらのデータから、染色体5q31~q33上に近接した間隔にある1個以上の遺伝子が、BHR、アトピーおよび喘息への罹病性を決定するという仮説が強く支持された<sup>79、80、81、82</sup>。

最近、喘息の表現型と染色体5q31~q33上の遺伝子マーカーとの間の連鎖も示されている<sup>83</sup>。アトピーとBHRに対する遺伝的な罹病性をもたらす、合理的な位置にある候補遺伝子となるような遺伝子が数多くあるため、ヒトゲノムのこの領域を、喘息との連鎖について評価した。

上記の方法を用いて、連鎖が明らかになった<sup>42、83</sup>。特に、以前、BHRとアトピーに連鎖していることが分かっている染色体5qの、この同じ領域からとったマーカーに関して、兄

10

20

30

40

50

弟姉妹対とLODとを用いて、オランダの84家族を解析した<sup>42、83</sup>。喘息の発端者と、その家族における閉塞性の気道病を分類するためのアルゴリズムを用いた。この分類スキームは、前述したように、ヒスタミンに対するBHRの有無、呼吸症状、有意な喫煙経歴 [5箱より多く喫煙した年数]、皮膚検査反応によって定義されたアトピー、気道閉鎖 [FEV1の予想% < 95% CI]、および気管支拡張への可逆性 [予想値で>9%] に基づいていた。

兄弟姉妹対解析 (N=10、p<0.05) と、喘息の表現型について優性モデルを用いた最尤法解析とによって、喘息と染色体5q上のマーカーとの間の連鎖に関する証拠が発見された<sup>83</sup>。遺伝子頻度0.015 [有病率3%] で優性モデル [クラス1は影響あり、クラス2~4は不明確、クラス5は影響なし] を用いると、喘息は、 $\theta = 0.03$ のとき最大LOD値3.64で、D5S658と連鎖していた。D5S436と較べて5 cMテロメア側にあるかまたはIL-9から離れているD5S470については、 $\theta = 0.0$ のとき最大LOD値2.71が観察された<sup>83</sup>。

本出願の最初の提出に続いて、IL-9またはその近傍の遺伝子が、アトピーと喘息で用いる上で重要である可能性が高いことが示された<sup>43</sup>。IL-9の示唆は、無作為に確かめられた集団において、血清総IgEレベルのlog値とIL-9遺伝子の遺伝子マーカーの対立配列との間に強い相関があることに基づいていた<sup>43</sup>。マーカーの1個以上の特異的な対立配列とのこのタイプの関連は、「連鎖不均衡」と名付けられており、近傍の遺伝子が、研究中の生物学的多様性を決定するというものを一般的に示唆している<sup>44</sup>。

IL-9遺伝子は、染色体5のq31~q33領域にマップされている<sup>40</sup>。ヒトのゲノムには、この遺伝子の唯一のコピーが存在する<sup>45、46</sup>。ヒトとマウスのIL-9遺伝子については、構造的な類似性が見られる<sup>45、46</sup>。それぞれの遺伝子は、5個のエキソンと4個のイントロンを有し、およそ4kbのDNAにわたって広がっている。この遺伝子の発現は、活性化されたT細胞に限定されていると考えられる<sup>45、46</sup>。

IL-9の機能は、今では、当初分かっていたよりも大きく広がっている。IL-9は、T細胞増殖因子として働くが、またこのサイトカインは、赤血球の前駆細胞、B細胞、肥満細胞、および胎児胸腺細胞の増殖を媒介することも知られている<sup>45、46</sup>。IL-9は、IL-3と協働的に作用して、肥満細胞の活性化と増殖を引き起こす<sup>47</sup>。このサイトカインはまた、IL-4によって誘導される、正常なヒトB型リンパ球によるIgE、IgG、およびIgMの産生を増加させる<sup>48</sup>。IL-9は、また、マウスB型リンパ球によるIgEおよびIgG1の放出を誘導するIL-4を増加させる<sup>49</sup>。寄生生物による感染に対する粘膜性炎症反応におけるIL-9の重要な役割も明らかになっている<sup>50、51</sup>。

IL-9に加えて、染色体5qには、IL-3、IRF1、EGR1、ITK、GRL1、ADRB2、CSF1R、FGFA、ITGA2、CD14、PDGFR、CDC25、CSF2、IL-4、IL-5、IL-12B、およびIL-13を含む、その他多数の遺伝子候補が乗っている。これらはすべて、アトピー性アレルギーにおいて重要で、治療薬開発の標的となる可能性があると考えられる。さらに、当技術分野では、IL-9の配列またはIL-9の機能がどのようにしてアトピー性アレルギー、喘息、または気管支過反応と特異的に相関しているのかに関する知識がない。このような知識がないと、当業者は、IL-9をこれらの疾患の診断に用いればよいのか、治療に用いればよいのか、また、どうやって用いるのかが分からないであろう。

当技術分野では、IL-9は、還元条件下のドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって決定されたところによると、約20~30kDの見かけの分子量を有する新規のサイトカインであると規定されている。これは、144アミノ酸蛋白質として産生されるが、プロセッシングされて126アミノ酸の糖蛋白質になる。ヤン (Yang) らは、IL-9をコードしているDNA配列が、この蛋白質に対する約450ヌクレオチドの適正な読み枠を有する約630ヌクレオチドからなっていることを開示している<sup>85</sup>。

また、当技術分野においては、選択的スプライシングによって、多数の蛋白質アイソフォームが、単一の遺伝子座から生成されることも知られている。選択的スプライシングは、単一の遺伝子座から多数の蛋白質アイソフォームを生成させるための効果的なメカニズムである。選択的スプライシングは、細胞の遺伝的構成を変更することなしに、蛋白質発現を可逆的に修飾するために、末端の分化細胞で用いられている。これらの蛋白質アイソフォームは、異なる組織、または異なる細胞分化もしくはは活性化状態において選択的に発現

10

20

30

40

50

される。蛋白質アイソフォームは、異なる機能を有することがあるので、アルムスとホワイト (Alms and White) は、IL-4のエキソン2を除いて形成されるためにIL-4<sub>2</sub>と呼ばれる、IL-4の天然のスプライシング変異体をクローン化して発現させた<sup>86</sup>。IL-4<sub>2</sub>は、IL-4によって誘導されるT細胞の増殖を阻害することが観察された。

ところで、当技術分野では、エキソン2および3を欠失させて生成させた、IL-9の蛋白質アイソフォーム、またはこれらの欠失蛋白質によって示される調節機能に関する知識がない。特に、生物学的活性の調節、すなわち、IL-9の発現または活性の抑制調節におけるそれらの役割ははっきりしていない。その上、選択的スプライシングによるこのような蛋白質アイソフォームの形成は、これまでに観察されておらず、また、もとのサイトカインのアゴニストまたはアンタゴニストとして機能するIL-9の変異体を提供するためにも用いられていなかった。

また、当技術分野には、喘息関連疾患に関するIL-9レセプターの役割についての知識もない。IL-9は、標的細胞の表面で発現される特異的なレセプターに結合することが知られている<sup>46、52、53</sup>。このレセプターは、実際には、2本の蛋白質鎖でできている。IL-9レセプターとして知られている1本目の蛋白質鎖は、IL-9に特異的に結合し、もう1本の蛋白質鎖は、IL-2レセプターと共通した鎖である<sup>46</sup>。さらに、ヒトのIL-9レセプターのcDNAがクローニングされている<sup>46、52、53</sup>。このcDNAは、マウスのIL-9レセプターに有意な相同性を示す522アミノ酸の蛋白質をコードしている。このレセプターの細胞外領域は、高度に保存されており、マウス蛋白質とヒト蛋白質とで67%の相同性が存在する。このレセプターの細胞質領域に、高い保存性はない。ヒトの細胞質ドメインは、マウスのレセプターの相当する領域よりもはるかに大きい<sup>46</sup>。

IL-9レセプター遺伝子も、その特徴が分かっている<sup>53</sup>。これは、単一コピー遺伝子として、マウスのゲノムの中に存在し、9個のエキソンと8個のイントロンからなると考えられている<sup>53</sup>。ヒトのゲノムには、少なくとも4個のIL-9レセプターの偽遺伝子が含まれている。ヒトIL-9レセプター遺伝子は、性染色体XおよびYの320kbの亜末端領域にマッピングされている<sup>46</sup>。このような研究があるにもかかわらず、当技術分野には、IL-9レセプターとアトピー性アレルギー、喘息、または気管支過反応との関係についての知識が全くない。

このように、当技術分野には、IL-9遺伝子、そのレセプター、およびそれらの機能が、どのように、アトピー性アレルギー、喘息、気管支過反応および関連疾患と関係しているのかに関する知識が欠けている。したがって、当技術分野においては、アトピー性アレルギー、喘息、または気管支過反応についての遺伝学的情報と、これらの疾患の病因におけるIL-9の役割を明らかにすることが特に必要である。また、これらの疾患における、IL-9レセプターとIL-9レセプター遺伝子の役割を明らかにする必要もある。さらに、最も重要なのは、それらの知識に基づいて、これらの疾患を治療するために、IL-9とそのレセプターとの相互作用を調節することができる因子を同定する必要があることである。

#### 発明の概要

本出願者らは、喘息およびそれに関連した疾患を含むアトピー性アレルギーの病因におけるIL-9(喘息関連因子1、すなわちAAF1としても知られている)の役割を明らかにする情報で、IL-9の活性を調節できる化合物をもたらした情報を提供することによって、これらの疾患の治療に対する長い間感じられていた必要性を充たしている。本出願者らはまた、気道過反応性における生物学的な多様性を決定する遺伝子に関して、ヒトとマウスとの間で保存されている連関とシンテニー相同性を明らかにした。これらの関係は、遺伝子候補としてのIL-9を特異的に同定する。さらに、本出願者らは、マウスにおける気管支過反応、好酸球増加症と気管支洗浄液中の細胞数の増加、および血清総IgEの増加を含む、多数の抗原誘導応答にとってIL-9が重要であると判定した。これらの発見により、喘息に関連するアレルギー性炎症が類型化される。

さらに、本出願者らは、ヒトのIL-9遺伝子のエキソン5の3365番目の位置で、核酸をCからTに変化させると、IL-9の117番目のコドンでトレオニンがメチオニンになると推定されるアミノ酸置換が生じると判定した。この置換が一人の人の両方の対立遺伝子に起きる

10

20

30

40

50

と、これに付随して、喘息、異常な皮膚検査反応、および血清総IgEの低下を含む、アトピー性アレルギーの証拠が減少する。このように、本出願者らは、一人の人の中で両IL-9遺伝子産物の117番目のコドンがメチオニンになるという特徴を持つ非喘息性で非アトピー性の表現型が存在することを同定した。さらに有意義な推論となるよう、117番目のコドンのトレオニンによって特徴づけられる喘息性のアトピー表現型に対する罹病性の有無について同定した。このように、本発明には、このような配列を有する精製単離したDNA分子と、このDNAによってコードされるペプチドが含まれる。

IL-9の生物学的活性は、IL-9レセプターへの結合と、特異的な細胞の中の調節シグナルの伝達によって起こる。このため、IL-9のアゴニストまたはアンタゴニストと、IL-9またはそのレセプターとの相互作用によって、IL-9の機能を阻害または調節することができる。抑制制御、すなわち、IL-9によって制御されている機能の抑制は、さまざまな方法で行われる。IL-9のレセプターへの結合を妨害することができるアゴニストまたはアンタゴニストの投与は、重要なメカニズムの一つであり、そのようなアゴニストおよびアンタゴニストも、本発明の請求の範囲に含まれる。実施例には、さまざまな突然変異を含む、IL-9またはIL-9レセプターのDNA配列にコードされているポリペプチド産物を投与することが含まれる。これらの突然変異は、IL-9またはIL-9レセプターの点突然変異、挿入、欠失、またはスプライシング変異体でよい。

本発明のさらなる態様には、「アゴニストおよびアンタゴニスト」の投与によるIL-9の活性を調節することが含まれる。熟練した当業者には、必要な3次元構造的コンホメーションを有する分子と、レセプター結合に必須または重要な残基を含む分子のすべてが、本発明の範囲内にあることが容易に理解されると思われる。特に、成熟蛋白質の43～60残基目および71～90残基目は、レセプター結合に重要であると考えられる。本出願者らは、KP-16ペプチド(43～60残基目)とKP-20ペプチド(71～90残基目)が、レセプターのアンタゴニストとして作用することを明らかにした。さらに、本来のIL-9分子の中のこれらの残基は、逆平行ヘリックス構造を形成すると推定されている。この蛋白質の3次元構造は、52番目のセリンおよび/または53番目のグルタミン酸が、85番目のリジンと相互作用し、56番目のセリンが82番目のリジンと相互作用し、また、59番目のトレオニンが78番目のバリンと相互作用することを示している。これらの逆平行ヘリックスおよび関連する機能的な原子団の3次元的な配置が、レセプター結合にとって重要な必須の3次元的な立体的コンホメーションを表すため、これらの関係を刺激する化合物は、本発明の範囲内に含まれる。

IL-9レセプター(また、喘息関連因子2、AAF2とも呼ばれる)の生物学的活性は、可溶性IL-9レセプター分子を用いて調節することもできる。このような分子は、IL-9が細胞結合レセプターに結合するのを妨げ、IL-9に対するアンタゴニストとして作用するが、これも本発明の範囲内である。

IL-9がそのレセプターに結合するのを遮断するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体も、本発明の範囲内であり、また喘息および関連疾患を含むアトピー性アレルギーを治療するのに有用な治療薬である。

本発明の別の態様は、遺伝子治療において、IL-9またはIL-9レセプターの点突然変異、挿入、欠失、またはスプライシング変異など、さまざまな突然変異を含む単離DNA配列を使用することに関する。

また、IL-9およびIL-9レセプターの発現は、合成アンチセンス・オリゴヌクレオチド配列を有効量投与することによって抑制制御される。本発明のオリゴヌクレオチド化合物は、ヒトIL-9およびIL-9レセプターをコードするmRNAに結合し、それによってこれらの分子の発現を阻害する。

IL-9とIL-9レセプター両者の構造が、非常に詳細に調査解析され、レセプター結合には、IL-9のアミノ酸残基が重要であることが確認されている。構造研究と、この特異的な結合対の結合特性に基づき、本発明はさらに、IL-9がIL-9レセプターと相互作用するのを阻害するのに必要な残基が構造的なコンホメーションにより提供されるように作成された小分子を含む。このような阻害は、レセプター活性の調節をもたらすため、これらの分子は、

10

20

30

40

50

アトピー性アレルギーを治療するのに有用である。

本発明の別の態様は、IL-9機能に必要なシグナル経路の下流を制御することを目的とする。IL-9は、IL-9シグナル経路に独特だと考えられる、Stat3のチロシンのリン酸化を誘導し<sup>5,8</sup>、阻害因子の標的として有用である。このため、チロフォスチン(tyrophostin)のようなチロシンキナーゼの特異的または非特異的阻害因子は、IL-9の生理学的活性の下流制御において有用であり、これらは本発明の一部をなす。さらなる態様において、アミノステロール化合物も、IL-9シグナル伝達経路のシグナル伝達の阻害に關与するため、アトピー性アレルギーおよび関連疾患を治療する上で有用である。

上で検討された産物は、アトピー性アレルギー、喘息、および他の関連疾患を治療するのに効果的なさまざまな治療薬を示したものである。

本発明はまた、上述のDNA分子にコードされる短縮したポリペプチドも含む。これらのポリペプチドは、IL-9のIL-9レセプターとの相互作用を調節することができる。

したがって、本出願者らは、気管支過反応、喘息、および関連疾患を含むアトピー性アレルギーの発病における、IL-9経路の重要な役割を同定した。より具体的には、本出願者らは、アンタゴニスト、およびIL-9とそのレセプターとの相互作用を制御することができるアンタゴニストを同定する方法を提供した。本出願者らはまた、1) 117番目のコドンにメチオニンを有するIL-9に匹敵する活性を有し、IL-9に対するレセプターへIL-9の活性を抑制制御するのに十分なほど結合することができる化合物を投与することによって、また、2) エキソン1、2、3、4または5のいずれか一つ以上に欠失を含む、単離された塩基配列によってコードされている欠失蛋白質産物を投与することによって、IL-9の活性を制御するための方法を提供する。

アトピー性アレルギー、気管支過反応、および喘息におけるIL-9経路の重要な役割を同定し、本出願者らは、アトピー性アレルギー、喘息、および関連疾患への罹病性を診断するための方法も提供する。最後に、本出願者らは、IL-9およびそのレセプターの発現または機能のいずれかを抑制制御するのに十分な量投与することができる化合物または因子を同定するために、IL-9とそのレセプターの機能を測定するための方法を提供する。

添付した図面は、本明細書に組み入れられその一部を構成し、本発明のいくつかの態様を例示して、説明とともに、本発明の原理を説明するのに役立つ。

#### 【図面の簡単な説明】

図1：喘息関連遺伝子のマッピングに有用な多形遺伝子マーカーの相対順序およびセンチモルガン [ cM ] での距離を示すマップ。

図2：ヒト染色体5q31-q33およびマウスのシンテニー領域の遺伝子マップの図解。

図3：気管支収縮刺激に対する感受性が増加したマウスにおけるアトラキリウム誘発気道反応性に関するマウス第13染色体のLODスコア曲線。

図4：ヒトおよびマウスIL-9遺伝子のエキソン5に対応するアミノ酸配列の配置。最初の配列はヒト遺伝子のトレオニン対立遺伝子から翻訳される。中央の配列はヒト遺伝子のメチオニン対立遺伝子から翻訳される。最後の配列はマウス遺伝子から翻訳される。

図5：ヒトIL-9遺伝子対立遺伝子と国際単位で測定した血清中総IgE値の相関を示すヒストグラム。S/Sはトレオニン/トレオニンの人、S/Rはトレオニン/メチオニンの人、およびR/Rはメチオニン/メチオニンの人を指す。

図6：IL-9座での単純配列リピート多型性の図解。

図7：トレオニン117 IL-9のcDNA配列の翻訳。

図8：メチオニン117 IL-9のcDNA配列の翻訳。

図9：トレオニン117によるpFlag発現構築物のマップ。

図10：ライゲーション部位周辺領域からのトレオニン117 cDNAのpFlag発現構築物の配列。

図11：メチオニン117によるpFlag発現構築物のマップ。

図12：ライゲーション部位周辺領域からのメチオニン117 cDNAのpFlag発現構築物の配列。

図13：IL-9組換え蛋白のウェスタンブロット。

10

20

30

40

50

図14：阻害ペプチドのアミノ酸配列。

図15：IL-9媒介M07e増殖のKP-16による阻害。

図16：IL-9媒介M07e増殖のKP-20による阻害。

図17：IL-9媒介M07e増殖のKP-23による阻害。

図18：IL-9媒介M07e増殖の様々なチロフォスチンによる阻害。

図19：IL-9媒介M07e増殖の様々なアミノステロールによる阻害。

図20：インビボでの抗原反応におけるIL-9の役割の特徴づけ。

図21：対照、卵白アルブミンチャレンジ、および抗IL-9前処置動物からの肺の組織学検査。

図22：マウスIL-9受容体に対する遮断抗体によるインビボでの抗原反応の阻害。

10

図24：ヒトメチオニン117 IL-9およびトレオニン117 IL-9の発現。

図25：ヒト組換え型メチオニン117およびトレオニン117型IL-9の可溶性抗体に対する結合。

図26：非刺激および刺激マウス脾細胞におけるIL-9の定常状態濃度。

図27：化学部分の付録。

図28：イヌ、魚、サメから単離したアミノステロール。

#### 発明の詳細な説明

本出願者らは、喘息および関連疾患を含むアトピー性アレルギーの診断、予防または治療において用いることができるIL-9経路およびこの経路に作用する組成物を明らかにすることによって、当技術分野における必要性を解決した。喘息には、可逆的な気道閉塞を伴う気道の炎症性疾患が含まれる。アトピー性アレルギーは、アトピー、ならびに喘息、気管支過反応（BHR）、鼻炎、蕁麻疹、腸のアレルギー性炎症疾患、およびさまざまな形の湿疹を含む関連疾患を意味する。アトピーは、対照と比較して、血清総IgEが上昇するかまたはアレルギーに対する異常な皮膚検査反応となって発現する、環境アレルギーに対する過敏反応である。BHRは、さまざまな刺激に対する気管支収縮反応が増強した気管支過反応を意味する。

20

喘息関連疾患を示す家族のDNAを解析することによって、本出願者らは、アトピーの発現を測定できるものの一つとして、血清総IgEの生物学的な多様性と相関関係にある、IL-9遺伝子における多型性を確認した。IL-9遺伝子（喘息関連因子1、すなわちAAF1としても知られている）とは、ヒト骨髄系およびリンパ系の制御に関するさまざまな機能を示すサイトカイン、インターロイキン-9の遺伝子座を指す。本発明のIL-9遺伝子は、ヒトの第5染色体のq31～q33領域中およびマウスでは第13染色体中に認められる。

30

本出願者らは、多型性という語で、「遺伝子座」と名付けられた特異的なDNA配列における、普通の配列からの変化を意味させている。一般的に、当業者がある遺伝子座を含む2個以上の対立遺伝子を同定し、最も少ない共通遺伝子座が1%以上の頻度で存在する場合、その遺伝子座は多型であると定義される。

本発明の多型性は、IL-9の117残基目のアミノ酸置換をもたらす。特に、親水性アミノ酸のトレオニンの代わりに、本発明のIL-9は、疎水性アミノ酸メチオニン（Met IL-9）を提示する。遺伝子レベルでは、本発明の多型性は、レナウルドら（Renauld and colleagues）（1990）[GenBank寄託番号M30135、およびM30136]<sup>54</sup>によって説明されているように、ヒトIL-9遺伝子の3365番目のヌクレオチド、またはケラーら（Kelleher）（1991）によって報告されている[GenBank寄託番号M86593]、ヒトIL-9遺伝子の配列の4244塩基目に相当するヌクレオチドでの、チミン残基によるシトシン残基の置換である<sup>55</sup>。

40

IL-9の対立遺伝子の片方または両方のいずれかにおいて、117番目のアミノ酸にトレオニン（Thr）を有する個体（Thr/ThrまたはThr/Met）は一般的に、喘息に対する罹病性またはアトピー性アレルギーの表現型を示すので、これらの遺伝子型は、調査した集団における血清総IgEレベルの平均を高くするという特徴を有する。これに対し、IL-9の対立遺伝子の両方で、117番目のコドンにメチオニン（Met）を有する個体（Met/Met）は、喘息を起こさず、皮膚検査反応における異常が少なく、血清総IgEが低い。したがって、IL-9のMet/Met遺伝子型により、喘息またはアトピー性アレルギーに対する防御が行われてい

50

ると考えられる。

したがって、本発明は、117番目にメチオニンを有するヒト・インターロイキン9 (Met IL-9) をコードする塩基配列を含む単離精製されたDNAまたはその断片を提供する。本発明はまた、実質的に相同な配列だけでなく、このDNAの縮退配列も含んでいる。本発明のIL-9の起源はヒトである。またはDNAもしくはその断片は、当技術分野において既知の方法を用いて合成してもよい。また、認められた技術によってDNAを構築し、そのDNAを発現ベクターにクローニングし、化合物を発現するはずの細胞を、このベクターでトランスフェクションするという、遺伝子工学的技術によって、この化合物を産生することもできる。例えば、サムブルックら (Sambrook) 「分子クローニング：実験マニュアル」第2版 (コールドスプリングハーバー研究所出版 [1985]) に記載の方法を参照のこと。

10

気道過反応が、事実上すべての喘息患者と、近交マウスのいくつかの系統 (DBA/2) において見られる<sup>84</sup>。気道過反応は、ヒトにおいて、喘息の発症に関する危険因子であり、喘息の動物モデルにおいては、喘息に対する治療の効果を評価するための生理学的な尺度として用いられる。ヒト<sup>79</sup>およびマウスの遺伝子マッピングの結果 (実施例1および2を参照) とともに、これらのデータは、マウスの気道反応において、マウスIL-9遺伝子産物についての重要な役割を示唆している。特に、過反応DBA/2 (D2) マウスは、定常レベルのIL-9発現において、C57BL/6 (B6) 過反応マウス<sup>84</sup>とは異なっている (実施例14、図26を参照)。さらに、IL-9/IL-9レセプターに対する遮断抗体による前処理は、マウスにおいて、抗原に誘導される気道過反応および炎症を、場合によっては完全に防止することができるが、これは、これらの免疫応答におけるIL-9に関する重要な制御的な役割を示している。このように、分子の異なる変化により、ヒトおよびマウスでは気道過反応における生物学的な多様性が作出されるが、これらの変化は、この経路を制御する同一の遺伝子 (IL-9/IL-9R) の中で起きていることをこれらのデータは示している。これらをまとめると、これらの観察から、気道過反応、喘息、およびアトピー性アレルギーにおける、IL-9およびIL-9レセプターの重要な役割が確認されている。さらに、これらのデータから、IL-9が、そのレセプターと相互作用することを遮断する従来からの薬剤が、上で詳述したような、抗原に誘導される反応から保護することが示される。

20

アトピー性アレルギー、気管支過反応、喘息、および関連疾患の発病におけるIL-9の決定的な役割を明らかにするさらなる証拠は、マウスにおいては、数多くの抗原誘導応答に対してIL-9が決定的であるという本出願者らの観察から直接に得られる。抗原によるエアロゾル投与の前に抗体で前処理して、IL-9の機能を抑制制御すると、抗原に誘導される応答から動物を完全に防御することができる。これらの応答には、気管支過反応、好酸球増加症および気管支洗浄液中の細胞数の増加、炎症に関連した肺の組織学的変化、および血清総IgEの増加が含まれる。したがって、アトピー性アレルギーの発病に重要な、喘息に関連したアレルギー性炎症を特徴づけるこのような反応を、IL-9の機能を抑制制御することによって治療することは、本発明の範囲内に含まれる。

30

本出願者らはまた、IL-9レセプターに対する「アゴニストおよびアンタゴニスト」を投与することによるIL-9の活性の制御について開示する。熟練した当業者には、必要な3次元構造的コンホメーションを有する分子と、レセプター結合に必須または重要な残基を含む分子のすべてが、本発明の範囲内にあることが容易に理解できると思われる。本出願者らは、KP-16ペプチド (IL-9の43~60残基目) およびKP-20ペプチド (IL-9の71~90残基目) (例えば、アプライドバイオシステムズ社モデル431Aペプチド合成機 (Applied Biosystems Model 431A Peptid Synthesier) など、標準的なペプチド自動合成技術を用いて産生される) が、IL-9のアンタゴニストとして作用することを明らかにした。特に、本出願者らは、成熟蛋白質の43~60残基目と71~90残基目が、レセプター結合に重要らしいことを明らかにした。さらに、これらの残基には、エキソン4のほとんど (アミノ酸44~88) が含まれ、逆平行ヘリックス構造を形成すると推定される。この蛋白質の3次元構造から、52番目のセリンおよび/または53番目のグルタミン酸が、85番目のリジンと相互作用し、56番目のセリンが82番目のリジンと相互作用し、また、59番目のトレオニンが78番目のバリリンと相互作用することが示唆される。これらの逆平行ヘリックスおよび関連する機能的

40

50

な原子団の3次元的な配置が、レセプター結合にとって重要な必須の3次元的な立体的コンホメーションを表すため、これらの関係を刺激する化合物は、本発明の範囲内である。喘息様表現型に関連するIL-9配列および喘息様表現型の欠如に関連するIL-9配列を明らかにしたことから、抗原に対する肺の炎症反応がIL-9とは無関係であり、したがってIL-9の機能の抑制制御は抗原誘導反応に対する防御であることが示された。さらに、本出願者らは、アトピー性アレルギーおよび関連疾患に対する罹病性を診断する方法、ならびにIL-9とそのレセプターとの関係に基づいてこれらの疾患を治療するための方法も提供する。レセプターは、分子を認識して結合する、可溶性または膜結合型の成分であり、本発明のIL-9レセプター（喘息関連因子2、すなわちAAF2としても知られている）は、IL-9を認識して結合する成分である。IL-9レセプターの機能には、IL-9様分子に結合することと、特異的な細胞の中でその制御シグナルを増幅させることが含まれる<sup>57-60</sup>。この機能を阻害すると、IL-9の発現またはIL-9によって調節される機能の抑制制御、すなわち低下がもたらされる。したがって、IL-9とIL-9レセプターとのこの相互作用のおかげで、生物の一定の機能が、調節または制御されている。レセプターの一般的な議論については、グッドマンとギルマンの（Goodman and Gilman's）「治療学の薬学的基礎（The Pharmacologic Basis of Therapeutics）」（第7版、マクミラン出版社、米国ニューヨーク、1985）を参照。

一つの診断的な態様には、IL-9のDNA配列における変異を認識することが含まれる。一つの方法は、当業者によって理解されているように、十分なハイブリッド形成を行う条件下で、本発明のIL-9に相補的な配列を有する核酸分子（プローブとしても知られている）を導入することを含む。一つの態様においては、この配列は、Met117 IL-9またはThr117 IL-9に特異的に結合し、別の態様において、Met117 IL-9とThr117 IL-9の両方に結合する。これらの疾患に関連したDNA配列の変異を識別する別の方法は、当技術分野において周知の複数の方法によって、直接DNA配列を解析することである<sup>77</sup>。別の態様には、これらの疾患に関連する、IL-9遺伝子におけるDNA配列の変異を検出することが含まれる<sup>73-77</sup>。これらには、ポリメラーゼ連鎖反応、制限酵素断片長の多型性（RFLP）解析、および一本鎖のコンホメーション解析が含まれる。好ましい態様において、本出願者らは、本明細書において説明されているStyI RFLPを用いて、ThrおよびMet対立遺伝子に関係したIL-9の多型性を、遺伝子レベルで識別するための方法を具体的に提供する。別の態様においては、Nla、PfiM1、PfiM1およびNco1 RFLPを用いて、IL-9遺伝子のこれら2つの対立遺伝子を

区別する。別の態様は、アトピー性アレルギーおよび関連疾患を治療することを含む。好ましい態様において、本出願者らは、Met IL-9に匹敵する活性と、IL-9の活性を抑制制御するのに十分な程度にIL-9レセプターに結合する能力を有する化合物を投与する方法を提供している。Met IL-9に匹敵する活性を有する化合物は、類似の機能を有するが、必ずしも同一でない化合物である。このように、これは、IL-9レセプターには結合するが、同一の生理学的効果をもたない。実施例には、さまざまな点突然変異および/または欠失を有するIL-9のアミノ酸配列、ならびに、実質的にそれと相同な配列が含まれる。例えば、このような化合物は、当技術分野において既知の技術によつて測定したところに従うと、Thr IL-9がIL-9レセプターに結合するのを阻害するかもしれない。本発明はまた、上述のアミノ酸配列の機能的に有効な断片を含む。このような技術の一つにおいて、Thr IL-9は、IL-9レセプターの「リガンド」と考えてもよく、この2つの間の結合は、グッドマンとギルマンの（Goodman and Gilman's）「治療学の薬学的基礎（The Pharmacologic Basis of Therapeutics）」（第7版、マクミラン出版社、米国ニューヨーク、1985）において示されているように、当技術分野において周知のリガンド結合測定法によって評価することもできる。別の態様において、この化合物は、構造的にIL-9のMet対立遺伝子に似ているかもしれない。とすると、そのような化合物は、IL-9の117番目のコドンでメチオニンを取り込むか、または別の親水的なアミノ酸を取り込むかもしれない。したがって、本発明の範囲に含まれるのは、117番目の位置で、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンからなる群より選択されたアミ

10

20

30

40

50

ノ酸による、Thrの置換を含むIL-9変異体である。または本発明の化合物は、Met IL-9に類似する構造的な組成物を有するIL-9の断片として存在しているかもしれない。本発明の別の態様において、この化合物はMet IL-9に匹敵する機能を保持しているかもしれないが、構造的には、Met IL-9に似ていないかもしれない。例えば、この化合物の組成には、アミノ酸以外の分子が含まれるかもしれない。この例は、単なる例示にすぎず、通常の技術を有する当業者は、効果的なアンタゴニストをもたらす、別の置換および/または欠失によるIL-9の類似体も、本発明の範囲に含まれることを容易に理解できよう。既に検討したように、必要な3次元構造的コンホメーションを有する分子と、レセプター結合に必須または重要な残基を含む分子のすべてが、本発明の範囲内に含まれる。

特異的な測定法は、IL-9の既知の制御、部分的には、Tリンパ球、IgE合成、および肥満細胞からの放出に基づくことができる<sup>54-60</sup>。別の測定法には、ヒトIL-9が、M07e細胞において、複数の蛋白質の迅速で一過性的なチロシンリン酸化を特異的に誘導できることが含まれる<sup>57</sup>。この反応は、IL-9レセプターの発現および活性化に依存しているため、利用する価値があるかもしれない化合物の特徴を調べるための簡単な方法または測定法になる。転写因子Stat3のチロシンリン酸化は、IL-9の作用に特異的に関連していると考えられ<sup>58</sup>、この反応は、本発明の範囲内の化合物の特徴を調べるための簡単な方法または測定法になる。さらに、IL-9およびIL-9様分子の機能の特徴を調べるための別の方法には、細胞増殖測定法を用いてヒトIL-9の機能を測定するために用いられる、ATCCから入手可能な周知のマウスのTS1クローンおよびD10クローンが含まれる<sup>59</sup>。本発明の一部を構成するMet IL-9は、IL-9レセプターの「弱いアゴニスト」と見なすことができる。このような弱いアゴニストは、本発明のもう一つの好ましい態様である。本発明によれば、アゴニストという語は、レセプターと相互作用するかまたは結合して、内生する化合物の効果の少なくともいくつかを模倣する化合物を含む。ある細胞の表面上でIL-9レセプターと相互作用または結合するアゴニストは、このサイトカインの作用の特徴である、一連の生化学的および生理学的な変化を開始させる<sup>45-51, 54-61</sup>。本発明に係る別の弱いアゴニストを同定するために、本明細書および引用された文献<sup>2, 45-51, 54-60</sup>で説明されているところにしたがって、IL-9レセプターへの結合またはIL-9様機能について調べることができる。

本発明は、また、IL-9とそのレセプターのアンタゴニストを含む。アンタゴニストは、それ自体は薬学的活性をもたないが、アゴニストの作用を阻害することによって効果をもたらす化合物である。本発明のアンタゴニストを同定するために、本明細書および引用された文献<sup>2, 45-51, 54-60</sup>で説明されているところにしたがって、既知のアゴニストとの競合的結合、またはIL-9様機能の抑制制御を調べることができる。

アゴニストまたはアンタゴニストのいずれかの結合には、イオン力、水素結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力、および共有結合を含む、既知のあらゆる相互作用のタイプが含まれる。多くの場合、アゴニストまたはアンタゴニストとレセプターとの相互作用において複数のタイプの結合が重要である。

さらなる態様において、これらの化合物は、IL-9の類似体であってもよい。当技術分野においてすべて十分に説明されている方法<sup>62</sup>によって作出することができる、この遺伝子の単離DNA配列における点突然変異、塩基置換、および/または欠失によって、IL-9の類似体を作成してもよい。本発明はまた、IL-9のスプライシング変異体を含み、その5個のエキソンに1個以上の欠失を有するインターロイキン-9の単離核酸配列を開示している。「スプライシング変異体」という語は、本明細書においては、少なくとも1個のエキソンを含むヒトIL-9をコードしている単離精製されたDNA分子を意味している。当技術分野においては、スプライシング変異体が、自然に発現しているという証拠はない。したがって、本発明は、ヒトIL-9のエキソン1、4および5を有する、単離核酸を提供する。本発明の範囲内にある別の変異体には、エキソン1、2、3、4および5；エキソン1、2、3および4；エキソン1、2、4および5；ならびに、エキソン1、3、4および5を含む配列が含まれる。これらのエキソンは、さまざまな点突然変異を含むものと理解されるべきである。

IL-9に由来する拮抗ペプチドの具体的な例としては、エキソン4に由来するKP-16(配列

10

20

30

40

50

番号：13)およびKP-20(配列番号：14)が含まれる。エキソン4は、44個のアミノ酸をコードしているが、上記のペプチドは、それぞれ16個と20個のアミノ酸を含み、互いに重複していない。これらのペプチドは、個別に測定しても組み合わせて測定しても、かなりの阻害活性を示す。さらに、エキソン5に由来するKP-23(配列番号：15)およびKP-24(配列番号：16)も、同様の活性を示す。IL-9のエキソン1から5のいずれかを1個以上欠失させても、IL-9のスプライシング変異体を形成させることができる。上で示したように、これらのエキソンに由来するペプチドは制御能力を示し、このため、喘息を含むアレルギーを治療するのに有用である。

多酵素システムにおいては、第一の酵素または制御的な酵素を、多酵素システムの最終産物によって活性化または阻害できることが、当技術分野において知られている。最終産物の濃度を定常状態の濃度よりも上昇させると、最終産物は、一連の流れの中の制御的な酵素の特異的な活性化因子または阻害因子として作用する。また、このようなフィードバック機構が、IL-9のシステムにも関連するため、本発明のさまざまなポリペプチドは、IL-9レセプターの活性に対し、またおそらく、喘息の発病に關与するその他のサイトカインおよびそれらのレセプターの発現または機能に対して、このような活性化または阻害調節を行うことができることが観察されている。

本発明にはまた、当業者には慣例的な知識を用いて行うことができるアゴニストまたはアンタゴニストの改変が含まれる。例えば、レセプターに対する化合物の親和性は、一般的に、この化合物の化学構造に密接に関連している。したがって、構造-活性関係を用いて、本発明のアゴニストとアンタゴニストの改変を行うことができる。例えば、結晶学/X線回折とNMRの技術を用いて、本発明の改変を行うことができる。

例えば、分子画像を用いて、欠失突然変異体の構造モデルを構築するための鋳型として用いることができるヒトIL-9の3次元構造を作出することができる。そして、これらのモデルを用いて、IL-9に匹敵するが生物学的活性はそれよりも低いIL-9レセプターに対する親和性を有する、IL-9分子の突然変異体を同定し構築することができる。より低い生物学的活性とは、IL-9よりも2倍から100,000倍低いことを意味し、好ましくは、IL-9よりも100倍から1,000倍低い。

さらに別の態様において、これらの化合物は、レセプターの構造に対する動態学的プローブとして用いることも、IL-9依存的な細胞系によりレセプターアンタゴニストを開発するために用いることもできる。

さらに、本発明は、IL-9またはIL-9レセプターの合成を阻害するか、またはそれらの生物学的安定性を低下させる化合物も提供する。生物学的安定性とは、分子の合成とその分解との間の時間の測定値のことである。例えば、蛋白質、ペプチド、またはペプチド模倣薬<sup>8,9</sup>の安定性は、D型アミノ酸を用いて引き延ばすことができ、または酵素による分解に対してより感受性になるように配列を変更することによって短縮することができる。

別の態様において、本発明のアゴニストとアンタゴニストは、IL-9とIL-9レセプターに対する抗体である。IL-9およびそのレセプターに対する抗体は、当技術分野において周知の標準的な技術を用いて作製されるモノクローナル抗体でも、ポリクローナル抗体でもよい(Harlow & Lane's)「抗体-実験マニュアル(Antibodies-A Laboratory Manual)」(コールドスプリングハーバー研究所、1988)を参照)。これらを用いて、IL-9がレセプターに結合するのを阻害することができる。一つの態様において、この抗体は、IL-9と相互作用する。別の態様においては、この抗体は、IL-9レセプターと相互作用する。これらの抗体を誘導するために用いられるIL-9は、上で検討したIL-9の変異体のいずれでもよい。

抗体は、当技術分野において標準的な技術を用いて、IL-9またはIL-9レセプターのペプチド配列からも作製される(免疫学のプロトコール、第9章、ワイリー社(Wiley)を参照のこと)。遮断抗血清を作製するために用いることができる、マウスIL-9レセプターからのペプチド配列は、以下のものが同定されている：GGQKAGAFTC(1~10残基目)(配列番号：19)、LSNSIYRIDCHWSAPELGQESR(11~32残基目)(配列番号：20)、およびCESYEDKTEGEYYKSHWSEWS(ペプチドを担体蛋白質に結合させるため、N末端にCys残基を付加した18

10

20

30

40

50

4~203残基目) (配列番号: 21)。さらに、ヒトIL-9レセプターに対する遮断抗体に結合するエピトープは、成熟ヒトIL-9レセプターの8~14残基と同定されている。(TCLTNNI) (配列番号: 22) およびヒトIL-9に対する遮断抗体に結合する2つのエピトープも、50~67残基(CFSERLSQMTNTTMQTRY) (配列番号: 23) および99~116残基(TAGNALTLFLKSLLEIFQK) (配列番号: 16) であると同定されている。マウスの配列において遮断抗体を産生するペプチドに相当する、ヒトのペプチドおよびヒトのエピトープが、治療用抗体を作製するのに有用である可能性が最も高い。

さらに別の態様において、本発明の化合物は、アトピー性アレルギーおよび喘息の治療に有効となるよう、IL-9経路の機能または制御を変化させる蛋白質を含む、化学的な成分と結合させてもよい<sup>61</sup>。これらの蛋白質には、アトピー性アレルギーおよび喘息の治療にさらに有益となりうるIL-4、IL-5、IL-3、IL-2、IL-13、およびIL-10を含む別のサイトカインおよび増殖因子の組合せ<sup>62</sup>が含まれる。さらに、本発明のIL-9は、リン酸化によって共役させてもよく、ピオチニル酸、チオ酸、アセチル酸、ヨウ素酸、および図27に示したクロスリンキング試薬(ピアス社(Pierce))のいずれと共役してもよい。

さらなる態様において、本発明には、IL-9に結合する可溶性IL-9レセプター分子を投与することによって、IL-9の発現または機能を抑制制御することが含まれる。レナウルドラ(Renauld)<sup>59</sup>は、IL-9レセプターに可溶性形態が存在することを明らかにした。この分子は、細胞に結合したレセプターへのIL-9の結合を阻害し、IL-9のアンタゴニストとして作用させるために用いることができる。可溶性レセプターは、サイトカインまたは別のリガンドに結合して、それらの機能を調節するために用いられてきた<sup>87</sup>。可溶性レセプターは、溶液中または膜の外側に生じる、膜結合レセプターの形態である。可溶性レセプターは、一般的には膜と結合しているこの分子のセグメントが存在しないために、生じるのかもしれない。このセグメントは、当技術分野においては、一般的に、この遺伝子の膜通過ドメインまたはこの蛋白質の膜結合セグメントと呼ばれている。したがって、本発明の一つの態様において、可溶性レセプターは、膜結合レセプターの断片または類似体を意味する。本発明の別の態様において、レセプターが膜の中に入り込めなくなるか、またはレセプターは膜に入り込めるがその中に留まることができなくなるよう、膜と結合するセグメントの構造を改変する(例えば、DNA配列の多型性または遺伝子の突然変異)。このように、可溶性レセプターは、対応する膜結合型とは対照的に、膜との結合に重要な、この遺伝子またはレセプター蛋白質の1個以上のセグメントに違いがある<sup>52、53</sup>。

これらの化合物は、IL-9に結合するよう作用する可溶性IL-9レセプターの既知の形態であってもよい。またはこれらの化合物は、IL-9レセプターの既知の形態に似ているが、断片として存在するものでもよい。本発明の別の態様において、この化合物は、可溶性IL-9レセプターに匹敵する機能を保持しているが、組成においては、可溶性IL-9レセプターに似ていなくてもよい。例えば、この化合物の組成には、アミノ酸以外の分子が含まれていてもよい。このように、これらの化合物は、IL-9に結合して、IL-9がその細胞表面レセプターに作用するのを阻害する。

本発明のさらなる態様は、アンチセンスまたは遺伝子治療に関する。アンチセンス、または遺伝子治療として提供される場合、特定の選択された効果をもたらすよう、改変したDNA分子を作製することができる。当技術分野において、今では分かっている。IL-9レセプターをコードする本来のDNAセグメントは、他の哺乳動物すべてのDNA鎖と同じように、センス鎖とアンチセンス鎖が水素結合によって一緒になった2本鎖を有する。レセプターをコードするmRNAは、チミジンがウリジンに置き換わっていると予想されるが、センス鎖と同じ塩基配列を持っている。したがって、レセプターの配列に関する知識に基づいて、合成オリゴヌクレオチドを合成することができる。これらのオリゴヌクレオチドは、このレセプターをコードするDNAおよびRNAに結合することができる。本発明の活性断片は、mRNAおよびDNAのコード鎖に相補的であり、通常、少なくとも15ヌクレオチド、より一般的には20ヌクレオチド、好ましくは30ヌクレオチド、より好ましくは50ヌクレオチド以上である。センス鎖とアンチセンス鎖との間の結合強度は、総水素結合に依存する。したがって、熟練した当業者は、mRNAの総塩基数に基づいて、オリゴヌクレオチド配列の最適

10

20

30

40

50

な長さを容易に計算することができると思われる。

この配列は、mRNAの配列いずれかの部分に対して相補的である。すなわち、5'末端もしくはキャッピング部位の近傍、またはキャッピング部位の下流、キャッピング部位と開始コドンとの間であるかもしれないし、非コード領域またはコード領域の全部または一部だけをカバーしているかもしれない。アンチセンス配列が結合する特定の部位は、所望の阻害の程度、配列の独自性、アンチセンス配列の安定性などによってさまざまである。

本発明の実施において、IL-9レセプターの発現は、上記の合成アンチセンスオリゴヌクレオチド配列を有効量投与することによって抑制制御される。本発明のオリゴヌクレオチド化合物は、ヒトIL-9またはIL-9レセプターをコードするmRNAに結合して、これらの蛋白質の発現（翻訳）を阻害する。グラスら（Gruss et al.）の「インターロイキン9は、初期および培養ホジキン細胞およびリード-スタンバーグ細胞によって発現されている（Interleukin 9 is expressed by primary and cultural Hodgkin and Reed-Stemberg cells.）」、Cancer Res. 52:1026-31（1992年2月15日）を参照のこと。

IL-9の点突然変異、挿入、欠失、またはスプライシング突然変異など、さまざまな突然変異を有する単離DNA配列も同様に、遺伝子治療において有用である。

IL-9レセプターの直接的な制御に加えて、本発明は、シグナル伝達の阻害を含む下流制御の方法も含む。特に、本発明のさらなる態様は、チロシンのリン酸化阻害に向けられている。当技術分野において、高度な発エルゴンリン酸基転移反応は、キナーゼとして知られる多様な酵素によって触媒されることが分かっている。言い換えると、キナーゼは、ATPと代謝物との間でリン酸基を転移させる。IL-9は、多種の蛋白質のチロシンのリン酸化を誘導する。すなわち、JAK1チロシンキナーゼおよびJAK3チロシンキナーゼの活性化に加えて、IL-9は、Stat3のチロシンのリン酸化も誘導する<sup>58</sup>ことが、当技術分野において知られている。Stat3のリン酸化は、IL-9シグナル伝達経路に独特なものであるため、阻害因子にとって完全な標的となる<sup>58</sup>。本発明は、チロシンキナーゼ蛋白質の特異的な阻害因子であるチロフォスチンを、その範囲内に含む。このように、チロフォスチン（例えば、カルバイオケム社（Calbiochem）から入手可能）およびこれらのキナーゼのその他の同様の阻害因子は、シグナル伝達を調節する上で有用であり、アトピー性アレルギーおよび喘息を治療する上でも有用である。

本発明のさらに別の局面において、驚くべきことに、アミノステロール化合物も、IL-9の刺激によるシグナル伝達の阻害において有用であることが分かった。本発明において有用なアミノステロール化合物が、米国特許出願第08/290,826号と、その関連出願第08/416,883号および第08/478,763号で説明されており、また、第08/483,059号と、その関連出願第08/483,057号、第08/479,455号、第08/479,457号、第08/475,572号、第08/476,855号、第08/474,799号、および第08/487,443号でも説明されており、これらは、参照として本明細書に組み入れられる。

さらに、本発明には、薬学的に許容される担体と共に、本発明の化合物を含む薬学的組成物が含まれる。薬学的に許容される担体は、水および油などの滅菌した液体で、ピーナッツ油、大豆油、ミネラル油、ゴマ油などの、石油性、動物性、植物性、または合成した油が含まれる。薬学的組成物が静脈に投与される場合には、水が、好ましい担体である。食塩水および含水デキストロスとグリセロールの水溶液も、特に、注射可能な水溶液の液状担体として用いることができる。適当な薬学的担体は、マーチン、E.W.（Martin, E.W.）の「レミントンの製薬科学（Remington's Pharmaceuticals Sciences）」で説明されており、これは特に、参照として本明細書に組み入れられる。

本発明に係る治療方法に用いられる化合物は、治療されるべき条件、部位特異的治療の必要性、投与すべき薬物の量などに応じて、全身的または局所的に投与することができる。局所的な投与法を用いることができる。溶液、懸濁液、ゲル、軟膏、または塗剤などのあらゆる一般的な局所用の組成物を用いることができる。例えば、「レミントンの製薬科学」第17版、ペンシルバニア州イーストン、マック出版社（Mack Publishing Company）で例示されているように、局所的処方剤の調製が、薬学的処方剤の技術分野において十分に説明されている。局所的な施用のためには、粉末またはスプレー、特にエアロゾルの形状

10

20

30

40

50

で投与することもできる。全身投与に合わせた薬学的組成物として、活性成分を投与してもよい。知られているように、薬物を全身的に投与すべき場合には、粉末、丸薬、錠剤などにして調製したり、経口投与用にシロップまたはエリキシルとして調製してもよい。静脈内、腹腔内、または病変部内に投与するためには、注射によって投与可能な溶液または懸濁液として化合物を調製する。ある場合には、これらの化合物を座薬の形状に処方するのが有用であろうし、皮下に蓄積させたり筋肉内注射をするためには、長時間かけて放出されるような処方剤とするのが有用なこともある。好ましい態様において、本発明の組成物は、吸入によって投与してもよい。吸入療法のためには、化合物を、用量計付きの吸入器によって投与するのに有用な溶液にするか、または乾燥粉末吸入器に適当な形状にすることができよう。

10

有効用量とは、IL-9の発現、またはIL-9によって調節される機能のいずれかを抑制制御する用量のことである。所定の有効用量は、条件によってさまざまであり、また一定の場合でも、治療すべき症状の重篤さおよび治療に対する患者の感受性によってさまざまである。したがって、絶えず実験によって、その時間と場所における所定の有効用量を決定するのが一番よい。しかし、本発明による喘息関連疾患の治療において、重量で0.001%~5%の間、好ましくは、約0.01%~1%を含む処方薬が、通常は、治療学的に有効な用量を構成すると予想される。全身的に投与する場合には、1日につき、体重1kg当たり0.01mg~100mgの間の用量、しかし好ましくは、約0.1~10mg/kgの用量が、ほとんどの場合、治療結果に効果をもたらすと考えられる。

本出願者らはまた、IL-9の発現、またはIL-9によって調節される機能を抑制制御する化合物をスクリーニングする方法を提供する。当技術分野において標準的な技術を用いて、IL-9によって発現される機能が抑制制御されるか否かを判定することができる<sup>57~60</sup>。特定の態様において、本出願者らは、Met IL-9と同等の機能を有する化合物を同定する方法を提供する。したがって、一つの態様において、インビボでのIL-9機能の抑制制御における、化合物の効能を評価するための、当技術分野において周知の技術<sup>42</sup>を用いて、血清総IgEを測定することができる。別の態様においては、インビボでのIL-9機能の抑制制御における化合物の効能を評価するための、当技術分野において周知の技術<sup>42</sup>を用いて、気管支過反応、気管支肺胞洗浄液、および好酸球増加症を測定することができる。さらに別の態様において、IL-9の機能は、インビトロで評価することができる。当業者に知られているように、ヒトIL-9は、M07e細胞において、複数の蛋白質の迅速で一過性的なチロシンのリン酸化を特異的に誘導する。転写因子Stat3のチロシンのリン酸化は、IL-9の作用に特異的に関連していると考えられる。IL-9レセプターの「安定的な発現」に依存する、IL-9およびIL-9様分子の機能の特徴を調べるための別の方法では、周知のマウスのTS1クローンをを用いて、細胞増殖測定法によってヒトIL-9の機能を評価する<sup>59</sup>。

20

また本発明には、IL-9レセプターを発現する細胞系に基づいて、飽和可能で特異的なリガンド結合を見つけるための簡単なスクリーニング法が含まれる<sup>46、59</sup>。IL-9レセプターは、K562、C8166-45、B細胞、T細胞、肥満細胞、好中球、巨核球(UT-7細胞)<sup>53</sup>、ヒト巨核芽性白血病細胞系M07e<sup>57</sup>、TF1<sup>59</sup>、マクロファージ、胎児胸腺細胞、ヒト腎細胞系293<sup>53</sup>、およびマウス胚海馬前駆細胞系<sup>46、52、53</sup>を含む、広く多様な細胞型において発現している。別の態様において、可溶性IL-9レセプターを用いて、リガンド結合およびレセプターのアンタゴニストの可能性のあるものを評価することができる。

30

40

本発明の実施には、従来用語および当業者の通常の技術の範囲内にある、分子生物学、薬学、免疫学、および生化学の技術が用いられる。例えば、サムブルックら(Sambrook)「分子クローニング：実験マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版(コールドスプリングハーバー研究所出版[1985])、またはアウスウーベルら(Ausubel)「分子生物学の最新プロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社(John Wiley & Sons, Inc.) [1994]を参照のこと。

ところで、本発明者らは、次の基本的な背景情報を提供する。身体の遺伝的物質であるDNAは、46本の染色体の上に配置されているが、染色体の各々は、セントロメアによって結

50

合された2本の腕を有する。各染色体は、pまたはqと名付けられたセグメントに分けられる。pという記号は、セントロメアから最も近いテロメアまでを測定した染色体の短腕を同定するとき用いられる。染色体の長腕は、qという記号で表される。染色体上の位置は、染色体番号(すなわち、5番染色体)、ならびにpまたはq領域の位置(すなわち、q31-q33)によって示される。さらに、身体は、性染色体、XおよびYを持っている。減数分裂の過程で、XおよびY染色体は、偽常染色体領域として知られている領域でDNA配列情報を交換する。

DNA、すなわちデオキシリボ核酸は、4つの異なる塩基性化合物、アデニン[A]、チミン[T]、シトシン[C]、およびグアニン[G]を含む、2本の相補的なヌクレオチド鎖から成る。一方の鎖のAは、もう一方の鎖のTと結合し、一方の鎖のCは、もう一方の鎖のGと結合して、相補的な「塩基対」を形成し、各対は、それぞれの鎖に一つずつ塩基を有する。

3個のヌクレオチド(「コドン」)が連続したものをグループにすると、1個のアミノ酸をコードしている。したがって、例えば、3個のヌクレオチドCAGは、アミノ酸のグルタミンをコードしている。天然に存在する20個のアミノ酸と、それらの一文字コードは、以下の通りである。

アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
アスパラギン、 またはアスパラギン酸	Asx	B
システイン	Cys	C
グルタミン	Gln	Q
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン、 またはグルタミン酸	Glx	Z
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

アミノ酸は、蛋白質を構成する。アミノ酸は、親水性、すなわち水に対して親和性を示すものもあり、または疎水性、すなわち水を忌避するものもある。例えば、G、A、V、L、I、P、F、Y、W、C、およびMと名付けられたアミノ酸は疎水性で、また、S、Q、K、R、H、D、E、NおよびTと名付けられたアミノ酸は親水性である。一般的に、アミノ酸の疎水的または親水的な性質は、ペプチド鎖の折りたたみに影響を与え、結果的に、蛋白質の3次元構造に影響を与える。

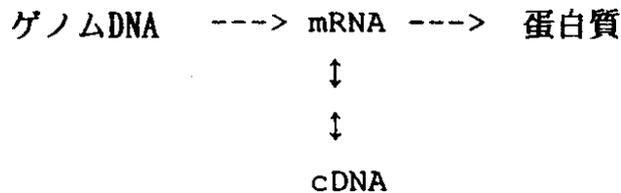
DNAは、以下のように蛋白質と関係している。

10

20

30

40



ゲノムDNAは、生物の細胞の中に見られるDNA配列のすべてを含む。これは、メッセンジャーRNA [「mRNA」] に「転写」される。相補的DNA [「cDNA」] は、mRNAの逆転写によって作出される、mRNAの相補的なコピーである。ゲノムDNAとは異なり、mRNAもcDNAも、いわゆる「エキソン」という、蛋白質をコードするDNA領域またはポリペプチドをコードするDNA領域のみを有する。ゲノムDNAはまた、蛋白質をコードしていない「イントロン」も含みうる。

10

実際、真核生物の遺伝子は、イントロンによって中断されたエキソンからなるため、それらによってコードされる蛋白質について不連続である。RNAに転写された後、イントロンはスプライシングによって切り出され、成熟メッセンジャーRNA (mRNA) を生成させる。エキソンの間のスプライシング部位は、典型的には、スプライシング作用に対するシグナルとして作用するコンセンサス配列によって決められる。スプライシングは、一次RNA転写産物からのイントロンを除去することと、切り出されたイントロンの両側に残ったRNAの末端を結合または融合することから成り立つ。イントロンの有無、イントロンの組成物、および遺伝子当たりのイントロンの数は、同じ生物種の系統間および同一の基本的な機能遺伝子を有する生物種の間で異なる。ほとんどの場合、イントロンは本質的ではなく融

20

通がきくと想定されるが、それらの分類も絶対的ではない。例えば、一つの遺伝子のあるイントロンは、別の遺伝子のエキソンであったりする。場合によっては、代わりのまたは別のスプライシングパターンによって、同じ一本のDNA鎖から別の蛋白質が生成される。実のところ、イントロンの構造的な特徴と、そのもとにあるスプライシング機構とが、異なる種類のイントロンの分類の基礎を作っている。

エキソンに関しては、これらは、例えば、機能的ドメイン、折りたたみ領域、または蛋白質の構造的要素など、不連続なドメインまたはモチーフに相当することがあり、または逆ターン、ループ、グリコシル化シグナル、およびその他のシグナル配列、または構造化されていないポリペプチドリンカー領域などの、短いポリペプチド配列に相当することがある。本組み合わせ法のエキソンの基本単位は、天然に存在するエキソン配列に相当する核酸

30

配列、または突然変異 (例えば、点突然変異、欠失、融合) を起こした天然のエキソン配列を含むことができる。

ここでDNAの操作に戻ると、DNAは、一定の分かっている部位でDNAを切断する「制限酵素」と、DNAを連結させるDNAリガーゼとを用いて、切断し、スプライスし、またそれ以外の操作を行なうことができる。このような技術は、サムブルックら (Sambrook) 「分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)」第2版 (コールドスプリングハーバー研究所出版 [1985])、またはアウスウーベルら (Ausubel) 「分子生物学の最新プロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」ジョン・ワイリー・アンド・サンズ社 (John Wiley & Sons, Inc.) [1994] などの教科書に開

40

示されているため、当技術分野において通常の技術を有する者によく知られている。

そして、特異的な長さや配列を有するDNAを、プラスミド、コスミド、またはウイルスなどの遺伝的因子で、自らの調節に基づいて複製することのできる「レプリコン」の中に挿入することができる。「組換えベクター」または「発現ベクター」とは、DNAの発現、すなわち、DNAによってコードされている蛋白質の産生が可能ないように、DNAセグメントが挿入されているレプリコンのことである。発現ベクターは、実験室で構築してもよいし、別の実験室から入手してもよいし、または商業的な供給業者から購入してもよい。

組換えベクター [当技術分野において、さまざまな名前で行われている] は、包括的には、「形質転換」として知られている処理によって、宿主の中に組み込まれる。形質転換とは、感染、直接的な取り込み、形質導入、F-接合、マイクロインジェクション、またはエレクトロポレーションなど、多数の方法のいずれかによって、外来のDNAセグメントを

50

宿主細胞へ転移させることである。組換え宿主細胞、細胞、および細胞培養物としてさまざまに知られている単細胞の宿主細胞には、バクテリア、酵母、昆虫細胞、植物細胞、哺乳動物細胞、およびヒト細胞が含まれる。特に好ましい態様において、宿主細胞には、大腸菌、シュードモナス菌、パチルス菌、放線菌、酵母、CHO、R1-1、B-W、LH、COS-J、COS-7、BSC1、BSC40、BMT10、およびS69細胞が含まれる。酵母細胞には、特に、サッカロマイセス属、ピヒア属、カンジダ属、ハンセヌラ (Hansenula) 属、およびトルロピス (Torulopsis) 属が含まれる。

当業者は、宿主細胞によるDNAセグメントの発現には、適切な調節配列または因子が必要であることを認識している。調節配列は、用いる宿主細胞によって異なるが、例えば、原核生物においては、プロモーター、リボソーム結合部位、および/または転写終結部位が含まれる。真核生物においては、このような調節配列には、プロモーターおよび/または転写終結部位が含まれる。当業者にはよく理解されているように、注意深い選抜とこれらの調節配列の置き方によっては、ポリペプチドの発現が促進される、すなわち、標準的なレベルを超えて増加することがある。

別の態様において、用いられうるプロモーターには、ヒトのサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、テトラサイクリンで誘導できるプロモーター、シミアンウイルス (SV40) プロモーター、モロニー Maus 白血病の長い末端反復配列 (LTR) プロモーター、グルココルチコイドで誘導できるマウス乳腺癌ウイルス (MMTV) プロモーター、ヘルペスチミジンキナーゼ・プロモーター、マウスおよびヒトの  $\alpha$ -アクチン・プロモーター、HTLV1 および HIV IL-9 の 5' 側隣接領域、ヒトおよびマウスの IL-9 レセプターの 5' 側隣接領域、バクテリアの tac プロモーター、ならびにショウジョウバエのヒートショック骨格接着領域 (SAR) エンハンサー因子が含まれる。

DNA は、ペプチド、オリゴペプチド、および蛋白質など、どのような長さのポリペプチドとしても発現させられる。ポリペプチドには、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などの、翻訳後修飾も含まれる。

本発明にとって有益なもう一つの分子生物学的技術は、「連鎖解析」である。連鎖解析は、特性または疾患と相関関係にある染色体または染色体領域を同定するために用いられる解析的な方法である<sup>44</sup>。染色体は、その上に遺伝子が組織化されている、遺伝の基本的な単位である。遺伝子の他に、当業者は、染色体上に「DNA マーカー」を同定している。DNA マーカーとは、その同一性および配列を容易に決定できる、既知の DNA 配列である。連鎖解析の方法論は、病気遺伝子、例えば、喘息に対する罹病性に関連した遺伝子を特定の染色体にマッピングするのに応用されてきた<sup>42</sup>、<sup>44</sup>。

本発明の別の態様は、開示された本発明の明細および実施を考慮することにより、当業者には明らかになると思われる。本発明の真の範囲は、請求の範囲によって示されており、本明細書および実施例は、例示にすぎないと考えられるよう意図されている。

#### 方法

以下の実施例に記述した実験の実施に当たって、本出願者らは以下の方法を用いた：

#### 患者集団

喘息の家族を 2 つの源から募集した<sup>27</sup>、<sup>42</sup>、<sup>79-83</sup>、<sup>99</sup>。それぞれの場合において、ヒト IL-9 遺伝子の 3365 位での多型性に関して患者の遺伝子型を分類した [ GenBank 寄託番号 M30136 ]。

米国東海岸の 74 人から成る第 3 の集団を、喘息およびアトピーに関して無作為に確認した。コドン 117 におけるメチオニン置換の発生率を、一般集団におけるこの変種の発生率の不偏推計値として用いた。

ペンシルバニア州フィラデルフィアの 49 人から成る第 4 の集団を、喘息およびアトピーに関して無作為に確認した。血清中総 IgE を、酵素結合免疫ソルベント試験 [ ELISA、ゲンザイム、ケンブリッジ、マサチューセッツ州 ] によって解析した。各個人の末梢血の白血球から DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA について、遺伝子マーカー ( 遺伝子タイピング ) および候補遺伝子の分析を実施した。再度、コドン 117 におけるメチオニン置換の発生率を、一般集団におけるこの変種の発生率の不偏推計値として用いた。

10

20

30

40

50

### オリゴヌクレオチドプライマー。

プライマーは全て、OLIGO 4.0を用いて設計した。1L-9遺伝子の特徴付けは、報告された配列の5個の各エキソン周囲のプライマーを用いて実施した。各エキソン周囲のプライマー配列は：エキソン1 [上流] [5' GCT CCA GTC CGC TGT CAA 3'] および [下流] [5' CTC CCC CTG CAG CCT ACC 3'] [産物のサイズ150bp]；エキソン2 [上流] [5' CGG GG C TGA CTA AAG GTT CT 3'] および [下流] [5' GTT CTT AAA GAG CAT TCA CT 3'] [産物のサイズ99bp]；エキソン3 [上流] [5' ATT TTC ACA TCT GGA ATC TTC ACT 3'] および [下流] [5' AAT CCA AGG TCA ACA TTA TG 3'] [産物のサイズ113bp]；エキソン4 [上流] [5' TTT CTT TGA ATA AAT CCT TAC 3'] および [下流] [5' GAA ATC ACC AAC AGG AAC ATA 3'] [産物のサイズ206bp]；ならびにエキソン5 [上流] [5' ATC AAC TTT CAT CCC CAC AGT 3'] および [下流] [5' GGA TAA ATA ATA TTT CAT CTT CAT 3'] 10  
であった。各エキソンはまず、一本鎖構造多型性解析 [SSCP] を用いて調べた<sup>72、73</sup>。エキソン5のプライマーは、ポリメラーゼ連鎖反応 [PCR] 増幅後に160bpの産物を産生し、これはまた、直接固相配列分析によっても調べた<sup>72、73</sup>。上流のプライマーは5'ピオチン標識と共に合成し、増幅した後、ストレプトアビジン結合常磁性ビーズ [ダイナル] によってPCR産物を捕獲し、他所で記述されている<sup>77</sup>サンガーシークエンシングによって特徴付けを行った。配列の多型性は、繰り返し分析によって人為的誤差と識別した。

### SSCP分析。

電気野に暴露された一本鎖DNAの移動の変化に基づく多型性の検出法であるSSCP<sup>72</sup>は、シュウエンゲルら (Schwengel, 1994) が記述したように、室温で10%グリセロールの存在 20  
下および非存在下で、クロスリンクモノマー濃度2.67%で6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて実施した<sup>77</sup>。PCR産物4  $\mu$ lを2倍濃度の停止緩衝液 [95%ホルムアミド、20mM EDTA、0.05%BPB、0.05%キシレンシアノール] 5  $\mu$ l、および0.5%SDS 1  $\mu$ lならびに50  $\mu$ M EDTAと混合し、85~90  $^{\circ}$ Cで8分間変性させ、その後直ちに氷上に置いた。電気泳動は、ゲルを含むグリセロールで約24時間、および非グリセロールゲルでは12時間、12ワットで実施した。次にゲルを乾燥させ、コダックのXAR (登録商標) フィルムに露出した。

### DNAシークエンシング。

PCR産物の直接DNAシークエンシングは、シュウエンゲルら (Schwengel, 1994) <sup>77</sup> が記述したように、エチジウムブロマイドで染色した1%アガロースゲル上に正しいサイズのPCR産物の存在を確認した後、固相法を用いて行った。PCR産物20  $\mu$ lをダイナビーズ (Dynabeads) (登録商標) m-280 [ダイナル] 40  $\mu$ lと共に15分インキュベートした。ビーズは、製造元の示唆通りに洗浄して希釈した。各試料をその後、10mMトリス塩酸pH7.5、1 mM EDTA、2 M NaClを含むB&W緩衝液で洗浄し、0.1N NaOHで変性させ、次に0.1N NaOH、B&W緩衝液、および10mMトリス塩酸pH8ならびに1 mM EDTA [TE] で洗浄した。ビーズ沈殿物をH<sub>2</sub>O 10  $\mu$ lに再懸濁した。

サンガーシークエンシング反応は、シーケナーゼ [アメリカバイオケミカルカンパニー] を用いて行った。<sup>35</sup>S-dATPまたは<sup>33</sup>P-dATPはシークエンシング溶液に取り込まれ、その産物を、7M尿素を含む5%または6%のいずれかのポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ゲルは固定せずに乾燥させ、X線フィルムに露出した。両親および子供の遺伝子型の 40  
比較により、対立遺伝子を決定した。頻度の少ない人為的誤差は、繰り返すことで真の配列多型性と容易に識別された。

DNAを末梢白血球から得て抽出した。ゲノムDNAを、増幅のために200  $\mu$ g/mlの濃度に希釈した<sup>27、42</sup>。DXYS154を含む単純配列リピート [SSR] は、ゲノムデータベース [GDB; ウェルチ図書館、ジョン・ホプキンス大学、バルチモア、MD] から選択した。sKK-1マーカの遺伝子タイピングは、90bpの産物を生じる以下のプライマーsKK-1U [5' CAA ATC TGA AGA GCA AAC TAT 3'] およびsKK-1L [5' TTA AAA AAT TCA TTT CAG TAT TCT 3'] を用いて実施した。各SSR産物は、PCR<sup>72</sup>によって増幅し、先に記述した方法に従ってサイズを測定した<sup>27、42</sup>。試料の取り扱いにはウェーバーら (Weber) が記述した方法を少し改変して実施した<sup>71、27、42</sup>。各オートグラフの2回の独立した計測から遺伝子型を決定した。家 50

族を遺伝子タイピングした個々の人には臨床データを知らせなかった。

#### RFLP分析。

3365位でのCからTへの多型性の結果として、IL-9エキソン5のPCR産物の52位でStyI制限酵素断片長多形 [ RFLP ] を産生した。このDNA配列変種の存在に関して試験するために、PCR増幅の前にエキソン5の下流のプライマーを末端標識した。PCR産物を次にStyIで消化し、長さが108bp [ 標識 ] および52bp [ 非標識 ] の2つの断片を得た。このRFLPをSSCPと共に用いて、家族および個人におけるこの多型性の存在を確認した。

#### 連鎖分析およびデータ処理。

連鎖分析は、BHR、アトピーおよび喘息のような複雑な形質の遺伝的基礎の調査のための確立されたアプローチである罹患兄弟ペア法 ( affected sib-pair methods ) [ SIBPAL, S . A . G . E . ] <sup>78</sup>を用いて実施した。非罹患兄弟ペアの比率はなおも遺伝子担体である可能性があるが、形質を発現していないため、罹患兄弟ペアを通常、最初に試験する。遺伝 [ 優勢、劣性等 ] のモデルが正確に特定されなければならないLODスコア法とは対照的に、兄弟ペア法による分析はこの点において明確な仮定をしない。このように、兄弟ペア分析では、両親の臨床情報は連鎖の試験に用いない。これらの方法では、罹患した2人の子供が、同じ両親のマーカー対立遺伝子のコピーをどれほどの頻度で共有するかという点を適切に観察する<sup>44</sup>。両親のマーカー対立遺伝子の同じコピーが異なる子孫に認められれば、それらは「遺伝により同じもの」を受け継いでいると言われる。偶然による予測値 [ 50% ] より起こる頻度が有意に高いマーカー対立形質に関して、罹患兄弟ペアが遺伝により同一である場合、連鎖が示唆される。同じマーカー対立遺伝子が疾患遺伝子と共に異なる子孫に伝搬されれば、このことは、マーカー座が連鎖している、または減数分裂の際に共分離されるほど、同じ染色体上で疾患遺伝子に極めて近い位置に存在するに違いないことを意味する。次に、マーカーの染色体での位置を知ることによって、形質をマッピングする。ヒトにおける連鎖はまた、確率比の方法によって確立してもよい。この方法は、例えば1つの仮説の下で、観察された家族のデータが2つのDNAマーカー間に連鎖を生じる確率と、別の仮説の下で、典型的には非連鎖を生じる確率との比較を含む。これらの確率の比を、他の仮説に対する一つの仮説のオッズ比と呼ぶ。慣例により、哺乳類の遺伝学者はオッズ比の対数またはLODスコアを好む。一般に連鎖は、連鎖対非連鎖のオッズが圧倒的に大きい場合、または1,000対1 [ LOD = 3 ] に達した場合に、証明されたと見なされる。オッズ比がこの仮説に対して100 : 1 [ LOD = - 2 ] に低下すると連鎖は拒絶される。最大確率推計値は、確率比が最大の場合の再結合分画である。このように、多系統のLODsは、スコアが3 [ 1,000対1のオッズを表す ] になるまで、または-2 [ 100 : 1のオッズを示す ] に低下するまで加算される。

臨床および遺伝子型データは全て、マッキントッシュ ( MacIntosh ) ( 登録商標 ) またはサンマイクロシステムズ ( Sun Microsystems ) ( 登録商標 ) コンピューターでエクセル ( EXCELL ) ( 登録商標 ) 用いて処理した。統計分析はJMP [ SASインスチテュート、インク、カリー、NC ] を用いて行った。ウィルコキソン / クラスカル - ワリス ( Wilcoxon / Kruskal - Wallis ) 検定 [ 階数和 ] を用いて、コドン117でのホモ接合体 [ Met / Met ]、ヘテロ接合体 [ Met / Thr ]、またはホモ接合体 [ Thr / Thr ] がその血清中総IgEが異なるか否かを検定した。P値は全て、対立遺伝子の増加的共有のみが予測されるため片側検定を用いた罹患兄弟ペア分析を除き、両側で行った。

この背景的情報を提供し、本出願者らは本発明の好ましい面について記述する。

#### 実施例 1

##### BHRとマウス第13染色体との連鎖分析

BHRの複雑な遺伝的決定因子を詳細に分析する一助として、本出願者らは、様々な気管支収縮刺激に対するその遺伝的感受性が異なるマウスモデルを開発した。組換え近親交配株 [ BXD ] を用いた近交系動物モデルにより、BHRに対する感受性を制御する遺伝子の数、その影響の程度、およびその正確な染色体上の位置を明らかにするためのヒトで進行中の試験を促進することが可能である。特に、動物モデルにおいて、喘息に関して重要な危険因子に対する感受性を決定する遺伝子の位置を特定することは、ヒトにおけるこの遺伝子の

位置クローニングの役に立つ可能性がある。

BHRおよびアトピーの素因を有する遺伝子は、本発明の前には確認されていないが、染色体 5 q31~q33は、マウス第11、13、および18染色体の一部とシンテニーであることがわかっていて、図2は、BHR、アトピー、および喘息に関連する気道炎症において、何らかの役割を果たしている可能性がある多数の位置候補領域を含むシンテニー領域を図示する。特に、BHRとの連鎖に関して有意な証拠を示しているヒト染色体 5 q31~q33の領域は、多数の候補遺伝子を含むマウス第11、13、および18染色体の一部と相同である<sup>84</sup>。特に、IL-9または近傍遺伝子は最近、無作為確認集団を用いた血清中総IgE濃度の対数値とこの遺伝子マーカーとの間の連鎖的不均衡に基づく、可能性のある候補遺伝子として示唆されている<sup>43</sup>。

4つの候補区間の比較にもかかわらず、連鎖の証拠は唯一の領域で認められ、これをAib1 [アトラキュリウム誘発気管支収縮1]と呼んだ。図3その結果を示す。特に、図3は、低反応性C57BL/6Jおよび高反応性DBA/2J原種系に由来する24 BXD RI系のアトラキュリウム誘発気道反応性に関するLODスコア曲線を示している [直線]。20 BXD系の選択的遺伝子タイピングから得られたLODスコア曲線も同様に示す [点線]。BXD系-2、-6、-18、および-32は、DBA/2の下1標準偏差以上でC57BL/6の平均反応以上の平均反応を示す表現型の間であるため、2回目の分析では用いなかった。アトラキュリウム20mg/kgの静脈内注射に対する気管支収縮反応は、気道圧時間指数 [ APTI ] と呼ばれる、時間 [ 4分 ] に対して積分した最大吸気圧の変化によって評価した。アトラキュリウム誘発 APTI は RT系当たり 2~8匹の動物において測定した。マーカーデータはマップマネージャーデータ分析プログラムのRWEデータベースから得た。マーカー間の遺伝子距離 [ cM ] を横座標に示す。LODスコアはマップマーカー/QTL連鎖プログラムによって計算した。QTLはこの領域で検出され、アトラキュリウム誘発気道収縮-1 [ Aib1 ] と呼ばれた。

図3は、この定量的形質座 [ QTL ] がマウス第13染色体の中央部に位置し、この区間でオッズ [ LOD ] 2.42の最大見込み対数値が得られたことを示している。BXDマップの全てのマーカーを分析すると、アトラキュリウム誘発気管支収縮の総変動の44%はAib1で説明された。アトラキュリウムに対する反応が中間であった4つの系統 [ BXD-2、-6、-18、および-32 ] を除外した後にQTL分析を行うと、第13染色体のLODは2.85に増加した。第13染色体の連鎖領域における既知の位置候補には：D1ドーパミン受容体 [ Drd1 ]、繊維芽細胞増殖因子受容体4 [ Fgfr4 ]、リンパ球抗原-28 [ Ly28 ]、チオプリンメチルトランスフェラーゼ [ Tpm1 ] およびIL-9が含まれる。

本出願者は、ヒトにおけるこれまでのマッピングデータに基づき、マウスの4つの候補領域との連鎖に関して特に試験しているため、本明細書に示すデータは非常に重要である。ランダー & ボットスタイン (Lander and Botstein) が古い論文で述べているように<sup>67</sup>、連鎖に関する偽陽性率は、LOD閾値(T)を  $T = 1/2 (\log_{10} e) (Z^2/n)$  (ここで、nは調べた区間の数に等しい) となるように選択すれば得られる。典型的には、連鎖の証拠として3.3という最大LODを必要とする<sup>67</sup>。しかし、この閾値は、ゲノム全体を調査しているという仮説に基づいている。これらの同じ著者が、0.83というLODは、唯一の領域を調べる場合には十分であると指摘している。この場合、4つの候補領域では、多数の独立した比較について訂正すると、真のP 0.05を得るためには、各領域について0.0125というP値 ( ) が必要である。ソラー & ブロディ (Soller and Brody)<sup>68</sup> が示唆しているように、ただ一つの偽陽性所見でも起こるような5%誤差率を採用し、等式  $1/2 (\log_{10} e) (Z^2/n)$  を解釈すると、LOD閾値は少なくとも1.36となる。1.48という最大LODは、IL-9遺伝子候補について得られた。許容可能な偽陽性誤差率を 0.1%に制限すると、LOD閾値は2.36に増加する。このように、第13染色体 (Aib1) 上の候補区間について得られた2.42という最大LODは、非常に有意である。

これらのLOD閾値データは、ヒトおよびマウスにおけるBHRの連鎖の保存に関する証拠を提供する。ヒトにおけるBHRは、多くの増殖因子およびサイトカインが含まれ、IL-9遺伝子およびマウス第13染色体のIL-9領域に対するAib1座マップを含む染色体 5 q上の領域と連鎖する。

10

20

30

40

50

## 実施例 2

### IL-9遺伝子多型性の同定

本出願者らは、BHRに関してマウスとヒトの間に連鎖の保存があることを証明した。これらのデータは、この遺伝子またはDNA配列の機能の変化がマウスの気管支反応性の制御に重要である可能性があることを示唆している。上記の方法を用いて、PCR後のヒトIL-9の各エクソンに関して、正しいサイズの独自の産物をゲル電気泳動によって同定した。SSCPにより、一つの多型性をヒトIL-9遺伝子のエクソン5に同定した。直接DNA配列分析により、新規SSCPコンフォーマーの原因として、ヒトIL-9遺伝子の3365位 [ GenBank寄託番号M30136 ] でのCからTへのヌクレオチド置換が証明された。このDNA配列変化は、IL-9蛋白質のアミノ酸117でのトレオニン（親水性）からメチオニン（疎水性）への非保存的置換を予測する。

10

エクソン5は、マウスIL-9配列と比較してヒトIL-9の最高保存区間内にある蛋白質のこの部分をコードする（図4参照）。

様々な集団からの個々の人を遺伝子型分類を行い、ヒトIL-9のコード配列におけるヌクレオチド置換の直接分析によって、これらの対立遺伝子の発生率を調べた。喘息家系グループの394人中2人が、コドン117においてホモ接合 [ Met / Met ] であった [ 0.5% ]。ヘテロ接合は91人 [ 23.1% ]、そして [ Thr / Thr ] ホモ接合体は301人 [ 76.4% ] であった。イタリアの家系集団では喘息の症状患者により確認したため、このIL-9変種の真の発生率は有意により高い可能性がある。アトピーおよび喘息に関して無作為に確認した別の民族的に多様な集団では、コドン117において [ Met / Met ] ホモ接合体は49人中1人 [ 2.0% ] であった。ヘテロ接合は11人 [ 22.4% ]、そして [ Thr / Thr ] ホモ接合体は37人 [ 75.5% ] であった。Met / Thrヘテロ接合体の発生率は、アトピーおよび喘息に関して無作為に確認した第4の集団では18.9%であった。このように、報告された配列 [ GenBank寄託番号M30136 ] と比較すると、集団の約20%が3,365位でのT対立遺伝子の担体を表す可能性がある。集団におけるいかなる対立遺伝子の発生率も $p^2+2pq+q^2$ であることは当技術分野で周知であるため、集団の約4%がIL-9のコドン117においてMet / Metホモ接合であると予想される。

20

全体的に、血清中総IgEは、[ Met / Met ] ホモ接合体では平均で44.5 I.U.で、これは野生型の [ Thr / Thr ] ホモ接合体の値 [ 351.7 I.U. ] または [ Met / Thr ] ヘテロ接合体の値 [ 320.9 I.U. ] とは有意に異なっていた。図5参照。ホモ接合の保護された人 [ Met / Met ] は、1人の人で皮膚試験陽性が1回あったことを例外として、アトピー性アレルギーの証拠を証明できなかった。これらのデータは、この新規DNA多型性がホモ接合状態で遺伝されれば、血清中総IgEがより低くなることを含め、アトピー性アレルギーからの保護に関連することを示している。

30

図6は、IL-9単純配列リピート多型性のPCR増幅を図示している。報告された配列 [ GenBank寄託番号M30136 ] と比較した3,365位でのヌクレオチド多型性によって生じた制限断片長に関して、このマーカーをこれらの個人の遺伝子型と比較する。2つの家族を示す。レーン1および2の人は、レーン3 ( Met / Thr ) およびレーン4 ( Met / Met ) の人の両親 ( Thr / Met ) である；レーン5 ( Thr / Thr ) および6 ( Met / Met ) は、レーン7 ( Met / Thr ) および8 ( Met / Thr ) の子供の両親である。IL-9単純配列リピート多型性（各図における最低のバンドは、長さが248ヌクレオチドである）に関する最少の対立遺伝子は、これらの人および世界中で試験した集団からの全員において、Met117対立遺伝子による完全な連鎖不均衡の中にある。これは、イタリア人および調べた全ての無作為に確認した多様な民族的個人においても当てはまり、したがって、このマーカーはMet117対立遺伝子の存在の検出に診断的に用いてもよい。これらのデータは、この変種が世界中の集団に広く分布しており、これらの集団の多くが分離される前にこの変種が生じている、という仮説ともよく一致する。

40

## 実施例 3

### IL-9受容体発現およびリガンド結合アッセイ

精製組換えThrIL-9、MetIL-9、および構造または機能がMetIL-9に類似している可能性が

50

ある化合物を、ボルトンAE&ハンターWM (Bolton AE, and Hunter WM, Biochem J.133:529 ~ 539 (1973)) が記述したように、ボルトン・ハンター試薬を用いて放射標識する。この材料を2,300cpm / fmol以上の高比活性に標識する。ヒトK562およびM07e細胞は、10% (v/v) ウシ胎児血清、50mM 2-メルカプトエタノール、0.55mM L-アルギニン、0.24mM L-アスパラギン、および1.25mM L-グルタミンを加えたダルベッコ改変イーグル培地0.8ml中で、30 で増殖および再懸濁する。K562またはM07e細胞はそのまま、または下記のようにIL-9受容体遺伝子にトランスフェクトさせた後に使用する。完全な長さのIL-9受容体を含むプラスミドDNAを、pRC / RSVプラスミド (In Vitrogen、サンジエゴ) にクローニングし、塩化セシウムを用いた遠心によって精製した。電気穿孔の直前に、プラスミドDNA (50  $\mu$ g) を0.4cmのキュベット中の細胞に加える。2重電気パルス (750V / 74 / 40マイクロファラデーおよび100V / 74 / 2100マイクロファラデー) の後、細胞をIL-9を加えた新鮮な培地で直ちに希釈する。24時間後、細胞を洗浄し、リガンドなし、または様々な濃度の<sup>125</sup>I-リガンドと共に20 で3時間、G418 (2.5mg / ml、GIBCO) 中でインキュベートする。平行実験において大量の非標識リガンドを用いて、非特異的結合を推定する。次に、細胞を洗浄して濾過し、回収して計数した。特異的取り込みはスクッチャード解析によって計算する。特異的結合を評価するために、<sup>125</sup>I-標識Thr117 IL-9および様々な量の推定のコールドリガンドを用いて同様の競合的アッセイを行う。

アミノ酸44 ~ 270 (R & D Systems) を含む可溶性のIL-9受容体を、異なる型のヒト組換えIL-9と共にインキュベートした。量を変化させたFlag Met117およびFlag Thr117 (実施例7に記述) を、PBS中で可溶性受容体0.5  $\mu$ gと共に室温で30分インキュベートした。EBC緩衝液 (50mM トリスpH7.5 ; 0.1M NaCl ; 0.5% NP40) (300  $\mu$ l) を、抗FLAGモノクローナル抗体 (IBI) 1  $\mu$ gと共に加え、氷浴で1時間インキュベートした。プロテインAセファロース溶液40  $\mu$ lを各試料に加えて4 で1時間混合した。試料を11,000  $\times$  gで1分間遠心し、沈殿物をEBC 500  $\mu$ lで4回洗浄した。沈殿物を2倍濃度のSDS緩衝液26  $\mu$ lに溶解し、4分間沸騰させ、18% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ウェスタンブロットは、ブロットを抗IL-9受容体抗体でプローブしたことを除き、実施例15に記述のように実施した (R & D Systems) 。

図25は、IL-9組換え蛋白質の可溶性IL-9受容体への結合を示す。レーン1は分子量マーカー、レーン2は受容体とインキュベートしたIL-9 Flag Met117、レーン3は受容体とインキュベートしたIL-9 Flag Thr117である。これらのデータは、いずれの型のIL-9組換え蛋白質も可溶性受容体に結合することを示している。のみならず、これらのデータは実施例2 (ここでは、ヘテロ接合体の血清中IgEがThr117ホモ接合体と差がない) のデータと共に、IL-9 Met117型が弱いアゴニストを表すことと一致する。

#### 実施例 4

##### K562、C8166-45、およびM07e細胞におけるIL-9受容体発現およびリガンド機能解析

組換えThr117 IL-9、Met117 IL-9、および構造または機能側MetIL-9に類似している可能性がある化合物を、ダルベッコの改変イーグル培地中で用いるために精製して調製した。K562、C8166-45、またはM07e細胞はそのまま、または実施例3に記述のように、IL-9受容体遺伝子をトランスフェクトさせた後に用いた。増殖因子を除去して24時間後、細胞を精製Thr117 IL-9、Met117 IL-9、および構造または機能がMetIL-9に類似している可能性がある化合物の可変量の非存在下 (対照)、または存在下でインキュベートした。細胞増殖は酸フォスファターゼの測定によって評価した。簡潔に述べると、M07e細胞の各4本ずつの試料を平底マイクロタイタープレート (150または200  $\mu$ lのウェル) で、リガンドの存在下または非存在下で37 で72 ~ 96時間培養した。酸フォスファターゼは製造元 (Clontech、パロアルト、CA) の示唆通りに測定する。実験は全て少なくとも2回繰り返す。

#### 実施例 5

##### 細胞の単離と培養

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) は、製造元 (Pharmacia Biotech、AB Uppsala、スウェーデン) に従って、エンドトキシン試験済フィコールパックPLUSを用いた密度勾配遠心によって健常ドナーから単離した。PBMC (5  $\times$  10<sup>6</sup>)、マウス脾細胞 (5  $\times$  10<sup>6</sup>)、またはM07e細胞

10

20

30

40

50

5 × 10<sup>6</sup>個を、同系のヒト血清または熱不活化FBSのいずれかを終濃度10%となるように加えたRPMI-1640 (Bethesda Research Labs (BRL)、ベセスダ、MD) 7 mlで培養した。細胞を非刺激、またはPMA 5 μg/ml / PHA 5 μg/ml、またはPHA 5 μg/ml / rhIL-2 50 U (R & D Systems、ミネアポリス、MN)のいずれかで刺激して37 °Cで24時間培養した。

#### 実施例 6

##### RNA単離、RT-PCR、RT-PCR産物のクローニングおよびシーケンシング

RNA PCRコアキット (Perkin-Elmer Corp、フォスターシティ、CA) を用いて、発売元に従って、培養PBMC、マウス脾細胞、およびM07e細胞から総細胞RNAを24時間後に抽出した。各細胞源からのRNA 1 μgを65 °Cで5分間変性させ、次にMuMLV逆転写酵素50 U、1 U/μl RNアーゼ阻害剤、2.5mMオリゴd(T) 16プライマー、各1 mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、5 10  
0mM KCl、10mMトリス塩酸、pH7.0、25mM MgCl<sub>2</sub>を含む反応混合液 (RNA PCRコアキット、Perkin-Elmer Corp、フォスターシティ、CA) 20 μlを用いてcDNAに逆転写した。反応混合液をサーモサイクラーチューブにピペッティングし、PCRサーマルサイクラーに置き、1 サイクル (42 °Cで15分、99 °Cで5分、および4 °Cで5分) を行った。偽逆転写反応を陰性対照として用いた。

次に、2 mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、10mMトリス塩酸、pH7.0、DI水65.5 μl、2.5 U AmplitaqDNAポリメラーゼ、およびヒトcDNA IL-9エキソン 1 (フォワード) およびエキソン 5 (リバー 20  
ース) を表すオリゴヌクレオチド各 1 μl (20 μM) を含む第二のチューブに、この混合液を加えて全量を100 μlとした。反応混合液を以下のPCRの状態にした: 98 °Cで120秒、次に以下を30サイクル: 94 °Cで30秒; 55 °Cで40秒; 72 °Cで40秒。最後に72 °Cで15分間1 サイクル行って反応混合液を伸長させた。

hIL-9 cDNAを表すPCR産物を1.5%アガロースゲルでのゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイド染色を用いて可視化した。全ての実験において陰性対照増幅物として、RNAをH<sub>2</sub>Oに置換した偽逆転写酵素反応の産物を用いた。

cDNAを増幅するためにこれらの実験で用いたPCRオリゴヌクレオチドプライマー対は以下を含む: ヒトインターロイキン 9 (hIL-9) エキソン 1 フォワード 5'-TCT CGA GCA GGG GT G TCC AAC CTT GGC G-3' (配列番号: 1) およびエキソン 5 リバー 30  
ース 5'-GCA GCT GGG ATA AAT AAT ATT TCA TCT TCA T-3' (配列番号: 2); マウスインターロイキン 9 (mIL-9) エキソン 1 フォワード 5'-TCT CGA GCA GAG ATG CAG CAC CAC ATG GGG C-3' (配列番号: 3) およびマウスエキソン 5 リバー 30  
ース 5'-GCA GCT GGT AAC AGT TAT GGA GGG GAG GTT T-3' (配列番号: 4); XhoIおよびPvuII制限酵素認識配列は、ヒトおよびマウスIL-9プライマーの下線部である。PCR産物をTAクローニングベクター (In Vitrogen、サンジエゴ、CA) にサブクローニングした。マウスcDNAの増幅は438bp産物を生じ、ヒトcDNAの増幅は410 bp産物を生じた。

ヒトIL-9およびマウスmIL-9の相補的DNAを生成し、XhoIおよびPvuII制限エンドヌクレアーゼの消化部位を含むIL-9エキソン 1 および 5 特異的プライマーを用いたRT-PCRによって増幅した。hIL-9およびmIL-9の増幅産物は、シリカを用いて2.5%アガロースゲルから単離した (サムブルックJら (Sambrook, J.) (1989) 分子クローニング: 実験室マニュアル (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) (参照として全文が本明細書に組み入れられる)。回収後、cDNA産物をTAクロー 40  
ニングベクターにライゲーションし (In Vitrogen Corp.、サンジエゴ、CA)、次にこれを用いて、製造元の指示に従って、INV F'コンピテント細胞を形質転換させた。hIL-9およびmIL-9 cDNAインサートを含むプラスミドを、従来の方法によって単離した (サムブルックJら (Sambrook, J.) (1989) 分子クローニング: 実験室マニュアル (Molecular Cloning A Laboratory Manual) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。増幅後、各インサートを含む、およびこの周囲のDNA配列のPCRによる、またはクローニングによる誤差を分析した。

hIL-9およびmIL-9 cDNAインサートは、M13 (-20) フォワードプライマー (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') (配列番号: 17) およびシーケナーゼ (Sequenase) (登録商標) (US B) を用いて、ジデオキシチエンターミネーション法 (サンガーら (Sanger, 1977) Pro 50

c.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463) によってシークエンシングを行い、ゲル電気泳動によって分析した(サムブルックJら(Sambrook,J.)(1989)分子クローニング:実験マニュアル(Molecular Cloning A Laboratory Manual) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。クローニングおよび/またはTaqポリメラーゼによる配列誤差のないhIL-9およびmIL-9 cDNAインサート(図7および8の翻訳cDNA配列参照)を発現ベクターにサブクローニングした(図9~12参照)、またはこれを用いてミスセンス変異および欠失変異を作製した。

#### 実施例7

#### インビトロでのIL-9構築物のクローニングおよび発現

##### 構築物に関する一般クローニング法

hIL-9を原核生物発現ベクターにサブクローニングした。TA2AAF1 MetおよびトレオニンベクターをEcoRIによって消化し、0.420kB断片(hIL-9 cDNAの5'末端でXhoI部位を含む)をpBluescript(PBS)(Stratagene)のポリリンカーを含むEcoRI部位にクローニングした。次に、T3プロモーターに対するセンス方向でのクローンをXhoI(TAベクターのIL-9 cDNAインサートからの5'XhoI部位およびPBSポリリンカーからの3'XhoI部位を含む断片)で消化し、インサートを原核細胞発現ベクターpGEXおよびpFLAGのXhoI部位にサブクローニングした。

##### pGEX-4T-1グルタチオン-s-トランスフェラーゼ遺伝子融合ベクターにおけるIL-9構築物のクローニングおよび発現

IL-9蛋白質の発現、精製、および検出のために、定法によって4.9KbのpGEX-4T-1グルタチオン-s-トランスフェラーゼ遺伝子融合ベクターの多クローニングカセット内のXhoI部位に、IL-9 cDNAインサートをサブクローニングした。簡潔に述べると、無傷のIL-9 cDNA配列を含むTAクローン、およびpGEX-4T-1ベクターを、1倍濃度のリアクト2緩衝液(New England Biolabs、ピバリー、MA)の存在下で、XhoIおよびPvuII制限エンドヌクレアーゼを用いて37℃で1時間消化した(総量50μl)。エチジウムブロマイド10μg/mlを含む1.5%調製アガロースゲルで産物を電気泳動した。適当なサイズのDNAバンドを切除し、アガロースをNaIストック溶液3容量の中で45℃で10分間融解させた。シリカマトリクス(DI H<sub>2</sub>O(GeneClean II、ラホヤ、CA)溶液を、DNA5μg当たり5μlの割合で溶液に加えた。スラリーを4℃で30分間時折攪拌しながらインキュベートした。次にスラリーを微量遠心によって沈殿させ、低塩緩衝液で3回洗浄し、DI H<sub>2</sub>O 10μlに再懸濁してシリカからDNA

を溶出した。最後に微量遠心を行って、精製DNAを含む溶液10μl溶液を得た。産物をDI H<sub>2</sub>O 50μlに再懸濁し、エタノール2容量および3M酢酸ナトリウム1/10容量を加えて沈殿させた。試料をRTで14,000rpmで10分遠心し、陰圧下で風乾し、適当量のDI H<sub>2</sub>Oに再懸濁した。mIL-9およびhIL-9 cDNAインサートによるpGEX-4T-1ベクターへのDH5αバクテリア(GIBCO/BRL、ガイサーズバーグ、MD)のライゲーションおよび形質転換は、定法を用いて実施した。

pGEX-4T-1ベクターに含まれるhIL-9 cDNAインサートが正しいヌクレオチド配列であることを確認するために、前述のmIL-9およびhIL-9 cDNA特異的オリゴヌクレオチド(エキソン1フォワード、エキソン5リバースプライマー)を用いて、ジデオキシチエンターミネーション法によって候補IL-9 cDNAを含むプラスミドをシークエンシングした。

組換え融合蛋白質を大規模培養から得た形質転換した大腸菌(50ml)を一晩培養して、新鮮なLB/ampプロスに接種した。培養液を激しく振って37℃で4時間インキュベートし、次にイソプロピル β-D-チオガラクトピラノシドを加えて最終濃度を1mMとし、培養液をさらに1.5時間インキュベートした。細胞を4℃、500×gで遠心して回収し、グルタチオン-セファロース4Bカラム(Pharmacia)でのアフィニティークロマトグラフィーを利用して組換え変異体を精製し、GST-融合蛋白質を得た。変種のいくつかは封入体として発現され、マーストン(1987、クローバー(Clover)D.M.編、DNAクローニング:実践的アプローチ(DNA cloning:A practical approach)、IRL Press Pxfprd、59~88、大腸菌に発現させた真核細胞ポリペプチドの精製)が記述した方法によって、不溶性封入体から精製した。簡潔に述べると、細胞をライソザイムで溶解し、その後デオキシコール酸で処置した

10

20

30

40

50

。混入した核酸をDNアーゼI処置によって除去した。不溶性材料を2 M尿素で1回洗浄し、8 M尿素を含む溶解緩衝液(50mMトリス塩素、pH8.0、1 mM EDTA、100mM NaCl)中で最終的に可溶化した。溶解緩衝液中の尿素の濃度を減少させて(8 M尿素から開始して、6、4および2 M尿素)封入体の可溶化成分を段階的に透析し、変性蛋白質を再度折り畳ませた。最後に、試料を2 M尿素で透析し、2.5%  $\beta$ -メルカプトエタノール( $\beta$ -ME)に対して透析し、10,000gで15分遠心した。融合蛋白質を最後に0.01Mトリス塩素、pH8.0に対して透析した。pGEX-4Tベクターに発現した融合蛋白質をトロンピン100 Uで37 °Cで6時間開裂させ、グルタチオン-セファロース4Bカラム上のクロマトグラフィー後のフロースルー分画から回収した。最終精製は、充填して0.05M重炭酸アンモニウム緩衝液で平衡にしたセファデックスG-100カラム(100×1.5cm)でのクロマトグラフィーによって行った。

pFLAG-1(登録商標)発現ベクターにおけるIL-9構築物のクローニングおよび発現

ヒトIL-9蛋白質の発現、精製および検出のために、IL-9 cDNAインサートを5.37Kb Flagベクターの多クローニング部位(XhoI)のXho2部位にサブクローニングした。低分子量(1 kD)、疎水性、FLAGマーカーペプチドと、pFLAG-1(登録商標)発現ベクター(1)(IBIコダックから得た)によって発現された組換え蛋白質のN-末端との融合にFLAG技術を集中させた。各バクテリアコロニーは、50  $\mu$ g/mlアンピシリンを含むLBブロス中で、590nmでの光学密度が0.6に達するまで増殖させた。次に、IPTGを終濃度1 mMとなるように加え、培養液をさらに1時間インキュベートして蛋白質合成を誘導した。遠心によって細胞を回収して、細胞沈殿物をラムリ緩衝液(ラムリ(Laemmli)、1970)50  $\mu$ l中で10分沸騰させ、10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。抗-FLAG(登録商標)M1モノクローナル抗体を用いて、その発現、アフィニティー精製、およびFLAGマーカー除去を通じて、ウェスタン(図13参照)スロットまたはドットプロット上でのFLAG融合蛋白質の特異的および有効な検出を行った。FLAG融合蛋白質は、アガロースに共有結合させたマウス抗-FLAG(登録商標)IgG M1モノクローナル抗体によるアフィニティークロマトグラフィーによってマイルドな非変性状態で1段階で速やかに精製した。アフィニティー精製の後、アフィニティークラムからの除去後に融合蛋白質を用いてもよく、またはエンテロキナーゼによるFLAGペプチドの特異的および有効な蛋白質溶解除去によって、標準蛋白質を生物学的に活性な型で回収してもよい。最終精製は、充填し、0.05M重炭酸アンモニウム緩衝液で平衡にしたセファデックスG-100カラム(100×1.5cm)でのクロマトグラフィーによって得た。この実施例で先に述べたプロモーターはまた、FLAG技術で用いてもよい。

10

20

30

#### SDS-PAGEおよびイムノプロット分析

ミニゲルシステム(SE 280垂直ゲルユニット、ホーファー)において、ラムリ(Laemmli U.K.(1970)Nature 227,680~685)(参照として本明細書に全文が組み入れられる)の方法によって、12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを実施した。イムノプロット分析では、SDS-PAGEによって分離した蛋白質は、15%メタノールを含む25mMトリスグリシン緩衝液、pH8.3中で、TE 22Mマイティスモールトランスファーユニット(ホーファー)を用いてニトロセルロース膜にトランスファーした(トウビンら(Towbin H.)(1979)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.76, 4350~4354)。膜上の未結合の結合部位は、2%ウシ血清アルブミンを含む20mMトリス塩酸緩衝液、pH8.0で1時間インキュベートすることによってブロックした。次に膜を1:200希釈の抗体で4 °Cで一晩インキュベートした。膜を洗浄して、ペルオキシダーゼまたはアルカリフォスファターゼのいずれかを結合させた1:2000希釈のヤギ抗ウサギIgGで1時間処置した。洗浄後、超基質化学ルミネッセント試薬(Pierce)または4-クロロ-1-ナフトール色展開試薬を加えることによって、結合抗体を可視化した。膜を蒸留水に浸して反応を停止させた。図13は、精製ヒトFLAG IL-9融合組換え蛋白質(Met117およびThr117)が、抗-FLAG(登録商標)M1モノクローナル抗体によって認識されることから、それらが正しい大きさで、正しいリーディングフレームにあることを証明している。

40

#### 分析法

精製蛋白質の分子量は、パーセプティブ・バイオシステムズ・ボイジャー・バイオスペクトロメトリー・ワークステーション(Perceptive Biosystems Voyager Biospectrometry

50

workstation) を用いたマトリクス補助レーザー脱着マスペクトロメトリーによって確認した。アミノ酸分析は、真空密封ガラス球内で6N HCL中で110 で24時間の試料の加水分解後に実施した。

#### 自動エドマン分解

精製蛋白質の部分的アミノ酸配列は、オンラインモデル20A PTHアナライザーを備えたアプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) ・モデル455A気相シーケンサー上で、自動段階シーケンシングによって決定した。

#### 実施例 8

##### エキソン 2 および / またはエキソン 3 の欠失：構築物の変異発生およびシーケンシング

ヒトエキソン 2 およびエキソン 3 欠失は、製造元 (Stratagene、ラホヤ、CA) の示唆通りに、エクササイト (ExSite) PCR-に基づく部位特異的変異誘発キットを用いて作製した。PCRプライマーは以下の通りである：h9CD1Uフォワード5'-GTG ACC AGT TGT CTC TGT TTG-3' (配列番号：5)；h9CD1Lリバーズ5'-CTG CAT CTT GTT GAT GAG GAA-3' (配列番号：6)；h9CD2Uフォワード5'-GAC AAC TGC ACC AGA CCA TGC-3' (配列番号：7)；h9CD2Lリバーズ5'-ATT AGC ACT GCA GTG GCA CTT-3' (配列番号：8)。エキソン 2 欠失は、h9CD1Lフォワードおよびh9CD2Uリバーズのプライマー対を用いて作製する。エキソン 3 欠失は、h9CD2Uフォワードおよびh9CD2Lリバーズのプライマー対を用いて作製する。エキソン 2 およびエキソン 3 に含まれる欠失は、h9CD1Lフォワードおよびh9CD2Uリバーズのプライマー対を用いて作製する。

マウスエキソン 2 およびエキソン 3 欠失は、製造元 (Stratagene、ラホヤ、CA) の示唆通りに、エクササイトPCR-に基づく部位特異的変異誘発キットを用いて作製した。PCRプライマーは以下の通りであった：m9CD1Uフォワード5'-GTG ACC AGC TGC TTG TGT CTC-3' (配列番号：9)；m9CD1Lリバーズ5'-CTT CAG ATT TTC AAT AAG GTA-3' (配列番号：10)；m9CD2Uフォワード5'-GAT GAT TGT ACC ACA CCG TGC-3' (配列番号：11)；m9CD2Lリバーズ5'-GTT GCC GCT GCA GCT ACA TTT-3' (配列番号：12)。エキソン 2 欠失は、m9CD1Uフォワードおよびm9CD1Lリバーズのプライマー対を用いて作製した。エキソン 3 欠失は、m9CD2Uフォワードおよびm9CD2Lリバーズのプライマー対を用いて作製した。エキソン 2 およびエキソン 3 に含まれる欠失は、m9CD2Uフォワードおよびm9CD1Lリバーズのプライマー対を用いる。

hIL-9およびmIL-9 cDNAインサートの変異誘発構築物は、ジデオキシシチエンターミネーション法 (サンガーら (Sanger, 1977) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463) (本明細書に全文が参照として組み入れられる) によって、M13 (-20) フォワードプライマー (5'-GTA AAACGACGGCCAGT-3') (配列番号：18) およびシーケナーゼ (登録商標) (USB) を用いてシーケンシングを行い、ゲル電気泳動によって分析した (サムブルックJら (Sambrook, J.) (1989) 分子クローニング：実験マニュアル (Molecular Cloning A Laboratory Manual) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。エキソン 2、エキソン 3、またはエキソン 2 およびエキソン 3 の双方を欠損し、Taqポリメラーゼによる配列誤差のない変異株を用いて、発現ベクターを作成することが可能である。

#### 実施例 9

##### 細胞株、細胞増殖解析およびIL-9活性の阻害

細胞株を用いて、IL-9機能を遮断するその他の全ての化合物と共に、ペプチド、アミノステロール、チロフォスチン、rhIL-9、rmIL-9、およびこれらの蛋白質の組換え変異体の機能を評価した。増殖反応を測定し、これを、その他のサイトカイン、IL-9の変種または変異体、もしくはIL-9拮抗剤のそれぞれと比較した。さらに、ベースラインの増殖反応に化合物が拮抗する能力を調べた。一つのサイトカインについてベースライン増殖反応が確立すれば、3箇所づつ3回行ったアッセイにおいて統計学的に有意な反応の喪失があれば、それが拮抗の証拠と見なされた。真の拮抗反応は、直接観察、トリパンブルー染色 (当技術分野の一般技術の一つで周知の技法)、および酸フォスファターゼ活性の喪失により、細胞毒性とは識別された。拮抗剤の特異性は、スチール因子、インターロイキン 3、またはインターロイキン 4 のようなその他の増殖因子に対する活性が実質的に発現されている

か否かを評価することによって評価した。

M07e株はヒト巨核球細胞株であり、RPMI-1640 (GIBCO/BRL、ガイザースバーグ、MD)、20%ウシ胎児血清 (Hyclone) および10ng/ml IL-3 (R&D Systems、ミネアポリス、MN) で培養する。MJ株は、RPMI 1640 (GIBCO/BRL) 中で増殖するサイトカイン非依存的ヒトリンパ芽球細胞株であるK562は、ヒト赤血球白血病細胞株で、RPMI 1640 (GIBCO/BRL) および10%ウシ胎児血清 (Hyclone) で培養する。C8166-45はIL-9受容体保有細胞株で、RPMI 1640 (GIBCO/BRL) および10%ウシ胎児血清 (Hyclone) で培養する。細胞株は全て、IL-9を含むサイトカインに反応する。細胞株は72時間毎に  $2 \times 10^5$  細胞/mlになるよう再播種する。

細胞を2000rpmで10分遠心し、0.5%ウシ血清アルブミン (GIBCO/BRL、ガイザースバーグ、MD) およびインスリン-トランスフェリン-セレニウム (ITS) 共因子 (GIBCO/BRL、ガイザースバーグ、MD) を含むRPMI 1640に再懸濁した。血球計算盤を用いて細胞を計数し、 $1 \times 10^5$  細胞/mlの濃度に希釈して96ウェルマイクロタイタープレートに播種した。各ウェルは0.15または0.2mlを含み、細胞の最終濃度は  $2 \times 10^4$  細胞/mlであった。

M07e細胞は、50ng/ml幹細胞因子 (SCF) (R&D Systems、ミネアポリスMN) 単独、50ng/ml SCF + 50ng/ml IL-3 (R&D Systems、ミネアポリス、MN)、または50ng/ml SCF + 50ng/ml IL-9によって刺激した。細胞と基本培地のみが含まれる対照を含めた。試験化合物 (すなわち、IL-9組換え蛋白質、ペプチド、小分子) を連続希釈して、各試験条件に3箇所づつ加えた。MJ細胞株を非特異的細胞障害性の独立対照として用いた。37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養細胞を72~96時間インキュベートした。

細胞増殖は、細胞数の指標として細胞内に存在する酸フォスファターゼを定量するアバカス細胞増殖キット (Clontech、パロアルト、CA) を用いて解析した。基質のリン酸p-ニトロフェニル (pNPP) は、酸フォスファターゼによってp-ニトロフェノールに変換され、これを酵素濃度の指標として測定した。次に、pNPPを各ウェルに加え、37°Cで1時間インキュベートした。次に、1N水酸化ナトリウムを加えて酵素反応を停止させ、p-ニトロフェノールの量を、ダイナテック2000プレートリーダー (Dynatech Laboratories、シャンティリー、VA) を用いて波長410nmで定量した。細胞数を吸光度と比較する標準曲線を用いて、アッセイの直線範囲を決定した。吸光度測定値がアッセイの直線範囲内にある場合に限り、アッセイ結果を使用した。

図14は、IL-9機能の3つのペプチド拮抗剤のアミノ酸配列を図示する。各ペプチドをM07e細胞と共にインキュベートし、IL-9による細胞増殖の阻害を、対照条件 (ペプチドなし) との比較によって決定した (図15~17参照)。いずれのペプチドにも細胞障害性の証拠を認めなかった。ペプチドKP-16およびKP-20は、2つの抗平行ヘリックスの中に存在すると予測され、IL-9リガンドの極めて重要なIL-9受容対結合ドメインとなる。コドン117での蛋白質多型性は、これも拮抗剤的特性を示すKP-23およびKP-24に存在し、遺伝子変化部位周辺のこの領域の重要性をさらに示している。

図18は、インビトロでM07e細胞のIL-9依存的増殖に及ぼすチロフォスチン (カルピオケムから入手) の効果を図示する。各チロフォスチンをM07e細胞と共にインキュベートし、IL-9による細胞増殖の阻害は、対照条件 (処置なし) との比較によって決定した。チロフォスチンB46およびB56は最大の阻害を示し、このことは共通の構造活性相関を示唆している。

図19は、本明細書に参照として組み入れられるU.S.S.N. 08/290,826、08/416,883、08/478,763、および/または08/483,059に述べるように、サメ肝臓から単離したアミノステロールのインビトロでのM07e細胞のIL-9依存型増殖に及ぼす効果を図示する。各アミノステロールを培地20μg/mlでM07e細胞と共にインキュベートし、IL-9による細胞増殖の阻害は、対照条件 (処置なし) との比較によって決定した。いずれの処置でも細胞障害性の証拠を認めなかった。アミノステロール3および6は、一貫して最大の増殖阻害を示した。

実施例10

IgE分泌細胞の増殖アッセイ

10

20

30

40

50

B細胞株を用いて、その他のIL-9拮抗剤と共に、rIL-9およびこれらの蛋白質の組換え変異型の機能を評価することが可能である。IgE分泌細胞のrIL-9に対する増殖を測定し、これを他のサイトカインまたはrIL-9の組換え型と比較する。さらに、rIL-9に対するIgE分泌細胞のベースライン増殖反応に化合物が拮抗する能力を調べる。あるサイトカインについてベースラインIgE反応を確立した後、3箇所ずつで3回繰り返したアッセイにおいて、反応が統計学的有意に ( $P < 0.05$ ) 喪失すれば、拮抗の証拠と見なされる。真の拮抗剤反応は、トリパンブルー染色 (当技術分野で一般技術の一つとして周知の技法) により細胞毒性とは識別される。

#### 細胞増殖および培養

末梢血リンパ球 (PBL) をは、健常ドナーのヘパリン加血から、またはマウス脾臓を細かくつぶして単離する。単核細胞は、フィコール/ハイパック (Pharmacia、アップラサ、スウェーデン) を用いて遠心分離する。半精製ヒトBリンパ球は、ノイラミニダーゼ (Behring、マルスブルグ、FRG) 処置ヒツジ赤血球によるロゼット形成および37 で1時間のプラスチック接着性により得る。B細胞はまた、製造元の推奨に従って磁性ビーズ (DYNAL) をコーティングした抗CD20による常磁性分離を用いて精製する。

B細胞、T細胞および単球の相対比はそれぞれ、CD23、CD3およびCD14特異的モノクローナル抗体 (Becton Dickinson、マウンテン・ビュー、CA) を用いたフローサイトメトリーによって決定する。簡潔に述べると、 $10^6$  細胞/mlの細胞を、フィコエリスリン結合抗CD23およびフルオレジン結合抗CD3および抗CD14抗体の1:1000倍希釈と共に、4 で30分インキュベートする。滅菌PBSおよび1%ウシ血清アルブミン (Sigma) による3回のスピ

洗浄後、サイトフルオログラフ (FACST AR Plus、Becton Dickinson、グルノーブル、フランス) を用いて蛍光を測定する。典型的には、1試料当たり細胞5000個を計数して、CD20+細胞は45%、CD3+細胞35%およびCD14+細胞は10%である。細胞は、10%熱不活化仔ウシ胎児血清 (FCS)、2 mMグルタミン、100 U/mlペニシリン、100  $\mu$ g/mlストレプトマイシンおよび20mM HEPESを含むRPMI 1640 (RPMI-FCS) で、 $2 \times 10^6$  細胞/mlの密度で37、5%CO<sub>2</sub>/95%空気含有湿潤環境で培養する。IL-4、rhIL-9、rmIL-9、またはこれらの蛋白質の組換え変異体を濃度を増加させて単独、または併用して、培養細胞と共にインキュベートする。これらの組換え分子またはその他のIL-9拮抗剤を1つ以上混合して、競合実験を行う。培養細胞は9~13日毎に維持する。

#### IgE分泌B細胞の発生率

ヒトまたはマウスIL-9に反応したIgE分泌ヒトB細胞の発生率は、ELISA-スポットアッセイ (ダガスら (Dugas、1993)、Eur J Immunol 23:1687~1692; レンツ (Renz、H、1990)、J Immunology. 145:3461) を用いて決定する。ニトロセルロース平底96ウェルプレートを、0.1M NaHCO<sub>3</sub> 緩衝液で希釈した (2.5  $\mu$ g/ml) 精製ヤギ抗ヒトIgE mAbで4 で一晩コーティングする。PBS-ツィーン20で1回洗浄後、プレートをRPMI-FCSで1時間インキュベートして非特異的結合部位を飽和させる。培養9~13日後に得たB細胞を回収して、3回洗浄し、 $10^5$  細胞/ml RPMI-FCSに再懸濁し、次に抗IgEコーティングプレート上にトランスファーしてその後37 で18時間インキュベートする。洗浄後、様々な濃度のペルオキシダーゼ結合マウス抗ヒトIgE mabを37 で2時間加える。0.03%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む0.1Mトリス塩酸で希釈したジアミノベンゼンを加えてスポットを可視化する。24時間後、スポットを倒立顕微鏡の25倍率で計数する。データは $10^6$  個当たりのIgE分泌細胞数として表す。

#### 実施例11

##### IL-9と共に刺激した細胞によって分泌されるIgEのELISA

実施例10で記述のように、細胞を単離、調製および刺激する。平底マイクロタイタープレート (Nunc) を、ウサギ抗ヒトIgE (終濃度、1:2000倍希釈; セロテック、オックスフォード、GB) の10mM重炭酸緩衝溶液 (pH9.6) 200  $\mu$ lでコーティングする。4 で一晩インキュベートした後、プレートを0.05%ツィーンを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (PBS-ツィーン; Merck、ホーエンブルン、FRG) で4回洗浄し、RPMI-FCSで室温で1時間インキュベートして、非特異的蛋白質結合部位を飽和させる。洗浄後、ヒトIgE (Eurobio、レ・ユリス、フランス) の連続希釈、標準物質のPBS-ツィーン溶液をそれぞれのプレート

10

20

30

40

50

に加えて校正曲線を作製する。次に、試験すべき培養上清の希釈液を加え、室温で2時間後、プレートを洗浄して、希釈した特異的アルカリフォスファターゼ結合抗IgE (1:250; Serotec)、抗IgGまたは抗IgM (Behring) を適当なプレートに加える。室温で2時間後、プレートを洗浄してリン酸p-ニトロフェニル (Sigma) のクエン酸溶液200  $\mu$ l (0.5mg/ml) を加える。プレートを37  $^{\circ}$ Cでインキュベートして、オートリーダー (Dynatech Laboratories Inc、シャンティリー、VA) を用いて405nmでの吸光度 (A) を測定する。アッセイの閾値感度は、IgEについて100pg/ml、IgGについて1 ng/ml、およびIgMについて2 ng/mlで、試料2本間の変動は、普通10%を超えない。

#### 実施例12

#### マウス喘息モデルにおけるIL-9の役割：非感作動物の気道反応

10

##### 動物

5 ~ 6週令の認定非ウイルス感染雄性マウスを、ジャクソン・ラボラトリー (Jackson Laboratory) (バーハーバー、ME) から得た。実験手技の3 ~ 7日前に、ウイルスおよび抗原不含施設の高性能微粒子濾過空気 (HEPA) ラミナーフードに動物を収容し、固形齧歯類飼料および水を自由に摂取させた。動物施設は22  $^{\circ}$ Cに維持し、照明サイクルは自動的に調節した (照明：消灯、10:14時間)。5 ~ 6週令の雄性および雌性DBA/2 (D2)、C57BL/6 (B6) および (B6D2) F1 (F1) マウスをジャクソン・ラボラトリー (バーハーバー、ME)、または国立癌研究所、フレデリック博士から購入した。BXDマウスはジャクソン・ラボラトリー (バーハーバー、ME) から購入した。飼料および水は自由に摂取させた。

20

##### 表現型タイピングおよび全処置の効率

気管支収縮反応を測定するために、気管での呼吸気圧を測定し、薬物投与前および投与中に記録した。マウスは、先に記述したように麻酔して、機器を備えた。(レビット&ミツナー (Levitt RC and Mitzner W.) FASEB J 2:2605 ~ 2608 (1988); レビット&ミツナー (Levitt RC and Mitzner W.) J Appl Physiol 67(3):1125 ~ 1132; クリーバーガー、バセット、ヤカブ、およびレビット (Kleeberger S, Basett D, Jakab GJ, and Levitt RC) 258(2):L313 ~ 320 (1990); レビットRC; Pharmacogenetics 1:94 ~ 97 (1991); レビット&エワート (Levitt RC and Ewart SL); Am J Respir Crit Care Med 151:1537 ~ 1542 (1995); エワート、レビット、およびミツナー (Ewart S, Levitt RC, and Mitzner W) 印刷中、J Appl Phys (1995)。以下の一つ以上に対する気道反応性を測定した：5-ヒドロキシトリプタミン (5HT) (Sigma)。他に用いることが可能なブランチコンストラクションは、アセチルコリン (Sigma)、アトラキリウム (Glaxo welcome) である。気管支収縮剤チャレンジ後の $P_{pi}$ 変化の単純な繰り返し測定を用いたが、これは気道圧時間指数 (APTI) と呼ばれている (レビット&ミツナー (Levitt RC and Mitzner W.) FASEB J 2:2605 ~ 2608 (1988); レビット&ミツナー (Levitt RC and Mitzner W.) J Appl Physiol 67(3):1125 ~ 1132 (1989))。APTIは、注射時から最大圧がベースラインまたは平衡に達するまでの時間で積分した最大吸気圧 ( $P_{pi}$ ) の変化によって評価した。APTIは気道抵抗 ( $R_{rs}$ ) と同等であるが、APTIには気管支収縮からの回復に関連する別の成分が含まれている。

30

気管支反応性の系統分布は、これまでの研究において多数の近交系マウス系統で確認された (レビット&ミツナー (Levitt RC and Mitzner W.) FASEB J 2:2605 ~ 2608 (1988); レビット&ミツナー (Levitt RC and Mitzner W.) J Appl Physiol 67(3):1125 ~ 1132 (1989))。  $R_{rs}$  および / または APTI は、A/J、C3H/HeJ、DBA/2J、C57BL/6J マウスにおいて決定した。

40

屠殺前に、血清中IgE測定のために、完全に麻酔した動物の下大静脈の針穿刺により全血を採取した。試料を遠心して細胞を分離して血清を採取し、これを用いて総IgE濃度を測定した。直ちに測定しない試料は-20  $^{\circ}$ Cで凍結した。

気管支肺胞洗浄および細胞分析は、他所に記載のように実施した (クリーバーガーら (Kleeberger, 1990))。

IgE血清試料は全てELISA抗体サンドイッチアッセイを用いて測定した。マイクロタイター

50

プレート (Corning #2585096、コーニング、NY) を、ラット抗マウスIgE抗体 (Southern Biotechnology #1130-01、パーミンガム、AL) を、アジ化ナトリウム (Sigma #S-7795、#S-6014、#S-8032、セントルイス、MO) を含む炭酸ナトリウム-重炭酸ナトリウムコーティング溶液に2.5 µg/mlの濃度で、50 µl/ウェルずつコーティングした。プレートをプラスチックラップで覆い、4 で16時間インキュベートした。プレートを、0.05% ツィーン20のリン酸緩衝生理食塩溶液 (BioFluids、#313、ロックビル、MD) の洗浄緩衝液で3回洗浄し、各洗浄について5分インキュベートした。非特異的結合部位のブロッキングは、5% ウシ血清アルブミン (Sigma #A-7888) のPBS溶液を200 µl/ウェル加えることにより行い、プラスチックラップで覆って37 で2時間インキュベートした。洗浄緩衝液で3回洗浄後、試験試料50 µlを2箇所ずつウェルに加えた。試験試料を5% BSAの洗浄緩衝溶液で1:10、1:50、および1:100倍希釈後、解析した。試験試料の他に、0.8ng/ml ~ 200ng/mlの一連のIgE標準物質 (PharMingen #03121D、サンジエゴ、CA) の5% BSA洗浄緩衝溶液を解析して標準曲線を得た。試料なしのブランク、または標準物質を用いてプレートリーダーをゼロにした (バックグラウンド)。試料および標準物質を加えた後、プレートをプラスチックラップで覆って室温で2時間インキュベートした。洗浄緩衝液で3回洗浄した後、第二抗体である250ng/mlのラット抗マウスIgEホースラディッシュペルオキシダーゼ結合物 (PharMingen #02137E) の5% BSA洗浄緩衝溶液を50 µl加えた。プレートをプラスチックラップで覆い、室温で2時間インキュベートした。洗浄緩衝液で3回洗浄後、基質である0.5mg/mlの0-フェニルアミンジアミン (Sigma #P-1526) の0.1Mクエン酸緩衝溶液 (Sigma #C-8532) 100 µlを各ウェルに加えた。5 ~ 10分後、12.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (VWR #3370-4、ブリッジポート、NJ) 50 µlで反応を停止させ、ダイナテックMR-5000プレートリーダー (シャンティリー、VA) で490nmでの吸光度を測定した。標準曲線は、X軸 (対数スケール) に抗原濃度およびY軸 (一次スケール) に吸光度をとって、標準物質IgE濃度から作製した。試料中のIgE濃度は標準曲線から内挿した。

10

20

#### 実施例13

##### マウス喘息モデルにおけるIL-9の役割：感作動物の気道反応

##### 動物、表現型タイピングおよび抗原感作の最適化

動物および手技は、基本的に実施例12に記述したとおりであった。七面鳥卵アルブミン (OVA) による感作およびエアロゾルチャレンジを行って、BHR、BAL、および血清中IgEに及ぼす効果を評価した。OVAまたは生理食塩水エアロゾル吸入前の0日目に、OVA (25 µg) を腹腔内注射した。マウスにOVAまたは生理食塩水エアロゾルをチャレンジし、これは13または14日のいずれかに始めて、5 ~ 7日間1日1回投与した。血清中IgE、BAL、およびBHRの表現型測定は21日目に実施した。7日のOVAエアロゾル暴露が5-HTまたはアセチルコリンによる気管支収縮剤チャレンジに及ぼす効果は、血清中総IgE、BAL総細胞数および白血球分別細胞数、および気管支反応性と共に評価した。抗体 (Ab) または生理食塩水前処置が生理食塩水エアロゾルまたはOVAエアロゾル誘発肺炎症に及ぼす効果は、BHR、BAL、および血清中IgEの測定によって調べた。Abは、生理食塩水またはOVAのエアロゾル暴露の2 ~ 3日前に腹腔内投与した。

30

深い麻酔の間に肺を除去した後、肺組織学検査を実施した。先の機器の備え付けは人為的誤差を生じる可能性があるため、これらの試験には別の動物を用いた。このように、小グループの動物を、これらの動物は気管支反応性試験を除くその他の試験に用いなかったことを除き、様々な前処置を行うコホートと正確に同じように平行して処置した。気管支反応性試験の後、肺を除去して液体窒素中に沈めた。凍結切片作製と組織学的検査は、一般的方法で実施した。

40

マウスIL-9に対するポリクローナル中和抗体は、R&Dシステムズ、ミネアポリス、MNから購入し、マウスIL-9受容体に対するブロッキング抗体は、マガイニンで産生されたペプチド結合体を用いて、ランピン・バイオロジカル・ラボラトリーズ (オッツビル、PA) がマガイニン・ファーマシューティカルズ・インクのために産生した。ウサギにおいて、マウスIL-9受容体からのペプチド配列に対するポリクローナル抗血清を調製した。抗血清を産生するために用いたペプチドは：GGQKAGAFTC (残基1 ~ 10) (配列番号：19) ; LSNSIYRI

50

DCHWSAPELGQESR (残基11~32) (配列番号:20); およびCESYEDKTEGEYYKSHWSEWS (担体蛋白質にペプチドを結合させるため、N-末端にCys残基を加えた残基184~203) (配列番号:21)。抗血清は、免疫学のプロトコール (Protocols in Immunology)、第9章、ウィリーが記述した方法を用いて産生した。簡潔に述べると、ペプチドは、双機能的クロスリンク剤MBS (ピラス) を用いて、システイン残基の側鎖を通じて、担体蛋白質、ケイホル・リンペット、ヘモシアニン (Sigma) に結合させた。ペプチド結合体を用いて適当なアジュバントと共にウサギを免疫し、ペプチド結合体の数回ブースター注射後に有用な抗血清を得た。抗体を治療的に用いて、IL-9機能をダウンレギュレートし、非感作マウスにおけるベースライン肺反応性、血清中IgE、およびBALに対するこの経路の重要性を評価した。Ab前処置後、対照と比較したベースラインBHR、BAL、および血清中IgE濃度を決定した。別の実験において、組換え型ヒトおよびマウスのIL-9を抗原感作の1日前および感作の間中毎日腹腔内注射した (13~18日目)。次に、動物を記述のように表現型タイプングした。

10

0日目に生理食塩水の腹腔内注射で処置し、14~20日目に生理食塩水でチャレンジした (実施例12に記述のように) 代表的な動物の表現型反応を、図20のパネル1 (上段) に示す。ベースライン (対照) 血清中総IgEは9.2ng/mlであった。気管支肺胞洗浄 (BAL) 総細胞数は、BAL 1ml当たり182,500個であった。これらの動物は、歴史的対照 (レビット & ミツナー (Levitt RC and Mitzner W.) J Appl Physiol 67(3):1125~1132; 1989) と比較して、気管支反応過敏性を示さなかった。

図20パネル2 (上段中央) は、0日目にOVAを腹腔内注射して前感作し、14~20日目に生理食塩水をチャレンジした群の代表的な動物を示す。これらの動物の気管支収縮剤、血清中IgE、またはBAL細胞数に対する反応は、非感作マウスと差がなかった (図7上段パネル)。

20

図20パネル3 (下段中央) は、0日目にOVAを腹腔内注射して前感作し、14~20日目に抗原 (OVA) をチャレンジした群の代表的な動物を示す。これらの動物は、気管支反応過敏性 (対照の約2~3倍)、血清中IgEの上昇 (対照のほぼ1000倍)、およびBAL細胞数の上昇によって示されるように気道中の炎症細胞数の増加 (約30倍) を示した。この抗原チャレンジの結果気道に集められた細胞のほとんどが好酸球であった。

図20パネル4 (下段) は、0日目にOVAを腹腔内注射して前感作し、マウスIL-9に対するポリクローナル中和抗体 (約200µg/0.5ml PBS/マウスを腹腔内注射) で前処置し、14~20日目に抗原 (OVA) をチャレンジした群の代表的な動物を示す。これらの動物は抗原に対する反応を示さなかった。彼らの気管支反応性、血清中IgE、BAL細胞数は、対照と有意差がなかった (図20上段の2パネル)。

30

図21は、代表的な動物における、マウスIL-9に対するポリクローナル中和抗体を3日前に腹腔内注射して前処置した場合、およびしなかった場合のOVAに対する抗原チャレンジ (上記の通り) の効果を図示する。左の図 (A1-2-1B) は、対照動物 (OVAで感作したが、生理食塩水エアロゾルチャレンジにのみ暴露) の肺の組織学切片である。右の図 (A1-4-5) は、マウスIL-9に対するポリクローナル中和抗体で3日前に前処置し、OVAで感作し、OVAエアロゾルチャレンジに暴露した動物の肺からの組織学切片である。中和抗体による前処置により、抗原チャレンジから完全に保護された、という組織学的確認が得られた。

40

図22パネル1 (上段) は、0日目にOVA腹腔内注射によって前感作し、13~18日目に抗原 (OVA) をチャレンジした代表的な動物を示す。これらの動物は、気管支反応過敏性 (対照の約2~3倍) を示し、対照と比較してBAL細胞数の上昇によって示されるように、気道での好酸球を含む炎症細胞数の増加を示した (図20上段の2パネル)。この抗原チャレンジの結果気道に集まった細胞の多くは好酸球であった。

図22パネル2 (下段) は、0日目にOVAの腹腔内注射によって前感作し、マウスIL-9受容体に対するポリクローナル中和抗体 (約1mg/0.5ml PBS/マウスを腹腔内注射) で前処置し、13~18日目に抗原 (OVA) をチャレンジした群の代表的な動物を示す。この代表的な動物は抗原に対する反応を示さなかった。この反応は、対照群の気管支反応性、BAL細胞数と有意差がなかった (図20上段の2パネル)。これらのデータは、アトピー性アレルギー

50

ギーをIL-9受容体に対する抗体で治療する潜在的有効性を示している。

#### 実施例14

##### マウス脾臓の単離および培養

マウスを麻酔して脾臓を無菌的に除去した。はさみで脾臓を細かく刻み、ワイヤーメッシュ(滅菌済み)[#60ふるい]にゆっくりと通した。細胞をRPMI-1640[ジブコ、BRL、ロックビル、MD]40mlに再懸濁し、250×gで5分間2回遠心した。沈殿物を溶解バター10mlに再懸濁して、RBCsを除去した[4.15gm NH<sub>4</sub>Cl、0.5gKH CO<sub>3</sub>; 0.19g EDTAをddH<sub>2</sub>Oで500mlにする]。細胞を、RPMI-FCS[RPMI-1640、10%AFBS、50μM BME 2mMグルタミン、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む]40mlで37℃で約5分インキュベートした。これらの細胞を再度250×gで5分間遠心し、コンカナバリンA[シグマ#C5275]5μg/mlの存在下、または非存在下でRPMI-FCS 20mlに再懸濁した。IL-9は、無処置脾細胞では48時間日目、およびDBA/2(D2)およびC57BL/6J(B6)マウスのコンカナバリンAで刺激後に評価した。IL-9はRT-PCR(実施例6で述べたように)で増幅し、サザントランスファー後IL-9特異的マウスプローブで調べた。サザンプロットは「標準的な」方法によって実施した。簡潔に述べると、RT-PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動した。ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、定規を置いて写真を撮影し、サザンプロットでDNAの分子量を決定した。次に、ゲルを0.5N NaOHに30分浸し、0.5Mトリス、pH7.0で30分中和した。DNAをキャピラリートランスファーによってゼタプローブ(Borad)ナイロン膜にトランスファーして、20倍濃度のSSC中で一晩放置した。翌日、膜を空気乾燥させ、80℃で15分焼いて6倍濃度のSSCおよび0.1%SDS中で42℃で1時間プレハイブリダイズした。キナーゼ末端標識p32オリゴヌクレオチドプローブ(5'-AATTACCTTATTGAAAATCTGAAG-3')を、ハイブリダイゼーション溶液+0.1mg/mlの剪断サケ精子DNAに加え、42℃で一晩インキュベートした。翌日、フィルターを3倍濃度のSSCおよび0.1%SDSで37℃で30分洗浄し、フィルターを1時間フィルムに暴露した。図26は、マウスの各系統の48時間後のIL-9の定常状態濃度を図示する。IL-9は非刺激D2(D2-)脾細胞に認められたが、B6(B6-)マウスにはIL-9は検出されなかった。D2(D2+)脾細胞ではコンカナバリンA刺激後にIL-9のわずかな増加を認めしたが、B6(B6+)マウスでは、コンカナバリンA処置にもかかわらず検出可能なIL-9を認めなかった。

10

20

#### 実施例15

##### PBMCにおけるヒトMet117 IL-9およびThr117 IL-9の発現

##### SDS-PAGEおよびイムノブロット分析

実施例13に述べたように、野生型(Thr117)またはMet117 IL-9遺伝子型のいずれかを阻害する蛋白質を健常ドナーのヒトPBMCから単離した後、ラムリ(Laemmli U.K. (1970) Nature 227,680~685)の方法によって、ミニゲルシステム(エクセルII垂直ゲルユニット、ノベックス)で18%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを実施した。イムノブロット分析では、SDS-PAGEによって分離した蛋白質をSDトランスブロットトランスファーユニット(Biorad)を用いて、15%メタノールを含む25mMトリスグリシン緩衝液、pH8.3中のニトロセルロース膜に移した(トウビンら(Towbin H.) (1979) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 76,4350~4354)。膜上の未結合結合部位は、20mMトリス塩酸緩衝液、pH8.0+5%ドライミルクを含む0.05%ツィーン20(TBST)で1時間から一晩インキュベートすることによってブロックした。次に膜をやぎ抗ヒトIL-9ポリクローナル抗体(R&Dシステムズ)の1:1000倍希釈と共に室温で1時間インキュベートした。膜をTBSTで洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼを結合させたマウス抗やぎTgGの1:10,000倍希釈で1時間処置した。TBSTで洗浄後、スーパーシグナル基質ケモルミネッセンスシステム(Pierce)を加えて、結合抗体を視覚化した。

30

40

図24は、IL-9遺伝子のゲノム分析によって遺伝子型が決定されているヒトにおけるマイトゲン刺激48時間後の培養PBMCからのヒトIL-9蛋白質の発現を示す。レーン1はMet117ホモ接合体、レーン2はMet117/Thr117ヘテロ接合体、レーン3はThr117ホモ接合体である。ほぼ予測されたサイズの単一の産物(14kD)が、マイトゲン刺激後に各個人のPBMCに認められた。これらのデータは、いずれの型のIL-9蛋白質も発現され、定常状態で安定である

50

ことを証明する。

本発明は、様々な特殊材料、技法および実施例を参照として本明細書に記述および図解してきたが、本発明は材料の特別な材料の組み合わせ、その目的に選択された技法に制限されるものではないと理解される。そのような詳細に関する多数の変化は、当業者によって認識されるように含むことが可能である。

## 参考文献

1. Gergen PJ, and Weiss KB: The increasing problem of asthma in the United States. *Am Rev Respir Dis* 146:823-824, 1992.
2. Goodman and Gilman's *The Pharmacologic Basis of Therapeutics*, Seventh Edition, MacMillan Publishing Company, N.Y. USA, 1985. 10
3. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, and Cline MG: Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *New Eng J Med* 320:271-277, 1989.
4. Clifford RD, Pugsley A, Radford M, and Holgate ST: Symptoms, atopy, and bronchial response to methacholine in parents with asthma and their children. *Arch Dis in Childhood* 62:66-73, 1987. 20
5. Gergen PJ: The association of allergen skin test reactivity and respiratory disease among whites in the U.S. population. *Arch Intern Med* 151:487-492, 1991.
6. Burrows B, Sears MR, Flannery EM, Herbison GP, and Holdaway MD: Relationship of bronchial responsiveness assessed by methacholine to serum IgE, lung function, symptoms, and diagnoses in 11-year-old New Zealand children. *J Allergy Clin Immunol* 90:376-385, 1992. 30
7. Johannson SGO, Bennich HH, and Berg T: The clinical significance of IgE. *Prog Clin Immunol* 1:1-25, 1972.
8. Sears MR, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, and Holdaway MD: Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *New Engl J Med* 325(15):1067-1071, 1991. 40
9. Halonen M, Stern D, Taussig LM, Wright A, Ray CG, and Martinez FD: The predictive relationship between serum IgE levels at birth and subsequent incidences

- of lower respiratory illnesses and eczema in infants. *Am Rev Respir Dis* 146:666-670, 1992.
10. Marsh DG, Meyers DA, and Bias WB: The epidemiology and genetics of atopic allergy. *New Eng J Med* 305:1551-1559, 1982.
  11. Hopp RJ, Bewtra AK, Biven R, Nair NM, Townley RG. Bronchial reactivity pattern in nonasthmatic parents of asthmatics. *Ann Allergy* 1988;61:184-186. 10
  12. Hopp RJ, Townley RG, Biven RE, Bewtra AK, Nair NM. The presence of airway reactivity before the development of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:2-8.
  13. Ackerman V, Marini M, Vittori E, et al. Detection of cytokines and their cell sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients: relationship to atopic status, symptoms, and level of airway hyperresponsiveness. *Chest* 1994;105:687-696. 20
  14. Hamid G, Azzawi M, Ying S, et al. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. *J Clin Invest* 1991;87:1541-1546.
  15. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, et al. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:434-57. 30
  16. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-304.
  17. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, et al. Prednisolone treatment in asthma is associated with modulation of bronchoalveolar lavage cell interleukin-4, interleukin-5, and interferon- $\gamma$  cytokine gene expression. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:401-406. 40
  18. Robinson DS, Ying S, Bentley A, et al. Relationship among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine

- responsiveness in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:397-403.
19. Sears M, Burrows B, Flannery EM, Herbison GP, Hewitt CJ, Holdaway MD. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N Engl J Med* 1991;325:1067-1071.
  20. Burrows B, Sears MR, Flannery EM, Herbison GP, Holdaway MD. Relationship of bronchial responsiveness assessed by methacholine to serum IgE, lung function, symptoms, and diagnoses in 11-year-old New Zealand children. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90:376-385. 10
  21. Clifford RD, Pugsley A, Radford M, Holgate ST. Symptoms, atopy, and bronchial response to methacholine in parents with asthma and their children. *Arch Dis Childhood* 1987;62:66-73. 20
  22. O'Connor GT, Sparrow D, and Weiss ST: The role of allergy and nonspecific BHR in the pathogenesis of COPD. *Am Rev Respir Dis* 140:225-252, 1989.
  23. Cogswell JJ, Halliday DF, and Alexander JR: Respiratory infections in the first year of life in children at the risk of developing atopy. *Brit Med J* 284:1011-1013, 1982.
  24. Boushey HA, Holtzman MJ, Sheller JR, and Nadel JA: BHR. *Am Rev Respir Dis* 121:389-413, 1980. 30
  25. Cookson WOCM, and Hopkin JM: Linkage between immunoglobulin E responses underlying asthma and rhinitis and chromosome 11q. *Lancet* 1292-1295, 1989.
  26. Moffatt MF, Sharp PA, Faux JA, Young RP, Cookson WOCM, and Hopkins JM; Factors confounding genetic linkage between atopy and chromosome 11q. *Clin Exp Allergy* 22:1046-1051, 1992. 40
  27. Amelung P, Panhuysen C, Postma DS, Levitt RC, Koeter GH, Francomano C, Bleeker ER, and Meyers DA: Atopy, asthma and bronchial hyperresponsiveness: Exclusion

- of linkage to markers on chromosome 11q and 6p. *Clin Exper Allergy* 22:1077-1084, 1992.
28. Rich SS, Roitman-Johnson B, Greenberg B, Roberts S, and Blumenthal MN: Genetic evidence of atopy in three large kindreds: no evidence of linkage to D11S97. *Clin Exp Allergy* 22:1070-1076, 1992.
29. Lympany P, Welsh K, MacCochrane G, Kemeny DM, and Lee TH: Genetic analysis using DNA polymorphism of the linkage between chromosome 11q13 and atopy and BHR to methacholine. *J Allergy Clin Immunol* 89:619-628, 1992a. 10
30. Lympany P, Welsh KI, Cochrane GM, Kemeny DM, and Lee TH: Genetic analysis of the linkage between chromosome 11q and atopy. *Clin Exp Allergy* 22:1085-1092, 1992b.
31. Hizawa N, Yamagushi E, Ohe M, Itoh A, Furuya K, Ohnuma N, and Kawakami Y: Lack of linkage between atopy and locus 11q13. *Clinical and Experimental Allergy* 22:1065-1069, 1992. 20
32. Sanford AJ, Shirakawa T, Moffatt MF, Daniels SE, Ra C, Faux JA, Young RP, Nakamura Y, Lathrop GM, Cookson WOCM, and Hopkin JM: Localization of atopy and  $\beta$  subunit of high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ R1) on chromosome 11q. *Lancet* 341:332-334, 1993. 30
33. Shirakawa T, Airong L, Dubowitz M, Dekker JW, Shaw AE, Faux JA, Ra C, Cookson WOCM, and Hopkin JM: Association between atopy and variants of the  $\beta$  subunit of the high-affinity immunoglobulin E receptor. *Nature Genetics* 7:125-130, 1994.
34. Marsh DG, Bias WB, and Ishizaka K: Genetic control of basal serum immunoglobulin E level and its effect on specific reaginic sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:3588-3592, 1974. 40
35. Gerrard JW, Rao DC, and Morton NE: A genetic study of IgE. *Am J Hum Genet* 30:46-58, 1978.

36. Meyers DA, Beaty TH, Freidhoff LR, and Marsh DG: Inheritance of serum IgE (basal levels) in man. *Am J Hum Genet* 41:51-62, 1987.
37. Meyers DA, Bias WB, and Marsh DG: A genetic study of total IgE levels in the Amish. *Hum Hered* 32:15-23, 1982.
38. Martinez FD, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ, Wright AL, and Taussig LM: Evidence for mendelian inheritance of serum IgE levels in Hispanic and Non-hispanic white families. *Am J Hum Genet* 55:555-565, 1994. 10
39. Blumenthal MN, Namboodiri KK, Mendell N, Gleich G, Elston RC, and Yunis E: Genetic transmission of serum IgE levels. *Am J Med Genet* 10:219-228, 1981.
40. The Genome Data Base. The Welch Library, The Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, Maryland, USA. 20
41. Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, et al. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994;264:1152-1156.
42. Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CIM, et al. Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* 1994;23:464-470. 30
43. Doull, I., Lawrence, S., Watson, M., Begishvili, T., Beasley, R., Lampe, F., Holgate, S.T., Morton, N.E. Allelic association of markers on chromosome 5q and 11q with atopy and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996;153:1280-1284.
44. Ott J. Analysis of human genetic linkage. Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press, 1991. 40
45. Renauld, J-C, Houssiau, F, Druez, C. Interleukin-9. *Int Rev Exp Pathology* 1993;34A: 99-109.

46. Renauld, J-C, Kermouni, A, Vink, A, Louahed, J, Van Snick, J. Interleukin-9 and its receptor: involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis. *J Leukoc Biol* 1995;57:353-360.
47. Hultner, L, Moeller, J, Schmitt, E, Jager, G, Reisbach, G, Ring, J, Dormer, P. Thiol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell growth-enhancing activity different from both IL-3 and IL-4. *J Immunol* 1989;142:3440-3446. 10
48. Dugas, B, Renauld, J-C, Pene, J, Bonnefoy, J, Peti-Frere, C, Braquet, P, Bousquet, J, Van Snick, J, Mencia-Huerta, JM. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced immunoglobulin [IgG, IgM and IgE] production by normal human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993;23:1687-1692. 20
49. Petit-Frere, C, Dugas, B, Braquet, P, Mencia-Huerta, JM. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced IgE and IgG1 release from murine B lymphocytes. *Immunology* 1993;79:146-151.
50. Behnke, JM, Wahid, FN, Grecis, RK, Else, KJ, Ben-Smith, AW, Goyal, PK. Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus* [*Nematospiroides dubius*]: downregulation of specific cytokine secretion [IL-9 and IL-10] correlates with poor mastocytosis and chronic survival of adult worms. *Parasite Immunol* 1993;15:415-421. 30
51. Gessner, A, Blum, H, Rollinghoff, M. Differential regulation of IL-9 expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. *Immunobiology* 1993;189:419-435. 40
52. Renauld J-C, Druetz C, Kermouni A, et al. Expression cloning of the murine and human interleukin 9

- receptor cDNAs. *Proc Natl Acad Sci* 89:5690-5694(1992).
53. Chang M-S, Engel G, Benedict C et al. Isolation and characterization of the Human interleukin-9 receptor gene. *Blood* 83:3199-3205(1994).
54. Renauld J-C, Goethals A, Houssiau F, et al. Human P40/IL-9. Expression in activated CD4+ T cells, Genomic Organization, and Comparison with the Mouse Gene. *J Immunol* 144:4235-4241(1990). 10
55. Kelleher K, Bean K, Clark SC, et al. Human interleukin-9: genomic sequence, chromosomal location, and sequences essential for its expression in human T-cell leukemia virus (HTLV-I-transformed human T cells. *Blood* 77:1436-1441(1991).
56. Houssiau FA, Schandene L, Stevens M, et al. A cascade of cytokines is responsible for IL-9 expression in human T cells. Involvement of IL-2, IL-4, and IL-10. *J of Immunol.* 154:2624-2630(1995). 20
57. Miyazawa K, Hendrie PC, Kim Y-J, et al. Recombinant human interleukin-9 induces protein tyrosine phosphorylation and synergizes with steel factor to stimulate proliferation of the human factor-dependent cell line, M07e. *Blood* 80:1685-1692(1992).
58. Yin T, Tsang M L-S, Yang Y-C. JAK1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4PS/insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 269:26614-26617(1994). 30
59. Renauld J-C, Druez C, Kermouni A, et al. Expression cloning of the murine and human interleukin 9 receptor cDNAs. *Proc Natl Acad Sci* 89:5690-5694(1992). 40
60. Chang M-S, Engel G, Benedict C et al. Isolation and characterization of the Human interleukin-9 receptor gene. *Blood* 83:3199-3205(1994).

61. Kreitman RJ, Puri RK, Leland P, et al. Site-specific conjugation to interleukin4 containing mutated cysteine residues produces interleukin 4-toxin conjugates with improved binding and activity. *Biochemistry* 33:11637-11644(1994)
62. Simoncsits A, Bristulf J, Tjornhammar ML, et al. Deletion mutants of human interleukin 1 beta significantly reduced agonist properties: search for the agonist/antagonist switch in ligands to the interleukin 1 receptors. *Cytokine* 6:206-214(1994). 10
63. Zav'yalov VP, Navolotskaya EV, Isaev IS, et al. Nonapeptide corresponding to the sequence 27-35 of the mature human IL-2 efficiently competes with rIL-2 for binding to thymocyte receptors. *Immunol Lett* 31:285-288(1992).
64. Chu JW, and Sharom FJ. Glycophorin A interacts with interleukin-2 and inhibits interleukin-2-dependent T-lymphocyte proliferation. *Cell Immunol* 145:223-239(1992). 20
65. Alexander AG, Barnes NC, Kay AB. Trial of cyclosporin in corticosteroid-dependent chronic severe asthma. *Lancet* 339:324-328(1992).
66. Morely J. Cyclosporin A in asthma therapy: a pharmacological rationale. *J Autoimmun* 5 Suppl A:265-269(1992). 30
67. Lander, E.S., Botstein, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185-199(1989).
68. Soller, M., Brody, T. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theor Appl Genet* 47:35-39(1976). 40
69. Kvaloy K, Galvagni F, and Brown WRA. The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region

- of the human sex chromosomes. *Hum Mol Genet* 3:771-778(1994).
70. Freije D, Helms C, Watson MS, et al. *Science* 258:1784-1787(1992).
71. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Human Genet* 1989;44:388-396.
72. Saiki KK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491. 10
73. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, and Stone EM: The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16:325-332, 1993. 20
74. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, and Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874-9, 1989.
75. Sarkar G, Yoon H-S, and Sommer SS: Dideoxy fingerprinting (ddF): A rapid and efficient screen for the presence of mutations. *Genomics* 13:441-443, 1992. 30
76. Cotton RG: Detection of single base changes in nucleic acids. *Biochemical Journal* 263(1):1-10, 1989.
77. Schwengel D, Nouri N, Meyers D, and Levitt RC: Linkage mapping of the human thromboxane A2 receptor (TBXA2R) to chromosome 19p13.3 using transcribed 3' untranslated DNA sequence polymorphisms. *Genomics* 18:212-215, 1993. 40
78. SAGE, Statistical Analysis for Genetic Epidemiology (1992). Release 2.1. Computer program package

- available from the Department of Biometry and Genetics, LSU Medical Center, New Orleans, LA.
79. Postma DS, Bleecker ER, Holroyd KJ, Amelung PJ, Panhuysen CIM, Xu J, Meyers DA, Levitt RC: Genetic Susceptibility to Asthma: Bronchial Hyperresponsiveness Coinherited with a Major Gene for Atopy. *N Engl J Med* 333:894-900 (1995).
  80. Xu J, Levitt RC, Panhuysen CIM, Postma DS, Taylor EW, Amelung PJ, Holroyd KJ, Bleecker ER, Meyers DA: Evidence for two-unlinked loci regulating serum total IgE levels. *Am J Hum Genet* 57:425-430 (1995). 10
  81. Meyers DA, Xu J, Holroyd KJ, Panhuysen CIM, Amelung PJ, Postma DS, Levitt RC, Bleecker ER. Two locus segregation and linkage analysis for total serum IgE levels. *Clin Exp Allergy* 25:113-115 (1995).
  82. Bleecker ER, Amelung PJ, Levitt RC, Postma DS, Meyers DA. Evidence for linkage of total serum IgE and bronchial hyperresponsiveness to chromosome 5q: a major regulatory locus important in asthma. *Clin Exp Allergy* 25:84-88 (1995). 20
  83. Panhuysen CIM, Levitt RC, Postma DS, et al., Evidence for a susceptibility locus for asthma mapping to chromosome 5q. *Journal of Investigative Medicine* 43:281A (1995). 30
  84. Levitt RC, Eleff SM, Zhang L-Y, Kleeberger SR, and Ewart SL. Linkage homology for bronchial hyperresponsiveness between DNA markers on human chromosome 5q31-q33 and mouse chromosome 13. *Clin Exp Allergy* 25:61-63 (1995).
  85. Yang et al., U.S. Patent No. 5,414,071 Human cytokine IL-9 (May 9, 1995).
  86. Alms W and White B. Human interleukin variants generated by alternative splicing PCT/US95/04094 (WO 95/27052). 40
  87. Cytokine handbook, Angus Thomson (1994).

88. Martinati LC, Trabetti E, Casartelli A, Boner AL, Pignatti PF. Affected sib-pair and mutation analyses of the high affinity IgE receptor beta chain locus in Italian families with atopic asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996;153:1682-1685.
89. Kauvar, M. Lawrence, Peptide mimetic drugs: A comment on progress and prospects, *Nature Biotechnology Volume 14, June 1996.*

10

本発明の上記のその他の態様は、明細書の検討および本明細書に開示の方法の実践から当業者には明らかとなるであろう。明細書および実施例は例示目的のみと見なされ、本発明の真の範囲は以下の請求の範囲に示されると意図している：

配列表

(1) 一般情報：

(i) 出願人：Magainin Pharmaceuticals Inc.

(ii) 発明の名称、喘息および関連疾患を含むアトピー性アレルギーを治療するための標的としての喘息関連因子

(iii) 配列数：22

(iv) 文書通信情報：

20

(A) 宛名：Finnegan, Henderson, Farabow, Garrett & Dunner, L.L.P.

(B) 街路名：1300 I Street, N.W.

(C) 市名：Washington

(D) 州名：D.C.

(E) 国名：USA

(F) 郵便番号：20005-3315

(v) コンピューター読み取りフォーム：

(A) メディア形式：Floppy disk

(B) コンピューター：IBM PC compatible

(C) 運転システム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：PatentIn Release #1.0, Version #1.30

30

(vi) 現出願データ：

(A) 出願番号：PCT/US96/12757

(B) 出願日：23-AUG-1996

(C) 分類：

(viii) 弁理士/代理人情報：

(A) 氏名：Fordis, Jean B.

(B) 登録番号：32,984

(C) 参照/明細書番号：5387.056-304

(ix) 電気通信情報：

40

(A) 電話：(202)408-4000

(B) ファックス：(202)408-4400

(2) 配列番号：1の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：28塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：1：

50

tctcgagcag ggggtgtccaa ccttggcg

28

( 2 ) 配列番号 : 2 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 3 1 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 2 :

gcagctggga taaataatat ttcaccttca t

10

31

( 2 ) 配列番号 : 3 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 3 1 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 3 :

tctcgagcag agatgcagca ccacatgggg c

20

31

( 2 ) 配列番号 : 4 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 3 1 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 4 :

gcagctggta acagttatgg aggggaggtt t

30

31

( 2 ) 配列番号 : 5 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 2 1 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 5 :

gtgaccagtt gtctctgttt g

40

21

( 2 ) 配列番号 : 6 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 2 1 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 6 :

50

ctgcatccttg ttgatgagga a

21

( 2 ) 配列番号 : 7 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 2 1 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 7 :

gacaactgca ccagaccatg c

10

21

( 2 ) 配列番号 : 8 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 2 1 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 8 :

attagcactg caotggcact t

21

20

( 2 ) 配列番号 : 9 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 2 1 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 9 :

gtgaccagct gcttgtgtct c

21

30

( 2 ) 配列番号 : 1 0 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 2 1 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 1 0 :

cttcagatit tcaataaggt a

21

40

( 2 ) 配列番号 : 1 1 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 2 1 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 1 1 :

gatgattgta ccacaccgtg c

21

- ( 2 ) 配列番号 : 1 2 の情報 :
  - ( i ) 配列の特性 :
  - ( A ) 配列の長さ : 2 1 塩基対
  - ( B ) 配列の型 : 核酸
  - ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
  - ( D ) トポロジー : 直鎖状
  - ( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)
  - ( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 1 2 :
- gttgccgctg cagctacatt t**

10

21

- ( 2 ) 配列番号 : 1 3 の情報 :
  - ( i ) 配列の特性 :
  - ( A ) 配列の長さ : 1 8 アミノ酸
  - ( B ) 配列の型 : アミノ酸
  - ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
  - ( D ) トポロジー : 直鎖状
  - ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
  - ( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 1 3 :
- Ser Asp Asn Ala Thr Arg Pro Ala Phe Ser Glu Arg Leu Ser Gln Met**  
**1 5 10 15**

20

**Thr Asn**

- ( 2 ) 配列番号 : 1 4 の情報 :
  - ( i ) 配列の特性 :
  - ( A ) 配列の長さ : 1 8 アミノ酸
  - ( B ) 配列の型 : アミノ酸
  - ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
  - ( D ) トポロジー : 直鎖状
  - ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
  - ( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 1 4 :
- Phe Ser Arg Val Lys Lys Ser Val Glu Val Leu Lys Asn Asn Lys Ala**  
**1 5 10 15**

30

**Pro Tyr**

- ( 2 ) 配列番号 : 1 5 の情報 :
  - ( i ) 配列の特性 :
  - ( A ) 配列の長さ : 1 8 アミノ酸
  - ( B ) 配列の型 : アミノ酸
  - ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
  - ( D ) トポロジー : 直鎖状
  - ( ii ) 配列の種類 : ペプチド
  - ( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 1 5 :
- Glu Gln Pro Ala Asn Gln Thr Thr Ala Gly Asn Ala Leu Thr Phe Leu**  
**1 5 10 15**

40

**Lys Ser**

50

( 2 ) 配列番号 : 1 6 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 1 8 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 1 6 :

Thr Ala Gly Asn Ala Leu Thr Phe Leu Lys Ser Leu Leu Glu Ile Phe  
1 5 10 15

10

### Gln Lys

( 2 ) 配列番号 : 1 7 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 1 7 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

20

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 1 7 :

gtaaaacgac ggccagt

17

( 2 ) 配列番号 : 1 8 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 1 7 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 1 8 :

30

gtaaaacgac ggccagt

17

( 2 ) 配列番号 : 1 9 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 1 0 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 1 9 :

Gly Gly Gln Lys Ala Gly Ala Phe Thr Cys  
1 5 10

40

( 2 ) 配列番号 : 2 0 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 2 2 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 2 0 :

Leu Ser Asn Ser Ile Tyr Arg Ile Asp Cys His Trp Ser Ala Pro Glu  
 1 5 10 15

Leu Gly Gln Glu Ser Arg  
 20

( 2 ) 配列番号 : 2 1 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 2 1 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 2 1 :

Cys Glu Ser Tyr Glu Asp Lys Thr Glu Gly Glu Tyr Tyr Lys Ser His  
 1 5 10 15

10

Trp Ser Glu Trp Ser  
 20

( 2 ) 配列番号 : 2 2 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 7 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 2 2 :

Thr Cys Leu Thr Asn Asn Ile  
 1 5

20

( 2 ) 配列番号 : 2 3 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 1 8 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 2 3 :

Cys Phe Ser Glu Arg Leu Ser Gln Met Thr Asn Thr Thr Met Gln Thr  
 1 5 10 15

30

Arg Tyr

40

( 2 ) 配列番号 : 2 4 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 4 1 5 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 2 4 :

tctcgagcag ggggtgtccaa ccttggcggg gatcctggac atcaacttcc tcatcaacaa 60  
 gatgcaggaa gatccagett ccaagtgcc aatgtgacct gttgtctctg 120  
 tttgggcatt ccctctgaca actgcaccag accatgcttc agtgagagac tgtctcagat 180  
 gaccaatacc accatgcaaa caagatacce actgattttc agtcgggtga aaaaatcagt 240  
 tgaagtacta aagaacaaca agtgtccata tttttcctgt gaacagccat gcaaccaaac 300  
 cacggcaggc aacgcgctga catttctgaa gagtcttctg gaaattttcc agaaagaaaa 360  
 gatgagaggg atgagaggca agatatgaag atgaaatatt atttatccca gctgc 415

(2) 配列番号：25の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：127アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列の記載：配列番号：25：

Gln Gly Cys Pro Thr Leu Ala Gly Ile Leu Asp Ile Asn Phe Leu Ile  
 1 5 10 15

Asn Lys Met Gln Glu Asp Pro Ala Ser Lys Cys His Cys Ser Ala Asn  
 20 25 30

Val Thr Ser Cys Leu Cys Leu Gly Ile Pro Ser Asp Asn Cys Thr Arg  
 35 40 45

Pro Cys Phe Ser Glu Arg Leu Ser Gln Met Thr Asn Thr Thr Met Gln  
 50 55 60

Thr Arg Tyr Pro Leu Ile Phe Ser Arg Val Lys Lys Ser Val Glu Val  
 65 70 75 80

Leu Lys Asn Asn Lys Cys Pro Tyr Phe Phe Ser Cys Glu Gln Pro Cys  
 85 90 95

Asn Gln Thr Thr Ala Gly Asn Ala Leu Thr Phe Leu Lys Ser Leu Leu  
 100 105 110

Glu Ile Phe Gln Lys Glu Lys Met Arg Gly Met Arg Gly Lys Ile  
 115 120 125

(2) 配列番号：26の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：415塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：26：

10

20

30

40

tctcgagcag ggggtgccaa ccttggcggg gatcctggac atcaacttcc tcatcaacaa 60  
 gatgcaggaa gatccagctt ccaagtgcc a ctgcagtgct aatgtgacca gttgtctctg 120  
 tttgggcatt ccctctgaca actgcaccag accatgcttc agtgagagac tgtctcagat 180  
 gaccaatacc accatgcaaa caagataccc actgattttc agtcgggtga aaaaatcagt 240  
 tgaagtacta aagaacaaca agtgtccata ttttctctgt gaacagccat gcaaccaaac 300  
 catggcaggc aacgcgctga catttctgaa gagtcttctg gaaattttcc agaaagaaaa 360  
 gatgagaggg atgagaggca agatatgaag atgaaatatt atttatccca gctgc 415

10

(2) 配列番号：27の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：126アミノ酸

(B) 配列の型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列の記載：配列番号：27：

Gln Gly Cys Pro Thr Leu Ala Gly Ile Leu Asp Ile Asn Phe Leu Ile  
 1 5 10 15

20

Asn Lys Met Gln Glu Asp Pro Ala Ser Lys Cys His Cys Ser Ala Asn  
 20 25 30

Val Thr Ser Cys Leu Cys Leu Gly Ile Pro Ser Asp Asn Cys Thr Arg  
 35 40 45

Pro Cys Phe Ser Glu Arg Leu Ser Gln Met Thr Asn Thr Thr Met Gln  
 50 55 60

Thr Arg Tyr Pro Leu Ile Phe Ser Arg Val Lys Lys Ser Val Glu Val  
 65 70 75 80

30

Leu Lys Asn Asn Lys Cys Pro Tyr Phe Ser Cys Glu Gln Pro Cys Asn  
 85 90 95

Gln Thr Met Ala Gly Asn Ala Leu Thr Phe Leu Lys Ser Leu Leu Glu  
 100 105 110

Ile Phe Gln Lys Glu Lys Met Arg Gly Met Arg Gly Lys Ile  
 115 120 125

40

(2) 配列番号：28の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：585塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：28：

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgtrgcgcaa	60
gctgactaca aggacgacga tgacaagctt gaattctcta gagatatcgt cgacagatct	120
ctcgagcagg ggtgtccaac cttggcgggg atcctggaca tcaacttcct catcaacaag	180
atgcaggaag atccagcttc caagtgccac tgcagtgcta atgtgaccag ttgtctctgt	240
ttgggcattc cctctgacaa ctgcaccaga ccatgcttca gtgagagact gtctcagatg	300
accaatacca ccatgcaaac aagataccca ctgattttca gtcgggtgaa aaaatcagtt	360
gaagtactaa agaacaacaa gtgtccatat ttttctctgt aacagccatg caaccaaacc	420
acggcaggca acgcgctgac atttctgaag agtcttctgg aaattttcca gaaagaaaag	480
atgagagggg tgagaggcaa gatatgaaga tgaaatatta tttatcccag ctgccaacgg	540
tagcgaaacc agccagtgcc actgcaatcg cgatagctgt ctttt	585

10

( 2 ) 配列番号 : 2 9 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 1 6 8 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

20

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 2 9 :

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
1 5 10 15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu Phe  
20 25 30

Ser Arg Asp Ile Val Asp Arg Ser Leu Glu Gln Gly Cys Pro Thr Leu  
35 40 45

Ala Gly Ile Leu Asp Ile Asn Phe Leu Ile Asn Lys Met Gln Glu Asp  
50 55 60

10

Pro Ala Ser Lys Cys His Cys Ser Ala Asn Val Thr Ser Cys Leu Cys  
65 70 75 80

Leu Gly Ile Pro Ser Asp Asn Cys Thr Arg Pro Cys Phe Ser Glu Arg  
85 90 95

Leu Ser Gln Met Thr Asn Thr Thr Met Gln Thr Arg Tyr Pro Leu Ile  
100 105 110

20

Phe Ser Arg Val Lys Lys Ser Val Glu Val Leu Lys Asn Asn Lys Cys  
115 120 125

Pro Tyr Phe Ser Cys Glu Gln Pro Cys Asn Gln Thr Thr Ala Gly Asn  
130 135 140

Ala Leu Thr Phe Leu Lys Ser Leu Leu Glu Ile Phe Gln Lys Glu Lys  
145 150 155 160

30

Met Arg Gly Met Arg Gly Lys Ile  
165

( 2 ) 配列番号 : 3 0 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 5 8 5 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

40

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 3 0 :

atgaaaaaga cagctatcgc gattgcagtg gcactggctg gtttcgctac cgttgcgcaa	60
gctgactaca aggacgacga tgacaagctt gaattctcta gagatatcgt cgacagatct	120
ctcgagcagg ggtgtccaac cttggcgggg atcctggaca tcaacttcct catcaacaag	180
atgcaggaag atccagcttc caagtgccac tgcagtgcta atgtgaccag ttgtctctgt	240
ttgggcattc cctctgacaa ctgcaccaga ccatgcttca gtgagagact gtctcagatg	300
accaatacca ccatgcaaac aagataccca ctgattttca gtcgggtgaa aaaatcagtt	360
gaagtactaa agaacaacaa gtgtccatat ttttctctgt aacagccatg caaccaaacc	420
atggcaggca acgcgctgac atttctgaag agtcttctgg aaattttcca gaaagaaaag	480
atgagagggg tgagaggcaa gatatgaaga tgaaatatta tttatcccag ctgccaacgg	540
tagcгааacc agccagtgcc actgcaatcg cgatagctgt ctttt	585

10

( 2 ) 配列番号 : 3 1 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 1 6 8 アミノ酸

( B ) 配列の型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

20

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 3 1 :

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala  
 1 5 10 15

Thr val Ala Gln Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Leu Glu Phe  
 20 25 30

Ser Arg Asp Ile Val Asp Arg Ser Leu Glu Gln Gly Cys Pro Thr Leu  
 35 40 45

Ala Gly Ile Leu Asp Ile Asn Phe Leu Ile Asn Lys Met Gln Glu Asp  
 50 55 60 10

Pro Ala Ser Lys Cys His Cys Ser Ala Asn Val Thr Ser Cys Leu Cys  
 65 70 75 80

Leu Gly Ile Pro Ser Asp Asn Cys Thr Arg Pro Cys Phe Ser Glu Arg  
 85 90 95

Leu Ser Gln Met Thr Asn Thr Thr Met Gln Thr Arg Tyr Pro Leu Ile  
 100 105 110 20

phe Ser Arg Val Lys Lys Ser val Glu val Leu Lys Asn Asn Lys Cys  
 115 120 125

Pro Tyr Phe Ser Cys Glu Gln Pro Cys Asn Gln Thr Met Ala Gly Asn  
 130 135 140

Ala Leu Thr Phe Leu Lys Ser Leu Leu Glu Ile Phe Gln Lys Glu Lys  
 145 150 155 160 30

Met Arg Gly Met Arg Gly Lys Ile  
 165

( 2 ) 配列番号 : 3 2 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 1 8 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

( xi ) 配列の記載 : 配列番号 : 3 2 :

gctccagtcc gctgtcaa

18

( 2 ) 配列番号 : 3 3 の情報 :

( i ) 配列の特性 :

( A ) 配列の長さ : 1 8 塩基対

( B ) 配列の型 : 核酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 配列の種類 : DNA(genomic)

10

20

30

40

50

(xi) 配列の記載：配列番号：33：  
ctccccctgc agcctacc

18

(2) 配列番号：34の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：20塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA(genomic)

10

(xi) 配列の記載：配列番号：34：  
cggggctgac taaaggttct

20

(2) 配列番号：35の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：20塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：35：  
gttcttaaag agcattcact

20

20

(2) 配列番号：36の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：24塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：36：  
atcttcacat ctggaatctt cact

24

30

(2) 配列番号：37の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：20塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：37：  
aatccaaggt caacattatg

20

(2) 配列番号：38の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 配列の長さ：21塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：DNA(genomic)

(xi) 配列の記載：配列番号：38：  
tttctttgaa taaatcctta c

21

(2) 配列番号：39の情報：

(i) 配列の特性：

50

- (A) 配列の長さ：21塩基対  
 (B) 配列の型：核酸  
 (C) 鎖の数：一本鎖  
 (D) トポロジー：直鎖状  
 (ii) 配列の種類：DNA(genomic)  
 (xi) 配列の記載：配列番号：39：  
**gaaatcacca acaggaacat a** 21
- (2) 配列番号：40の情報：  
 (i) 配列の特性：  
 (A) 配列の長さ：21塩基対 10  
 (B) 配列の型：核酸  
 (C) 鎖の数：一本鎖  
 (D) トポロジー：直鎖状  
 (ii) 配列の種類：DNA(genomic)  
 (xi) 配列の記載：配列番号：40：  
**atcaactttc atccccacag t** 21
- (2) 配列番号：41の情報：  
 (i) 配列の特性：  
 (A) 配列の長さ：24塩基対  
 (B) 配列の型：核酸 20  
 (C) 鎖の数：一本鎖  
 (D) トポロジー：直鎖状  
 (ii) 配列の種類：DNA(genomic)  
 (xi) 配列の記載：配列番号：41：  
**ggataaataa tatttcatct tcac** 24
- (2) 配列番号：42の情報：  
 (i) 配列の特性：  
 (A) 配列の長さ：21塩基対  
 (B) 配列の型：核酸  
 (C) 鎖の数：一本鎖 30  
 (D) トポロジー：直鎖状  
 (ii) 配列の種類：DNA(genomic)  
 (xi) 配列の記載：配列番号：42：  
**caaatctgaa gagcaacta t** 21
- (2) 配列番号：43の情報：  
 (i) 配列の特性：  
 (A) 配列の長さ：24塩基対  
 (B) 配列の型：核酸  
 (C) 鎖の数：一本鎖  
 (D) トポロジー：直鎖状 40  
 (ii) 配列の種類：DNA(genomic)  
 (xi) 配列の記載：配列番号：43：  
**ttaaaaaatt catttcagta ttct** 24
- (2) 配列番号：44の情報：  
 (i) 配列の特性：  
 (A) 配列の長さ：24塩基対  
 (B) 配列の型：核酸  
 (C) 鎖の数：一本鎖  
 (D) トポロジー：直鎖状  
 (ii) 配列の種類：DNA(genomic) 50

(xi) 配列の記載：配列番号：4 4 :  
aattacctta ttgaaaatct gaag

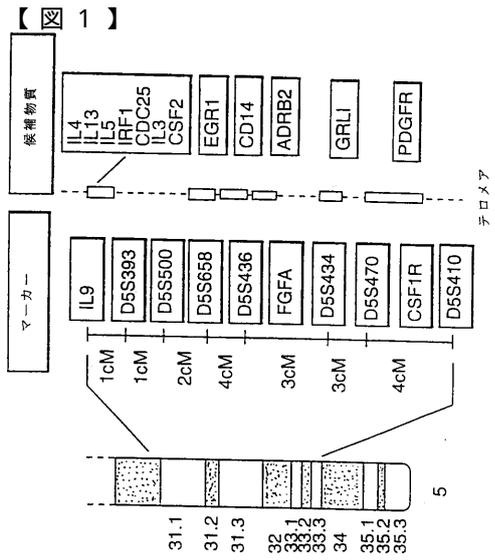


FIG. 1

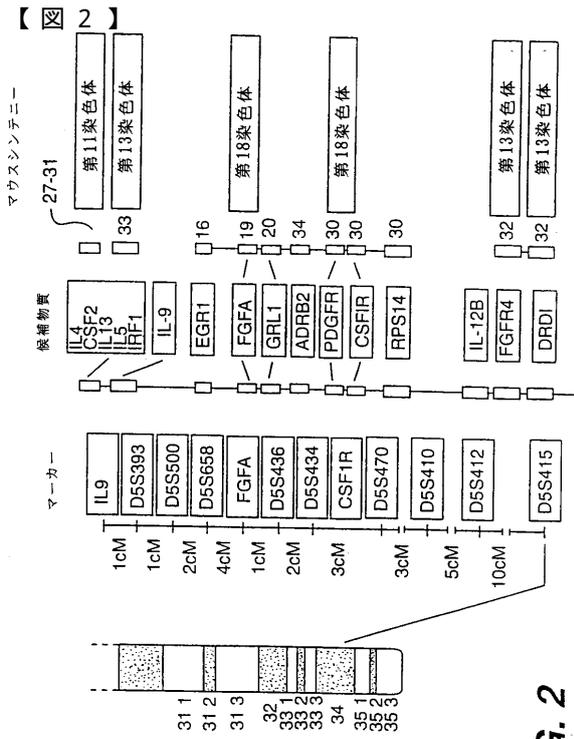


FIG. 2

KP-16 (配列番号13) SER ASP ASN ALA THR ARG PRO ALA PHE SER GLU ARG LEU SER GLN MET THR ASN

KP-20 (配列番号14) PHE SER ARG VAL LYS SER VAL GLU VAL LEU LYS ASN ASN LYS ALA PRO TYR

KP-23 (配列番号15) GLU GLN PRO ALA ASN GLN THR THR ALA GLY ASN ALA LEU THR PHE LEU LYS SER

FIG. 14

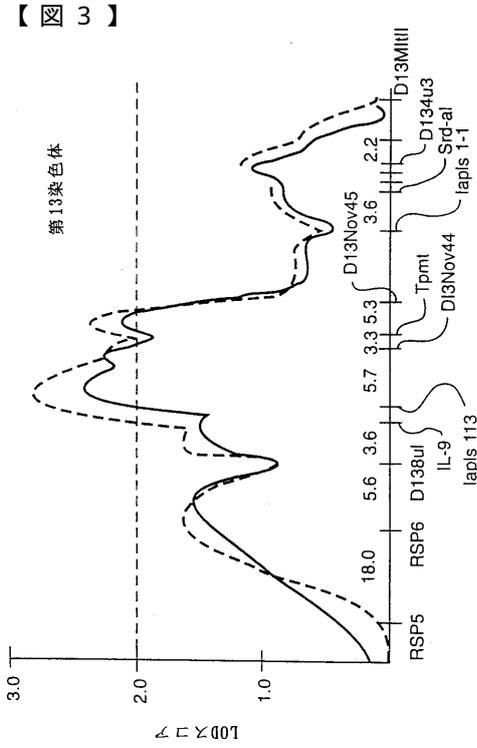


FIG. 3

ヒト 105 YFSCCEPCNQTTAGNALTFLLKSLLEIFQKEKMRGMRGKI

ヒト 105 YFSCCEPCNQTMAGNALTFLLKSLLEIFQKEKMRGMRGKI

マウス 105 SFSCCKPCNQTMAGNTLSFLKSLLLGTFQKTEMQRQKSRP

FIG. 4

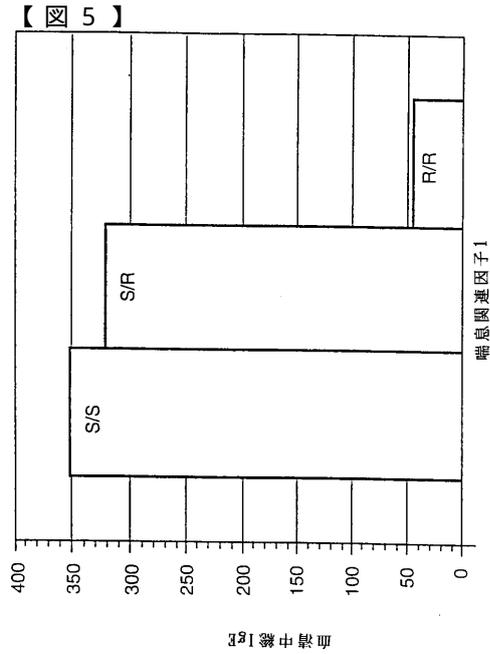


FIG. 5

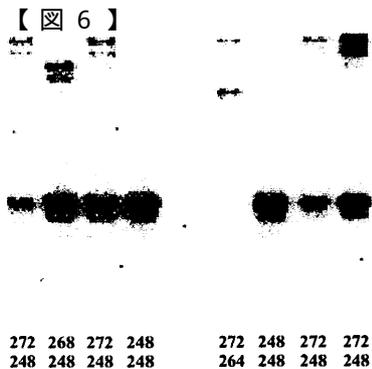


FIG. 6

15 \* 30 \* 45 \* 60 \*  
 TCT CGA GCA GGG GTG TCC AAC CTT GGC GGG GAT CCT GGA CAT CAA CTT CCT CAT CAA CAA K>  
 75 \* 90 \* 105 \* 120 \*  
 GAT GCA GGA AGA TCC AGC TTC CAA GTG CCA CTG CAG TGC TAA TGT GAC CAG TTG TCT CTG  
 M Q E D P A S K C H C S A N V T S C L C>  
 135 \* 150 \* 165 \* 180 \*  
 TTT GGG CMT TCC CTC TGA CAA CTG CAC CNG ACC ATG CTT CAG TGA CAG ACT GTC TCA GAT  
 L G I P S D N C T R P C F S E R L S Q M>  
 195 \* 210 \* 225 \* 240 \*  
 GAC CAA TAC CAC CMT GCA AAC AAG ATA CCC ACT GAT TTT CAG TGC GGT GAA AAA ATC AGT  
 T N T T M Q T R Y P L I F S R V K K S V>  
 255 \* 270 \* 285 \* 300 \*  
 TGA AGT ACT AAA GAA CAA CAA GTG TCC ATA TTT TTC CTG TGA ACA GCC ATG CAA CCA AAC  
 E V L K N N K C P Y F S C E Q P C N Q T>  
 315 \* 330 \* 345 \* 360 \*  
 CMT GGC AGG CMA CGC GCT GAC AAT TCT GAA GAG TCT TCT GGA AAT TTT CCA GAA AGA AAA  
 M A G N A L T F L K S L L E I F Q K E K>  
 375 \* 390 \* 405 \*  
 GAT GAG AGG GAT GAG AGG CMA GAT ATG AAG ATG AAA TAT TTA TCC CAG CTG C

8

FIG. 8

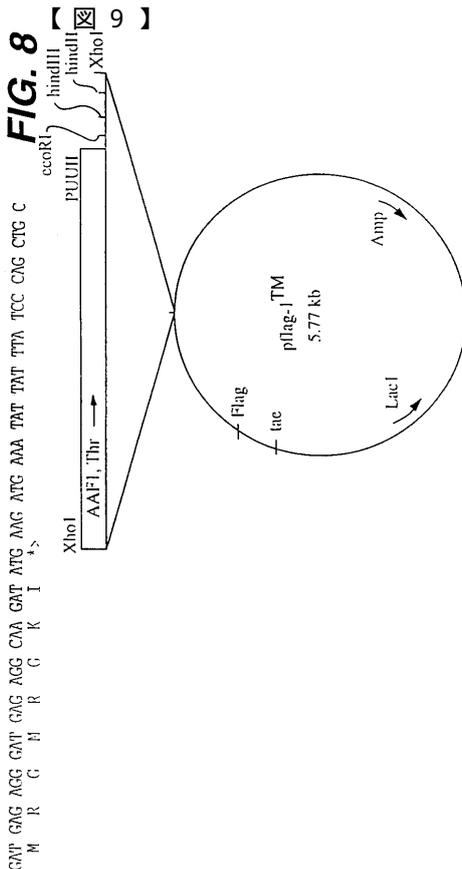


FIG. 9

15 \* 30 \* 45 \* 60 \*  
 TCT CGA GCA GGG GTG TCC AAC CTT GGC GGG GAT CCT GGA CAT CAA CTT CCT CAT CAA CAA K>  
 75 \* 90 \* 105 \* 120 \*  
 GAT GCA GGA AGA TCC AGC TTC CAA GTG CCA CTG CAG TGC TAA TGT GAC CAG TTG TCT CTG  
 M Q E D P A S K C H C S A N V T S C L C>  
 135 \* 150 \* 165 \* 180 \*  
 TTT GGG CAT TCC CTC TGA CAA CTG CAC CAG ACC ATG CTT CAG TGA GAG ACT GTC TCA GAT  
 L G I P S D N C T R P C F S E R L S Q M>  
 195 \* 210 \* 225 \* 240 \*  
 GAC CAA TAC CAC CMT GCA AAC AAG ATA CCC ACT GAT TTT CAG TGC GGT GAA AAA ATC AGT  
 T N T T M Q T R Y P L I F S R V K K S V>  
 255 \* 270 \* 285 \* 300 \*  
 TGA AGT ACT AAA GAA CAA CAA GTG TCC ATA TTT TTC CTG TGA ACA GCC ATG CAA CCA AAC  
 E V L K N N K C P Y F S C E Q P C N Q T>  
 315 \* 330 \* 345 \* 360 \*  
 CAC GGC AGG CMA CGC GCT GAC AAT TCT GAA GAG TCT TCT GGA AAT TTT CCA GAA AGA AAA  
 T A G N A L T F L K S L L E I F Q K E K>  
 375 \* 390 \* 405 \*  
 GAT GAG AGG GAT GAG AGG CMA GAT ATG AAG ATG AAA TAT TTA TCC CAG CTG C

FIG. 7

【 1 0 】

15 30 45 60  
 ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA CTG GCA GCT GCT ACC GTT GCG CAA  
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Phe Ala Thr Val Ala Gln>  
 75 105 120  
 GCT GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC CTT GAA TTC TCT AGA GAT ATC GTC GAC AGA TCT  
 Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Lys Leu Glu Phe Ser Arg Asp Ile Val Asp Arg Ser>  
 135 165 180  
 CTC GAG CAG GGG TCT CCA ACC TTG GCG GGC ATC GAC ATC AAC TTC CTC ATC AAC AAG  
 Leu Glu Gln Gly Cys Pro Thr Leu Ala Gly Ile Leu Asp Ile Asn Phe Leu Ile Asn Lys>  
 195 225 240  
 ATG CAG GAA GAT CCA GCT TCC TAG TGC TGC TCC AGT GCT AAT CTG ACC AGT TGT CTC TCT  
 Met Gln Glu Asp Pro Ala Ser Lys Cys His Cys Ser Ala Asn Val Thr Ser Cys Leu Cys>  
 255 285 300  
 TTG GGC ATT CCC TCT GAC AAC TGC ACC AGA CCA TGC TTC AGT GAG AGA CTG TGT CAG ATC  
 Leu Gly Ile Pro Ser Asp Asn Cys Thr Arg Pro Cys Phe Ser Glu Arg Leu Ser Gln Met>  
 315 345 360  
 ACC AAT ACC ACC ATG CAA ACA AGA TAC CCA CTG ATT TTC AGT CCG GTG AAA AAA TCA GTT  
 Thr Asn Thr Thr Met Gln Thr Arg Tyr Pro Leu Ile Phe Ser Arg Val Lys Lys Ser Val>  
 375 405 420  
 GAA GTA CTA AAG AAC AAC TGT CCA TAT TTT TCC TGT GAA CAG CCA TGC AAC CAA ACC  
 Glu Val Leu Lys Asn Asn Lys Cys Pro Tyr Phe Ser Cys Glu Gln Pro Cys Asn Gln Thr>  
 435 465 480  
 ACG GCA GGC AAC GCG CTG ACA TTT CTG AAG AGT CTT CTG GAA ATT TTC CAG AAA GAA AAG  
 Met Ala Gly Asn Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Glu Ile Phe Gln Lys Glu Lys>  
 495 525 540  
 ATG AGA GGG ATG AGA GGC AAG ATA TCA AGA TGA AAT ATT TAT CCC AGC TCC CAA CCG  
 Met Arg Gly Met Arg Gly Lys Ile Phe>  
 555 570  
 TAG CGA AAC CAG CCA GTC CCA CTG CAA TCG CGA TAG CTG TCT TTT

FIG. 10

【 1 1 】

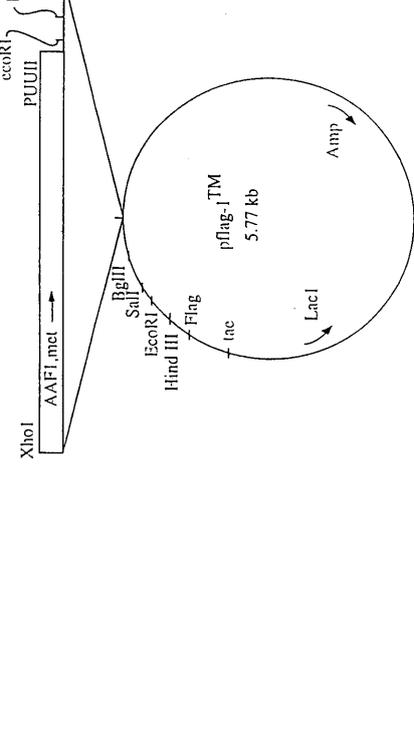


FIG. 11

【 1 2 】

15 30 45 60  
 ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA CTG GCA GCT GCT ACC GTT GCG CAA  
 Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Phe Ala Thr Val Ala Gln>  
 75 105 120  
 GCT GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC CTT GAA TTC TCT AGA GAT ATC GTC GAC AGA TCT  
 Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Lys Leu Glu Phe Ser Arg Asp Ile Val Asp Arg Ser>  
 135 165 180  
 CTC GAG CAG GGG TCT CCA ACC TTG GCG GGC ATC GAC ATC AAC TTC CTC ATC AAC AAG  
 Leu Glu Gln Gly Cys Pro Thr Leu Ala Gly Ile Leu Asp Ile Asn Phe Leu Ile Asn Lys>  
 195 225 240  
 ATG CAG GAA GAT CCA GCT TCC TAG TGC TGC TCC AGT GCT AAT CTG ACC AGT TGT CTC TCT  
 Met Gln Glu Asp Pro Ala Ser Lys Cys His Cys Ser Ala Asn Val Thr Ser Cys Leu Cys>  
 255 285 300  
 TTG GGC ATT CCC TCT GAC AAC TGC ACC AGA CCA TGC TTC AGT GAG AGA CTG TGT CAG ATC  
 Leu Gly Ile Pro Ser Asp Asn Cys Thr Arg Pro Cys Phe Ser Glu Arg Leu Ser Gln Met>  
 315 345 360  
 ACC AAT ACC ACC ATG CAA ACA AGA TAC CCA CTG ATT TTC AGT CCG GTG AAA AAA TCA GTT  
 Thr Asn Thr Thr Met Gln Thr Arg Tyr Pro Leu Ile Phe Ser Arg Val Lys Lys Ser Val>  
 375 405 420  
 GAA GTA CTA AAG AAC AAC TGT CCA TAT TTT TCC TGT GAA CAG CCA TGC AAC CAA ACC  
 Glu Val Leu Lys Asn Asn Lys Cys Pro Tyr Phe Ser Cys Glu Gln Pro Cys Asn Gln Thr>  
 435 465 480  
 ACG GCA GGC AAC GCG CTG ACA TTT CTG AAG AGT CTT CTG GAA ATT TTC CAG AAA GAA AAG  
 Met Ala Gly Asn Ala Leu Thr Phe Leu Leu Leu Glu Ile Phe Gln Lys Glu Lys>  
 495 525 540  
 ATG AGA GGG ATG AGA GGC AAG ATA TCA AGA TGA AAT ATT TAT CCC AGC TCC CAA CCG  
 Met Arg Gly Met Arg Gly Lys Ile Phe>  
 555 570  
 TAG CGA AAC CAG CCA GTC CCA CTG CAA TCG CGA TAG CTG TCT TTT

FIG. 12

【 1 3 】

メチオニン117      トレオニン117



FIG. 13

【 図 15 】

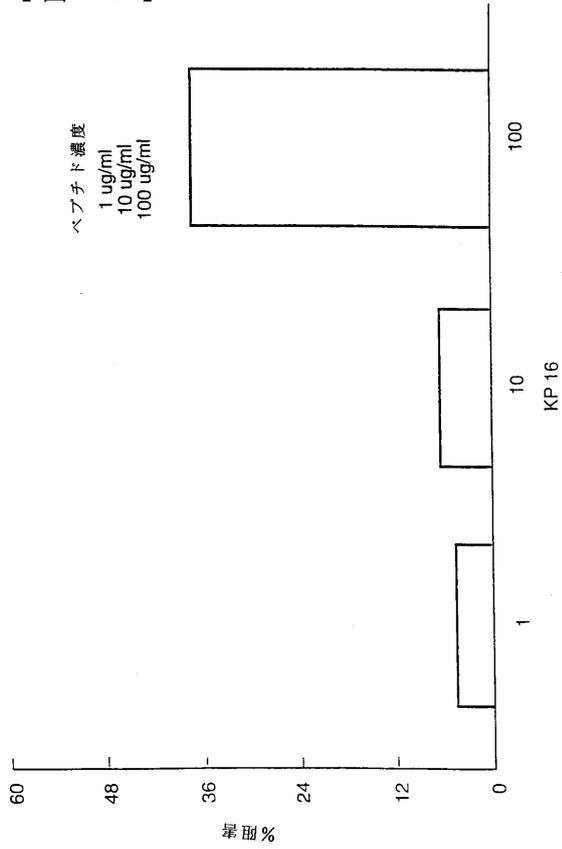


FIG. 15

【 図 16 】

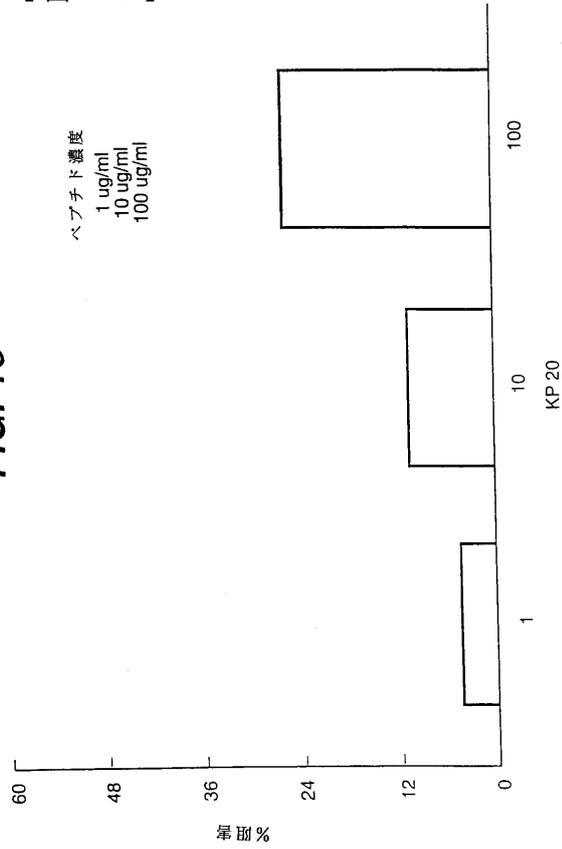


FIG. 16

【 図 17 】

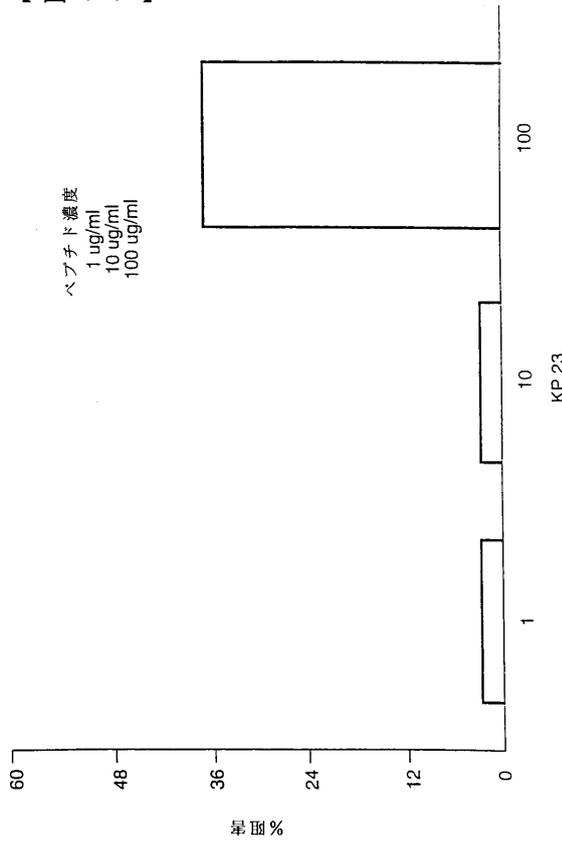


FIG. 17

【 図 18 】

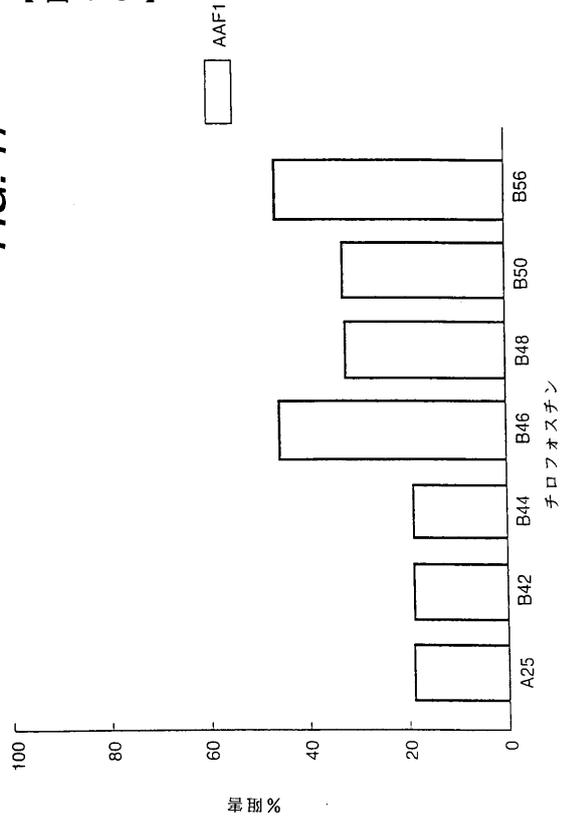


FIG. 18

【 図 19 】

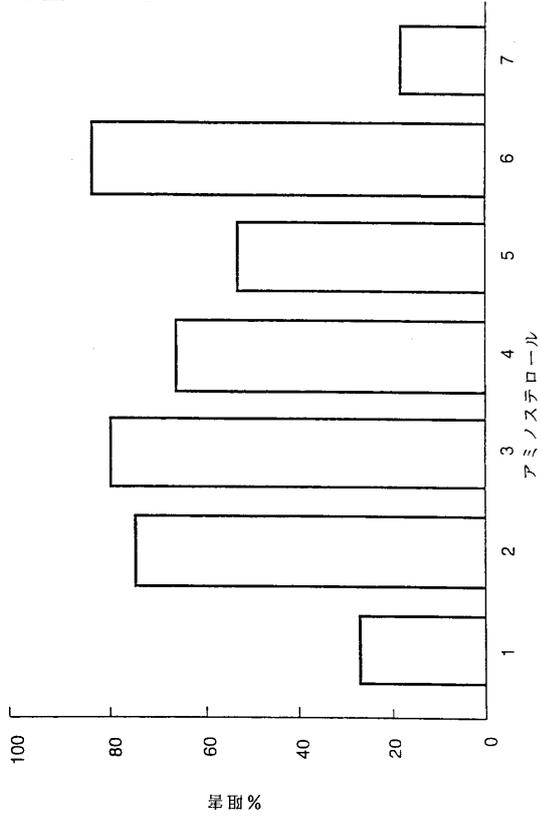


FIG. 19

【 図 20 】

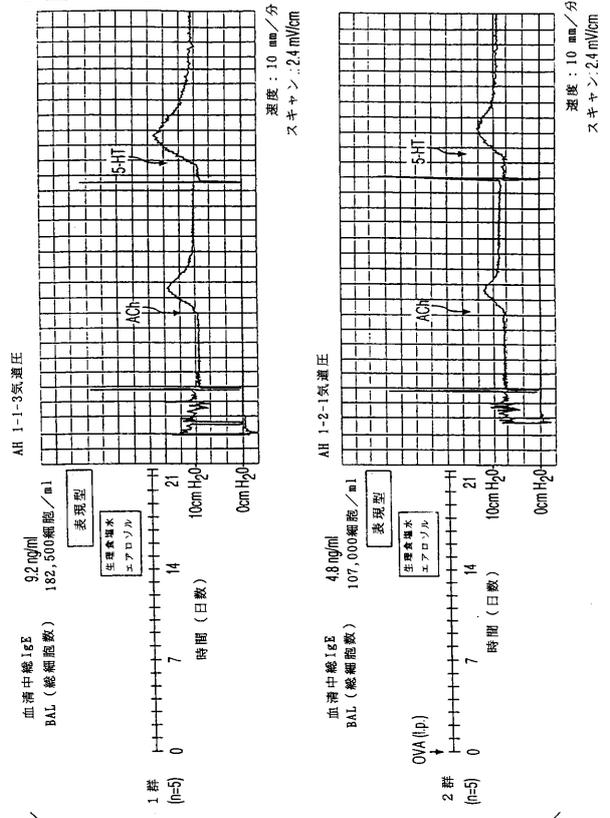


FIG. 20

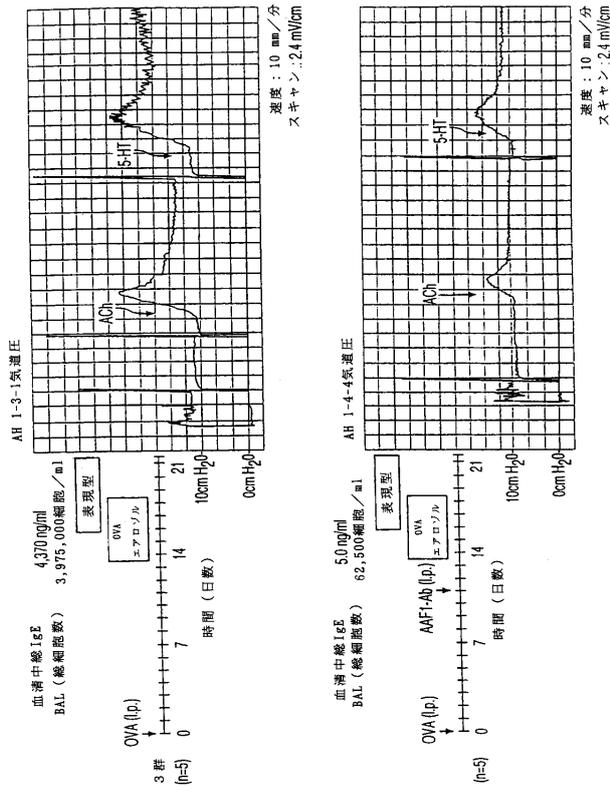


FIG. 20 (続き)

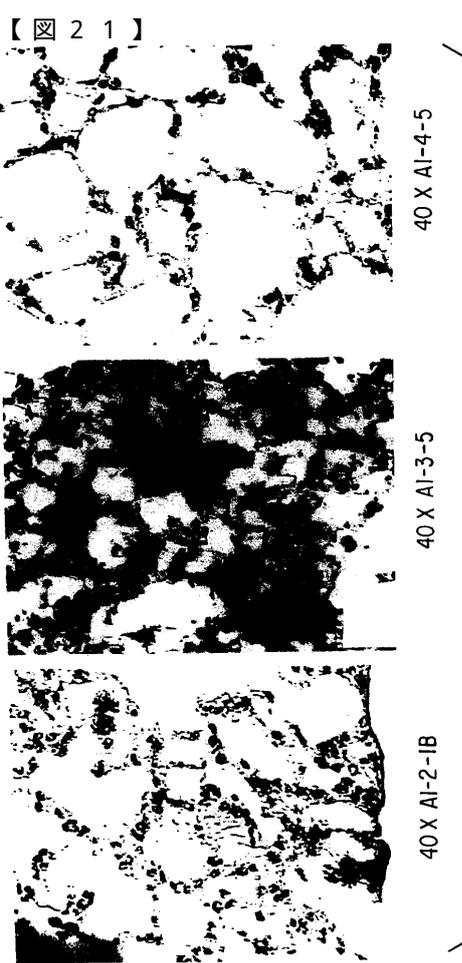


FIG. 21

【 図 21 】

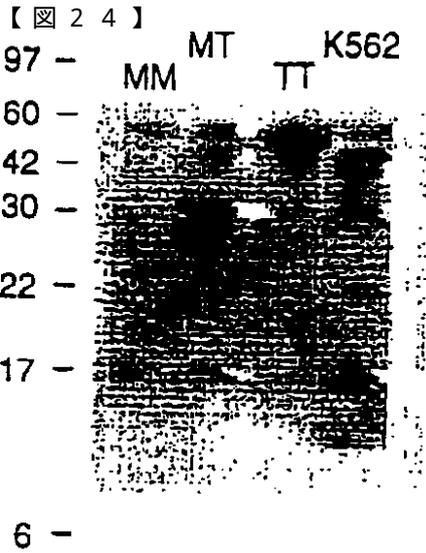
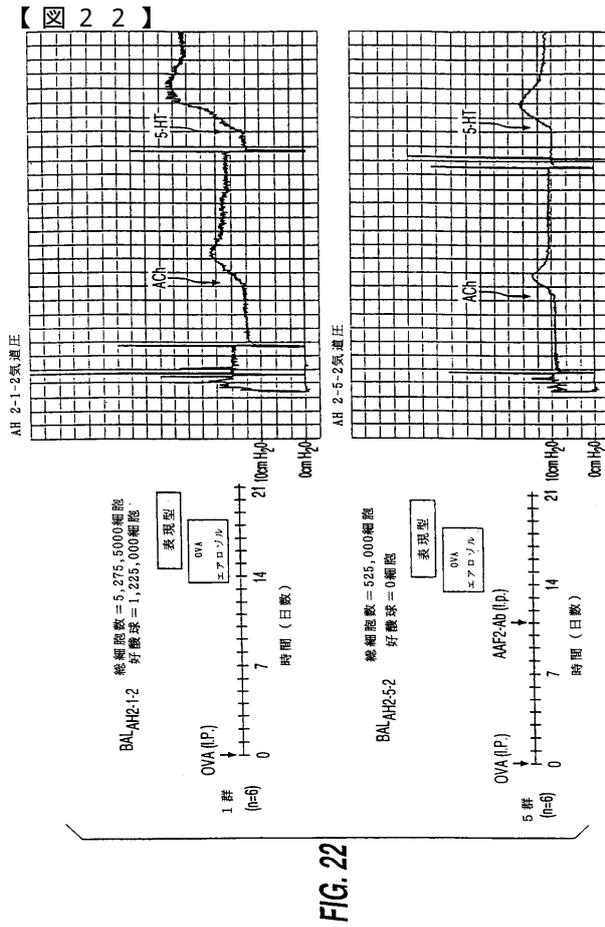


FIG. 24

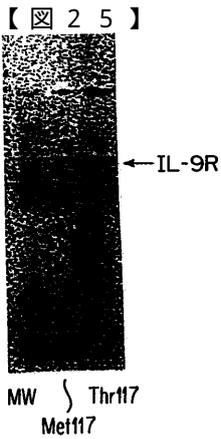


FIG. 25

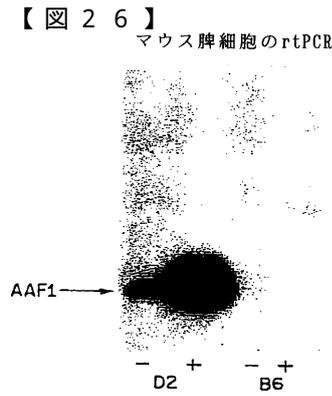


FIG. 26

【 27 】

ダブル エーゼリンカー 番号	TM ダブル エーゼリンカー 頭字語	反応性タオ				透明化				ハイ	
		-NH <sub>2</sub> アミノ基	-SM 硫黄基	非ケル活性 (光反応性)	-COOM カルボキシル基	チオール 基	ペリオドール 基	ヒドロキシル オミノ	はい		
21510	AMOS	X								X	X
21511	AMOS	X	X							X	X
21512	AMOS	X	X							X	X
21513	AMOS	X	X							X	X
21514	AMOS	X	X							X	X
21515	AMOS	X	X							X	X
21516	AMOS	X	X							X	X
21517	AMOS	X	X							X	X
21518	AMOS	X	X							X	X
21519	AMOS	X	X							X	X
21520	AMOS	X	X							X	X
21521	AMOS	X	X							X	X
21522	AMOS	X	X							X	X
21523	AMOS	X	X							X	X
21524	AMOS	X	X							X	X
21525	AMOS	X	X							X	X
21526	AMOS	X	X							X	X
21527	AMOS	X	X							X	X
21528	AMOS	X	X							X	X
21529	AMOS	X	X							X	X
21530	AMOS	X	X							X	X
21531	AMOS	X	X							X	X
21532	AMOS	X	X							X	X
21533	AMOS	X	X							X	X
21534	AMOS	X	X							X	X
21535	AMOS	X	X							X	X
21536	AMOS	X	X							X	X
21537	AMOS	X	X							X	X
21538	AMOS	X	X							X	X
21539	AMOS	X	X							X	X
21540	AMOS	X	X							X	X
21541	AMOS	X	X							X	X
21542	AMOS	X	X							X	X
21543	AMOS	X	X							X	X
21544	AMOS	X	X							X	X
21545	AMOS	X	X							X	X
21546	AMOS	X	X							X	X
21547	AMOS	X	X							X	X
21548	AMOS	X	X							X	X
21549	AMOS	X	X							X	X
21550	AMOS	X	X							X	X
21551	AMOS	X	X							X	X
21552	AMOS	X	X							X	X
21553	AMOS	X	X							X	X
21554	AMOS	X	X							X	X
21555	AMOS	X	X							X	X
21556	AMOS	X	X							X	X
21557	AMOS	X	X							X	X
21558	AMOS	X	X							X	X
21559	AMOS	X	X							X	X
21560	AMOS	X	X							X	X
21561	AMOS	X	X							X	X
21562	AMOS	X	X							X	X
21563	AMOS	X	X							X	X
21564	AMOS	X	X							X	X
21565	AMOS	X	X							X	X
21566	AMOS	X	X							X	X
21567	AMOS	X	X							X	X
21568	AMOS	X	X							X	X
21569	AMOS	X	X							X	X
21570	AMOS	X	X							X	X
21571	AMOS	X	X							X	X
21572	AMOS	X	X							X	X
21573	AMOS	X	X							X	X
21574	AMOS	X	X							X	X
21575	AMOS	X	X							X	X
21576	AMOS	X	X							X	X
21577	AMOS	X	X							X	X
21578	AMOS	X	X							X	X
21579	AMOS	X	X							X	X
21580	AMOS	X	X							X	X
21581	AMOS	X	X							X	X
21582	AMOS	X	X							X	X
21583	AMOS	X	X							X	X
21584	AMOS	X	X							X	X
21585	AMOS	X	X							X	X
21586	AMOS	X	X							X	X
21587	AMOS	X	X							X	X
21588	AMOS	X	X							X	X
21589	AMOS	X	X							X	X
21590	AMOS	X	X							X	X
21591	AMOS	X	X							X	X
21592	AMOS	X	X							X	X
21593	AMOS	X	X							X	X
21594	AMOS	X	X							X	X
21595	AMOS	X	X							X	X
21596	AMOS	X	X							X	X
21597	AMOS	X	X							X	X
21598	AMOS	X	X							X	X
21599	AMOS	X	X							X	X
21600	AMOS	X	X							X	X
21601	AMOS	X	X							X	X
21602	AMOS	X	X							X	X
21603	AMOS	X	X							X	X
21604	AMOS	X	X							X	X
21605	AMOS	X	X							X	X
21606	AMOS	X	X							X	X
21607	AMOS	X	X							X	X
21608	AMOS	X	X							X	X
21609	AMOS	X	X							X	X
21610	AMOS	X	X							X	X
21611	AMOS	X	X							X	X
21612	AMOS	X	X							X	X
21613	AMOS	X	X							X	X
21614	AMOS	X	X							X	X
21615	AMOS	X	X							X	X
21616	AMOS	X	X							X	X
21617	AMOS	X	X							X	X
21618	AMOS	X	X							X	X
21619	AMOS	X	X							X	X
21620	AMOS	X	X							X	X
21621	AMOS	X	X							X	X
21622	AMOS	X	X							X	X
21623	AMOS	X	X							X	X
21624	AMOS	X	X							X	X
21625	AMOS	X	X							X	X
21626	AMOS	X	X							X	X
21627	AMOS	X	X							X	X
21628	AMOS	X	X							X	X
21629	AMOS	X	X							X	X
21630	AMOS	X	X							X	X
21631	AMOS	X	X							X	X
21632	AMOS	X	X							X	X
21633	AMOS	X	X							X	X
21634	AMOS	X	X							X	X
21635	AMOS	X	X							X	X
21636	AMOS	X	X							X	X
21637	AMOS	X	X							X	X
21638	AMOS	X	X							X	X
21639	AMOS	X	X							X	X
21640	AMOS	X	X							X	X
21641	AMOS	X	X							X	X
21642	AMOS	X	X							X	X
21643	AMOS	X	X							X	X
21644	AMOS	X	X							X	X
21645	AMOS	X	X							X	X
21646	AMOS	X	X							X	X
21647	AMOS	X	X							X	X
21648	AMOS	X	X							X	X
21649	AMOS	X	X							X	X
21650	AMOS	X	X							X	X
21651	AMOS	X	X							X	X
21652	AMOS	X	X							X	X
21653	AMOS	X	X							X	X
21654	AMOS	X	X							X	X
21655	AMOS	X	X							X	X
21656	AMOS	X	X							X	X
21657	AMOS	X	X							X	X
21658	AMOS	X	X							X	X
21659	AMOS	X	X							X	X
21660	AMOS	X	X							X	X
21661	AMOS	X	X							X	X
21662	AMOS	X	X							X	X
21663	AMOS	X	X							X	X
21664	AMOS	X	X							X	X
21665	AMOS	X	X							X	X
21666	AMOS	X	X							X	X
21667	AMOS	X	X							X	X
21668	AMOS	X	X							X	X
21669	AMOS	X	X							X	X
21670	AMOS	X	X							X	X
21671	AMOS	X	X							X	X
21672	AMOS	X	X							X	X
21673	AMOS	X	X							X	X
21674	AMOS	X	X							X	X
21675	AMOS	X	X							X	X
21676	AMOS	X	X							X	X
21677	AMOS	X	X							X	X
21678	AMOS	X	X							X	X
21679	AMOS	X	X							X	X
21680	AMOS	X	X							X	X
21681	AMOS	X	X							X	X
21682	AMOS	X	X							X	X
21683	AMOS	X	X							X	X
21684	AMOS	X	X							X	X
21685	AMOS	X	X							X	X
21686	AMOS	X	X							X	X
21687	AMOS	X	X							X	X
21688	AMOS	X	X							X	X
21689	AMOS	X	X							X	X
21690	AMOS	X	X							X	X
21691	AMOS	X	X							X	X
21692	AMOS										

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 0 7 K	16/24	
C 0 7 K	14/54	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 0 7 K	14/54	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 1 2 R	1/91	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	K
C 1 2 R	1/19	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
			C 1 2 P	21/02	K
			C 1 2 R	1:91	
			C 1 2 P	21/02	K
			C 1 2 R	1:19	

(72)発明者 プラサド カール ユー .  
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 ランズデイル マックアーサー ドライブ 2 3 1 0

(72)発明者 ニコラス ニコレイデズ  
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 メディア ブレイクル レーン 2 1 2

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 Proc Natl Acad Sci USA 94 p.13175-13180 (1997)  
 Int Arch Allergy Immunol 107 p.29-33 (1995)  
 Genomics 23 p.464-470 (1994)  
 Am J Hum Genet 55(3) A193 (1994)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)  
 A61K 39/395  
 BIOSIS/WPI(DIALOG)  
 JSTPlus(JDream2)  
 PubMed