

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-528010

(P2004-528010A)

(43) 公表日 平成16年9月16日(2004.9.16)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/275	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/275	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 3
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/16	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	4 C O 8 4
		(全 122 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-534485 (P2002-534485)	(71) 出願人	503136185
(86) (22) 出願日	平成13年10月11日 (2001.10.11)		バイロン・セラピューティックス・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月11日 (2003.4.11)		カナダ国オンタリオ エヌ6ジー・4エック
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/032136		クス8, ロンドン, コリップ・サークル
(87) 国際公開番号	W02002/031115		700, スウィート 203, ユーダブリ
(87) 国際公開日	平成14年4月18日 (2002.4.18)		ューオー・リサーチ・パーク
(31) 優先権主張番号	60/239, 354	(74) 代理人	100089705
(32) 優先日	平成12年10月11日 (2000.10.11)		弁理士 社本 一夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100076691
			弁理士 増井 忠式
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫モジュレーションのための核酸およびポリペプチド

(57) 【要約】

本発明は、免疫モジュレーションにある役割を果たしている g p 3 8 ポリペプチド、これらポリペプチドをコードする核酸分子、およびこれらポリペプチドおよび核酸分子を用いた治療方法および診断方法を提供する。本発明は、更に、g p 3 8 核酸分子およびポリペプチドの生物学的活性をモジュレートする化合物を同定する方法、およびこれら化合物を用いた治療方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

実質的に純粋なヤタボックスウイルス (Y a t a p o x v i r u s) 免疫モジュレーション性ポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、ヤバ (y a b a) サル腫瘍ウイルスに由来する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、タナボックスウイルス (t a n a p o x v i r u s) に由来する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、同定可能なシグナル配列をコードするアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記ポリペプチドが、ケモカイン結合性ポリペプチド、サイトカイン結合性ポリペプチド、免疫モジュレーターおよび抗炎症性ポリペプチドから成る群より選択される、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記ケモカインが、ヒトインターフェロン - 、ヒトインターロイキン - 2 およびヒトインターロイキン - 5 から成る群より選択される、請求項 5 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 7】

前記ポリペプチドがグリコシル化されている、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記ポリペプチドが抗サイトカイン活性を有する、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

前記ポリペプチドが、 S E Q I D N O : 1、S E Q I D N O : 2、S E Q I D N O : 4 または S E Q I D N O : 6 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、 S E Q I D N O : 1、S E Q I D N O : 2、S E Q I D N O : 4 または S E Q I D N O : 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 11】

実質的に純粋なヤタボックスウイルス核酸分子であって、ヤタボックスウイルス免疫モジュレーション性ポリペプチドをコードする、前記核酸分子。

【請求項 12】

前記核酸分子が、ゲノム DNA、c DNA および m RNA から成る群より選択される、請求項 11 に記載の核酸分子。

【請求項 13】

前記核酸分子が、同定可能なシグナル配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 11 に記載の核酸分子。

40

【請求項 14】

前記核酸分子が、ヤバサル腫瘍ウイルスポリペプチドをコードする、請求項 11 に記載の核酸分子。

【請求項 15】

前記核酸分子が、タナボックスウイルスポリペプチドをコードする、請求項 11 に記載の核酸分子。

【請求項 16】

前記核酸分子が、 S E Q I D N O : 1、S E Q I D N O : 2、S E Q I D N O : 4 または S E Q I D N O : 6 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含

50

むポリペプチドをコードする、請求項 11 に記載の核酸分子。

【請求項 17】

前記核酸分子が、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 または SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項 16 に記載の核酸分子。

【請求項 18】

前記核酸分子が、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5 または SEQ ID NO: 7 のヌクレオチド配列と実質的に同一であるヌクレオチド配列を含む、請求項 11 に記載の核酸分子。

【請求項 19】

ヤタボックスウィルス免疫モジュレーション性ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする配列に少なくとも 50% の核酸配列同一性を有する核酸分子であって、該フラグメントが少なくとも 6 個のアミノ酸を含み、そして該核酸分子が、高ストリンジェントな条件下において、ヤタボックスウィルス核酸分子の少なくとも一部分にハイブリダイズする、前記核酸分子。

10

【請求項 20】

前記核酸分子が、ヤタボックスウィルス免疫モジュレーション性ポリペプチドまたは少なくとも 6 個のアミノ酸を含むそのフラグメントをコードする核酸分子に 100% の相補性を有する、請求項 19 に記載の核酸分子であって、そして該核酸分子が高ストリンジェントな条件下においてヤタボックスウィルス核酸分子の少なくとも一部分にハイブリダイズする、核酸分子。

20

【請求項 21】

ヤタボックスウィルス核酸分子またはそのフラグメントのコーディング鎖に対するアンチセンスである配列を含む、前記核酸分子。

【請求項 22】

請求項 11 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 23】

前記ベクターが遺伝子治療用ベクターである、請求項 22 に記載のベクター。

【請求項 24】

請求項 22 に記載のベクターを含む細胞。

30

【請求項 25】

前記核酸分子が、ヤタボックスウィルスポリペプチドの発現のための調節配列に機能的に連結していて、該調節配列がプロモーターを含む、請求項 22 に記載のベクター。

【請求項 26】

前記細胞が、ヒト細胞、霊長類細胞および齧歯類動物細胞から成る群より選択される、請求項 24 に記載の細胞。

【請求項 27】

請求項 11 に記載の核酸分子を含む非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の非ヒトトランスジェニック動物からの細胞。

40

【請求項 29】

ヤタボックスウィルスポリペプチドと実質的に同一のポリペプチドをコードする一方のまたは両方の対立遺伝子中にノックアウト変異を有する、非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項 30】

ヤタボックスウィルスポリペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 31】

前記ポリペプチドが、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 または SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 30 に記載の抗体。

【請求項 32】

50

ヤタボックスウィルス遺伝子、またはヤタボックスウィルス遺伝子ホモログまたはそのフラグメントを分析するためのプローブであって、該プローブは、ヤタボックスウィルスポリペプチドまたは少なくとも6個のアミノ酸を含むそのフラグメントをコードする配列に少なくとも50%のヌクレオチド配列同一性を有し、そして該プローブは、高ストリンジエントな条件下において、ヤタボックスウィルス核酸分子の少なくとも一部分にハイブリダイズする、前記プローブ。

【請求項33】

前記プローブが、ヤタボックスウィルスポリペプチドまたは少なくとも6個のアミノ酸を含むそのフラグメントをコードする核酸分子に100%の相補性を有し、そして該プローブは、高ストリンジエントな条件下において、ヤタボックスウィルス核酸分子の少なくとも一部分にハイブリダイズする、請求項32に記載のプローブ。

10

【請求項34】

試料中のヤタボックスウィルスポリペプチドを検出する方法であって、該試料と請求項30に記載の抗体とを接触させ、そして該ポリペプチドへの該抗体の結合について検定することを含む方法。

【請求項35】

細胞中のヤタボックスウィルス遺伝子、またはヤタボックスウィルス遺伝子ホモログまたはそのフラグメントを検出する方法であって、請求項11に記載の核酸分子または約18ヌクレオチド長を超えるそのフラグメントと、該細胞からのゲノムDNA標品とを、ハイブリダイゼーション条件下において接触させて、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5またはSEQ ID NO: 7に約50%またはそれを超えるヌクレオチド配列同一性を有するDNA配列の検出を提供することを含む、前記方法。

20

【請求項36】

免疫モジュレーション性ヤタボックスウィルス遺伝子、またはヤタボックスウィルス免疫モジュレーション性遺伝子ホモログまたはそのフラグメントを同定する方法であって、

(a) 哺乳動物細胞試料を提供し；

(b) 該細胞試料中に候補遺伝子を導入し；

(c) 該候補遺伝子を発現させ；そして

(d) 該候補遺伝子が、該細胞試料中で免疫機能のレベルの変化を引き出すかどうか確かめることを含み、ここにおいて、免疫機能のレベルの変化が、該免疫モジュレーション性ヤタボックスウィルス遺伝子、またはヤタボックスウィルス免疫モジュレーション性遺伝子ホモログまたはそのフラグメントを同定する、前記方法。

30

【請求項37】

ヤタボックスウィルスポリペプチドの発現または活性をモジュレートする試験化合物を同定する方法であって、該ヤタボックスウィルスポリペプチドと該試験化合物とを接触させ、そして該ヤタボックスウィルスポリペプチド発現または活性への該試験化合物の作用を決定することを含む、前記方法。

【請求項38】

細胞からの分泌についてタンパク質を標的化する方法であって、ヤタボックスウィルスポリペプチドより選択される同定可能なシグナル配列を目的のタンパク質に取り付けること

40

【請求項39】

哺乳動物での免疫モジュレーションの方法であって、治療的有効量のヤタボックスウィルスポリペプチドまたはそのフラグメントを該哺乳動物に投与することを含み、ここにおいて、該ポリペプチドが、該哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する、前記方法。

【請求項40】

哺乳動物での免疫モジュレーションの方法であって、ヤタボックスウィルスポリペプチドの活性をモジュレートする化合物であって該哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する該化合物の治療的有効量を、該哺乳動物に投与することを含む、前記方法。

【請求項41】

50

免疫モジュレーション性障害を有する哺乳動物を処置する方法であって、ヤタボックスウィルスポリペプチドの活性をモジュレートする化合物であって該哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する該化合物の治療的有効量を、該哺乳動物に投与することを含む、前記方法。

【請求項 4 2】

少なくとも 1 回用量の治療的有効量のヤタボックスウィルスポリペプチドまたはそのフラグメントを、薬学的に許容しうる担体中に含む医薬組成物であって、免疫モジュレーション性障害の処置用に製剤化されている、前記医薬組成物。

【請求項 4 3】

ヤタボックスウィルスポリペプチドが、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4 または SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列、およびそのフラグメントおよび類似体と実質的に同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 3 7 ~ 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記免疫モジュレーションが、哺乳動物における免疫抑制、免疫刺激、細胞増殖、アポトーシス、T 細胞刺激の減少および炎症の減少から成る群より選択される、請求項 3 9 または請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 3 9 ~ 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記哺乳動物が、急性炎症、慢性関節リウマチ、移植片拒絶反応、喘息、炎症性腸疾患、ブドウ膜炎、再狭窄、多発性硬化症、乾癬、創傷治癒、エリテマトーデス、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、1 型インスリン依存性糖尿病、皮膚炎 (dermatitis)、髄膜炎、血栓性血小板減少性紫斑病、シェーグレン症候群、脳炎、白血球接着不全、リウマチ熱、ライター症候群、乾癬性関節炎 (psoriatic arthritis)、進行性全身性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、天疱瘡、類天疱瘡、壊死性血管炎、重症筋無力症 (myasthenia gravis)、エリテマトーデス、多発性筋炎、サルコイドーシス、肉芽腫症、血管炎、悪性貧血、CNS 炎症性障害、抗原抗体複合体媒介性疾患、自己免疫性溶血性貧血、橋本甲状腺炎、グレーブズ病、習慣性自然流産、レイノー症候群 (Reynard's syndrome)、糸球体腎炎、皮膚筋炎、慢性活動性肝炎、セリアック病、AIDS の自己免疫性合併症、萎縮性胃炎、強直性脊椎炎、アジソン病、乾癬、尋常性天疱瘡 (penphigus vulgaris)、ベーチェット症候群、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症、透析後症候群、白血病、後天性免疫不全症候群、敗血症性ショックおよび他のタイプの急性炎症、および脂質性組織球増殖症から成る群より選択される状態を有する、請求項 3 9 ~ 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 7】

ヤタボックスウィルス核酸分子の分析用キットであって、試験対象中に存在するヤタボックスウィルス核酸分子を分析するための核酸分子プローブを含む、前記キット。

【請求項 4 8】

ヤタボックスウィルスポリペプチドの分析用キットであって、試験対象中に存在するヤタボックスウィルスポリペプチドを分析するための抗体を含む、前記キット。

【請求項 4 9】

SEQ ID NO: 8 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの発現または活性をモジュレートする試験化合物を同定する方法であって、該ポリペプチドと該試験化合物とを接触させ、そして該ポリペプチド発現または活性への該試験化合物の作用を決定することを含む、前記方法。

【請求項 5 0】

細胞からの分泌についてタンパク質を標的化する方法であって、SEQ ID NO: 8 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドより選択される同

定可能なシグナル配列を目的のタンパク質に取り付けることを含み、ここにおいて、該目的のタンパク質は該細胞から分泌されている、前記方法。

【請求項 5 1】

哺乳動物での免疫モジュレーションの方法であって、SEQ ID NO: 8 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントの治療的有効量を該哺乳動物に投与することを含み、ここにおいて、該ポリペプチドが、該哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する、前記方法。

【請求項 5 2】

哺乳動物での免疫モジュレーションの方法であって、SEQ ID NO: 8 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの活性をモジュレートする化合物であって該哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する該化合物の治療的有効量を、該哺乳動物に投与することを含み、前記方法。

10

【請求項 5 3】

免疫モジュレーション性障害を有する哺乳動物を処置する方法であって、SEQ ID NO: 8 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドの活性をモジュレートする化合物であって該哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する該化合物の治療的有効量を該哺乳動物に投与することを含み、前記方法。

【請求項 5 4】

SEQ ID NO: 8 のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントの少なくとも 1 回用量の治療的有効量を、薬学的に許容しうる担体中に含む医薬組成物であって、免疫モジュレーション性障害の処置用に製剤化されている、前記医薬組成物。

20

【請求項 5 5】

ポリペプチドが、SEQ ID NO: 8 のアミノ酸配列を有する、請求項 4 9 ~ 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記免疫モジュレーションが、哺乳動物における免疫抑制、免疫刺激、細胞増殖、アポトーシス、T 細胞刺激の減少および炎症の減少から成る群より選択される、請求項 5 1 または請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 5 1 ~ 5 3 に記載の方法。

30

【請求項 5 8】

前記哺乳動物が、急性炎症、慢性関節リウマチ、移植片拒絶反応、喘息、炎症性腸疾患、ブドウ膜炎、再狭窄、多発性硬化症、乾癬、創傷治癒、エリテマトーデス、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、1 型インスリン依存性糖尿病、皮膚炎、髄膜炎、血栓性血小板減少性紫斑病、シェーグレン症候群、脳炎、白血球接着不全、リウマチ熱、ライター症候群、乾癬性関節炎、進行性全身性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、天疱瘡、類天疱瘡、壊死性血管炎、重症筋無力症、エリテマトーデス、多発性筋炎、サルコイドーシス、肉芽腫症、血管炎、悪性貧血、CNS 炎症性障害、抗原抗体複合体媒介性疾患、自己免疫性溶血性貧血、橋本甲状腺炎、グレーブズ病、習慣性自然流産、レイノー症候群、糸球体腎炎、皮膚筋炎、慢性活動性肝炎、セリアック病、AIDS の自己免疫性合併症、萎縮性胃炎、強直性脊椎炎、アジソン病、乾癬、尋常性天疱瘡、ベーチェット症候群、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症、透析後症候群、白血病、後天性免疫不全症候群、敗血症性ショックおよび他のタイプの急性炎症、および脂質性組織球増殖症から成る群より選択される状態を有する、請求項 5 1 ~ 5 3 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、概して、免疫学に関し、具体的には、免疫モジュレーターとしての新規なウイ

50

ルス遺伝子の同定および使用に関する。

【0002】

発明の背景

ウイルスは、高等脊椎動物門の細胞内で生存することによって増殖する。従って、それらは、宿主免疫系から特異的に免れるように進化してきている。ウイルスの生存は、外来抗原への宿主応答を逃れる、抑制する、対抗する、またはそれ以外には回避することができる戦略に依存している。これら宿主応答は、進化論的制約の強力な要素であり、現存する真核ウイルスは全て、宿主免疫応答を抑制するかまたはウイルスを免疫系検出から免れさせる、ウイルスにコードされたタンパク質の存在によって証明されるように、宿主免疫系との戦いの生き残りを含むしている。

10

【0003】

ウイルスによって用いられる一つまたは複数の特異的戦略は、そのゲノム容量によって劇的に異なる。小さいゲノムを有するウイルスは、宿主免疫レパートリー中の弱点または間隙を利用して検出を免れることによって確実に生存している。或いは、または更に、小さいウイルスゲノムは、速やかに複製して、宿主免疫応答を効果的にしのいでいる。より大きいDNAウイルス（例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、イリドウイルスおよびボックスウイルス）は、感染した宿主による免疫認識および/またはクリアランスからウイルスを防御するように機能するタンパク質を特異的にコードする。このような「破壊」ウイルスタンパク質は、炎症性障害および自己免疫障害の処置に有用な治療薬である。ボックスウイルスは、特に、このような免疫モジュレーション性タンパク質の豊富な源となっている。

20

【0004】

ボックスウイルスのヤタボックスウイルス (Yatapoxvirus) 属には、Tanapoxウイルス (TPV)、ヤバサル腫瘍ウイルス (YMTV) およびヤバ様疾患 (YLD) ウイルスが含まれる (Knight et al., *Virology* 172: 116-124, 1989)。TPV および YMTV は両方とも、直鎖状二本鎖の約 145 kbp DNA ゲノムを含有する (Essani et al., *Microbial Pathogenesis* 17: 347-353, 1994; Knight et al., 上記)。TPV は、ヒトにおいて、一過性発熱、1カ所またはそれを超える結節性皮膚病変および局所リンパ節症を特徴とする軽い疾患を生じるが、YMTV は、サルおよびヒトにおいて良性腫瘍を引き起こす (Paulose et al., *Microbial Pathogenesis* 25: 33-41, 1998; Amano et al., *Journal of General Virology* 76: 1109-1115, 1995)。TPV に誘発された細胞から分泌される 38 kDa 糖タンパク質は、3種類のヒトサイトカイン、すなわち、インターフェロン- γ 、インターロイキン-2 およびインターロイキン-5 を特異的に結合し且つ中和すると報告されている (Essani et al., 上記)。

30

【0005】

免疫学的障害の処置のために新規なウイルス免疫モジュレーション性遺伝子およびポリペプチドを同定することは有用であると考えられる。

40

【0006】

発明の概要

概して、本発明は、免疫モジュレーション性 gp38 ポリペプチド、これらポリペプチドをコードする核酸分子、およびこれらポリペプチドおよび核酸分子を用いた治療方法、診断方法およびスクリーニング方法を提供する。本発明は、更に、gp38 核酸分子およびポリペプチドの生物学的活性をモジュレートする化合物を同定する方法、およびこれら化合物を用いた治療方法を提供する。

【0007】

本発明は、新規なヤタボックスウイルス免疫モジュレーション性 gp38 ポリペプチド、これらポリペプチドをコードする核酸分子、およびこれらポリペプチドおよび核酸分子を

50

用いた治療方法、診断方法およびスクリーニング方法を提供する。本発明は、更に、ヤタボックスウイルスg p 3 8 核酸分子およびポリペプチドの生物学的活性をモジュレートする化合物を同定する方法、およびこれら化合物を用いた治療方法を提供する。

【0008】

第一の側面において、本発明は、実質的に純粋なヤタボックスウイルス免疫モジュレーション性ポリペプチドを提供する。第一の側面の好ましい態様において、このポリペプチドは、ヤバ(y a b a)サル腫瘍ウイルスにまたはタナボックスウイルス(t a n a p o x v i r u s)に由来することがありうる。第一の側面のもう一つ好ましい態様において、このポリペプチドには、同定可能なシグナル配列をコードするアミノ酸配列が含まれる。第一の側面のもう一つ好ましい態様において、このポリペプチドは、ケモカイン(例えば、ヒトインターフェロン-、ヒトインターロイキン-2およびヒトインターロイキン-5)結合性ポリペプチド、サイトカイン結合性ポリペプチド、免疫モジュレーターおよび抗炎症性ポリペプチドでありうる。第一の側面の他の好ましい態様において、このポリペプチドは、グリコシル化されていることがありうるしまたは抗サイトカイン活性を有することがありうる。第一の側面の他の好ましい態様において、このポリペプチドには、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 6のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列が含まれてよいし、またはSEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 6のアミノ酸配列が含まれてよい。

10

【0009】

第二の側面において、本発明は、ヤタボックスウイルス免疫モジュレーション性ポリペプチドをコードする実質的に純粋なヤタボックスウイルス核酸分子を提供する。第二の側面の好ましい態様において、この核酸分子は、ゲノムDNA、cDNAまたはmRNAでありうる。第二の側面のもう一つ好ましい態様において、この核酸分子には、同定可能なシグナル配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が含まれる。第二の側面の他の好ましい態様において、この核酸分子は、ヤバサル腫瘍ウイルスポリペプチドまたはタナボックスウイルスポリペプチドをコードすることができるし、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 6のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を含めたポリペプチドをコードすることができるし、またはSEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 6のアミノ酸配列を含めたポリペプチドをコードすることができる。第二の側面の他の好ましい態様において、この核酸分子には、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7またはSEQ ID NO: 9のヌクレオチド配列と実質的に同一であるヌクレオチド配列が含まれうる。

20

30

【0010】

第二の側面の他の好ましい態様において、本発明は、ヤタボックスウイルス免疫モジュレーション性ポリペプチドをコードする実質的に純粋なヤタボックスウイルス核酸分子を含めたベクター(例えば、遺伝子治療用ベクター)、およびこのベクターを含有する細胞を提供する。このベクター中のヤタボックスウイルス核酸分子は、ヤタボックスウイルスポリペプチドの発現のための調節配列に機能的に連結していることがありうるし、これら調節配列には、プロモーターが含まれうる。この細胞は、ヒト細胞、霊長類細胞または齧歯類動物細胞でありうる。

40

【0011】

第二の側面の他の好ましい態様において、本発明は、ヤタボックスウイルス免疫モジュレーション性ポリペプチドをコードする実質的に純粋なヤタボックスウイルス核酸分子を含有する非ヒトトランスジェニック動物、およびこの非ヒトトランスジェニック動物からの細胞を提供する。

【0012】

第二の側面の他の好ましい態様において、本発明は、細胞中のヤタボックスウイルス遺伝子、またはヤタボックスウイルス遺伝子ホモログまたはそのフラグメントを検出する方法

50

であって、ヤタボックスウィルス免疫モジュレーション性ポリペプチドをコードする実質的に純粋なヤタボックスウィルス核酸分子または約18ヌクレオチド長を超えるそのフラグメントと、この細胞からのゲノムDNA標品とを、ハイブリダイゼーション条件下において接触させて、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7またはSEQ ID NO: 9に約50%またはそれを超えるヌクレオチド配列同一性を有するDNA配列の検出を提供することによる方法を提供する。

【0013】

第三の側面において、本発明は、ヤタボックスウィルス免疫モジュレーション性ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする配列に少なくとも50%の核酸配列同一性を有する核酸分子であって、このフラグメントには、少なくとも6個のアミノ酸が含まれ、そしてこの核酸分子は、高ストリンジェントな条件下において、ヤタボックスウィルス核酸分子の少なくとも一部分にハイブリダイズする核酸分子を提供する。第三の側面の好ましい態様において、この核酸分子は、ヤタボックスウィルス免疫モジュレーション性ポリペプチドまたは少なくとも6個のアミノ酸を含めたそのフラグメントをコードする核酸分子に100%の相補性を有し、そしてこの核酸分子は、高ストリンジェントな条件下において、ヤタボックスウィルス核酸分子の少なくとも一部分にハイブリダイズする。

10

【0014】

第四の側面において、本発明は、核酸分子であって、ヤタボックスウィルス核酸分子またはそのフラグメントのコーディング鎖に対するアンチセンスである配列を包含する核酸分子を提供する。

20

【0015】

第五の側面において、本発明は、ヤタボックスウィルスポリペプチドと実質的に同一のポリペプチドをコードする一方のまたは両方の対立遺伝子中にノックアウト変異を有する非ヒトトランスジェニック動物を提供する。

【0016】

第六の側面において、本発明は、ヤタボックスウィルスポリペプチド、例えば、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 6のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を包含するポリペプチドに特異的に結合する抗体を提供する。第六の側面の好ましい態様において、本発明は、試料中のヤタボックスウィルスポリペプチドを検出する方法であって、この試料と抗体とを接触させ、そしてこのポリペプチドへの抗体の結合について検定することによる方法を提供する。

30

【0017】

第七の側面において、本発明は、ヤタボックスウィルス遺伝子、またはヤタボックスウィルス遺伝子ホモログまたはそのフラグメントを分析するためのプローブであって、ヤタボックスウィルスポリペプチドまたは少なくとも6個のアミノ酸を包含するそのフラグメントをコードする配列に少なくとも50%のヌクレオチド配列同一性を有するプローブを提供するが、このプローブは、高ストリンジェントな条件下において、ヤタボックスウィルス核酸分子の少なくとも一部分にハイブリダイズする。第七の側面の好ましい態様において、このプローブは、ヤタボックスウィルスポリペプチドまたは少なくとも6個のアミノ酸を包含するそのフラグメントをコードする核酸分子に100%の相補性を有し、そしてこのプローブは、高ストリンジェントな条件下において、ヤタボックスウィルス核酸分子の少なくとも一部分にハイブリダイズする。

40

【0018】

第八の側面において、本発明は、免疫モジュレーション性ヤタボックスウィルス遺伝子、またはヤタボックスウィルス免疫モジュレーション性遺伝子ホモログまたはそのフラグメントを同定する方法であって、(a)哺乳動物細胞試料を提供し；(b)この細胞試料中に候補遺伝子を導入し；(c)この候補遺伝子を発現させ；そして(d)この候補遺伝子が、細胞試料中で免疫機能のレベルの変化を引き出すかどうか確かめることによるが、ここにおいて、免疫機能のレベルの変化が、この免疫モジュレーション性ヤタボックスウィ

50

ルス遺伝子、またはヤタボックスウィルス免疫モジュレーション性遺伝子ホモログまたはそのフラグメントを同定する、前記方法を提供する。

【0019】

第九の側面において、本発明は、ヤタボックスウィルスポリペプチドの発現または活性をモジュレートする試験化合物を同定する方法であって、このヤタボックスウィルスポリペプチドと試験化合物とを接触させ、そしてヤタボックスウィルスポリペプチド発現または活性へのこの試験化合物の作用を決定することによる、前記方法を提供する。

【0020】

第十の側面において、本発明は、豚痘 (swinepox) (C1L) ポリペプチドの発現または活性をモジュレートする試験化合物を同定する方法であって、この豚痘 (C1L) ポリペプチドと試験化合物とを接触させ、そして豚痘 (C1L) ポリペプチド発現または活性へのこの試験化合物の作用を決定することによる、前記方法を提供する。

10

【0021】

第十一の側面において、本発明は、細胞からの分泌についてタンパク質を標的化する方法であって、ヤタボックスウィルスポリペプチドより選択される同定可能なシグナル配列を目的のタンパク質に取り付けることによるが、ここにおいて、この目的のタンパク質は細胞から分泌されている、前記方法を提供する。

【0022】

第十二の側面において、本発明は、細胞からの分泌についてタンパク質を標的化する方法であって、豚痘 (C1L) ポリペプチドより選択される同定可能なシグナル配列を目的のタンパク質に取り付けることによるが、ここにおいて、この目的のタンパク質は細胞から分泌されている、前記方法を提供する。

20

【0023】

第十三の側面において、本発明は、哺乳動物での免疫モジュレーションの方法であって、治療的有効量のヤタボックスウィルスポリペプチドまたはそのフラグメントを哺乳動物に投与することによるが、ここにおいて、このポリペプチドは、この哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する、前記方法を提供する。

【0024】

第十四の側面において、本発明は、哺乳動物での免疫モジュレーションの方法であって、治療的有効量の豚痘 (C1L) ポリペプチドまたはそのフラグメントを哺乳動物に投与することによるが、ここにおいて、このポリペプチドは、この哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する、前記方法を提供する。

30

【0025】

第十五の側面において、本発明は、哺乳動物での免疫モジュレーションの方法であって、ヤタボックスウィルスポリペプチドの活性をモジュレートする化合物であって哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する化合物の治療的有効量を、この哺乳動物に投与することによる、前記方法を提供する。

【0026】

第十六の側面において、本発明は、哺乳動物での免疫モジュレーションの方法であって、豚痘 (C1L) ポリペプチドの活性をモジュレートする化合物であって哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する化合物の治療的有効量を、この哺乳動物に投与することによる、前記方法を提供する。

40

【0027】

第十三～第十六までの側面の免疫モジュレーションは、哺乳動物における免疫抑制、免疫刺激、細胞増殖、アポトーシス、T細胞刺激の減少および炎症の減少でありうる。

【0028】

第十八の側面において、本発明は、免疫モジュレーション性障害を有する哺乳動物を処置する方法であって、豚痘 (C1L) ポリペプチドの活性をモジュレートする化合物であって哺乳動物に免疫モジュレーション性作用を有する化合物の治療的有効量を、この哺乳動物に投与することによる、前記方法を提供する。

50

【0029】

第十九の側面において、本発明は、少なくとも1回用量の治療的有効量のヤタポックスウィルスポリペプチドまたはそのフラグメントを、薬学的に許容しうる担体中に含めた医薬組成物であって、免疫モジュレーション性障害の処置用に製剤化されている医薬組成物を提供する。

【0030】

第二十の側面において、本発明は、少なくとも1回用量の治療的有効量の豚痘(C1L)ポリペプチドまたはそのフラグメントを、薬学的に許容しうる担体中に含めた医薬組成物であって、免疫モジュレーション性障害の処置用に製剤化されている医薬組成物を提供する。

【0031】

第十三～第二十までの側面の好ましい態様において、ヤタポックスウィルスポリペプチドには、SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6またはSEQ ID NO: 8のアミノ酸配列と実質的に同一であるアミノ酸配列、およびそのフラグメントおよび類似体が含まれる。

【0032】

第十三～第二十までの側面の他の好ましい態様において、哺乳動物はヒトである。

【0033】

第十三～第二十一までの側面の他の好ましい態様において、哺乳動物は、急性炎症、慢性関節リウマチ、移植片拒絶反応、喘息、炎症性腸疾患、ブドウ膜炎、再狭窄、多発性硬化症、乾癬、創傷治癒、エリテマトーデス、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、1型インスリン依存性糖尿病、皮膚炎(dermatitis)、髄膜炎、血栓性血小板減少性紫斑病、シェーグレン症候群、脳炎、白血球接着不全、リウマチ熱、ライター症候群、乾癬性関節炎(psoriatic arthritic)、進行性全身性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、天疱瘡、類天疱瘡、壊死性血管炎、重症筋無力症(mayasthenia gravis)、エリテマトーデス、多発性筋炎、サルコイドーシス、肉芽腫症、血管炎、悪性貧血、CNS炎症性障害、抗原抗体複合体媒介性疾患、自己免疫性溶血性貧血、橋本甲状腺炎、グレーブズ病、習慣性自然流産、レイノー症候群(Reynard's syndrome)、糸球体腎炎、皮膚筋炎、慢性活動性肝炎、セリアック病、AIDSの自己免疫性合併症、萎縮性胃炎、強直性脊椎炎、アジソン病、乾癬、尋常性天疱瘡(pemphigus vulgaris)、ベーチェット症候群、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症、透析後症候群、白血病、後天性免疫不全症候群、敗血症性ショック、脂質性組織球増殖症および癌から成る群より選択される状態を有する。

【0034】

第二十一および第二十二の側面において、本発明は、ヤタポックスウィルス核酸分子の分析用キットであって、試験対象中に存在するヤタポックスウィルス核酸分子を分析するための核酸分子プローブを含めたキット、または試験対象中に存在するヤタポックスウィルスポリペプチドを分析するための抗体を含めたキットを提供する。

【0035】

本発明は、いくつかの利点を提供する。例えば、それは、ヤタポックスウィルスまたは豚痘(C1L)gp38ポリペプチドの生物活性に感受性である免疫疾患の診断および処置に用いることができる方法および試薬を提供する。本発明の他の特徴および利点は、発明の詳細な記述、図面および請求の範囲から明らかであろう。

【0036】

発明の詳細な記載

本発明は、免疫モジュレーションにおいてある役割を果たしているgp38ポリペプチドおよび豚痘中ポリペプチド、これらポリペプチドをコードする核酸分子、およびこれらポリペプチドおよび核酸分子を用いた治療方法および診断方法を提供する。本発明は、更に、gp38および豚痘の核酸分子およびポリペプチドの生物学的活性をモジュレートする

10

20

30

40

50

化合物を同定する方法、およびこれら化合物を用いた治療方法を提供する。

【0037】

「ポリペプチド」または「ポリペプチドフラグメント」は、いずれの翻訳後修飾（例えば、グリコシル化、アセチル化またはリン酸化）とも無関係な、天然に存在するまたは天然に存在しないポリペプチドの全部または一部分を構成している2個またはそれを超えるアミノ酸の鎖を意味する。「翻訳後修飾」とは、合成中または合成後のポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントへの何らかの変化を意味する。翻訳後修飾は、（細胞内で合成中のように）自然に生じることがありうるしまたは（組換えまたは化学的手段によるように）人工的に生じることができる。「タンパク質」は、1個またはそれを超えるポリペプチドから作ることができる。

10

【0038】

「ヤタボックスウイルス gp38 免疫モジュレーション性ポリペプチド」または「ヤタボックスウイルス gp38 ポリペプチド」は、本明細書中に記載のポリペプチド配列と実質的に同一である、免疫モジュレーション性活性を有するヤタボックスウイルス gp38 ポリペプチドまたはタンパク質、またはその生物学的に活性なフラグメントまたは類似体を意味する。ヤタボックスウイルスは、例えば、本明細書中に援用される、Essani et al. (Microbial Pathogenesis 17:347-353, 1994)、Knight et al. (Virology 172:116-124, 1989)、Paulose et al. (Microbial Pathogenesis 25:33-41, 1998) および Amano et al. (Journal of General Virology 76:1109-1115, 1995) に記載されている。具体的には、本発明中に包含されるのは、ヤバサル腫瘍ウイルス (YMTV) およびタナボックスウイルス (TPV) の gp38 ポリペプチドである。

20

【0039】

ヤタボックスウイルス gp38 ポリペプチドは、本明細書中に記載されたのと実質的に同一のアミノ酸配列を有する基準ヤタボックスウイルス gp38 ポリペプチドと比較して、少なくとも50%、好ましくは、少なくとも75%、より好ましくは、少なくとも90%、最も好ましくは、少なくとも95%の生物学的活性、例えば、免疫モジュレーション性または抗炎症性活性を有するポリペプチドをコードすると定義することもできる。ヤタボックスウイルス gp38 ポリペプチドという用語には、ホモログ、例えば、ヤタボックスウイルス gp38 タンパク質の哺乳動物ホモログ並びに対立遺伝子変異、自然変異体、誘発変異体、本明細書中に記載のヤタボックスウイルス gp38 配列に高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされているタンパク質、およびヤタボックスウイルス gp38 ポリペプチドに向けられる抗血清によって特異的に結合したポリペプチドまたはタンパク質が含まれる。この用語には、ヤタボックスウイルス gp38 フラグメントを包含するキメラポリペプチドも含まれる。

30

【0040】

「豚痘ウイルス (C1L) gp38 免疫モジュレーション性ポリペプチド」または「豚痘ウイルス (C1L) gp38 ポリペプチド」は、本明細書中に記載のポリペプチド配列と実質的に同一である、免疫モジュレーション性活性を有する豚痘ウイルス (C1L) gp38 ポリペプチドまたはタンパク質、またはその生物学的に活性なフラグメントまたは類似体を意味する。

40

【0041】

豚痘ウイルス (C1L) gp38 ポリペプチドは、本明細書中に記載されたのと実質的に同一のアミノ酸配列を有する基準豚痘ウイルス (C1L) gp38 ポリペプチドと比較して、少なくとも50%、好ましくは、少なくとも75%、より好ましくは、少なくとも90%、最も好ましくは、少なくとも95%の生物学的活性、例えば、免疫モジュレーション性または抗炎症性活性を有するポリペプチドをコードすると定義することもできる。豚痘ウイルス (C1L) gp38 ポリペプチドという用語には、ホモログ、例えば、豚痘ウイルス (C1L) gp38 タンパク質の哺乳動物ホモログ並びに対立遺伝子変異、自然変

50

異体、誘発変異体、本明細書中に記載の豚痘ウイルス(C1L) gp38配列に高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAによってコードされているタンパク質、および豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチドに向けられる抗血清によって特異的に結合したポリペプチドまたはタンパク質が含まれる。この用語には、豚痘ウイルス(C1L) gp38フラグメントを包含するキメラポリペプチドも含まれる。

【0042】

「生物学的に活性なフラグメント」とは、完全長のヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチドの免疫モジュレーション性の少なくとも30%、好ましくは、少なくとも50%、より好ましくは、少なくとも75%、最も好ましくは、少なくとも95%である免疫モジュレーション性を示すヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチドのポリペプチドフラグメントを意味する。本明細書中で用いられる「フラグメント」という用語は、少なくとも10個連続したアミノ酸、好ましくは、少なくとも30個連続したアミノ酸、より好ましくは、少なくとも50個連続したアミノ酸、最も好ましくは、少なくとも60~80個またはそれを超えて連続したアミノ酸を意味する。ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質のフラグメントは、当業者に知られている方法によって生成することができるし、または通常のタンパク質プロセッシング(例えば、生物学的活性に必要とされない未完成ポリペプチドからのアミノ酸の除去、または選択的mRNAスプライシングまたは選択的タンパク質プロセッシングイベントによるアミノ酸の除去)によって生じてよい。

10

【0043】

「類似体」とは、それが由来しているヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチドの免疫モジュレーション性の少なくとも30%、好ましくは、少なくとも50%、より好ましくは、少なくとも75%、最も好ましくは、少なくとも95%である性質を示す、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチドのアミノ酸配列中の何らかの置換、付加または欠失を意味する。類似体は、アミノ酸配列相違によって、翻訳後修飾によってまたはその両方によって、天然に存在するヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質とは異なることがあり得る。本発明の類似体は、天然に存在するヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38配列と実質的に同一である。修飾には、ポリペプチドの*in vivo*および*in vitro*化学誘導体化、例えば、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化またはグリコシル化が含まれる。このような修飾は、ポリペプチド合成またはプロセッシング中に、または単離される修飾酵素での処理後に行われてよい。類似体は、一次配列中の変更によって、天然に存在するヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチドと異なることもありうる。これらには、自然および誘発両方の遺伝子変異体が含まれる(例えば、本明細書中に援用される Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), CSH Press, 1989; または本明細書中に援用される Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1994に記載のように、照射またはエタンメチル硫酸への暴露によるランダム変異誘発または部位特異的変異誘発によって生じる)。更に包含されるのは、L-アミノ酸以外の残基、例えば、D-アミノ酸、または天然に存在しないまたは合成のアミノ酸を含有する環状化ペプチド分子および類似体である。フラグメントおよび類似体は、標準的な技法、例えば、固相ペプチド合成またはポリメラーゼ連鎖反応を用いて、生成することができる。

20

30

40

【0044】

「ヤタボックスウイルス gp38 核酸分子」は、本明細書中に記載のいずれかのヤタボックスウイルス gp38 ポリペプチドの特性または生物学的活性を有するポリペプチド、またはそのフラグメントまたは類似体をコードするゲノムDNA、cDNAまたはRNA(例えば、mRNA)のような核酸分子を意味する。ヤタボックスウイルス gp38 核酸分

50

子は、本明細書中に記載のように、基準ヤタボックスウイルス gp 38 核酸分子と実質的に同一である。

【0045】

「豚痘ウイルス (C1L) gp 38 核酸分子」は、本明細書中に記載のいずれかの豚痘ウイルス (C1L) gp 38 ポリペプチドの特性または生物学的活性を有するポリペプチド、またはそのフラグメントまたは類似体をコードするゲノム DNA、cDNA または RNA (例えば、mRNA) のような核酸分子を意味する。豚痘ウイルス (C1L) gp 38 核酸分子は、本明細書中に記載のように、基準豚痘ウイルス (C1L) gp 38 核酸分子と実質的に同一である。

【0046】

「同一性」という用語は、本明細書中において、同じタイプの基準分子の配列と特定の核酸分子またはポリペプチドの配列との関係を記載するのに用いられる。例えば、あるポリペプチドまたは核酸分子が、それを並列させた場合の基準分子と比較して、ある与えられた位置に同じアミノ酸またはヌクレオチド残基を有する場合、その位置に「同一性」があるといわれる。基準分子に対する核酸分子またはポリペプチドの配列同一性レベルは、典型的には、配列分析ソフトウェアを用いて、最適アラインメントに達するためのギャップの導入などの、そこで規定されるデフォルトパラメーターを用いて測定される (例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin in Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705, BLAST または PILEUP / PRETTYBOX プログラム)。これらソフトウェアプログラムは、いろいろな置換、欠失または他の修飾に対する同一性の程度を割り当てることによって同一のまたは類似の配列に対合する。保存的置換には、典型的に、次の群、すなわち、グリシン、アラニン、バリン、イソロイシンおよびロイシン; アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギンおよびグルタミン; セリンおよびトレオニン; リシンおよびアルギニン; およびフェニルアラニンおよびチロシンの群内の置換が含まれる。

【0047】

核酸分子またはポリペプチドは、それが、その長さ全体にわたって、基準分子の配列と少なくとも 50% または 55% の同一性、好ましくは、少なくとも 60%、65% または 68% の同一性、より好ましくは、少なくとも 75% または 85% の同一性、最も好ましくは、少なくとも 90%、95% または 99% の同一性を示す場合、基準分子と「実質的に同一」であるといわれる。ポリペプチドについて、比較配列の長さは、少なくとも 16 アミノ酸、好ましくは、少なくとも 20 アミノ酸、より好ましくは、少なくとも 25 アミノ酸、最も好ましくは、少なくとも 35 アミノ酸である。核酸分子について、比較配列の長さは、少なくとも 50 ヌクレオチド、好ましくは、少なくとも 60 ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも 75 ヌクレオチド、最も好ましくは、少なくとも 110 ヌクレオチドである。

【0048】

或いは、または更に、二つの核酸配列は、高ストリンジェントな条件下でそれらがハイブリダイズする場合、「実質的に同一」である。「高ストリンジェントな条件」とは、少なくとも 500 ヌクレオチド長の DNA プロブを用いて、0.5 M NaHPO₄、pH 7.2、7% SDS、1 mM EDTA および 1% BSA (画分 V) を含有する緩衝液中において 65 の温度で、または 48% ホルムアミド、4.8 x SSC、0.2 M Tris-Cl、pH 7.6、1 x Denhardt's 溶液、10% 硫酸デキストラン および 0.1% SDS を含有する緩衝液中において 42 の温度で起こるハイブリダイゼーションと匹敵するハイブリダイゼーションを可能にする条件を意味する。(これらは、高ストリンジェントなノーザンまたはサザンハイブリダイゼーションに典型的な条件である。) 高ストリンジェントな PCR、DNA シークエンス法、一本鎖高次構造多型分析および *in situ* ハイブリダイゼーションのような、分子生物学者によって常套的に行

10

20

30

40

50

われる多数の技法の成功にも、高ストリンジェントなハイブリダイゼーションは当てにされている。ノーザンおよびサザンハイブリダイゼーションとは対照的に、これらの技法は、通常は、比較的短いプローブ（例えば、通常は、PCRまたはシークエンス法には16ヌクレオチドまたはそれより長いもの、および*in situ*ハイブリダイゼーションには40ヌクレオチドまたはそれより長いもの）で行われる。これら技法で用いられる高ストリンジェントな条件は、分子生物学における当業者に周知であり、それらの例は、例えば、本明細書中に援用されるAusubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, 1998に見いだされうる。

【0049】

「プローブ」または「プライマー」とは、相補的配列を含有する第二のDNAまたはRNA分子（「標的」）に塩基対合しうる規定の配列を有する一本鎖のDNAまたはRNA分子を意味する。得られたハイブリッドの安定性は、生じる塩基対合の程度に依る。この安定性は、プローブと標的分子との間の相補性の程度およびハイブリダイゼーション条件のストリンジェントの程度などのパラメーターによって影響される。ハイブリダイゼーションのストリンジェントの程度は、温度、塩濃度、およびホルムアミドのような有機分子の濃度などのパラメーターによって影響され、当業者に周知である方法によって決定される。ヤタボックスウイルスgp38核酸分子に特異的なプローブまたはプライマーは、好ましくは、本明細書中に記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列に、45%を超える配列同一性、より好ましくは、少なくとも55~75%の配列同一性、なお一層好ましくは、少なくとも75~85%の配列同一性、また更に好ましくは、少なくとも85~99%の配列同一性、最も好ましくは、100%の配列同一性を有する。プローブは、当業者に周知である方法によって、放射性かまたは非放射性で検出可能に標識することができる。プローブは、核酸シークエンス法、ポリメラーゼ連鎖反応による核酸増幅、一本鎖高次構造多型(SSCP)分析、制限断片多型(RFLP)分析、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、*in situ*ハイブリダイゼーション、電気泳動移動度シフト分析(EMSA)、および当業者に周知である他の方法のような、核酸ハイブリダイゼーションを行う方法に用いることができる。分子、例えば、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマー、遺伝子またはそのフラグメント、cDNA分子、ポリペプチドまたは抗体は、試料中のその存在を直接的に同定しうるような方法でそれに印を付ける場合、「検出可能に標識」するということができる。分子を検出可能に標識する方法は、当該技術分野において周知であり、制限されることなく、（例えば、³²Pまたは³⁵Sのような同位体での）放射性標識および（例えば、フルオレセインのような蛍光標識での）非放射性標識が含まれる。

【0050】

「同定可能なシグナル配列」は、細胞の特定領域にポリペプチドを標的化させる既知の機能を有するペプチド配列への相同性または生物学的活性によって同定することができるアミノ酸の配列を意味する。好ましくは、このシグナル配列は、ポリペプチドを細胞膜に向けて、そのポリペプチドが分泌されるようにする。或いは、このシグナル配列は、ゴルジ装置のような細胞小器官またはオルガネラにポリペプチドを向けることができる。当業者は、容易に入手可能なソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705, BLASTまたはPILEUP/PRETTYBOXプログラム）を用いることによってシグナル配列を同定することができる。同定可能なシグナル配列は、例えば、YMTV gp38 (SEQ ID NO: 2)のアミノ酸17と18との間に切断を生じる配列と実質的に同一である配列であり得る。

【0051】

「実質的に純粋なポリペプチド」とは、天然ではそれを伴っているタンパク質および有機

10

20

30

40

50

分子から分離されたポリペプチド（またはそのフラグメントまたは類似体）を意味する。典型的には、あるポリペプチドが、それが天然に関連しているタンパク質および天然に存在する有機分子を少なくとも60重量%含まない場合、それは実質的に純粋である。好ましくは、このポリペプチドは、少なくとも75重量%、より好ましくは、少なくとも90重量%、最も好ましくは、少なくとも99重量%純粋であるヤタボックスウィルスgp38ポリペプチドである。実質的に純粋なヤタボックスウィルスgp38ポリペプチドは、例えば、天然源（例えば、感染した哺乳動物細胞）からの抽出によって、ヤタボックスウィルスgp38ポリペプチドをコードする組換え核酸分子の発現によってまたは化学合成によって得ることができる。純度は、いずれか適当な方法によって、例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動またはHPLC分析によって測定することができる。

10

【0052】

あるポリペプチドが、その自然状態でそれを伴っているタンパク質および有機分子から分離されている場合、それは、天然に関連している成分を実質的に含まない。したがって、化学合成されているかまたは天然に生産されている細胞とは異なった細胞系で生産されているタンパク質は、天然では関連している成分を実質的に含まない。したがって、実質的に純粋なポリペプチドには、真核生物に由来するもののみならず、発現系、例えば、大腸菌（*E. coli*）または他の原核生物、酵母または昆虫細胞中で合成されたものも含まれる。

【0053】

「実質的に純粋な核酸分子」は、天然ではそれを伴っている成分を含まない核酸分子を意味する。例えば、実質的に純粋なDNAは、本発明のDNAが由来する生物の天然に存在するゲノム中において、その遺伝子に隣接する遺伝子を含まない。したがって、この用語には、例えば、ベクター中に包含されている組換えDNA；自律複製性プラスミドまたはウイルス中に包含されている組換えDNA；または原核生物または真核生物のゲノムDNA中に包含されている組換えDNA；または他の配列とは無関係な別個の分子（例えば、PCRまたは制限エンドヌクレアーゼ消化によって生産されるcDNAまたはゲノムまたはcDNAフラグメント）として存在するものが含まれる。それには、追加のポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部分である組換えDNAも含まれる。

20

【0054】

「アンチセンス」である核酸分子は、ヤタボックスウィルスgp38遺伝子または核酸分子のような、ある遺伝子または核酸分子のコーディング鎖の少なくとも75ヌクレオチド、好ましくは、少なくとも100、150または200ヌクレオチドに相補的である配列を有する核酸分子を意味する。アンチセンス核酸分子は、例えば、ヤタボックスウィルスgp38遺伝子または核酸分子によってコードされるヤタボックスウィルスgp38ポリペプチドの生産を選択的に低下させることが可能であり得る。

30

【0055】

「ベクター」とは、コードされたペプチドまたはポリペプチドが宿主細胞中で発現されるように、プロモーターに機能的に連結したポリペプチド（例えば、ヤタボックスウィルスgp38ポリペプチド）コーディング配列を宿主細胞中に転移させるのに用いられる、例えば、バクテリオファージ、アデノウイルス、レトロウイルス、ボックスウイルス、ヘルペスウイルスまたは人工染色体に由来する、遺伝子操作されたプラスミドまたはウイルスを意味する。ベクターは、遺伝子治療用ベクター、すなわち、治療的利益のために患者の細胞中に遺伝物質を転移させるように設計されたベクターであってよい。

40

【0056】

ベクターは、概して、ポリペプチドコーディング配列に機能的に連結したプロモーターを含めた調節配列を含有する。「プロモーター」は、転写を方向づけるのに十分な最小の核酸配列要素である。所望ならば、本発明の構築物には、細胞タイプ特異的、組織特異的または時間特異的な方法で制御可能な、または外部シグナルまたは試剤によって誘導可能な、プロモーター依存性遺伝子発現を与えるのに十分であるプロモーター要素が含まれる

50

。このような要素は、遺伝子の5'、3'またはイントロン領域中に位置することがありうる。その調節配列に適当な分子（例えば、転写アクチベータータンパク質）が結合している場合に、遺伝子発現を可能にするように、遺伝子および1個またはそれを超える調節配列が連結している場合に、配列は「機能的に連結」している。

【0057】

「導入遺伝子」とは、細胞（例えば、細胞の核ゲノム）中に人工的に挿入され、しかもその細胞から発生する生物のゲノム中に包含されているDNA分子を意味する。このような導入遺伝子は、トランスジェニック生物には部分的にまたは完全に異種（すなわち、外来性）でありうるし、またはその生物の内因性遺伝子に相同である遺伝子でありうる。生物または動物（例えば、マウス、ラット、ブタまたはヤギのような動物）が、それに人工的に挿入された導入遺伝子を有する細胞から発生した場合、それは「トランスジェニック」であるということができる。

10

【0058】

「ノックアウト変異」とは、普通にコードされているポリペプチドの生物学的活性を、変異していない遺伝子に対して少なくとも80%減少させる（組換えDNA技術または変異原への意図的暴露によって生じる）核酸分子中の人工的に誘導される変化を意味する。この変異は、制限されることなく、挿入、欠失、フレームシフト変異またはミスセンス変異でありうる。「ノックアウト動物」は、好ましくは、上に定義のようにノックアウト変異を含有する哺乳動物、より好ましくは、マウスである。

【0059】

抗体は、それが、あるポリペプチド（例えば、ヤタボックスウィルスポリペプチド）を認識し且つ結合するが、天然にそのポリペプチドを包含する試料、例えば、生物学的試料中の他の分子（例えば、非ヤタボックスウィルスgp38関連ポリペプチド）を実質的に認識せず且つ結合しない場合、そのポリペプチドに「特異的に結合」といわれる。好ましい抗体は、本明細書中に示されるポリペプチド配列に実質的に同一であるいずれのヤタボックスウィルスgp38ポリペプチド配列またはそのフラグメントにも結合する。

20

【0060】

「試料」とは、組織バイオプシー、羊水、細胞、血液、血清、尿、便、または患者または試験対象から得られる他の検体を意味する。この試料を、当該技術分野において知られている方法によって分析して、ヤタボックスウィルスgp38遺伝子中の変異、ヤタボックスウィルスgp38遺伝子またはポリペプチドの発現レベル、またはヤタボックスウィルスgp38ポリペプチドの生物学的機能を検出することができる。例えば、患者試料に由来するPCR産物のシーケンス法、一本鎖高次構造多型（SSCP）分析または制限断片長多型（RFLP）分析などの方法を用いて、ヤタボックスウィルスgp38遺伝子中の変異を検出することができ；ELISAを用いて、ヤタボックスウィルスgp38ポリペプチドのレベルを測定することができ；そしてPCRを用いて、ヤタボックスウィルスgp38核酸分子のレベルを測定することができる。

30

【0061】

「免疫機能」または「免疫反応性」は、標準的な検定によって測定される、外来性抗原に応答する免疫系の能力を意味する。「モジュレートする」または「モジュレートすること」は、ヤタボックスウィルスgp38ポリペプチド若しくは核酸分子または試験化合物との相互作用の結果としての、標的細胞、試料または生物の応答における、減少かまたは増加による量的変化の誘導を意味する。この増加または減少は、未処置対照生物、試料または分子に対して、少なくとも10%、好ましくは、少なくとも20%、より好ましくは、少なくとも50%、なお一層好ましくは、少なくとも75%、また更に好ましくは、少なくとも95%、最も好ましくは、少なくとも100%である。

40

【0062】

「免疫モジュレーション」または「免疫モジュレーション性」は、本発明のポリペプチドまたは核酸分子、またはそのフラグメントおよび類似体のような試剤での処置に際して、同じタイプの未処置対照に対する哺乳動物の免疫系の全免疫反応性の変化または細胞応答

50

の変化を意味する。免疫モジュレーションは、免疫細胞、例えば、B細胞、T細胞、抗原提示細胞、または免疫機能に関与している何らかの他の細胞を用いて検定することができる。免疫モジュレーションは、免疫関連遺伝子およびタンパク質、またはサイトカイン、サイトカイン受容体、免疫グロブリン等のような免疫関連化合物の発現および/または活性を決定することによって検定することもできる。

【0063】

「免疫抑制」は、特定の免疫モジュレーターと接触したことがない免疫系の免疫反応性と比較した場合の、免疫モジュレーターの投与に対する免疫系の全免疫反応性の減少を意味する。「免疫刺激」は、特定の免疫モジュレーターと接触したことがない免疫系の免疫反応性と比較した場合の、免疫モジュレーターの投与に対する免疫系の全免疫反応性の増加を意味する。「T細胞刺激の減少」は、例えば、クロム放出試験によって測定されるような、T細胞刺激レベルの低下を意味する。「炎症の減少」は、標的組織中の炎症性細胞（白血球、例えば、好酸球）の数の、好ましくは、2倍までの減少を意味する。「細胞増殖」とは、類似した細胞の成長または複製を意味する。「アポトーシス」とは、染色性細胞が、原形質膜泡状突起形成（blebbing）、細胞体萎縮、クロマチン凝縮およびDNAラダー形成（laddering）を包含する十分に特性決定された一連の生化学的特徴を示す場合の細胞死の過程を意味する。

10

【0064】

「免疫モジュレーター」は、例えば、変異したウイルスのビルレンスの変化によってまたは当該技術分野において周知のいろいろな免疫検定（例えば、本明細書中に記載の走化性検定）によって測定されるような、免疫モジュレーション性作用または変化（すなわち、免疫抑制、免疫刺激等）を誘導する試剤を意味する。例えば、本発明において、免疫モジュレーターは、免疫機能レベルの変化が、ヤタボックスウイルスgp38ポリペプチドを同定するように、変化した免疫機能レベルを引き出すことができる。「抗炎症性」剤は、個体への投与の際に全体の炎症または免疫機能を減少させることができる免疫モジュレーション性剤である。

20

【0065】

好ましくは、この増加または減少は、未処置対照生物、試料または分子に対して、少なくとも10%、好ましくは、少なくとも20%、より好ましくは、少なくとも50%、なお一層好ましくは、少なくとも75%、また更に好ましくは、少なくとも95%、最も好ましくは、少なくとも100%である。

30

【0066】

「免疫モジュレーション性障害」または「免疫学的障害」とは、免疫機能の変化を特徴とする、何らかの病態生理学的状態（すなわち、いずれかの哺乳動物疾患が含まれるがこれに制限されるわけではない、外部源、遺伝的素因、物理的または化学的外傷、またはそれらの組合せによって生じる、生きている生物の機能および/または構造の妨害）を意味する。

【0067】

この変化には、例えば、免疫細胞の数またはサイズの減少、細胞アポトーシスまたは細胞死の増加、または免疫細胞の成長、生存または分化の減少が含まれる。免疫学的障害には、免疫応答または全身免疫を伴ういずれかの疾患が含まれる。より詳しくは、このような障害は、生体中の外来性物質（例えば、ウイルス、細菌、細菌毒素、植物花粉、真菌胞子、動物の鱗屑（animal danders）、投薬、食物、または同種または異種移植臓器）に抵抗する生物の能力を減少させるか、または生体にそれ自体の組織に対する抗体を産生させて（例えば、自己免疫性障害）組織傷害をもたらすか、または癌を引き起こす、免疫系の機能不全である。免疫学的障害は、（例えば、遺伝的欠損、疾病、傷害、栄養不良、または化学療法に用いられるような投薬によって引き起こされる）免疫系の機能不全が、感染の頻度または重症度の増加を引き起こす場合にも起こりうる。免疫学的障害は、しばしば、炎症を伴うが、これは、組織傷害への生体反応であり、傷害部位において、白血球、マクロファージおよびリンパ球の蓄積を引き起こす。

40

50

【0068】

免疫学的障害または免疫モジュレーション性障害には、急性炎症、慢性関節リウマチ、移植片拒絶反応、喘息、炎症性腸疾患、ブドウ膜炎、再狭窄、多発性硬化症、乾癬、創傷治癒、エリテマトーデス、および当業者によって認識されうるいずれか他の自己免疫性または炎症性障害が含まれるが、これに制限されるわけではない。

【0069】

例えば、本発明の方法によって処置することができる、炎症に関連した他の疾患には、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎および食物アレルギーが含まれるが、これに制限されるわけではない。免疫系が宿主自体の組織を攻撃している他の自己免疫性障害の例には、1型インスリン依存性糖尿病、皮膚炎、髄膜炎、血栓性血小板減少性紫斑病、シェーグレン症候群、脳炎、白血球接着不全、リウマチ熱、ライター症候群、乾癬性関節炎、進行性全身性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、天疱瘡、類天疱瘡、壊死性血管炎、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、多発性筋炎、サルコイドーシス、肉芽腫症、血管炎、悪性貧血、CNS炎症性障害、抗原抗体複合体媒介性疾患、自己免疫性溶血性貧血、橋本甲状腺炎、グレーブズ病、習慣性自然流産、レイノー症候群、糸球体腎炎、皮膚筋炎、慢性活動性肝炎、セリアック病、AIDSの自己免疫性合併症、萎縮性胃炎、強直性脊椎炎およびアジソン病が含まれるが、これに制限されるわけではない。本発明の方法によって処置することができる、非悪性のまたは免疫学的に関連した細胞増殖性疾患に関連した他の疾患には、乾癬、尋常性天疱瘡、ベーチェット症候群、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症、透析後症候群、白血病、後天性免疫不全症候群、敗血症性ショックおよび他のタイプの急性炎症、脂質性組織球増殖症および癌が含まれる。

10

20

【0070】

「試験化合物」とは、それが天然に存在しようと、人工的に誘導されようと、本明細書中に記載のまたは当該技術分野において知られている検定方法の一つを用いることにより、免疫モジュレーターとして作用するその能力について検定される化学物質を意味する。試験化合物には、例えば、ペプチド、ポリペプチド、合成有機分子、天然に存在する有機分子、核酸分子およびそれらの成分が含まれる。

【0071】

投薬用量に関して本明細書中で用いられる「治療的有効量」は、免疫学的障害に特有の症状を示しているか、または免疫学的障害の危険がある個々の患者各々に合わせて作られる、規定量の薬理的活性剤（例えば、本明細書中に記載のヤタボックスウィルス gp38ポリペプチド）の投与を意味する。例えば、本発明の処置を受ける患者は、自己免疫性または炎症性疾患を経験していることがありうる。当業者は、投与される薬剤の最適用量が個々に異なるということを理解するであろう。個々の患者の用量は、患者の身長、体重、問題の投薬の吸収および代謝の速度、処置される障害の段階、およびほかにどんな薬剤が同時投与されるかを考慮すべきである。

30

【0072】

「薬学的に許容しうる担体」とは、処置される哺乳動物に生理学的に許容されうるが、それと一緒に投与される化合物の治療的性質を保持する担体を意味する。一つの代表的な薬学的に許容しうる担体は、生理的食塩水である。他の生理学的に許容しうる担体およびそれらの製剤は、当業者に知られているし、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (19th edition), ed. A. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載されている。

40

【0073】

「処置すること」または「処置」とは、疾患、病理学的状態または障害を治癒させる、改善する、安定させるまたは予防する意図での患者の医学的処置を意味する。この用語には、積極的な処置、すなわち、疾患、病理学的状態または障害の改善に対して具体的に向けられるまたは治癒に関連した処置が含まれ、原因治療、すなわち、関連した疾患、病理学的状態または障害の原因の除去に対して向けられる処置も含まれる。更に、この用語には

50

、待期的処置、すなわち、疾患、病理学的状態または障害の治癒よりもむしろ症状の軽減のために設計される処置；予防的処置、すなわち、関連した疾患、病理学的状態または障害の発生を最小限にする、または部分的にまたは完全に阻止することに向けられる処置；および支持的処置、すなわち、関連した疾患、病理学的状態または障害の改善に対して向けられる別の具体的な療法を補足するのに用いられる処置が含まれる。「処置」という句には、対症的処置、すなわち、関連した疾患、病理学的状態または障害の全身症状に対して向けられる処置も含まれる。

【0074】

「サイトカイン」とは、免疫応答を調節する場合に、例えば、隣接した細胞にシグナル伝達することによってある重要な役割を果たしている低分子量ポリペプチドを意味する。「ケモカイン」とは、白血球（例えば、好中球、好塩基球、単球およびT細胞）の化学的誘因物質であり、しかも炎症部位中へのリンパ球および単球の浸潤に重要である低分子量リガンドを意味する。

10

【0075】

本発明の治療方法、診断方法およびスクリーニング方法を最初に記載後、これら方法を実施する場合に用いることができる一般的なアプローチを記載する。この説明は、当業者が本発明およびその理論および利点をよりよく理解するのを助けるであろう。この説明は、本発明を詳しく説明するためのものであり、その範囲を制限するものではない。

【0076】

g p 3 8 核酸分子、ポリペプチド、抗体および免疫モジュレーション性化合物を用いた治療方法

20

本発明には、免疫モジュレーション性剤を用いることによって免疫学的障害を処置するまたは予防する方法が含まれる。免疫モジュレーション性試薬には、制限されることなく、ヤタボックスウイルスg p 3 8または豚痘ウイルス（C 1 L）ポリペプチド；ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C 1 L）g p 3 8 c DNA、m RNAまたはアンチセンスRNA；ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C 1 L）g p 3 8抗体；およびヤタボックスウイルスg p 3 8の生物学的活性、発現または安定性をモジュレートするいずれかの化合物が含まれる。

【0077】

抗サイトカイン活性、抗炎症活性を示し且つ白血球走化性活性の減少を示す、本発明において同定されるヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C 1 L）g p 3 8ポリペプチド（またはそれらのフラグメントまたは類似体）は、本発明において特に有用であると考えられる；このようなポリペプチドは、例えば、慢性関節リウマチの個体の免疫反応性を減少させる治療薬として用いることができる。免疫抑制剤、または免疫機能を減少させる試剤を用いて処置することができる他の免疫学的障害には、急性炎症、アレルギー反応、喘息反応、炎症性腸疾患（すなわち、クローン病および潰瘍性大腸炎）、移植片拒絶反応および再狭窄が含まれる。或いは、アポトーシスを促進するまたは誘発するポリペプチドは、腫瘍の処置に用いることができる。

30

【0078】

免疫モジュレーション性障害によって生じる疾患の処置または予防は、例えば、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C 1 L）g p 3 8タンパク質を適当な細胞に供給することにより、免疫モジュレーション性タンパク質の機能をモジュレートすることによって達成される。ヤタボックスウイルスg p 3 8タンパク質または核酸分子を適当な細胞に供給することにより、免疫モジュレーション性タンパク質が関与している生理学的経路（例えば、シグナル伝達経路）を修飾することによって免疫欠損を補正することも可能である。

40

【0079】

例えば、自己免疫性または炎症性障害の処置のための、潜在的または実際の罹患組織部位へ（例えば、注射によって）または全身への、組換えヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C 1 L）g p 3 8タンパク質、核酸分子、抗体または化合物の直接投与は、当該

50

技術分野において知られているかまたは本明細書中に記載されているかのいずれかの慣用的な組換えタンパク質投与技術によって行うことができる。実際の投薬量は、個々の患者の体格および健康状態を含めた、当業者に知られている多数の因子に依るが、概して、成人に 0.1 mg ~ 100 mg / 日までをいずれかの薬学的に許容しうる製剤中で投与される。

【0080】

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 免疫モジュレーター、抗炎症薬または抗発癌薬は、薬学的に許容しうる希釈剤、担体または賦形剤と一緒に、薬学的有効量で投与することができる。慣用的な医薬慣例を用いて、免疫モジュレーション性障害に苦しむ患者にヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 ポリペプチドを投与するのに適した製剤または組成物を提供することができる。いずれの適当な投与経路も、例えば、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内、眼窩内、眼内、脳室内、包内、髄腔内、槽内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾルまたは経口投与を用いることができる。治療用製剤は、液状の液剤または懸濁剤の形であってよいし、経口投与用の製剤は、錠剤またはカプセル剤の形であってよいし、鼻腔内用製剤は、散剤、点鼻剤またはエアゾル剤の形であってよい。

10

【0081】

当該技術分野において周知の製剤製造方法は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences, 上記」に見いだされる。非経口投与用製剤は、例えば、賦形剤、滅菌水または生理食塩水、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、植物由来油、または水素化ナフタレンを含有してよい。生体適合性で生物分解性のラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーは、これら化合物の放出を制御するのに用いることができる。ヤタボックスウイルス gp38 免疫モジュレーション性化合物に潜在的に有用な他の非経口デリバリーシステムには、エチレン-酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透ポンプ、植込み可能注入システムおよびリポソームが含まれる。吸入用製剤は、賦形剤、例えば、ラクトースを含有してよいし、または例えば、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリココラートおよびデオキシコラートを含有する水性液剤であってよいし、または点鼻剤の形でまたはゲル剤として投与するための油状液剤であってよい。

20

【0082】

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 遺伝子治療
ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 遺伝子またはそのフラグメントは、免疫モジュレーション性遺伝子治療または抗癌遺伝子治療に用いることができる。例えば、腫瘍の白血球浸潤を促すために、機能性ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 遺伝子またはそのフラグメントを、腫瘍部位の細胞中に導入してよい。更に、自己免疫反応を逆行させることが分かっているヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 ポリペプチドも、遺伝子治療に用いることができる。或いは、炎症を阻止するヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 ポリペプチドは、遺伝子治療によって、例えば、好酸球により媒介される炎症状態の処置のために投与することができる。

30

40

【0083】

遺伝子移入は、ウイルスベクターを用いて、更には、非ウイルス手段によって達成される。患者の患部組織中への遺伝子の移植は、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 遺伝子またはそのフラグメントを、培養可能な細胞タイプ中に *ex vivo* で移入後、その細胞 (またはその子孫) を標的組織中に注入することによって行うこともできる。

【0084】

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 タンパク質を発現する細胞に適当な親和性 (tropism) を有するレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクターまたは他のウイルスベクターは、治療用ヤタボックス

50

スウィルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38 遺伝子構築物の遺伝子移入デリバリーシステムとして用いることができる。この目的に有用な多数のベクターが知られている(例えば、Miller, Human Gene Therapy 15-14, 1990; Friedman, Science 244:1275-1281, 1989; Eglitis and Anderson, Biotechniques 6:608-614, 1988; Tolstoshev and Anderson, Current Opinion in Biotechnology 1:55-61, 1990; Sharp, The Lancet 337:1277-1278, 1991; Cornetta et al., Nucleic Acid Research and Molecular Biology 36:311-322, 1987; Anderson, Science 226:401-409, 1984; Moen, Blood Cells 17:407-416, 1991; および Miller and Rosman, Biotechniques 7:980-990, 1989; Le Gal La Salle et al., Science 259:988-990, 1993; および Johnson, Chest 107:77S-83S, 1995を参照されたい)。レトロウイルスベクターは、特に十分に開発され、臨床環境で用いられている(Rosenberg et al., N. Engl. J. Med 323:370, 1990; Anderson et al., 米国特許第5,399,346号)。

【0085】

細胞中への治療用DNAの導入のための非ウイルスアプローチには、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、プロトプラストフュージョン法およびリポソーム法が含まれるがこれに制限されるわけではないいずれかの標準的な技法にもよる、*in vitro*トランスフェクションが含まれる。例えば、ヤタポックスウイルスgp38 遺伝子は、腫瘍細胞中に、リポフェクション(Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413, 1987; Ono et al., Neuroscience Lett 117:259, 1990; Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 298:278, 1989; Staubinger and Papahadjopoulos, Meth. Enz. 101:512, 1983); アシアロロソヌコイド-ポリリシンコンジュゲーション(*asialorosonucoid-polylysine conjugation*) (Wu and Wu, J. Biol. Chem. 263:14621, 1988; Wu et al., J. Biol. Chem. 264:16985, 1989); または外科的条件下のマイクロインジェクション(Wolff et al., Science 247:1465, 1990)によって導入してよい。

【0086】

上のアプローチのいずれについても、治療用ヤタポックスウイルスgp38 DNA構築物は、好ましくは、悪性腫瘍または炎症および細胞障害性損傷の部位に(例えば、注入によって)適用されるが、悪性腫瘍または炎症および細胞障害性損傷の周辺の組織に、またはこれら区域に供給されている血管にさえも適用されてもよい。

【0087】

遺伝子治療用構築物において、ヤタポックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38 cDNA発現は、いずれか適当なプロモーター(例えば、ヒトサイトメガロウイルス、シミアンウイルス40またはメタロチオネインプロモーター)から支配され、その生産は、いずれか望ましい哺乳動物調節要素によって調節される。例えば、所望ならば、内皮または上皮細胞における選択的遺伝子発現を支配することが知られているエンハンサーを用いて、ヤタポックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質発現を支配することができる。このようなエンハンサーには、制限されることなく、肺特異的プロモーター(例えば、サーファクタント)および腸管特異的調節配列が含まれる。

【0088】

或いは、ヤタポックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ゲノムクローンを

、治療用構築物として（例えば、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C1L）gp38 cDNAとのハイブリダイゼーションによるその単離後）利用する場合、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C1L）gp38タンパク質発現は、その同族の調節配列によって、または所望ならば、異種源に由来する調節配列、例えば、本明細書中に記載のいずれかのプロモーターまたは調節要素によって調節される。

【0089】

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C1L）gp38遺伝子治療は、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C1L）gp38 mRNAの腫瘍への直接投与によっても行われる。このmRNAは、いずれの標準的な技法によっても製造し且つ単離することができるが、最も容易には、高効率プロモーター（例えば、T7プロモーター）の制御下においてヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C1L）gp38 cDNAを用いた*in vitro*転写によって製造される。悪性細胞へのヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C1L）gp38 mRNAの投与は、上記のいずれかの直接核酸投与方法によって行われる。

10

【0090】

トランスジェニック動物

トランスジェニック動物は、標準的な技法を用いて作ることができる（例えば、Gene Targeting: A Practical Approach, A.L. Joyner, ed., Oxford University Press, 1999を参照されたい）。例えば、ヤタボックスウイルスgp38遺伝子は、内因性制御配列を用いて、または構成性、組織特異的または誘導性の調節配列を用いて提供することができる。機能性ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C1L）gp38ホモログポリペプチドを欠いたトランスジェニック動物も、標準的な技法を用いて作ることができる。これは、本明細書中に与えられるDNA配列を用いて、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス（C1L）gp38ホモログ遺伝子中でノックアウト変異を遺伝子操作することによって行うことができる。

20

【0091】

ヤタボックスウイルスノックアウト

ボックスウイルスは、最大の真核DNAウイルスの中に含まれ、感染した細胞の細胞質中で自律複製する異例の能力を有する。多数のボックスウイルスタンパク質は、存在する場合、それらが増加した病原性を与え且つ免疫応答性宿主中でのウイルス複製を向上させるという基準で、ビルレンス因子として定義されている。これらビルレンス因子タンパク質をコードする遺伝子が欠失している場合、得られたウイルス株は、概して、弱毒化されたまたは変化した疾患表現型を示す（本明細書中に援用される、Turner, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 163: 125-151, 1990; Buller, Microbiol. Rev., 55: 80-122, 1991; Smith, J. Gen. Virol., 74: 1725-1740; McFadden, Austin (TX): R.G. Landes Company, 1995）。このような「ノックアウト」ヤタボックスウイルスは、ウイルスタンパク質の免疫モジュレーション性のまたは他の役割の解明を助けることができる。

30

40

【0092】

標準的なウイルス学検定（例えば、Nash et al., (1999) Immunological Review, 57: 731）を用いると、当業者は、ヤタボックスウイルス感染への各々の遺伝子の寄与、およびウイルス感染の一般的な生化学的および生理学的進行を確定することができる。特定の遺伝子を欠いたノックアウトヤタボックスウイルスは、標準的な分子生物学的技術を用いて生じることができる（本明細書中に各々援用される、Sambrook et al., 上記; Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, CA, 1990; Erlich et al., PCR Technology: Principles and

50

Applications for DNA Amplification, Stockton Press, New York, NY, 1989を参照されたい)。これらノックアウトウイルスのビルレンスは、当該技術分野において周知の標準的な感染性検定(Nash et al., 上記を参照されたい)を用いて評価することができる。例えば、上述のように、ヤタボックスウイルスのgp38ポリペプチド(SEQ ID NO: 1または2)は、ヤタボックスウイルスまたは他のボックスウイルスによって用いられる、炎症を阻止する機構を解明するのに有用であり得る。

【0093】

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38核酸分子、ポリペプチドおよび抗体を用いた診断方法

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチドおよび核酸分子は、炎症、自己免疫および他の状態の検出または監視に用いることができる。例えば、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質は、白血球走化性に関連している可能性があるため、および白血球数の減少は、免疫抑制と関連しているため、特定のヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質生産レベルの変化は、その状態の予後の指標を与える。ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質発現レベルは、いずれの標準的な技法によっても検定することができる。例えば、生物学的試料(例えば、バイオプシー)中でのその発現は、標準的なノーザンブロット分析によって監視することができるしまたはPCRによって助けることができる(例えば、Ausubel et al., 上記; Yap and McC Gee, Nucl. Acids. Res. 19: 4294, 1991を参照されたい)。

【0094】

更にもう一つのアプローチにおいて、免疫検定は、生物学的試料中のヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質を検出するまたは監視するのに用いられる。ヤタボックスウイルス gp38タンパク質特異的ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体(本明細書中に記載のように製造される)は、いずれの標準的な免疫検定フォーマット(例えば、ELISA、ウェスタンブロットまたはRIA検定)においても、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチドレベルを測定するのに用いることができる。ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質生産の変化は、具体的な予後を示すものでありうる。免疫検定の例は、例えば、Ausubel et al., 上記に記載されている。免疫組織化学的技法は、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質検出に利用することもできる。例えば、組織試料は、抗ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質抗体およびいずれかの標準的な検出システム(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合した(conjugated)二次抗体を包含するもの)を用いて、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質の存在について、染色された切片および患者から得ることができる。このような技法に関する一般的な指針は、例えば、Bancroft and Stevens (Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone, 1982)および Ausubel et al. (上記)に見いだされうる。

【0095】

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38生物学的活性をモジュレートする分子、またはその生物学的活性がヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ウイルスによってモジュレートされる分子の同定

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38核酸分子配列の単離は、ヤタボックスウイルス gp38または豚痘ウイルス(C1L) ポリペプチドの生物学的活性を増加させるまたは減少させる分子の同定を容易にもする。同様に、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチド生物学的活性によって活性がモジ

10

20

30

40

50

ユレートされる分子を同定することができる。これら分子は、本明細書中に記載の検定、例えば、走化性検定を用いて調べることができる。ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質発現の増加または白血球走化性活性の減少を促進する分子は、本発明において特に有用であると考えられ、このような分子は、例えば、個体の免疫反応性を減少させる治療薬として用いることができる。

【0096】

一つのアプローチによれば、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38 mRNAを発現する細胞の培地に、いろいろな濃度で候補分子を加える。次に、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチド生物学的活性を、標準的な技法を用いて測定する。生物学的活性の測定には、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチドタンパク質および核酸分子のレベル、または免疫モジュレーションへのヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチドの作用の測定が含まれる。

10

【0097】

所望ならば、発現への候補分子の作用は、代わりに、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチド特異的抗体でのウェスタンブロットティングまたは免疫沈降などの標準的な免疫学的検出技術および同様の一般的なアプローチを用いて、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質生産レベルで測定することができる(下を参照されたい)。

【0098】

候補モジュレーターは、精製された(または実質的に精製された)分子でありうるし、化合物混合物(例えば、細胞から得られる抽出物または上澄み; Ausubel et al., 上記)の一つの成分でありうる。混合化合物検定において、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチド発現は、候補化合物プールのますます小さいサブセット(例えば、標準的な精製技術、例えば、HPLCまたはFPLCによって生じる)に対して、単一の化合物または最小限の化合物混合物が、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチド発現をモジュレートすることが示されるまで、調べられる。

20

【0099】

或いは、または更に、候補化合物は、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチド活性をモジュレートするものについてスクリーニングされうる。このアプローチでは、候補化合物の存在下での免疫モジュレーションレベルを、均等な条件下において、その不存在下での免疫モジュレーションレベルと比較する。再度、このようなスクリーニングは、一つまたはそれを超える有用な候補化合物が段階的に単離される候補化合物プールを用いて開始することができる。

30

【0100】

上記のスクリーニング検定は、当業者に周知であるいろいろな方法で行うことができる。これらには、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチド変異型を用いること、またはヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチドのフラグメントを用いることが含まれる。

40

【0101】

上記の方法でスクリーニングすることができる試験化合物は、化学物質でありうるし、天然に存在するものまたは人工的に誘導されるものでありうる。このような化合物には、例えば、ポリペプチド、合成有機分子、天然に存在する有機分子、核酸分子およびそれらの成分が含まれる。候補ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチドモジュレーターには、ペプチド分子、更には、非ペプチド分子(例えば、細胞抽出物、哺乳動物血清、または哺乳動物細胞が培養された成長培地中に見いだされる、例えば、ペプチド分子または非ペプチド分子)が含まれる。

【0102】

概して、免疫モジュレーション性疾患の予防または処置のための新規な薬物は、天然産物

50

、合成（または半合成）抽出物の大規模ライブラリーおよび化学ライブラリーの双方から、当該技術分野において周知である方法を用いて同定される。薬物の発見および開発の分野の当業者は、本発明のスクリーニング方法にとって、正確な試験抽出物または化合物源が重要ではないということを理解するであろう。したがって、実際には、いずれかの多数の化学抽出物または化合物も、これら方法を用いてスクリーニングすることができる。このような抽出物または化合物の例には、植物 - 、真菌 - 、原核生物 - または動物 - ベースの抽出物、発酵ブイオンおよび合成化合物、更には、既存の化合物の修飾が含まれるが、これに制限されるわけではない。

【0103】

サッカライド - 、脂質 - 、ペプチド - および核酸分子 - ベースの化合物が含まれるがこれに制限されるわけではない、いずれか多数の化合物のランダムなまたは支配された合成（例えば、半合成または全合成）を行うのにも、多数の方法が利用可能である。合成化合物ライブラリーは、Brandon Associates (Merrimack, NH) および Aldrich Chemical (Milwaukee, WI) から商業的に入手可能である。或いは、細菌、真菌、植物および動物の抽出物の形の天然化合物のライブラリーが、Biotics (Sussex, UK)、Xenova (Slough, UK)、Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, FL) および PharmaMar, U.S.A. (Cambridge, MA) を含めた多数の供給源から商業的に入手可能である。更に、天然のおよび合成によって製造されるライブラリーは、所望ならば、当該技術分野において知られている方法によって、例えば、標準的な抽出法および分別法によって製造される。更に、所望ならば、いずれのライブラリーまたは化合物も、標準的な化学的、物理的または生化学的方法を用いて容易に修飾することができる。

【0104】

更に、薬物の発見および開発の技術分野の当業者は、脱複製 (dereplication) (例えば、分類学的脱複製、生物学的脱複製および化学的脱複製またはそれらのいずれかの組合せ) の方法、または免疫学的障害へのそれらの治療的活性について既に知られている材料の複製物 (replicates) または反復体 (repeats) の脱離の方法を、可能な場合はいつでも用いることができるということを容易に理解する。

【0105】

粗製抽出物が、免疫モジュレーションを調節することが判明した場合、正のリード抽出物の分別を更に行って、認められる作用の原因となる化学成分を単離することができる。したがって、抽出、分別および精製の工程の目的は、望まれる活性を有する粗製抽出物中の化学物質の注意深い特性決定および同定である。化合物混合物中での活性の検出について本明細書中に記載の同様の検定を用いて、活性成分を精製し且つその誘導体を調べることができる。このような不均一抽出物の分別および精製の方法は、当該技術分野において知られている。所望ならば、処置に有用な試剤であることが分かった化合物を、当該技術分野において知られている方法によって化学修飾する。治療的に価値があると同定された化合物は、引き続き、例えば、本明細書中に記載のいずれかの動物モデルを用いて分析することができる。

【0106】

上のアプローチは、上記のヤタボックスウィルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 ポリペプチドの代わりに、ヤタボックスウィルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 タンパク質阻害活性を有する (例えば、アミノ末端に欠失または挿入を有する) 変更されたヤタボックスウィルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 ポリペプチドを置き換えることによって、候補化合物の活性を阻害するのに用いることもできる。

【0107】

動物モデル

ヤタボックスウィルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38 タンパク質の発現または活性のレベルで有効であることが判明した本発明の免疫モジュレーターおよび他の化合物を

10

20

30

40

50

、自己免疫性および炎症性の疾患および癌を処置する場合の効力について、動物モデルで調べる。

【0108】

候補化合物の免疫モジュレーション性作用を調べるための動物モデルは、当該技術分野において周知である。したがって、本発明は、本発明の候補化合物を調べるのに用いることができる動物モデルの選択に言及する。本発明において自己免疫性および炎症性の障害を処置する場合の候補化合物の効力について調べるのに用いるための考えられる動物モデルには、次が含まれるが、これに制限されるわけではない。

【0109】

急性炎症：

急性炎症の動物モデルは、初期のおよび迅速な薬物効力スクリーニング、および慢性炎症性疾患の結果の可能な予測値 (predictive value) を標的とする。次の動物モデルは、急性炎症を処置する場合の本発明の候補化合物の効力について調べるのに用いることができる。(1)カラゲニンに誘発される炎症モデル；(2)テルペンチンに誘発される炎症モデル；(3)トランスジェニックHLA B-27炎症モデル；および(4)炎症の耳搔き (ear-scratch) モデル。

【0110】

慢性関節リウマチ：ラット、マウス、ウサギ

慢性関節リウマチでの効力は、(1)ウサギ、ラットおよびマウスの各種抗原に誘発される関節炎モデル；および(2)トランスジェニックリウマチモデルで評価した。

【0111】

候補化合物の作用の分子機構および細胞機構を、関節病に関与する分解過程を調節する中心的な細胞内機構に影響を与えるそれら化合物の効力を調べることによって評価する。特に注目される重要な分子機構および細胞機構には、増加した血管新生、滑液過形成およびマトリックスメタロプロテアーゼ発現のような疾患過程を調節するシグナリングイベントが含まれる。これら過程は、関節炎疾患における軟骨分解に関与している。

【0112】

1. コラーゲンに誘発される関節炎：ラット、マウス、ウサギ

自己免疫に媒介される多発性関節炎は、特定の齧歯類動物系統 (ラット、マウスおよびウサギ) および非ヒト霊長類において、天然のII型コラーゲンでそれらを免疫感作することによって誘発することができる。コラーゲンに誘発される関節炎モデルは、広く用いられ且つ十分に特性決定されている。コラーゲンに誘発される関節炎は、II型コラーゲンの特定の領域に結合する自己抗体への感受性によって媒介される。この誘発機構は、MHCクラスII分子に関連しているが、免疫感作に用いられるII型コラーゲンの種にも依存する。

【0113】

2. オポアルブミンに誘発される関節炎：ウサギ

オポアルブミン関節炎の兆候および症状を減少させる場合の候補化合物の効力について調べる。多発性関節炎は、オポアルブミンでウサギを免疫感作することによって誘発される。

【0114】

3. アジュバントに誘発される関節炎：ラット、マウス、ウサギ

アジュバントに誘発される関節炎の兆候および症状を減少させる場合の候補化合物の効力について調べる。多発性関節炎は、フロイントアジュバント (Freud's Adjuvant) で特定の齧歯類動物系統を免疫感作することによって誘発される。

【0115】

4. 連鎖球菌細胞壁に誘発される関節炎：ラット

連鎖球菌細胞壁に誘発される関節炎の兆候および症状を減少させる場合の候補化合物の効力について調べる。慢性のびらん性多発性関節炎は、A群連鎖球菌から単離される細胞壁フラグメントの水性懸濁液の腹腔内注射によって誘発される。

10

20

30

40

50

【0116】

移植片拒絶反応（急性および慢性）

移植片拒絶反応での効力は、移植片血管病（GVD）の各種モデルで評価する。GVDは、充実性器官移植での後期移植片不全の最も一般的な原因である。GVDおよび移植片アテローム性動脈硬化症は、小血管中でのプラーク形成および線維症を特徴とする。移植片血管病の発症は、急性同種移植片拒絶反応、虚血-再灌流障害、および細菌感染またはウイルス感染に関連している。これら術後性傷害の一般的な経路は、血管壁中への間葉性細胞の移動を引き起こして、最終的には、血管腔の閉塞または部分閉塞をもたらす血管周囲炎症を引き起こす。

【0117】

10

1. 大動脈同種移植片モデル：ラット、ウサギ、サル

MHCミスマッチのラット、サルおよびウサギの特定の系統で行われる大動脈部分の移植後の血管傷害モデルにおいて、移植片アテローム性動脈硬化症および移植片拒絶反応を減少させる場合の候補化合物の効力について調べる。

【0118】

2. 気管同種移植片モデル：ラット、ウサギ、サル

MHCミスマッチのラット、ウサギおよびサルの特定の系統で行われる気管部分の移植後の血管傷害モデルにおいて、移植片アテローム性動脈硬化症および移植片拒絶反応を減少させる場合の候補化合物の効力について調べる。

【0119】

20

3. 異所性心臓移植片：マウス、ラット、サル

異所性心臓移植を、MHCミスマッチ動物で行う。このモデルにおいて、動物を移植後の最初の7日間だけシクロスポリンAで処置し、移植片血管病を発症させた後、術後90日目に屠殺後に分析する。

【0120】

4. 同所性腎臓移植片：マウス、ラット、サル

同所性腎臓移植を、MHCミスマッチ動物で行う。このモデルにおいて、治療量以下の用量のシクロスポリンAを、移植後の最初の10日間与えられた動物では、70%の症例で慢性の腎同種移植片拒絶反応の特徴を示され、その後術後90日目に屠殺後に分析する。

【0121】

30

5. 同所性肺移植片：ラット、サル

ラットおよびサルでの肺の全臓器移植後の臓器拒絶反応の兆候および症状を遅延させるまたは減少させる場合の候補化合物の有効性について調べる。

【0122】

6. 再灌流障害：ラット

臨床的肺移植での即時術後経過は、しばしば、虚血および再灌流障害の結果として、遅延移植片機能によって激しく損なわれる。虚血-再灌流障害での薬物候補の予防的効力は、ラットの急性 *in vivo* 二重肺移植モデルを用いて評価する（本明細書中に援用される、Hausen et al., Ann. Thorac. Surg. 61:1714-9, 1996）。

40

【0123】

再狭窄

バルーン血管形成術後の冠状動脈再狭窄モデルにおいて、アテローム性動脈硬化症プラーク沈着を減少させる場合の候補化合物の効力について調べる。アテローム性動脈硬化症プラーク形成は、血管閉塞に決定的に関与し、動脈傷害への過度の炎症性応答、および血栓形成に関連している。

【0124】

喘息：齧歯類動物

喘息の兆候および症状の減少での候補化合物の有効性を、抗原に誘発される実験的気道炎症の齧歯類動物モデルにおいて評価する。これらモデルには、次が含まれる。

50

【0125】

1. オボアルブミンに誘発される実験的気道炎症：齧歯類動物

実験的気道炎症のオボアルブミン感作齧歯類動物モデルにおけるエアゾールチャレンジ後の肺の気管支肺胞洗浄検査での炎症性細胞成分を減少させる場合の候補化合物の効力について調べる。

【0126】

2. GM-CSF導入遺伝子発現の存在下におけるオボアルブミンに誘発されるアレルギー感作：マウス

GM-CSFの局所発現の場合のオボアルブミンエアゾールチャレンジ後のマウス肺の気管支肺胞洗浄検査での炎症性細胞成分を減少させる場合の候補化合物の効力について調べる (Staempfli et al., J. Clin. Invest., Vol. 102: 9, 1704-1714)。

10

【0127】

炎症性腸疾患 (IBD)：マウスおよびラット

マウスおよびラットの抗原に誘発されるおよび遺伝的に媒介される自発性の慢性腸管炎症のいろいろなモデルを利用して、潰瘍性大腸炎またはクローン病における薬物候補の潜在的な治療的効力について評価する。例には、次が含まれる。

【0128】

1. デキストラン硫酸ナトリウムに誘発されるIBD：マウス

IBDの慢性の不可逆性臨床症状を、デキストラン硫酸ナトリウムの経口投与でマウスを処置することによって誘発する。

20

【0129】

2. IBDの遺伝子欠失モデルおよびトランスジェニックモデル：齧歯類動物

化合物の効力は、炎症性腸疾患のヒト要素によく似た症状を発するトランスジェニック齧歯類動物系統において調べるであろう。モデルには、IL-2、IL-10、TGF- β 、T細胞受容体 α 、ケラチン8、Gi2をコードする遺伝子の標的化欠失が含まれる。更に、ヒトWA-B27およびHLA-B27、更には、N-カドヘリンを機能的にブロックするドミナントネガティブ構築物の導入遺伝子を発現する動物を調べるであろう。

【0130】

ブドウ膜炎

ブドウ膜炎のいろいろな動物モデルにおいて、薬物候補の効力について評価するであろう。重要なモデルには、実験的自己免疫性ブドウ膜炎および養子移入された実験的自己免疫性ブドウ膜炎両方が含まれる。

30

【0131】

1. 実験的自己免疫性ブドウ膜炎 (EAU)

EAUは、眼特異的抗原での免疫感作によっていくつかの哺乳動物種で誘発される、T細胞に媒介される炎症性眼病である (本明細書中に援用される、Gery et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 27: 1296-1300, 1986, Sanui et al., J. Exp. Med., 169: 1947-1989)。この実験的疾患は、ヒトの一連の炎症性眼病のモデルと考えられ、それらヒト検査の前に多数のモダリティーを調べるのに用いられている。

40

【0132】

2. 養子移入された実験的自己免疫性ブドウ膜炎

養子移入されたEAUは、ナイーブ同系レシピエント中に注射されている網膜抗原に対して予め感作されたリンパ球の注射によって誘発される (本明細書中に援用される、McAllister et al., J. Immunol., 138: 1416-1420, 1987)。

【0133】

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38タンパク質発現

概して、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38は、適当な発現用

50

ビヒクル中における、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38タンパク質をコードするcDNAフラグメントの全部または一部分での適当な宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションによって生じることができる。

【0134】

分子生物学分野の当業者は、広範囲の発現系のいずれかを用いて、組換えタンパク質を提供することができるということを理解するであろう。用いられる正確な宿主細胞は、本発明に重要ではない。ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38タンパク質は、原核性宿主 (例えば、E. coli) 中または真核性宿主 (酵母細胞、例えば、Saccharomyces cerevisiae、昆虫細胞、例えば、Sf21細胞、または哺乳動物細胞、例えば、COS1、NIH 3T3またはHeLa細胞) 中で生じることができる。このような細胞は、広範囲の供給源 (例えば、the American Type Culture Collection, Rockland, MD; 例えば、Ausubel et al., 上記も参照されたい) から入手可能である。形質転換またはトランスフェクションの方法および発現用ビヒクルの選択は、選択される宿主系に依存するであろう。形質転換およびトランスフェクションの方法は、例えば、Ausubel et al. (上記) に記載されており、発現用ビヒクルは、例えば、Cloning Vectors: A Laboratory Manual, P. H. Poulos et al., 1985, Supp. 1987に与えられたものから選択することができる。

10

【0135】

一つの好ましい発現系は、Clontech (Pal Alto, CA) から入手可能な (例えば、ベクターpBacPAK9を用いた) バキュロウイルス系である。所望ならば、この系は、他のタンパク質発現技術、例えば、Evan et al. (Mol. Cell Biol. 5:3610-3616, 1985) によって記載されたmycタグアプローチと組み合わせて用いてよい。

20

【0136】

或いは、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38タンパク質を、安定的にトランスフェクションされた哺乳動物細胞系によって生じさせる。哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションに適した多数のベクターは、公的に利用可能であり、例えば、Pouwels et al. (上記) を参照されたいが、このような細胞系を構築する方法も、例えば、Ausubel et al. (上記) において、公的に利用可能である。一つの例において、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38タンパク質をコードするcDNAを、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子を包含する発現ベクター中にクローン化する。プラスミドの組込み、したがって、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38タンパク質をコードする遺伝子の宿主細胞染色体中への組込みは、細胞培地中の0.01~300 mMのメトトレキサートの包含について選択される (Ausubel et al., 上記に記載のように)。この優性選択は、大部分の細胞タイプで行うことができる。組換えタンパク質発現は、トランスフェクションされた遺伝子のDHFRに媒介される増幅によって増加させることができる。遺伝子増幅を有する細胞系を選択する方法は、Ausubel et al. (上記) に記載されており、このような方法は、概して、徐々に増加するレベルのメトトレキサートを含有する培地中で拡大した培養を伴う。この目的に一般的に用いられるDHFR含有発現ベクターには、pCVSEII-DHFRおよびpAdd26SV(A)が含まれる (Ausubel et al., 上記に記載される)。上記のいずれかの宿主細胞、または好ましくは、DHFR欠損CHO細胞系 (例えば、CHO DHFR⁻細胞、ATCC受託番号CRL9096) は、安定的にトランスフェクションされる細胞系のDHFR選択、またはDHFRに媒介される遺伝子増幅に好ましい宿主細胞の中に入る。

30

40

【0137】

組換えヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス (C1L) gp38タンパク質がいったん発現されたら、それを、例えば、アフィニティークロマトグラフィーを用いて単離する

50

。一つの例において、抗ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質抗体(例えば、本明細書中に記載のように製造される)を、カラムに取り付け且つ用いて、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質を単離する。アフィニティークロマトグラフィーの前に、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質を含んでいる細胞の溶解および分別を、標準法によって行う(例えば、Ausubel et al., 上記を参照されたい)。もう一つの例において、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質を、細胞から得られる抽出物または上澄みのような化合物混合物から精製するかまたは実質的に精製する(Ausubel et al., 上記)。標準的な精製技術を用いて、単一の化合物または最小限の数の有効な化合物が単離されるまで、望ましくない化合物をその混合物から漸進的に除去することができる。

【0138】

いったん単離されたら、組換えタンパク質は、所望ならば、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって更に精製することができる(例えば、Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980を参照されたい)。

【0139】

本発明のポリペプチド、特に、短いヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質フラグメントは、化学合成によって(例えば、Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, ILに記載の方法によって)生じることにもできる。

【0140】

ポリペプチド発現および精製のこれら一般的な技術は、有用なヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質フラグメントまたは類似体(本明細書中に記載される)を製造し且つ単離するのに用いることもできる。

【0141】

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチドは、いろいろなタグのいずれか一つに取り付けることができる。タグは、アミノ酸タグまたは化学的タグでありうるし、精製の目的に加えることができる(例えば、ニッケルカラムでの精製の6-ヒスチジンタグ)。いろいろな標識は、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質の別のタンパク質への、例えば、ケモカインまたはケモカイン受容体への結合を検出する手段として用いることができる。或いは、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38 DNAまたはRNAは、例えば、ハイブリダイゼーション検定での検出のために標識されてよい。ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38核酸またはポリペプチド、またはそれらの誘導體は、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素で、直接的にまたは間接的に標識されてよい。当業者は、他の適当な標識について承知しているであろうし、または常套実験を用いてこれを確かめることができるであろう。ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチドは、毒素に連結することにもできる。毒素に連結されたタンパク質は、そのタンパク質が悪性腫瘍に局在する能力を有する場合、例えば、その腫瘍に毒性薬を標的化させるのに用いることができる。

【0142】

抗ヤタボックスウイルスまたは抗豚痘ウイルス(C1L)gp38タンパク質抗体
ヤタボックスウイルスgp38タンパク質特異的抗体を生じさせるために、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)gp38ポリペプチドコーディング配列(例えば、TPV、YMTVまたは豚痘ウイルス(C1L)からのgp38)を、例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)とのC末端融合として発現させる(Smith 50

et al., Gene 67:31-40, 1988)。次に、この融合タンパク質を、グルタチオン-セファロースビーズ上で精製し、(遺伝子操作された切断部位において) トロンピンで切断されたグルタチオンで溶離し、そしてウサギの免疫感作に必要な程度まで精製する。一次免疫感作を、完全フロイントアジュバントで行い、それ以後の免疫感作を不完全フロイントアジュバントで行う。抗体力価は、ウェスタンブロットおよび免疫沈降分析により、GST-ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38融合タンパク質のトロンピンで切断されたヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質フラグメントを用いて監視する。免疫血清は、CNBr-セファロースにカップリングしたヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質を用いてアフィニティー精製する。抗血清特異性は、(既知の配列を用いたPCRによって作られた) 無関係のGSTタンパク質およびGST-トリプシンのパネルを用いて決定する。

10

【0143】

GST融合タンパク質への代替りのまたは補助の免疫源として、比較的珍しい親水性のヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質に該当するペプチドを生じさせ、そして導入されるC末端リシンによってキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)にカップリングさせてよい。これらペプチド各々への抗血清を、BSAに抱合したペプチド上で同様にアフィニティー精製し、そしてペプチド抱合体を用いたELISAおよびウェスタンブロットにおいて、およびGST融合タンパク質として発現されるヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質を用いたウェスタンブロットおよび免疫沈降によって特異性を調べる。

20

【0144】

或いは、モノクローナル抗体を、上記のヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質および標準的なハイブリドーマ技術を用いて製造することができる(例えば、Kohler et al., Nature, 256:495, 1975; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:292, 1976; Hammerling et al., In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, NY, 1981; Ausubel et al., 上記を参照されたい)。いったん製造されたら、モノクローナル抗体の特異的ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質認識についても、ウェスタンブロットまたは免疫沈降分析によって(Ausubel et al., 上記に記載の方法によって) 調べる。ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質を特異的に結合する抗体は、本発明に有用であると考えられ、このような抗体は、例えば、免疫検定において、哺乳動物によって生産されるヤタボックスウイルスgp38タンパク質のレベルを監視するのに(例えば、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38タンパク質の量または場所を決定するのに) 用いることができる。

30

【0145】

好ましくは、本発明の抗体は、全ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチドを用いて生じるのみならず、高度に保存された領域外にあるが、高頻度の荷電残基が用いられてもよいような判定基準によって抗原性であると考えられる、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L) gp38ポリペプチドのフラグメントを用いても生じる。一つの具体的な例において、このようなフラグメントは、標準的なPCR技術によって生じ、pGEX発現ベクター中にクローン化される(Ausubel et al., 上記)。融合タンパク質を、E. coli中で発現させ、Ausubel et al. (上記)に記載のグルタチオンアガロースアフィニティーマトリックスを用いて精製する。抗血清の低い親和性または特異性から起こりうる問題を最小限することを試みるために、各々のタンパク質について2種類または3種類のこのような融合を生じさせ、各々の融合を、少なくとも2羽のウサギに注射する。抗血清は、一連の、好ましく

40

50

は、少なくとも3回のブースター注射を含めた注射によって上昇する。

【0146】

ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)タンパク質への抗体は、ヤタボックスウイルスまたは豚痘ウイルス(C1L)タンパク質を検出するのに用いることができる。更に、これら抗体は、診断または治療的使用のために、放射性核種およびリボソームのような化合物にカップリングさせることができる。

【0147】

実施例

追加のヤタボックスウイルス関連gp38遺伝子のクローニング

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)およびDNAハイブリダイゼーションなどの標準的な技法を用いて、ヤタボックスウイルス関連gp38遺伝子をクローン化することができる。ヤタボックスウイルス関連gp38遺伝子およびホモログは、特異的プローブまたはプライマーでの低ストリンジェントなDNAハイブリダイゼーションまたは低ストリンジェントなPCRを用いて容易に同定することができる。縮重プライマーであるヤタボックスウイルス関連gp38アミノ酸配列を用いて、追加のヤタボックスウイルス関連gp38遺伝子およびホモログをRT-PCRによってクローン化することができる。

【0148】

本発明によって提供されるアミノ酸配列に基づき、制限部位を含有する縮重オリゴヌクレオチドプライマーを合成する。第一鎖cDNAは、目的の組織から調製されるRNAから合成し、そしてPCRは、Bluescript I I K S (Stratagene)中に引き続きサブクローン化することができるヤタボックスウイルス関連gp38 cDNAフラグメントを増幅するために、例えば、37で60秒間の最初の5サイクル工程後、50で60秒間の25サイクル(95で30秒間の変性および7290秒間の伸長)で行う。選択された組織から単離されるポリA RNAを用いたcDNAライブラリーの構築は、Stratagene ZAP Express Vectorを用いて、その製造者の指示にしたがって行う。可能性のあるクローンを、引き続き増幅させ、このcDNAライブラリー含有ファージのアリコート、Klenow酵素で³²P標識されたヤタボックスウイルスgp38 cDNAでスクリーニングする。単離されたファージミドは、引き続き、Applied Biosystems Instrumentation(373a型)およびダイ・ターミネータープロトコルを用いて、両鎖について自動配列決定を行う。配列分析は、例えば、Wisconsin大学遺伝学コンピューターグループ(Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)によって開発されたソフトウェアを用いて行う。

【0149】

種々の器官でのヤタボックスウイルスgp38 mRNA発現

種々の哺乳動物組織試料から単離される全RNAのノーザンブロット分析を行って、いずれかのヤタボックスウイルスgp38遺伝子、ホモログまたは誘導体の発現を検出する。脳、骨髄、皮膚、腸管、胃、心臓、胸腺、リンパ節、乳腺、骨格筋、舌、脾臓、肝、精巣および腎臓を含めた哺乳動物組織を分析する。同様に、脾臓から単離され且つ培養されるマクロファージ、肺上皮細胞系、および結腸腺癌細胞のような細胞系を、ヤタボックスウイルスgp38 mRNAの発現について分析する。

【0150】

DNAおよびRNA分析

RNAを、グアニジンイソシアネート中のCsCl遠心分離によって単離する(Chirgwin, et al. (1979) Biochemistry. 18:5294-9)。生物学的に活性なリボ核酸は、リボヌクレアーゼが濃縮された源から単離する。DNAも、これら勾配から単離する。ある場合には、RNAは、RNAzol(Biotecx Lab, Inc.)を用いて、その製造者の指示にしたがって単離する。ポリA RNAは、オリゴdTカラム(Pharmacia)を介する溶離によって富化させる。例えば、10μgの全RNA、2μgのポリA RNAまたは10μgの制限エンド

ヌクレアーゼ切断DNAを、アガロース中で電気泳動させ、Gene Screen (NEN Dupont) 膜に移す。膜は、翻訳されたタンパク質をコードする³²P標識された完全長cDNAまたはフラグメントとハイブリダイズするであろう。高ストリンジエントなハイブリダイゼーションは、例えば、50%ホルムアミド、10%硫酸デキストラン、5×SSC、1×デンハート溶液(0.0002%(w/v)ポリビニルピロリドン、0.0002%(w/v)BSA、0.0002%(w/v)Ficoll 400)、1%(w/v)SDS、100μg/ml変性ニシン精子DNAおよび20mMトリス中において42で行い、そして65において0.2×SSC、0.5%SDSでプロットを洗浄する。低ストリンジエントなハイブリダイゼーションは、例えば、0.6M NaCl、80mMトリスCl、4mMEDTA、0.1%(w/v)ピロリン酸ナトリウム、0.1%(w/v)SDS、10×デンハート、100μg/ml変性ニシン精子DNA中において50で行い、そして50において1×SSC、0.05%SDSで洗浄する。バンドハイブリダイゼーションの強度の定量は、Phosphor-Imager (Molecular Dynamics) を用いて決定するであろう。

【0151】

ヤタボックスウィルスgp38遺伝子分析

ヤタボックスウィルスgp38 cDNAのコーディング領域からのcDNAプローブを、Klenow酵素で³²P標識し且つ用いて、低ストリンジエントな条件下(0.6M NaCl、80mMトリスCl、4mMEDTA、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%SDS、10×デンハート溶液(0.002%ポリビニルピロリドン、0.002%BSA、0.002%Ficoll 400)、100μg/ml変性ニシン精子DNA中において50でのハイブリダイゼーションおよび50において1×SSC、0.05%SDSで洗浄されるプロット)において、哺乳動物ゲノムライブラリー(例えば、いろいろなライブラリーが、Stratagene, La Jolla, CAから入手可能である)から約 1×10^6 個のプラークをスクリーニングする。強くハイブリダイズするプラークを精製する。そのゲノムDNAを、適当な酵素での制限消化によってファージDNAから遊離させ、そしてpBlue-Script SK II (Stratagene)中にサブクローン化する。そのプローブとハイブリダイズする正に同定されるいずれかのゲノムフラグメントを、例えば、pBlue-Script KS II中にサブクローン化し、そしてApplied Biosystems Instrumentation (373a型)およびダイ・ターミネータープロトコールを用いて、両鎖について自動配列決定を行う。配列分析は、例えば、Wisconsin大学遺伝学コンピュータグループAltschul, et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990によって開発されたソフトウェアを用いて行う。

【0152】

ヤタボックスウィルスgp38遺伝子ホモログ染色体局在性は、遺伝子中で同定されるいずれかの多型の分析によって決定する。この多型に隣接するPCRプライマーは構築されるであろうし、ゲノムDNAをPCRによって増幅させる。これらプライマーを用いて、サイズ多型を同定する(例えば、Rowe, et al., Mamm. Gen. 5: 253-274, 1994を参照されたい)。

【0153】

同定されたゲノムフラグメントは、高ストリンジエントな条件下(50%ホルムアミド、10%硫酸デキストラン、5×SSC、1×デンハート溶液、1%SDS、100mcg/ml変性ニシン精子DNAおよび20mMトリス中において42でのハイブリダイゼーション、プロットを65において0.2×SSC、0.05%SDSで洗浄した)において、哺乳動物cDNA発現ライブラリー(Stratagene)をスクリーニングするのに用いることができる。正のプラークを同定し、精製し、そしてライブラリー製造者の指示にしたがってファージミドを製造する。これらインサートは、自動配列決定によって両鎖について完全に配列決定する。アラインメント分析は、Clustal法により、MegAlignソフトウェア(DNA STAR Inc)(Higgins, e

t a l . (1 9 8 8) G e n e 7 3 , 2 3 7 - 2 4 4) または他の標準的なソフトウェアを用いて決定されるであろう。

【0154】

タンパク質発現ベクターの構築およびトランスフェクション

PCRプライマーは、引き続きのサブクローニングに好都合な制限部位が隣接した、ヤタボックスウイルスg p 3 8 遺伝子またはそのホモログ若しくは誘導体のコーディング領域を増幅させるように設計する。PCRは、標準的な条件下において、ヤタボックスウイルスg p 3 8 cDNA - pBlueScriptを鋳型として用いて行う。次に、得られたPCR産物を、例えば、TAKクローニングキット(Invitrogen, San Diego, CA)を用いてサブクローン化し、そして確認の配列決定を行う。ヤタボックスウイルスg p 3 8 cDNAを、pcDNA-I/Amp(Invitrogen)の利用可能な制限部位中にサブクローン化する。約4 μgのヤタボックスウイルスg p 3 8 - pcDNA-I構築物を、約30%コンフルエントなCOS細胞が入っている100 mmプレート中に、DEAE-デキストランを用いてトランスフェクションさせる(Lopata, et al., Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717, 1984)。トランスフェクション効率を測定するために、COS細胞の重複培養(replicate)試料は、CMVプロモーター-胎盤アルカリ性ホスファターゼ制御プラスミドでトランスフェクションされるであろう(Fields-Berry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:693-697, 1992)。RNA発現は、ノーザン分析により、ヤタボックスウイルスg p 3 8 cDNAをプローブとして用いて確認する。ヤタボックスウイルスg p 3 8 - pcDNA-Iでトランスフェクションされたまたは模擬トランスフェクションされたCOS細胞上澄みを、72時間培養後に得、4 で貯蔵する。もう一組のトランスフェクション実験において、ヤタボックスウイルスg p 3 8 cDNAを、MoLTR-SV40I/PA発現ベクターの利用可能な部位中に同様にサブクローン化する(例えば、Luster, et al., J. Exp. Med. 178, 1057-1065, 1993を参照されたい)。20 μgの直鎖状ヤタボックスウイルスg p 3 8 - MoLTR構築物および1 μgの直鎖状ネオマイシン耐性プラスミドpSV7Neoを用いて、J558L細胞をエレクトロポレーションによってトランスフェクションする。単一ウェルからのG418耐性細胞を、ヤタボックスウイルスg p 3 8 mRNA発現についてノーザン分析によって分析する。ヤタボックスウイルスg p 3 8 タンパク質を発現する細胞または対照の(ヤタボックスウイルスg p 3 8 タンパク質を発現しない)非トランスフェクション細胞は、大量培養で増加するであろう。上澄み中のヤタボックスウイルスg p 3 8 タンパク質の濃度を最適にするために、それら細胞を、FCS不含RPMI中において高密度(1 × 10⁶ 個細胞/ml)で成長させ、72時間培養し、そしてその調整培地を、Centricon 3000マイクロコンセントレーター(Amicon, Beverly, MA)で5倍に濃縮後、貯蔵する。

【0155】

走化性検定

白血球、例えば、好酸球を単離する。具体的には、好酸球は、IL-5トランスジェニックマウスから単離することができる(Dent, et al., J. Exp. Med. 172:1425-1431, 1990)。これらマウスは巨脾症を発症し、好酸球が約30%の脾細胞の原因となっている。その脾臓から、免疫磁気分離を用いて混入している脾細胞を除去して、好酸球を精製する。簡単に言うと、脾細胞を、抗Thy-1(M5/49)、抗B220(6B2)および抗Lyt-2(53-6.7)で標識する。ハイブリドーマ細胞系は、例えば、American Type Culture Collectionから入手し、ハイブリドーマ細胞上澄みを抗体源として用いる。抗体で標識された細胞を、抗血清でコーティングされた磁気ビーズで処理するが、この抗血清は、一次抗体のアイソタイプに特異性を有し(M450, Dynal, Great Neck, NY)、そして好酸球を、磁場による負の選択によって濃縮させる。マクロファージ細胞は

、2.9%チオグリコラート(Difco, Detroit, CA)の腹腔内注射で(2日前に)予め処置されたマウスの腹膜腔から単離する。腹膜好中球は、ナトリウムカゼインで予め処置されたマウスから単離する(Luo, et al., J. Immun. 153, 4616-4624, 1994)。マクロファージおよび好中球は、Percoll勾配によって精製する(Luo, et al., J. Immun. 153, 4616-4624, 1994)。好酸球またはマクロファージを、0.05%BSAを含むHBSS中に 2×10^6 個細胞/mlでそれぞれ懸濁させ、50mlの重複培養細胞を、48ウェルマイクロ走化性チェンバー(Neuro Probe, Inc. Cabin John, MD)の最上部ウェル中に入れる。5 μ m細孔を有するポリカーボネートフィルターを用いて、それら細胞を、緩衝液(30ml)単独から、または組換えCOS細胞上澄みおよび正対照(例えば、MCP-1(Rollins, & Pober, Am. J. Path., 138, 1315-1319, 1991))および負対照(例えば、模擬トランスフェクションされたCOS細胞からの上澄み)を含有する緩衝液から分離し、その結果、比較を行うことができ、そしてヤタボックスウイルスgp38タンパク質の免疫抑制(走化性の阻害)性状を評価する。細胞を37 $^{\circ}$ Cで60分間(好酸球および好中球)または90分間(マクロファージ)インキュベートし、そしてフィルターを越えて移動し且つフィルターの底面に付着する細胞を、Diff-Quick(Baxter Scientific, McGaw Park, IL)で染色する。400 \times 視野当たりの細胞数を計数する。

【0156】

統計的分析

平均間の統計的有意差を、分散分析(ANOVA)によって決定する。P<0.05を有意とみなす。ANOVAが有意差を示す場合、Newman-Keuls試験を用いて、どの群が互いに有意に異なるかを決定する。

【0157】

他の実施態様

本明細書中に挙げられる公報および特許出願は全て、各々独立の公報または特許出願が、具体的に且つ個々に援用されると示された場合と同程度に、本明細書中に援用される。

【0158】

本発明をその具体的な実施態様に関連して記載してきたが、本発明が更に修正可能であること、および本出願が、概して、発明の理論にしたがって、および本発明が関する技術分野の範囲内の既知のまたは慣例の実務に入る且つ本明細書中の前に示された本質的な特徴に当てはめることができるような本開示からの逸脱を含めて、本発明のいずれの変更、使用または応用も包含するものであり、請求の範囲の範囲にしたがうということは理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、タナボックスウイルス(SEQ ID NO: 1)およびヤバサル腫瘍ウイルス(SEQ ID NO: 2)からのgp38の部分アミノ酸配列のアラインメントを示す。

【図2】図2は、ヤバサル腫瘍ウイルス(YMTV)からのgp38の部分アミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)および部分オープンリーディングフレームヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)を示す。

【図3】図3は、タナボックスウイルスからのgp38ポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)を示す。

【図4】図4は、タナボックスウイルスからのgp38の核酸配列(SEQ ID NO: 5)を示す。

【図5】図5は、ヤバ様疾患ウイルス(YLDV)からのgp38ポリペプチドのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 6)を示す。

【図6】図6は、ヤバ様疾患ウイルス(YLDV)からのgp38の核酸配列(SEQ ID NO: 7)を示す。

【 図 4 】

SEQ ID NO: 5

タナ gp38:

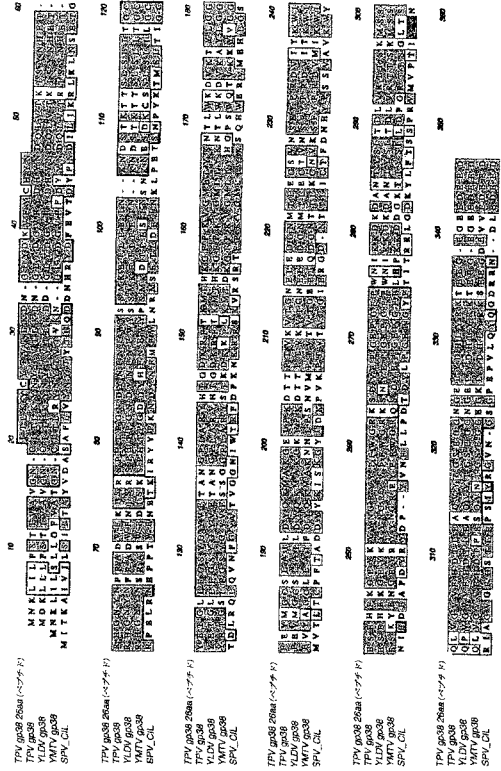
```

AAGCTTCATGAATAAAGTTAATAITTTAGCAACAATGTAGCAGTTTGTAACT
GCATAACTTTAAATAATAATTAATCTGTTACGTTAAAGATAAAGATAATGGTTATAC
GATGGAGTATTTACGATCATTACACCGATCAGTTAGTAAAGAAAATATCAT
ATAACCAAGAACTAGACACGAAACGTTAAATTTAGGGCTGATGGTTTAA
TATTTAGGAGTCCACACGCCAGGTAACGATTACAACTTTAACTTTGGT
ATTCITTAATGAAGAAGAACTTTAGAGAAATTAATAAAGGATAGCACAAA
AACTACTTCGGTTTCATTAATCACTGGGTTTATGAAACAGGATTAATTTG
GTAGTTATGGTATGTAGAAAACCGCCACCGCCGTTGCCAGATACCATAC
AGGAGATAAAGGTTTACGAAATGACACATAAAGGTTTCCCAAGGTTTGA
ATGTTAACTGTAAAAAACACTCTTTGGAAAGATGTAAAACCTTATCTAGGGG
GTTTTGAATACATGGGATGTCATTAAGCTATTTAGATTACCAA AAAATGGCT
AAAGGTCAATACCAAAGATACACACCTACAGTGAAGAAAGTAAACCGGTAAT
GAGTTAGAGATGGTAACATGACTTGAATGCAATGTTAAATTCATTTACCC
TCCTGACGTAATTAATAAGTGGATAGAAAAGCGAACATTTAAAGGTGAATAT
AAATAGTTAACGGAAAGTACTCCAGAAATGGGGAGAAAATCCGATTAATG
AGCCAGGAGGCCAGGTTTCCATGGAAATTAATAAAGATAAAGATGCGAA
ACACATATAGTTAAACAGATTAGTACGTACAACATCAAAAATAGTAGTCA
ACTAGTATGTGTTTCCATGACACTTTAGAACGCCAAGTTTATACTTGT
CTGAAGGATGCAATGGAGACTATACGACCCTATATAGAAAACACAGA
AGAGGAGAGGTTGAAGAGGATGAAGAAAGCGGAAACCCCTCGAG

```

【 図 9 】

クラスターW形式アラインメント



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/31115 A2

- (51) International Patent Classification: C12N (74) Agent: BIEKER-BRADY, Kristina; Clark & Elbing LLP, 176 Federal Street, Boston, MA 02110-2214 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/32136
- (22) International Filing Date: 11 October 2001 (11.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/239,354 11 October 2000 (11.10.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/239,354 (CIP) Filed on 11 October 2000 (11.10.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): VIRON THERAPEUTICS, INC. [CA/CA]; Suite 103, 100 Collip Circle, London, Ontario N6G 4X8 (CA).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): McFADDEN, Grant [CA/CA]; 1435 Corley Drive, South, London, Ontario N6G 2K5 (CA). ESSANI, Karim [US/US]; 9528 Autumnwood Circle, Kalamazoo, MI 49009 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/31115 A2

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES AND POLYPEPTIDES FOR IMMUNE MODULATION

(57) Abstract: The invention provides gp38 polypeptides, which play a role in immunomodulation, nucleic acid molecules encoding these polypeptides, and therapeutic and diagnostic methods employing these polypeptides and nucleic acid molecules. The invention also provides methods for identifying compounds that modulate the biological activities of gp38 nucleic acid molecules and polypeptides, and therapeutic methods employing these compounds.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

NUCLEIC ACID MOLECULES AND POLYPEPTIDES FOR IMMUNE

5

MODULATIONFIELD OF THE INVENTION

10 The invention generally relates to immunology, and specifically relates to the identification and use of novel viral genes as immune modulators.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 Viruses propagate by living within the cells of higher-order vertebrates. Accordingly, they have evolved to specifically avoid the host immune system. Virus survival is dependent upon strategies that can evade, suppress, counteract, or otherwise circumvent host responses to a foreign antigen. These host responses are a powerful element of evolutionary pressure; all eukaryotic viruses existing today contain remnants of their battles with the host immune system, as
20 evidenced by the presence of viral-encoded proteins that suppress the immune response or allow the virus to avoid immune system detection.

The specific strategy or strategies used by a virus varies dramatically according to its genome capacity. Viruses with small genomes ensure their survival by exploiting weaknesses or gaps in the host immune repertoire to avoid
25 detection. Alternatively or additionally, small viral genomes replicate rapidly, effectively outpacing the host immune response. Larger DNA viruses (*e.g.*, adenoviruses, herpesviruses, iridoviruses, and poxviruses) specifically encode proteins that function to protect the virus from immune recognition and/or clearance by the infected host. Such "subversive" viral proteins are useful
30 therapeutics for the treatment of inflammatory and autoimmune disorders. Poxviruses, in particular, have been a rich source of such immunomodulatory proteins.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

The *Yatapoxvirus* genus of poxviruses includes Tanapox virus (TPV), Yaba monkey tumor virus (YMTV), and Yaba-like disease (YLD) virus (Knight *et al.*, *Virology* 172:116-124, 1989). Both TPV and YMTV contain a linear double-stranded, approximately 145 kbp DNA genome (Essani *et al.*, *Microbial Pathogenesis* 17:347-353, 1994; Knight *et al.*, *supra*). TPV produces a mild disease in humans, characterized by transient fever, one or more nodular skin lesions, and regional lymphadenopathy, while YMTV causes benign tumors in monkeys and humans (Paulose *et al.*, *Microbial Pathogenesis* 25:33-41, 1998; Amano *et al.*, *Journal of General Virology* 76:1109-1115, 1995). A 38 kDa secreted glycoprotein from TPV-induced cells has been reported to specifically bind and neutralize three human cytokines, namely interferon- γ , interleukin-2, and interleukin-5 (Essani *et al.*, *supra*).

It would be useful to identify novel viral immunomodulatory genes and polypeptides for the treatment of immunological disorders.

15

SUMMARY OF THE INVENTION

In general, the present invention provides immunomodulatory gp38 polypeptides, nucleic acid molecules encoding these polypeptides, and therapeutic, diagnostic, and screening methods employing these polypeptides and nucleic acid molecules. The invention also provides methods for identifying compounds that modulate the biological activities of gp38 nucleic acid molecules and polypeptides, and therapeutic methods employing these compounds.

The present invention provides novel *Yatapoxvirus* immunomodulatory gp38 polypeptides, nucleic acid molecules encoding these polypeptides, and therapeutic, diagnostic, and screening methods employing these polypeptides and nucleic acid molecules. The invention also provides methods for identifying compounds that modulate the biological activities of *Yatapoxvirus* gp38 nucleic acid molecules and polypeptides, and therapeutic methods employing these compounds.

30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

In a first aspect, the invention provides a substantially pure *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide. In preferred embodiments of the first aspect, the polypeptide can be derived from yaba monkey tumor virus or from tanapox virus. In another preferred embodiment of the first aspect, the polypeptide includes an amino acid sequence that encodes an identifiable signal sequence. In another preferred embodiment of the first aspect, the polypeptide can be a chemokine (e.g. of human interferon- γ , human interleukin-2, and human interleukin-5) binding polypeptide, a cytokine binding polypeptide, an immunomodulator, or an anti-inflammatory polypeptide. In other preferred embodiments of the first aspect, the polypeptide can be glycosylated or have anti-cytokine activity. In other preferred embodiments of the first aspect, the polypeptide may include an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or may include the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

In a second aspect, the invention provides a substantially pure *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule encoding a *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide. In preferred embodiments of the second aspect, the nucleic acid molecule can be genomic DNA, cDNA, or mRNA. In another preferred embodiment of the second aspect, the nucleic acid molecule includes a nucleotide sequence that encodes a polypeptide with an identifiable signal sequence. In other preferred embodiments of the second aspect, the nucleic acid molecule can encode a yaba monkey tumor virus polypeptide or a tanapox virus polypeptide, encode a polypeptide including an amino sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or encode a polypeptide including the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. In other preferred embodiments of the second aspect, the nucleic acid molecule can include a nucleotide sequence that is substantially identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 9.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

In other preferred embodiments of the second aspect, the invention provides a vector (e.g. a gene therapy vector) including the substantially pure *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule encoding a *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide, and a cell containing this vector. The *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule in the vector can be operably linked to regulatory sequences for expression of a *Yatapoxvirus* polypeptide and the regulatory sequences can include a promoter. The cell can be a human cell, a primate cell, or a rodent cell.

In other preferred embodiments of the second aspect, the invention provides a non-human transgenic animal containing the substantially pure *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule encoding a *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide, and a cell from the non-human transgenic animal.

In other preferred embodiments of the second aspect, the invention provides a method of detecting a *Yatapoxvirus* gene or a *Yatapoxvirus* gene homolog or fragment thereof in a cell by contacting the substantially pure *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule encoding a *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide, or a fragment thereof, where the fragment is greater than about 18 nucleotides in length, with a preparation of genomic DNA from the cell, under hybridization conditions providing detection of DNA sequences having about 50% or greater nucleotide sequence identity to SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, or SEQ ID NO: 9.

In a third aspect, the invention provides a nucleic acid molecule having at least 50% nucleic acid sequence identity to a sequence encoding a *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide or a fragment thereof, where the fragment includes at least six amino acids and the nucleic acid molecule hybridizes under high stringency conditions to at least a portion of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule. In a preferred embodiment of the third aspect, the nucleic acid molecule has 100% complementarity to a nucleic acid molecule encoding a *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide or a fragment thereof including at least six amino acids, and the nucleic acid molecule hybridizes under high stringency conditions to at least a portion of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

In a fourth aspect, the invention provides a nucleic acid molecule, where the nucleic acid molecule includes a sequence that is antisense to the coding strand of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule or a fragment thereof.

5 In a fifth aspect, the invention provides a non-human transgenic animal having a knockout mutation in one or both alleles encoding a polypeptide substantially identical to a *Yatapoxvirus* polypeptide.

In a sixth aspect, the invention provides an antibody that specifically binds to a *Yatapoxvirus* polypeptide, for example, a polypeptide that includes an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. In a preferred
10 embodiment of the sixth aspect, the invention provides a method of detecting a *Yatapoxvirus* polypeptide in a sample by contacting the sample with the antibody, and assaying for the binding of the antibody to the polypeptide.

In a seventh aspect, the invention provides a probe for analyzing a
15 *Yatapoxvirus* gene or a *Yatapoxvirus* gene homolog or fragment thereof, the probe having at least 50% nucleotide sequence identity to a sequence encoding a *Yatapoxvirus* polypeptide or fragment thereof, where the fragment includes at least six amino acids, and the probe hybridizes under high stringency conditions to at least a portion of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule. In a preferred
20 embodiment of the seventh aspect, the probe has 100% complementarity to a nucleic acid molecule encoding a *Yatapoxvirus* polypeptide or fragment thereof, where the fragment includes at least six amino acids, and the probe hybridizes under high stringency conditions to at least a portion of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule.

25 In an eighth aspect, the invention provides a method of identifying an immunomodulatory *Yatapoxvirus* gene or a *Yatapoxvirus* immunomodulatory gene homolog or fragment thereof by: (a) providing a mammalian cell sample; (b) introducing into the cell sample a candidate gene; (c) expressing the candidate gene; and (d) determining whether the candidate gene elicits an alteration in the
30 level of immune function in the cell sample, where an alteration in the level of

WO 02/31115

PCT/US01/32136

immune function identifies the immunomodulatory *Yatapoxvirus* gene or the *Yatapoxvirus* immunomodulatory gene homolog, or fragment thereof.

In a ninth aspect, the invention provides a method for identifying a test compound that modulates the expression or activity of a *Yatapoxvirus* polypeptide, by contacting the *Yatapoxvirus* polypeptide with the test compound, and determining the effect of the test compound on the *Yatapoxvirus* polypeptide expression or activity.

In a tenth aspect, the invention provides a method for identifying a test compound that modulates the expression or activity of a *swinepox* (CIL) polypeptide, by contacting the *swinepox* (CIL) polypeptide with the test compound, and determining the effect of the test compound on the *swinepox* (CIL) polypeptide expression or activity.

In an eleventh aspect, the invention provides a method of targeting proteins for secretion from a cell by attaching an identifiable signal sequence selected from a *Yatapoxvirus* polypeptide to a protein of interest, where the protein of interest is secreted from the cell.

In a twelfth aspect, the invention provides a method of targeting proteins for secretion from a cell by attaching an identifiable signal sequence selected from a *swinepox* (CIL) polypeptide to a protein of interest, where the protein of interest is secreted from the cell.

In a thirteenth aspect, the invention provides a method of immunomodulation in a mammal by administering to the mammal a therapeutically effective amount of a *Yatapoxvirus* polypeptide or fragment thereof, where the polypeptide has an immunomodulatory effect in the mammal.

In a fourteenth aspect, the invention provides a method of immunomodulation in a mammal by administering to the mammal a therapeutically effective amount of a *swinepox* (CIL) polypeptide or fragment thereof, where the polypeptide has an immunomodulatory effect in the mammal.

In a fifteenth aspect, the invention provides a method of immunomodulation in a mammal by administering to the mammal a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of a

WO 02/31115

PCT/US01/32136

Yatapoxvirus polypeptide, where the compound has an immunomodulatory effect in the mammal.

In a sixteenth aspect, the invention provides a method of immunomodulation in a mammal by administering to the mammal a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of a *swinepox* (CIL) polypeptide, where the compound has an immunomodulatory effect in the mammal.

The immunomodulation of the thirteenth through sixteenth aspects can be immunosuppression, immunostimulation, cell proliferation, apoptosis, decreasing T cell stimulation, or decreasing inflammation in a mammal.

In an eighteenth aspect, the invention provides a method of treating a mammal having an immunomodulatory disorder, by administering to the mammal a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of a *swinepox* (CIL) polypeptide, where the compound has an immunomodulatory effect in the mammal.

In a nineteenth aspect, the invention provides a pharmaceutical composition including at least one dose of a therapeutically effective amount of a *Yatapoxvirus* polypeptide or fragment thereof, in a pharmaceutically acceptable carrier, the composition being formulated for the treatment of an immunomodulatory disorder.

In a twentieth aspect, the invention provides a pharmaceutical composition including at least one dose of a therapeutically effective amount of a *swinepox* (CIL) polypeptide or fragment thereof, in a pharmaceutically acceptable carrier, the composition being formulated for the treatment of an immunomodulatory disorder.

In preferred embodiments of the thirteenth to twentieth aspects, the *Yatapoxvirus* polypeptide includes an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, or SEQ ID NO: 8, and fragments and analogs thereof.

30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

In other preferred embodiments of the thirteenth to twentieth aspects, the mammal is a human. In other preferred embodiments of the thirteenth to twenty-first aspects, the mammal has a condition selected from the group consisting of acute inflammation, rheumatoid arthritis, transplant rejection, asthma,

- 5 inflammatory bowel disease, uveitis, restenosis, multiple sclerosis, psoriasis, wound healing, lupus erythematosus, allergic rhinitis, atopic dermatitis, food allergies, type 1 insulin-dependent diabetes mellitus, dermatitis, meningitis, thrombotic thrombocytopenic purpura, Sjogren's syndrome, encephalitis, leukocyte adhesion deficiency, rheumatic fever, Reiter's syndrome, psoriatic
10 arthritic, progressive systemic sclerosis, primary biliary cirrhosis, pemphigus, pemphigoid, necrotizing vasculitis, myasthenia gravis, lupus erythematosus, polymyositis, sarcoidosis, granulomatosis, vasculitis, pernicious anemia, CNS inflammatory disorder, antigen-antibody complex mediated diseases, autoimmune hemolytic anemia, Hashimoto's thyroiditis, Graves disease, habitual spontaneous
15 abortions, Reynard's syndrome, glomerulonephritis, dermatomyositis, chronic active hepatitis, celiac disease, autoimmune complications of AIDS, atrophic gastritis, ankylosing spondylitis, Addison's disease, psoriasis, pemphigus vulgaris, Behcet's syndrome, acute respiratory distress syndrome (ARDS), ischemic heart disease, atherosclerosis, post-dialysis syndrome, leukemia, acquired immune
20 deficiency syndrome septic shock, lipid histiocytosis, and cancer.

In twenty-first and twenty-second aspects, the invention provides a kit for the analysis of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule, the kit including a nucleic acid molecule probe for analyzing a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule present

- 25 in a test subject, or including an antibody for analyzing a *Yatapoxvirus* polypeptide present in a test subject.

The invention provides several advantages. For example, it provides methods and reagents that can be used in the diagnosis and treatment of immune diseases that are sensitive to the bioactivities of *Yatapoxvirus* or *swinepox* (CIL) gp38 polypeptides. Other features and advantages of the invention will be
30 apparent from the detailed description of the invention, the drawings, and the claims.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

5 **Figure 1** shows an alignment of partial amino acid sequences of gp38 from tanapox virus (SEQ ID NO: 1) and yaba monkey tumor virus (SEQ ID NO: 2).

Figure 2 shows a partial amino acid sequence (SEQ ID NO: 2) and partial open reading frame nucleotide sequence (SEQ ID NO: 3) of gp38 from yaba monkey tumor virus (YMTV).

10 **Figure 3** shows the amino acid sequence of gp38 polypeptide from tanapox virus (SEQ ID NO: 4).

Figure 4 shows the nucleic acid sequence of gp38 from tanapox virus (SEQ ID NO: 5).

15 **Figure 5** shows the amino acid sequence of gp38 polypeptide from yaba-like disease virus (YLDV) (SEQ ID NO: 6).

Figure 6 shows the nucleic acid sequence of gp38 from yaba-like disease virus (YLDV) (SEQ ID NO: 7).

Figure 7 shows the amino acid sequence of gp38 polypeptide from *swinepox* virus (CIL) (SEQ ID NO: 8).

20 **Figure 8** shows the nucleic acid sequence of gp38 from *swinepox* virus (CIL) (SEQ ID NO: 9).

Figure 9 shows the sequence similarity of the various polypeptide amino acid sequences.

25 **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

The invention provides gp38 polypeptides and in *swinepox* polypeptide, which play a role in immunomodulation, nucleic acid molecules encoding these polypeptides, and therapeutic and diagnostic methods employing these
30 polypeptides and nucleic acid molecules. The invention also provides methods for identifying compounds that modulate the biological activities of gp38 and

WO 02/31115

PCT/US01/32136

swinepox nucleic acid molecules and polypeptides, and therapeutic methods employing these compounds.

"Polypeptide" or "polypeptide fragment" means a chain of two or more amino acids, regardless of any post-translational modification (*e.g.*, glycosylation, acetylation, or phosphorylation), constituting all or part of a naturally or non-naturally occurring polypeptide. By "post-translational modification" is meant any change to a polypeptide or polypeptide fragment during or after synthesis. Post-translational modifications can be produced naturally (such as during synthesis within a cell) or generated artificially (such as by recombinant or chemical means). A "protein" can be made up of one or more polypeptides.

"*Yatapoxvirus* gp38 immunomodulatory polypeptide" or "*Yatapoxvirus* gp38 polypeptide" means a *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide or protein having immunomodulatory activity that is substantially identical to the polypeptide sequences described herein, or a biologically-active fragment or analog thereof. *Yatapoxviruses* have been described in, for example, Essani *et al.* (*Microbial Pathogenesis* 17:347-353, 1994), Knight *et al.* (*Virology* 172:116-124, 1989), Paulose *et al.* (*Microbial Pathogenesis* 25:33-41, 1998), and Amano *et al.* (*Journal of General Virology* 76:1109-1115, 1995), herein incorporated by reference. Specifically included in the invention are Yaba monkey tumor virus (YMTV) and tanapox virus (TPV) gp38 polypeptides.

A *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide may also be defined as encoding a polypeptide with at least 50%, preferably at least 75%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 95% of the biological activity, *e.g.*, immunomodulatory or anti-inflammatory activity, compared to a reference *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide having an amino acid sequence substantially identical to those described herein. The term *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide includes homologs, *e.g.*, mammalian homologs of *Yatapoxvirus* gp38 proteins as well as allelic variations, natural mutants, induced mutants, proteins encoded by DNAs that hybridize to the *Yatapoxvirus* gp38 sequences described herein under high stringency conditions, and polypeptides or proteins specifically-bound by

WO 02/31115

PCT/US01/32136

antisera directed to a *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide. The term also includes chimeric polypeptides that include a *Yatapoxvirus* gp38 fragment.

"*Swinepox* virus (CIL) gp38 immunomodulatory polypeptide" or "*swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide" means a *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide or protein having immunomodulatory activity that is substantially identical to the polypeptide sequences described herein, or a biologically-active fragment or analog thereof.

A *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide may also be defined as encoding a polypeptide with at least 50%, preferably at least 75%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 95% of the biological activity, e.g., immunomodulatory or anti-inflammatory activity, compared to a reference *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide having an amino acid sequence substantially identical to those described herein. The term *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide includes homologs, e.g., mammalian homologs of *swinepox* virus (CIL) gp38 proteins as well as allelic variations, natural mutants, induced mutants, proteins encoded by DNAs that hybridize to the *swinepox* virus (CIL) gp38 sequences described herein under high stringency conditions, and polypeptides or proteins specifically-bound by antisera directed to a *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide. The term also includes chimeric polypeptides that include a *swinepox* virus (CIL) gp38 fragment.

By "biologically-active fragment" is meant a polypeptide fragment of a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide that exhibits immunomodulatory properties that are at least 30%, preferably at least 50%, more preferably at least 75%, and most preferably at least 95% of the immunomodulatory properties of a full length *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide. As used herein, the term "fragment" means at least 10 contiguous amino acids, preferably at least 30 contiguous amino acids, more preferably at least 50 contiguous amino acids, and most preferably at least 60 to 80 or more contiguous amino acids. Fragments of *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 proteins can be generated by methods known to those skilled in the art or may result from normal protein processing (e.g., removal of amino acids

WO 02/31115

PCT/US01/32136

from the nascent polypeptide that are not required for biological activity or removal of amino acids by alternative mRNA splicing or alternative protein processing events).

By "analog" is meant any substitution, addition, or deletion in the amino acid sequence of a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide that exhibits properties that are at least 30%, preferably at least 50%, more preferably at least 75%, and most preferably at least 95% of the immunomodulatory properties of a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide from which it is derived. Analogs can differ from the naturally occurring *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein by amino acid sequence differences, by post-translational modifications, or by both. Analogs of the invention are substantially identical to a naturally occurring *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 sequence. Modifications include *in vivo* and *in vitro* chemical derivatization of polypeptides, *e.g.*, acetylation, carboxylation, phosphorylation, or glycosylation. Such modifications may occur during polypeptide synthesis or processing or following treatment with isolated modifying enzymes. Analogs can also differ from the naturally occurring *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide by alterations in primary sequence. These include genetic variants, both natural and induced (for example, resulting from random mutagenesis by irradiation or exposure to ethanemethylsulfate or by site-specific mutagenesis as described in Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed.), CSH Press, 1989, hereby incorporated by reference; or Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1994, hereby incorporated by reference). Also included are cyclized peptides molecules and analogs that contain residues other than L-amino acids, *e.g.*, D-amino acids or non-naturally occurring or synthetic amino acids. Fragments and analogs can be generated using standard techniques, for example, solid phase peptide synthesis or polymerase chain reaction.

"*Yatapoxvirus* gp38 nucleic acid molecule" means a nucleic acid molecule, such as a genomic DNA, cDNA, or RNA (*e.g.*, mRNA) molecule that encodes a polypeptide having the characteristics or biological activities of any *Yatapoxvirus*

WO 02/31115

PCT/US01/32136

gp38 polypeptide described herein, or a fragment or analog thereof. A *Yatapoxvirus* gp38 nucleic acid molecule is substantially identical to a reference *Yatapoxvirus* gp38 nucleic acid molecule, as described herein.

5 "Swinepox virus (C1L) gp38 nucleic acid molecule" means a nucleic acid molecule, such as a genomic DNA, cDNA, or RNA (*e.g.*, mRNA) molecule that encodes a polypeptide having the characteristics or biological activities of any *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide described herein, or a fragment or analog thereof. A *swinepox* virus (C1L) gp38 nucleic acid molecule is substantially identical to a reference *swinepox* virus (C1L) gp38 nucleic acid molecule, as
10 described herein.

The term "identity" is used herein to describe the relationship of the sequence of a particular nucleic acid molecule or polypeptide to the sequence of a reference molecule of the same type. For example, if a polypeptide or nucleic acid molecule has the same amino acid or nucleotide residue at a given position,
15 compared to a reference molecule to which it is aligned, there is said to be "identity" at that position. The level of sequence identity of a nucleic acid molecule or a polypeptide to a reference molecule is typically measured using sequence analysis software with the default parameters specified therein, such as the introduction of gaps to achieve an optimal alignment (*e.g.*, Sequence Analysis
20 Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705, BLAST, or PILEUP/PRETTYBOX programs). These software programs match identical or similar sequences by assigning degrees of identity to various substitutions, deletions, or other modifications. Conservative substitutions typically include
25 substitutions within the following groups: glycine, alanine, valine, isoleucine, and leucine; aspartic acid, glutamic acid, asparagine, and glutamine; serine and threonine; lysine and arginine; and phenylalanine and tyrosine.

A nucleic acid molecule or polypeptide is said to be "substantially identical" to a reference molecule if it exhibits, over its entire length, at least 50%
30 or 55% identity, preferably at least 60%, 65%, or 68% identity, more preferably at least 75% or 85% identity, and most preferably at least 90%, 95%, or 99%

WO 02/31115

PCT/US01/32136

identity to the sequence of the reference molecule. For polypeptides, the length of comparison sequences is at least 16 amino acids, preferably at least 20 amino acids, more preferably at least 25 amino acids, and most preferably at least 35 amino acids. For nucleic acid molecules, the length of comparison sequences is at least 50 nucleotides, preferably at least 60 nucleotides, more preferably at least 75 nucleotides, and most preferably at least 110 nucleotides.

Alternatively, or additionally, two nucleic acid sequences are "substantially identical" if they hybridize under high stringency conditions. By "high stringency conditions" is meant conditions that allow hybridization comparable with the hybridization that occurs using a DNA probe of at least 500 nucleotides in length, in a buffer containing 0.5 M NaHPO₄, pH 7.2, 7% SDS, 1 mM EDTA, and 1% BSA (fraction V), at a temperature of 65°C, or a buffer containing 48% formamide, 4.8X SSC, 0.2 M Tris-Cl, pH 7.6, 1X Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 0.1% SDS, at a temperature of 42°C. (These are typical conditions for high stringency northern or Southern hybridizations.) High stringency hybridization is also relied upon for the success of numerous techniques routinely performed by molecular biologists, such as high stringency PCR, DNA sequencing, single strand conformational polymorphism analysis, and *in situ* hybridization. In contrast to northern and Southern hybridizations, these techniques are usually performed with relatively short probes (*e.g.*, usually 16 nucleotides or longer for PCR or sequencing and 40 nucleotides or longer for *in situ* hybridization). The high stringency conditions used in these techniques are well known to those skilled in the art of molecular biology, and examples of them can be found, for example, in Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, 1998, which is hereby incorporated by reference.

By "probe" or "primer" is meant a single-stranded DNA or RNA molecule of defined sequence that can base pair to a second DNA or RNA molecule that contains a complementary sequence ("target"). The stability of the resulting hybrid depends upon the extent of the base pairing that occurs. This stability is affected by parameters such as the degree of complementarity between the probe

WO 02/31115

PCT/US01/32136

and target molecule, and the degree of stringency of the hybridization conditions. The degree of hybridization stringency is affected by parameters such as the temperature, salt concentration, and concentration of organic molecules, such as formamide, and is determined by methods that are well known to those skilled in the art. Probes or primers specific for *Yatapoxvirus* gp38 nucleic acid molecules, preferably, have greater than 45% sequence identity, more preferably at least 55-75% sequence identity, still more preferably at least 75-85% sequence identity, yet more preferably at least 85-99% sequence identity, and most preferably 100% sequence identity to the nucleic acid sequences encoding the amino acid sequences described herein. Probes can be detectably-labeled, either radioactively or non-radioactively, by methods that are well-known to those skilled in the art. Probes can be used for methods involving nucleic acid hybridization, such as nucleic acid sequencing, nucleic acid amplification by the polymerase chain reaction, single stranded conformational polymorphism (SSCP) analysis, restriction fragment polymorphism (RFLP) analysis, Southern hybridization, northern hybridization, *in situ* hybridization, electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and other methods that are well known to those skilled in the art. A molecule, *e.g.*, an oligonucleotide probe or primer, a gene or fragment thereof, a cDNA molecule, a polypeptide, or an antibody, can be said to be "detectably-labeled" if it is marked in such a way that its presence can be directly identified in a sample. Methods for detectably-labeling molecules are well known in the art and include, without limitation, radioactive labeling (*e.g.*, with an isotope, such as ³²P or ³⁵S) and nonradioactive labeling (*e.g.*, with a fluorescent label, such as fluorescein).

"Identifiable signal sequence" means a sequence of amino acids that may be identified by homology, or biological activity, to a peptide sequence with the known function of targeting a polypeptide to a particular region of the cell. Preferably the signal sequence directs the polypeptide to the cellular membrane such that the polypeptide is secreted. Alternatively, the signal sequence may direct the polypeptide to an intracellular compartment or organelle, such as the Golgi apparatus. One of ordinary skill in the art can identify a signal sequence by

WO 02/31115

PCT/US01/32136

using readily available software (*e.g.*, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705, BLAST, or PILEUP/PRETTYBOX programs). An identifiable signal sequence can be one that is, for example, substantially identical to a sequence that results in cleavage between amino acids 17 and 18 of YMTV gp38 (SEQ ID NO: 2).

By a "substantially pure polypeptide" is meant a polypeptide (or a fragment or analog thereof) that has been separated from proteins and organic molecules that naturally accompany it. Typically, a polypeptide is substantially pure when it is at least 60%, by weight, free from the proteins and naturally-occurring organic molecules with which it is naturally associated. Preferably, the polypeptide is a *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide that is at least 75%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 99%, by weight, pure. A substantially pure *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide can be obtained, for example, by extraction from a natural source (*e.g.*, an infected mammalian cell), by expression of a recombinant nucleic acid molecule encoding a *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide, or by chemical synthesis. Purity can be measured by any appropriate method, *e.g.*, by column chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, or HPLC analysis.

A polypeptide is substantially free of naturally associated components when it is separated from those proteins and organic molecules that accompany it in its natural state. Thus, a protein that is chemically synthesized or produced in a cellular system different from the cell in which it is naturally produced is substantially free from its naturally associated components. Accordingly, substantially pure polypeptides not only include those derived from eukaryotic organisms, but also those synthesized in expression systems, for example, *E. coli* or other prokaryotes, yeast, or insect cells.

"Substantially pure nucleic acid molecule" means a nucleic acid molecule that is free of the components that naturally accompany it. For example, a substantially pure DNA is free of the genes that, in the naturally-occurring genome of the organism from which the DNA of the invention is derived, flank

WO 02/31115

PCT/US01/32136

the gene. The term therefore includes, for example, a recombinant DNA which is incorporated into a vector; into an autonomously replicating plasmid or virus; or into the genomic DNA of a prokaryote or eukaryote; or that exists as a separate molecule (*e.g.*, a cDNA or a genomic or cDNA fragment produced by PCR or restriction endonuclease digestion) independent of other sequences. It also includes a recombinant DNA that is part of a hybrid gene encoding additional polypeptide sequence.

A nucleic acid molecule that is "antisense," means a nucleic acid molecule having a sequence that is complementary to at least 75 nucleotides, and preferably at least 100, 150, or 200 nucleotides, of the coding strand of a gene or nucleic acid molecule, such as a *Yatapoxvirus* gp38 gene or nucleic acid molecule. An antisense nucleic acid molecule can be, for example, capable of preferentially lowering the production of a *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide encoded by a *Yatapoxvirus* gp38 gene or nucleic acid molecule.

By "vector" is meant a genetically engineered plasmid or virus, derived from, for example, a bacteriophage, adenovirus, retrovirus, poxvirus, herpesvirus, or artificial chromosome, that is used to transfer a polypeptide (*e.g.*, a *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide) coding sequence, operably linked to a promoter, into a host cell, such that the encoded peptide or polypeptide is expressed within the host cell. A vector may be a gene therapy vector, *i.e.*, a vector designed to transfer genetic material into the cells of a patient for a therapeutic benefit.

Vectors generally contain regulatory sequences, including promoters, operably linked to the polypeptide coding sequences. A "promoter" is a minimal nucleic acid sequence element sufficient to direct transcription. If desired, constructs of the invention can include promoter elements that are sufficient to render promoter-dependent gene expression controllable in a cell type-specific, tissue-specific, or temporal-specific manner, or inducible by external signals or agents. Such elements can be located in the 5', 3', or intron regions of a gene. Sequences are "operably linked" when a gene and one or more regulatory sequences are connected in such a way as to permit gene expression when the

WO 02/31115

PCT/US01/32136

appropriate molecules (e.g., transcriptional activator proteins) are bound to the regulatory sequences.

By a "transgene" is meant a DNA molecule that is inserted by artifice into a cell (e.g., the nuclear genome of a cell), and is incorporated into the genome of
5 an organism that develops from the cell. Such a transgene can be partly or entirely heterologous (i.e., foreign) to the transgenic organism, or can be a gene that is homologous to an endogenous gene of the organism. An organism or animal (e.g., a mammal, such as a mouse, rat, pig, or goat) can be said to be
10 "transgenic" if it developed from a cell that had a transgene inserted into it by artifice.

By a "knockout mutation" is meant an artificially-induced alteration in a nucleic acid molecule (created by recombinant DNA technology or deliberate exposure to a mutagen) that reduces the biological activity of the polypeptide normally encoded therefrom by at least 80% relative to the unmutated gene. The
15 mutation can be, without limitation, an insertion, deletion, frameshift mutation, or a missense mutation. A "knockout animal" is preferably a mammal, and more preferably a mouse, containing a knockout mutation, as defined above.

An antibody is said to "specifically bind" to a polypeptide if it recognizes and binds the polypeptide (e.g., a *Yatapoxvirus* polypeptide), but does not
20 substantially recognize and bind other molecules (e.g., non-*Yatapoxvirus* gp38-related polypeptides) in a sample, e.g., a biological sample, that naturally includes the polypeptide. A preferred antibody binds to any *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide sequence that is substantially identical to the polypeptide sequences shown herein, or fragments thereof.

By "sample" is meant a tissue biopsy, amniotic fluid, cell, blood, serum, urine, stool, or other specimen obtained from a patient or test subject. The sample can be analyzed to detect a mutation in a *Yatapoxvirus* gp38 gene, expression levels of a *Yatapoxvirus* gp38 gene or polypeptide, or the biological
25 function of a *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide, by methods that are known in the art. For example, methods such as sequencing, single-strand conformational polymorphism (SSCP) analysis, or restriction fragment length polymorphism
30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

(RFLP) analysis of PCR products derived from a patient sample can be used to detect a mutation in a *Yatapoxvirus* gp38 gene; ELISA can be used to measure levels of *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide; and PCR can be used to measure the level of a *Yatapoxvirus* gp38 nucleic acid molecule.

5 "Immune function" or "immunoreactivity" refers to the ability of the immune system to respond to a foreign antigen as measured by standard assays. "Modulate" or "modulating" means the induction of a quantitative change, either by decrease or increase, in the response of a target cell, sample, or organism, as a result of an interaction with a *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide or nucleic acid
10 molecule or test compound. The increase or decrease is by at least 10%, preferably by at least 20%, more preferably by at least 50%, still more preferably by at least 75%, yet more preferably by at least 95% and most preferably by at least 100% relative to an untreated control organism, sample, or molecule.

"Immunomodulation" or "immunomodulatory" refers to an alteration in the
15 overall immunoreactivity of the immune system in a mammal, or alteration in the response of a cell, relative to an untreated control of the same type, upon treatment with an agent, such as a polypeptide or nucleic acid molecule of the present invention, or fragments and analogs thereof. Immunomodulation can be assayed using immune cells, for example, B cells, T cells, antigen-presenting
20 cells, or any other cell that is involved in immune function. Immunomodulation can also be assayed by determining expression and/or activity of immune-related genes and proteins, or immune-related compounds, such as cytokines, cytokine receptors, immunoglobulins, etc.

"Immunosuppression" refers to a decrease in the overall immunoreactivity
25 of the immune system upon administration of an immunomodulator in comparison to the immunoreactivity of an immune system that has not been contacted with the particular immunomodulator. "Immunostimulation" refers to a increase in the overall immunoreactivity of the immune system upon administration of an immunomodulator in comparison to the immunoreactivity of
30 an immune system that has not been contacted with the particular immunomodulator. "Decreasing T cell stimulation" means lowering the level of

WO 02/31115

PCT/US01/32136

T cell stimulation as measured by, for example, a chromium release assay.

"Decreasing inflammation" means decreasing the number of inflammatory cells (leukocytes, for example eosinophils) in the target tissue by, preferably, two-fold.

By "cell proliferation" is meant the growth or reproduction of similar cells. By

5 "apoptosis" is meant the process of cell death where a dying cell displays a set of well-characterized biochemical hallmarks which include cytolemmal blebbing, cell soma shrinkage, chromatin condensation, and DNA laddering.

"Immunomodulator" refers to an agent that induces an immunomodulatory effect or alteration (*i.e.*, immunosuppression, immunostimulation, *etc.*) as

10 measured, for example, by an alteration of virulence in mutated viruses or a variety of immunoassays well known in the art (for example, chemotaxis assays as described herein). For example, in the present invention, an immunomodulator may elicit an altered level of immune function, such that the alteration in the level of immune function identifies a *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide. An "anti-

15 inflammatory" agent is an immunomodulatory agent capable of decreasing the overall inflammation or immune function upon administration to an individual.

Preferably, the increase or decrease is by at least 10%, preferably by at least 20%, more preferably by at least 50%, still more preferably by at least 75%, yet more preferably by at least 95% and most preferably by at least 100% relative

20 to an untreated control organism, sample, or molecule.

By "immunomodulatory disorder" or "immunological disorder" is meant any pathophysiological condition (*i.e.*, a disturbance of function and/or structure of a living organism, resulting from an external source, a genetic predisposition, a physical or chemical trauma, or a combination of the above, including, but not

25 limited to, any mammalian disease) that is characterized by an alteration in immune function.

The alteration may include, for example, a decrease in immune cell number or size, an increase in cell apoptosis or death, or a decrease in immune cell growth, survival or differentiation. Immunological disorders include any

30 disease that involve the immune response or immunity in general. More specifically, such a disorder is a malfunction of the immune system that reduces

WO 02/31115

PCT/US01/32136

the ability of an organism to resist foreign substances in the body (e.g., viruses, bacteria, bacterial toxins, plant pollen, fungal spores, animal danders, medications, foods, or allogeneic or xenogeneic transplanted organs) or causes the body to produce antibodies against its own tissues (e.g., autoimmune disorders), resulting in tissue injury, or causes cancer. Immunological disorders can also occur when a malfunctioning immune system (caused by, for example, genetic defect, illness, injury, malnutrition, or medications, such as those used for chemotherapy) results in an increase in frequency or severity of infections. Immunological disorders are often accompanied by inflammation, which is the body's reaction to tissue injury, and results in the accumulation of white blood cells, macrophages, and lymphocytes at the site of injury.

Immunological or immunomodulatory disorders include, without limitation, acute inflammation, rheumatoid arthritis, transplant rejection, asthma, inflammatory bowel disease, uveitis, restenosis, multiple sclerosis, psoriasis, wound healing, lupus erythematosus, and any other autoimmune or inflammatory disorder that can be recognized by one of ordinary skill in the art.

For example, other diseases related to inflammation that may be treated by methods the present invention include, but are not limited to, allergic rhinitis, atopic dermatitis and food allergies. Examples of other autoimmune disorders, where the immune system attacks the host's own tissues, include, but are not limited to, type 1 insulin-dependent diabetes mellitus, dermatitis, meningitis, thrombotic thrombocytopenic purpura, Sjogren's syndrome, encephalitis, leukocyte adhesion deficiency, rheumatic fever, Reiter's syndrome, psoriatic arthritis, progressive systemic sclerosis, primary biliary cirrhosis, pemphigus, pemphigoid, necrotizing vasculitis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, polymyositis, sarcoidosis, granulomatosis, vasculitis, pernicious anemia, CNS inflammatory disorder antigen-antibody complex mediated diseases, autoimmune hemolytic anemia, Hashimoto's thyroiditis, Graves disease, habitual spontaneous abortions, Reynard's syndrome, glomerulonephritis, dermatomyositis, chronic active hepatitis, celiac disease, autoimmune complications of AIDS, atrophic gastritis, ankylosing spondylitis and Addison's

WO 02/31115

PCT/US01/32136

disease. Other diseases related to non-malignant or immunological-related cell-proliferative diseases that may be treated by methods of the present invention include psoriasis, pemphigus vulgaris, Behcet's syndrome, acute respiratory distress syndrome (ARDS), ischemic heart disease, atherosclerosis, post-dialysis syndrome, leukemia, acquired immune deficiency syndrome septic shock and other type of acute inflammation, lipid histiocytosis, and cancer.

By "test compound" is meant a chemical, be it naturally-occurring or artificially-derived, that is assayed for its ability to act as an immunomodulator by employing one of the assay methods described herein or known in the art. Test compounds may include, for example, peptides, polypeptides, synthesized organic molecules, naturally occurring organic molecules, nucleic acid molecules, and components thereof.

"Therapeutically effective amount" as used herein in reference to dosage of a medication, refers to the administration of a specific amount of a pharmacologically active agent (*e.g.*, a *Yatapoxvirus* gp38 polypeptide as described herein) tailored to each individual patient manifesting symptoms characteristic of an immunological disorder, or at risk for a immunological disorder. For example, a patient receiving the treatment of the present invention might be experiencing an autoimmune or inflammatory disease. A person skilled in the art will recognize that the optimal dose of a pharmaceutical agent to be administered will vary from one individual to another. Dosage in individual patients should take into account the patient's height, weight, rate of absorption and metabolism of the medication in question, the stage of the disorder to be treated, and what other pharmacological agents are administered concurrently.

By "pharmaceutically acceptable carrier" is meant a carrier that is physiologically acceptable to the treated mammal while retaining the therapeutic properties of the compound with which it is administered. One exemplary pharmaceutically acceptable carrier is physiological saline solution. Other physiologically acceptable carriers and their formulations are known to one skilled in the art and described, for example, in *Remington: The Science and*

WO 02/31115

PCT/US01/32136

Practice of Pharmacy, (19th edition), ed. A. Gennaro, 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

By "treating " or "treatment" is meant the medical management of a patient with the intent to cure, ameliorate, stabilize, or prevent a disease, pathological condition, or disorder. This term includes active treatment, that is, treatment directed specifically toward the improvement or associated with the cure of a disease, pathological condition, or disorder, and also includes causal treatment, that is, treatment directed toward removal of the cause of the associated disease, pathological condition, or disorder. In addition, this term includes palliative treatment, that is, treatment designed for the relief of symptoms rather than the curing of the disease, pathological condition, or disorder; preventative treatment, that is, treatment directed to minimizing or partially or completely inhibiting the development of the associated disease, pathological condition, or disorder; and supportive treatment, that is, treatment employed to supplement another specific therapy directed toward the improvement of the associated disease, pathological condition, or disorder. The phrase "treatment" also includes symptomatic treatment, that is, treatment directed toward constitutional symptoms of the associated disease, pathological condition, or disorder.

By "cytokine" is meant a small molecular weight polypeptide that plays an important role in regulating the immune response, by for example, signaling adjacent cells. By "chemokine" is meant a small molecular weight ligand that is a chemoattractant for leukocytes (e.g., neutrophils, basophils, monocytes, and T cells), and is important for infiltration of lymphocytes and monocytes into sites of inflammation.

The therapeutic, diagnostic, and screening methods of the invention are first described, followed by general approaches that can be used in carrying out these methods. This description will assist those skilled in the art to better understand the invention and its principles and advantages. It is intended that this description be illustrative of the invention and not limit the scope thereof.

30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

Therapeutic Methods Employing gp38 Nucleic Acid Molecules, Polypeptides, Antibodies, And Immunomodulatory Compounds

The invention includes methods of treating or preventing immunological disorders by using immunomodulatory agents. Immunomodulatory reagents include, without limitation, *Yatapoxvirus* gp38 or *swinepox* virus (C1L) polypeptides; *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 cDNAs, mRNAs, or antisense RNAs; *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 antibodies; and any compound that modulates *Yatapoxvirus* gp38 biological activity, expression, or stability.

10 *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptides identified in the present invention (or fragments or analogs thereof) that exhibit anti-cytokine activity, anti-inflammatory activity, and exhibit a decrease in leukocyte chemotaxis activity are considered particularly useful in the invention; such polypeptides may be used, for example, as therapeutics to decrease the immunoreactivity in a individual with rheumatoid arthritis. Other immunological disorders that may be treated using an immunosuppressive agent, or an agent that reduces the immune function, include acute inflammation, allergic reactions, asthmatic reactions, inflammatory bowel diseases (*i.e.*, Crohn's Disease and ulcerative colitis), transplant rejection, and restenosis. Alternatively, a polypeptide that enhances or induces apoptosis may be used in the treatment of tumors.

Treatment or prevention of diseases resulting from an immunomodulatory disorder is accomplished, for example, by modulating the function of a immunoregulatory protein by delivering a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein to the appropriate cells. It is also possible to correct an immune defect by modifying the physiological pathway (*e.g.*, a signal transduction pathway), in which the immunoregulatory protein participates, by delivering a *Yatapoxvirus* gp38 protein or nucleic acid molecule to the appropriate cells.

30 Direct administration of a recombinant *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein, nucleic acid molecule, antibody, or compound, either to the site of a potential or actual disease-affected tissue (for example, by injection), or

WO 02/31115

PCT/US01/32136

systemically for treatment of, for example, an autoimmune or inflammatory disorder, can be performed accordingly to any conventional recombinant protein administration technique known in the art or described herein. The actual dosage depends on a number of factors known to those of ordinary skill in the art, including the size and health of the individual patient, but generally, between 0.1mg and 100mg inclusive are administered per day to an adult in any pharmaceutically-acceptable formulation.

A *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 immunomodulator, antiinflammatory agent, or anticarcinogen may be administered with a pharmaceutically-acceptable diluent, carrier, or excipient, at a pharmaceutically effective dose. Conventional pharmaceutical practice may be employed to provide suitable formulations or compositions to administer *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptides to patients suffering from an immunomodulatory disorder. Any appropriate route of administration may be employed, for example, parenteral, intravenous, subcutaneous, intramuscular, intracranial, intraorbital, ophthalmic, intraventricular, intracapsular, intraspinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, or oral administration. Therapeutic formulations may be in the form of liquid solutions or suspensions; for oral administration, formulations may be in the form of tablets or capsules; and for intranasal formulations, in the form of powders, nasal drops, or aerosols.

Methods well known in the art for making formulations are found in, for example, "Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*." Formulations for parenteral administration may, for example, contain excipients, sterile water, or saline, polyalkylene glycols such as polyethylene glycol, oils of vegetable origin, or hydrogenated naphthalenes. Biocompatible, biodegradable lactide polymer, lactide/glycolide copolymer, or polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymers may be used to control the release of the compounds. Other potentially useful parenteral delivery systems for *Yatapoxvirus* gp38 immunomodulatory compounds include ethylene-vinyl acetate copolymer particles, osmotic pumps, implantable infusion systems, and liposomes. Formulations for inhalation may contain excipients, for example, lactose, or may be aqueous solutions containing,

WO 02/31115

PCT/US01/32136

for example, polyoxyethylene-9-lauryl ether, glycocholate and deoxycholate, or may be oily solutions for administration in the form of nasal drops, or as a gel.

Yatapoxvirus or swinepox virus (CIL) gp38 Gene Therapy

5 A *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 gene or fragment thereof can be used in immunomodulatory or anti-cancer gene therapy. For example, to enhance leukocyte infiltration of a tumor, a functional *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 gene or fragment thereof may be introduced into cells at the site of a tumor. In addition, *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptides
10 that are shown to reverse autoimmune reactions can also be used in gene therapy. Alternatively, *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptides that block inflammation can be administered via gene therapy, for example, for the treatment of eosinophil-mediated inflammatory conditions.

Gene transfer is achieved using viral vectors, as well as by non-viral
15 means. Transplantation of genes into the affected tissues of a patient can also be accomplished by transferring a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 gene or fragment thereof into a cultivatable cell type *ex vivo*, after which the cell (or its descendants) is injected into a targeted tissue.

Retroviral vectors, adenoviral vectors, adeno-associated viral vectors, or
20 other viral vectors with the appropriate tropism for *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein-expressing cells may be used as a gene transfer delivery system for a therapeutic *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 gene construct. Numerous vectors useful for this purpose are known (see, for example, Miller, *Human Gene Therapy* 15-14, 1990; Friedman, *Science* 244:1275-1281,
25 1989; Eglitis and Anderson, *BioTechniques* 6:608-614, 1988; Tolstoshev and Anderson, *Current Opinion in Biotechnology* 1:55-61, 1990; Sharp, *The Lancet* 337:1277-1278, 1991; Cornetta *et al.*, *Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 36:311-322, 1987; Anderson, *Science* 226:401-409, 1984; Moen, *Blood Cells* 17:407-416, 1991; and Miller and Rosman, *Biotechniques* 7:980-990, 1989;
30 Le Gal La Salle *et al.*, *Science* 259:988-990, 1993; and Johnson, *Chest* 107:77S-83S, 1995). Retroviral vectors are particularly well developed and have been

WO 02/31115

PCT/US01/32136

used in clinical settings (Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 323:370, 1990; Anderson *et al.*, U.S. Pat. No. 5,399,346).

Non-viral approaches, for the introduction of therapeutic DNA into cells, include transfection *in vitro*, by means of any standard technique, including but not limited to, calcium phosphate, DEAE dextran, electroporation, protoplast fusion, and liposomes. For example, a *Yatapoxvirus* gp38 gene may be introduced into a tumor cell by lipofection (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413, 1987; Ono *et al.*, *Neuroscience Lett* 117:259, 1990; Brigham *et al.*, *Am. J. Med. Sci.* 298:278, 1989; Staubinger and Papahadjopoulos, *Meth. Enz.* 101:512, 1983); asialorosonucoid-polylysine conjugation (Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 263:14621, 1988; Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264:16985, 1989); or microinjection under surgical conditions (Wolff *et al.*, *Science* 247:1465, 1990).

For any of the above approaches, the therapeutic *Yatapoxvirus* gp38 DNA construct is preferably applied to the site of the malignancy or inflammation and cytotoxic damage (for example, by injection), but may also be applied to tissue in the vicinity of the malignancy or inflammation and cytotoxic damage, or even to a blood vessel supplying these areas.

In the gene therapy constructs, *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 cDNA expression is directed from any suitable promoter (*e.g.*, the human cytomegalovirus, simian virus 40, or metallothionein promoters), and its production is regulated by any desired mammalian regulatory element. For example, if desired, enhancers known to direct preferential gene expression in endothelial or epithelial cells may be used to direct *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein expression. Such enhancers include, without limitation, the lung specific promoters (*e.g.* surfactant), and gut specific regulatory sequences.

Alternatively, if a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 genomic clone is utilized as a therapeutic construct (for example, following its isolation by hybridization with a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 cDNA), *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein expression is regulated by its cognate regulatory sequences or, if desired, by regulatory sequences derived from

WO 02/31115

PCT/US01/32136

a heterologous source, *e.g.*, any of the promoters or regulatory elements described herein.

Yatapoxvirus or *swinepox* virus (CIL) gp38 gene therapy is also accomplished by direct administration of the *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 mRNA to a tumor. This mRNA may be produced and isolated by any standard technique, but is most readily produced by *in vitro* transcription using a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 cDNA under the control of a high efficiency promoter (*e.g.*, the T7 promoter). Administration of *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 mRNA to malignant cells is carried out by any of the methods for direct nucleic acid administration described above.

Transgenic Animals

Transgenic animals may be made using standard techniques (see for example, *Gene Targeting: A Practical Approach*, A. L. Joyner, ed., Oxford University Press, 1999). For example, a *Yatapoxvirus* gp38 gene may be provided using endogenous control sequences or using constitutive, tissue-specific, or inducible regulatory sequences. Transgenic animals lacking functional *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 homolog polypeptide may also be made using standard techniques. This may be done by engineering knock-out mutations in the *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 homolog gene using DNA sequences provided herein.

Yatapoxvirus Knockouts

Poxviruses are among the largest eukaryotic DNA viruses and have the unusual capacity to replicate autonomously in the cytoplasm of infected cells. Many poxvirus proteins have been defined as virulence factors on the basis that, when present, they confer increased pathogenicity and improve viral replication within immunocompetent hosts. When genes that encode these virulence factor proteins are deleted, the resulting virus strain generally exhibits an attenuated or altered disease phenotype (Turner, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 163:125-151, 1990; Buller, *Microbiol. Rev.*, 55:80-122, 1991; Smith, *J. Gen. Virol.*, 74:1725-

WO 02/31115

PCT/US01/32136

1740; McFadden, Austin (TX): R. G. Landes Company, 1995, incorporated herein by reference). Such "knockout" *Yatapoxviruses* may assist in the elucidation of the immunomodulatory or other role of viral proteins.

Using standard virological assays (*e.g.*, Nash *et al.*, (1999) Immunological Review, 57:731), one of ordinary skill in the art may establish the contribution of each gene to *Yatapoxvirus* infection and the general biochemical and physiological progression of viral infection. Knockout *Yatapoxviruses* lacking a particular gene may be generated using standard molecular biological techniques (see Sambrook *et al.*, *supra*; Innis *et al.*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, CA, 1990; Erlich *et al.*, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Stockton Press, New York, NY, 1989 each of which is incorporated herein by reference). The virulence of these knockout viruses may be assessed using standard infectivity assays well known in the art (see Nash *et al.*, *supra*). For example, as mentioned above, the gp38 polypeptide of *Yatapoxviruses* (SEQ ID NOs: 1 or 2) can be useful in elucidating the mechanism used by *Yatapoxviruses* and other poxviruses to inhibit inflammation.

Diagnostic Methods Employing *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38

Nucleic Acid Molecules, Polypeptides, and Antibodies

Yatapoxvirus or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptides and nucleic acid molecules can be used in the detection or monitoring of inflammatory, autoimmune, and other conditions. For example, because *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 proteins may be involved in leukocyte chemotaxis, and because a decrease in the number of leukocytes correlates with immunosuppression, an alteration in the level of particular *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein production provides an indication of the prognosis of the condition. Levels of *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein expression may be assayed by any standard technique. For example, its expression in a biological sample (*e.g.*, a biopsy) may be monitored by standard

WO 02/31115

PCT/US01/32136

Northern blot analysis or may be aided by PCR (see, e.g., Ausubel *et al.*, *supra*; Yap and McGee, *Nucl. Acids. Res.* 19:4294, 1991).

In yet another approach, immunoassays are used to detect or monitor *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein in a biological sample.

- 5 *Yatapoxvirus* gp38 protein-specific polyclonal or monoclonal antibodies (produced as described herein) may be used in any standard immunoassay format (e.g., ELISA, Western blot, or RIA assay) to measure *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide levels. A change in *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein production may be indicative of a particular prognosis.
- 10 Examples of immunoassays are described, e.g., in Ausubel *et al.*, *supra*. Immunohistochemical techniques may also be utilized for *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein detection. For example, a tissue sample may be obtained from a patient, and a section stained for the presence of *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein using an anti-*Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein antibody and any standard detection system (e.g., one which includes a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase).
- 15 General guidance regarding such techniques can be found in, e.g., Bancroft and Stevens (*Theory and Practice of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, 1982) and Ausubel *et al.* (*supra*).

20

Identification Of Molecules That Modulate *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 Biological Activity Or Whose Biological Activity Is Modulated By *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 Virus

- Isolation of the *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 nucleic acid molecule sequence also facilitates the identification of molecules that increase or decrease a *Yatapoxvirus* gp38 or *swinepox* virus (C1L) polypeptide biological activity. Similarly, molecules whose activity is modulated by a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide biological activity can be identified.
- 25 These molecules can be tested using assays described herein, e.g., chemotaxis assays. A molecule which promotes an increase in *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein expression or a decrease in leukocyte chemotaxis
- 30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

activity is considered particularly useful in the invention; such a molecule may be used, for example, as a therapeutic to decrease the immunoreactivity in a individual.

According to one approach, candidate molecules are added at varying
5 concentrations to the culture medium of cells expressing *Yatapoxvirus* or
swinepox virus (C1L) gp38 mRNA. *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38
polypeptide biological activity is then measured using standard techniques. The
measurement of biological activity can include the measurement of *Yatapoxvirus*
or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide protein and nucleic acid molecule
10 levels, or the effect of *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide on
immunomodulation

If desired, the effect of candidate modulators on expression can, in the
alternative, be measured at the level of *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L)
gp38 protein production using the same general approach and standard
15 immunological detection techniques, such as western blotting or
immunoprecipitation with a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38
polypeptide-specific antibody (see below).

Candidate modulators can be purified (or substantially purified) molecules
or can be one component of a mixture of compounds (*e.g.*, an extract or
20 supernatant obtained from cells; Ausubel *et al.*, *supra*). In a mixed compound
assay, *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide expression is
tested against progressively smaller subsets of the candidate compound pool (*e.g.*,
produced by standard purification techniques, *e.g.*, HPLC or FPLC) until a single
compound or minimal compound mixture is demonstrated to modulate
25 *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide expression.

Alternatively, or in addition, candidate compounds can be screened for
those that modulate *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide
activity. In this approach, the level of immunomodulation in the presence of a
candidate compound is compared to the level of immunomodulation in its
30 absence, under equivalent conditions. Again, such a screen can begin with a pool

WO 02/31115

PCT/US01/32136

of candidate compounds, from which one or more useful modulator compounds is isolated in a step-wise fashion.

The screening assays described above can be carried out in a variety of ways that are well known to those skilled in this art. These include using
5 *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide variants or by using fragments of a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide.

A test compound that can be screened in the methods described above can be a chemical, be it naturally-occurring or artificially-derived. Such compounds can include, for example, polypeptides, synthesized organic molecules, naturally
10 occurring organic molecules, nucleic acid molecules, and components thereof. Candidate *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide modulators include peptide as well as non-peptide molecules (*e.g.*, peptide or non-peptide molecules found, *e.g.*, in a cell extract, mammalian serum, or growth medium in which mammalian cells have been cultured).

15 In general, novel drugs for prevention or treatment of immunomodulatory diseases are identified from large libraries of both natural products, synthetic (or semi-synthetic) extracts, and chemical libraries using methods that are well known in the art. Those skilled in the field of drug discovery and development will understand that the precise source of test extracts or compounds is not critical
20 to the screening methods of the invention. Accordingly, virtually any number of chemical extracts or compounds can be screened using these methods. Examples of such extracts or compounds include, but are not limited to, plant-, fungal-, prokaryotic-, or animal-based extracts, fermentation broths, and synthetic compounds, as well as modifications of existing compounds.

25 Numerous methods are also available for generating random or directed synthesis (*e.g.*, semi-synthesis or total synthesis) of any number of chemical compounds, including, but not limited to, saccharide-, lipid-, peptide-, and nucleic acid molecule-based compounds. Synthetic compound libraries are commercially available from Brandon Associates (Merrimack, NH) and Aldrich Chemical
30 (Milwaukee, WI). Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant, and animal extracts are commercially available from a

WO 02/31115

PCT/US01/32136

number of sources, including Biotics (Sussex, UK), Xenova (Slough, UK), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, FL), and PharmaMar, U.S.A. (Cambridge, MA). In addition, natural and synthetically produced libraries are produced, if desired, according to methods known in the art, *e.g.*, by standard
5 extraction and fractionation methods. Furthermore, if desired, any library or compound can be readily modified using standard chemical, physical, or biochemical methods.

In addition, those skilled in the art of drug discovery and development readily understand that methods for dereplication (*e.g.*, taxonomic dereplication,
10 biological dereplication, and chemical dereplication, or any combination thereof) or the elimination of replicates or repeats of materials already known for their therapeutic activities for immunological disorders can be employed whenever possible.

When a crude extract is found to regulate immunomodulation, further
15 fractionation of the positive lead extract can be carried out to isolate chemical constituents responsible for the observed effect. Thus, the goal of the extraction, fractionation, and purification process is the careful characterization and identification of a chemical entity within the crude extract having a desired activity. The same assays described herein for the detection of activities in
20 mixtures of compounds can be used to purify the active component and to test derivatives thereof. Methods of fractionation and purification of such heterogenous extracts are known in the art. If desired, compounds shown to be useful agents for treatment are chemically modified according to methods known in the art. Compounds identified as being of therapeutic value can be
25 subsequently analyzed using, for example, any of the animal models described herein.

The above approaches may also be used to inhibit the activity of the candidate compound by substituting an altered *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide having *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38
30 protein blocking activity (*e.g.*, have a deletion or insertion at the amino terminus) for the *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide described above.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

Animal Models

Immunomodulators of this invention and other compounds found to be effective at the level of *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein expression or activity are tested in animal models, for efficacy in treating, for example, autoimmune and inflammatory diseases and cancer.

Animal models for testing the immunomodulatory effects of candidate compounds are well known in the art. Therefore, the present invention refers to a selection of animal models that can be used to test the candidate compounds of the invention. Animal models proposed for use in the present invention to test candidate compounds for their efficacy in treating autoimmune and inflammatory disorders include, but are not limited to:

Acute inflammation:

Animal models of acute inflammation are targeted for initial and rapid drug efficacy screening, and for their potential predicative value of outcomes in chronic inflammatory diseases. The following animal models can be used to test the candidate compounds of the present invention for their efficacy in treating acute inflammation: 1) carrageenin-induced inflammation model; 2) turpentine-induced inflammation model; 3) transgenic HLAB-27 inflammation model; and 4) ear-scratch model of inflammation.

Rheumatoid arthritis: rat, mouse, rabbit

Efficacy in Rheumatoid Arthritis evaluated in: 1) various antigen-induced arthritis models in rabbit, rat, and mouse; and 2) in transgenic rheumatological models.

The molecular and cellular mechanisms of action of the candidate compounds are evaluated by testing their efficacy in influencing key intracellular mechanisms that regulate degradative processes involved in joint disease. Important molecular and cellular mechanisms that receive particular attention include signaling events regulating disease processes such as increased

WO 02/31115

PCT/US01/32136

angiogenesis, synovial hyperplasia, and matrix metalloprotease expression. These processes have been implicated in cartilage degradation in arthritic diseases.

- 5 1. Collagen-induced arthritis: rat, mouse, rabbit
Autoimmune-mediated polyarthritis can be induced in certain strains of rodents (rat, mouse and rabbit) and non-human primates by immunizing them with native type II collagen. The collagen-induced arthritis model is widely used and well characterized. Collagen-induced arthritis is mediated by susceptibility
10 to autoantibodies which bind to a particular region of type II collagen. The mechanism of induction is linked to MHC-class II molecules but also depends on the species of type II collagen used for immunization.
2. Ovalbumin-induced arthritis; rabbit
15 Candidate compounds are tested for efficacy in decreasing signs and symptoms of ovalbumin arthritis. Polyarthritis is induced in rabbits by immunizing them with Ovalbumin.
3. Adjuvant-induced arthritis: rat, mouse, rabbit
20 Candidate compounds are tested for the efficacy in decreasing signs and symptoms of adjuvant-induced arthritis. Polyarthritis is induced in certain strains of rodents by immunizing them with Freud's Adjuvant.
4. Streptococcal cell wall-induced arthritis: rat
25 Candidate compounds are tested for efficacy in decreasing signs and symptoms of streptococcal cell wall-induced arthritis. Chronic, erosive polyarthritis is induced by intraperitoneal injection of an aqueous suspension of cell wall fragments isolated from group A streptococci.

30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

Transplant rejection (acute and chronic)

Efficacy in transplant rejection is evaluated in various models of graft vascular disease (GVD). GVD is the most common cause of late graft failure in solid organ transplantation. GVD or graft atherosclerosis is characterized by plaque formation and fibrosis in small vessels. The development of graft vascular disease has been associated with acute allograft rejection, ischemia-reperfusion injury, and bacterial or viral infections. The common pathway of these postoperative insults results in perivascular inflammation which triggers migration of mesenchymal cells into the vessel wall, eventually resulting in occlusion or partial occlusion of the vessel lumen.

1. Aortic allograft model: rat, rabbit, monkey

Candidate compounds are tested for efficacy in reducing graft atherosclerosis and transplant rejection in a model of vascular injury after transplantation of aortic segments performed in certain strains of MHC mismatched rats, monkeys, and rabbits.

2. Tracheal allograft model: rat, rabbit, monkey

Candidate compounds are tested for efficacy in reducing graft atherosclerosis and transplant rejection in a model of vascular injury after transplantation of tracheal segments performed in certain strains of MHC mismatched rats, rabbits, and monkeys.

3. Heterotopic heart transplant: mouse, rat, monkey

A heterotopic heart transplantation is performed in MHC mismatched animals. In this model, animals are treated with cyclosporine A for only the first 7 days after transplantation are allowed to develop graft vascular disease, and are then analyzed after sacrifice at postoperative day 90.

30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

4. Orthotopic kidney transplant: mouse, rat, monkey

An orthotopic kidney transplantation is performed in MHC mismatched animals. In this model, animals receiving subtherapeutic doses of cyclosporine A for the first 10 days after transplantation are allowed to exhibit features of chronic renal allograft rejection in 70% of cases, and are then analyzed after sacrifice at postoperative day 90.

5. Orthotopic lung transplant: rat, monkey

Candidate compounds are tested for effectiveness in delaying or reducing signs and symptoms of organ rejection after lung whole organ transplantation in rats and monkeys.

6. Reperfusion injury: rat

The immediate postoperative course in clinical lung transplantation is often severely impaired by delayed graft function as a result of ischemia and reperfusion injury. Preventive efficacy of drug candidates in ischemia-reperfusion injury is evaluated using a model of acute *in vivo* double lung transplantation in the rat (Hausen *et al.*, *Ann. Thorac. Surg.* 61:1714-9, 1996 incorporated herein by reference).

Restenosis

Candidate compounds are tested for efficacy in reducing atherosclerotic plaque deposition in a model of coronary restenosis after balloon angioplasty. Atherosclerotic plaque formation is critically involved in vascular occlusion and has been linked to excessive inflammatory and thrombotic response to arterial injury.

Asthma: rodent

The effectiveness of candidate compounds in reduction of signs and symptoms of asthma is evaluated in rodent models of antigen-induced experimental airways inflammation. The models include:

WO 02/31115

PCT/US01/32136

1. Ovalbumin-induced experimental airways inflammation: rodent
Candidate compounds are tested for efficacy in reducing inflammatory cell components in the bronchoalveolar lavage of the lungs after aerosol challenge in
5 ovalbumin-sensitized rodent models of experimental airways inflammation.

2. Ovalbumin-induced allergic sensitization in presence of GM-CSF
transgene expression: mice
Candidate compounds are tested for efficacy in reducing inflammatory cell
10 components in the bronchoalveolar lavage of the lungs of mice after ovalbumin aerosol challenge in the context of local expression of GM-CSF (Staempfli *et al.*, *J. Clin. Invest.*, Vol. 102:9, 1704-1714).

- Inflammatory bowel disease (IBD): mice and rats*
15 Drug candidates are evaluated for their potential therapeutic efficacy in ulcerative colitis or Crohn's disease utilizing various models of antigen-induced and genetically-mediated spontaneous chronic intestinal inflammation in mice and rats. Examples include:
 - 20 1. Dextran sulfate sodium induced IBD: mice
Chronic, irreversible clinical symptoms of IBD are induced by treating mice with an oral administration of dextran sulfate sodium.

 2. Gene deletion and transgenic models for IBD: rodent
25 Compound efficacy will be tested in transgenic rodent lines which develop symptoms closely resembling the human elements of inflammatory bowel disease. Models include, the targeted deletion of the genes encoding IL-2, IL-10, TGF beta, T-cell receptor alpha/beta, keratin 8, Gi2 alpha. In addition, animals expressing transgenes for the human WA-B27 and HLA-B27 as well as a
30 dominant negative construct which functionally blocks N-cadherin will be tested.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

Uveitis

Drug candidates will be evaluated for efficacy in various animal models of uveitis. Key models include both, experimental autoimmune uveitis and adoptively transferred experimental autoimmune uveitis.

5

1. Experimental autoimmune uveitis (EAU)

EAU is a T-cell mediated inflammatory eye disease that can be induced in several mammalian species by immunization with ocular-specific antigens (Gery *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 27: 1296-1300, 1986, Sanui *et al.*, *J. Exp.*

10 *Med.*, 169:1947-1989, incorporated herein by reference). This experimental disease is considered a model for a family of inflammatory eye diseases in humans and has been used to examine numerous modalities before their human testing.

15 2. Adoptively transferred experimental autoimmune uveitis

Adoptively transferred EAU is induced through injection of lymphocytes presensitized against the retinal antigen are injected into naive syngenic recipients (McAllister *et al.*, *J. Immunol.*, 138:1416-1420, 1987 incorporated herein by reference)

20

Yatapoxvirus or *swinepox* virus (CIL) gp38 Protein Expression

In general, *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 may be produced by transformation or transfection of a suitable host cell with all or part of a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein-encoding cDNA fragment in a suitable expression vehicle.

25

Those skilled in the field of molecular biology will understand that any of a wide variety of expression systems may be used to provide the recombinant protein. The precise host cell used is not critical to the invention. The

30 *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein may be produced in a prokaryotic host (*e.g.*, *E. coli*) or in a eukaryotic host (yeast cells, *e.g.*, *Saccharomyces cerevisiae*, insect cells, *e.g.*, Sf21 cells, or mammalian cells, *e.g.*,

WO 02/31115

PCT/US01/32136

COS 1, NIH 3T3, or HeLa cells). Such cells are available from a wide range of sources (*e.g.*, the American Type Culture Collection, Rockland, MD; also, see, *e.g.*, Ausubel *et al.*, *supra*). The method of transformation or transfection and the choice of expression vehicle will depend on the host system selected.

- 5 Transformation and transfection methods are described, *e.g.*, in Ausubel *et al.* (*supra*); expression vehicles may be chosen from those provided, *e.g.*, in *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, P.H. Pouwels *et al.*, 1985, Supp. 1987).

- One preferred expression system is the baculovirus system (using, for example, the vector pBacPAK9) available from Clontech (Pal Alto, CA). If
10 desired, this system may be used in conjunction with other protein expression techniques, for example, the myc tag approach described by Evan *et al.* (*Mol. Cell Biol.* 5:3610-3616, 1985).

- Alternatively, a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein is produced by a stably-transfected mammalian cell line. A number of vectors
15 suitable for stable transfection of mammalian cells are available to the public, *e.g.*, see Pouwels *et al.* (*supra*); methods for constructing such cell lines are also publicly available, *e.g.*, in Ausubel *et al.* (*supra*). In one example, cDNA encoding the *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein is cloned into an expression vector which includes the dihydrofolate reductase (DHFR) gene.

- 20 Integration of the plasmid and, therefore, the *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein-encoding gene into the host cell chromosome is selected for by inclusion of 0.01-300 mM methotrexate in the cell culture medium (as described in Ausubel *et al.*, *supra*). This dominant selection can be accomplished in most cell types. Recombinant protein expression can be increased by DHFR-mediated amplification of the transfected gene. Methods for selecting cell lines
25 bearing gene amplifications are described in Ausubel *et al.* (*supra*); such methods generally involve extended culture in medium containing gradually increasing levels of methotrexate. DHFR-containing expression vectors commonly used for this purpose include pCVSEII-DHFR and pAdD26SV(A) (described in Ausubel
30 *et al.*, *supra*). Any of the host cells described above or, preferably, a DHFR-deficient CHO cell line (*e.g.*, CHO DHFR⁻ cells, ATCC Accession No. CRL

WO 02/31115

PCT/US01/32136

9096) are among the host cells preferred for DHFR selection of a stably-transfected cell line or DHFR-mediated gene amplification.

Once the recombinant *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein is expressed, it is isolated, *e.g.*, using affinity chromatography. In one example, 5 an anti-*Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein antibody (*e.g.*, produced as described herein) is attached to a column and used to isolate the *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein. Lysis and fractionation of *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein-harboring cells prior to affinity chromatography are performed by standard methods (see, *e.g.*, Ausubel *et al., supra*). In another example, *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 10 proteins are purified or substantially purified from a mixture of compounds such as an extract or supernatant obtained from cells (Ausubel *et al., supra*). Standard purification techniques can be used to progressively eliminate undesirable compounds from the mixture until a single compound or minimal number of 15 effective compounds has been isolated.

Once isolated, the recombinant protein can, if desired, be further purified, *e.g.*, by high performance liquid chromatography (see, *e.g.*, Fisher, *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology*, eds., Work and Burdon, Elsevier, 1980).

20 Polypeptides of the invention, particularly short *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein fragments, can also be produced by chemical synthesis (*e.g.*, by the methods described in *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., 1984 The Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

These general techniques of polypeptide expression and purification can 25 also be used to produce and isolate useful *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein fragments or analogs (described herein).

Yatapoxvirus or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptides can be attached to any one of a variety of tags. Tags can be amino acid tags or chemical tags and can be added for the purpose of purification (for example a 6-histidine tag for 30 purification over a nickel column). Various labels can be used as means for detecting binding of a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein to

WO 02/31115

PCT/US01/32136

another protein, for example to a chemokine or a chemokine receptor. Alternatively, *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 DNAs or RNAs may be labeled for detection, for example in a hybridization assay. *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 nucleic acids or polypeptides, or derivatives thereof, may be directly or indirectly labeled, for example, with a radioisotope, a fluorescent compound, a bioluminescent compound, a chemiluminescent compound, a metal chelator or an enzyme. Those of ordinary skill in the art will know of other suitable labels or will be able to ascertain such, using routine experimentation. *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptides can also be linked to toxins. Proteins linked to toxins can be used, for example to target toxic drugs to malignant tumors if the protein has the ability to localize to the tumor.

Anti-*Yatapoxvirus* or Anti-*swinepox* virus (C1L) gp38 Protein Antibodies

To generate *Yatapoxvirus* gp38 protein-specific antibodies, a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 polypeptide coding sequence (e.g., gp38 from TPV, YMTV, or *swinepox* virus (C1L)) is expressed, for example, as a C-terminal fusion with glutathione S-transferase (GST) (Smith *et al.*, *Gene* 67:31-40, 1988). The fusion protein is then purified on glutathione-Sepharose beads, eluted with glutathione cleaved with thrombin (at the engineered cleavage site), and purified to the degree necessary for immunization of rabbits. Primary immunizations are carried out with Freud's complete adjuvant and subsequent immunizations with Freud's incomplete adjuvant. Antibody titres are monitored by Western blot and immunoprecipitation analysis using the thrombin-cleaved *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein fragment of the GST-*Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 fusion protein. Immune sera are affinity purified using CNBr-Sepharose-coupled *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (C1L) gp38 protein. Antiserum specificity is determined using a panel of unrelated GST proteins and GST-trypsin (which was generated by PCR using known sequences).

WO 02/31115

PCT/US01/32136

As an alternate or adjunct immunogen to GST fusion proteins, peptides corresponding to relatively unique hydrophilic *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 proteins may be generated and coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) through an introduced C-terminal lysine. Antiserum to each of these peptides is similarly affinity purified on peptides conjugated to BSA, and specificity tested in ELISA and Western blots using peptide conjugates, and by Western blot and immunoprecipitation using *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein expressed as a GST fusion protein.

Alternatively, monoclonal antibodies may be prepared using the *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 proteins described above and standard hybridoma technology (see, e.g., Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495, 1975; Kohler *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6:511, 1976; Kohler *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6:292, 1976; Hammerling *et al.*, In *Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*, Elsevier, NY, 1981; Ausubel *et al.*, *supra*). Once produced, monoclonal antibodies are also tested for specific *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein recognition by Western blot or immunoprecipitation analysis (by the methods described in Ausubel *et al.*, *supra*). Antibodies which specifically bind *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 proteins are considered to be useful in the invention; such antibodies may be used, e.g., in an immunoassay to monitor the level of *Yatapoxvirus* gp38 proteins produced by a mammal (for example, to determine the amount or location of a *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 protein).

Preferably, antibodies of the invention are not only produced using the whole *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide, but using fragments of the *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) gp38 polypeptide that lie outside highly conserved regions and appear likely to be antigenic, by criteria such as high frequency of charged residues may also be used. In one specific example, such fragments are generated by standard techniques of PCR and cloned into the pGEX expression vector (Ausubel *et al.*, *supra*). Fusion proteins are expressed in *E. coli* and purified using a glutathione agarose affinity matrix as described in Ausubel *et al.* (*supra*). To attempt to minimize the potential

WO 02/31115

PCT/US01/32136

problems of low affinity or specificity of antisera, two or three such fusions are generated for each protein, and each fusion is injected into at least two rabbits. Antisera are raised by injections in a series, preferably including at least three booster injections.

- 5 Antibodies to *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) proteins can be used to detect *Yatapoxvirus* or *swinepox* virus (CIL) proteins. In addition, the antibodies can be coupled to compounds, such as radionuclides and liposomes for diagnostic or therapeutic uses.

10

EXAMPLES

Cloning Additional Yatapoxvirus-Related gp38 Genes.

Standard techniques, such as the polymerase chain reaction (PCR) and DNA hybridization, can be used to clone *Yatapoxvirus-related* gp38 genes.

- 15 *Yatapoxvirus-Related* gp38 genes and homologs can be readily identified using low-stringency DNA hybridization or low-stringency PCR with specific probes or primers. Degenerate primers *Yatapoxvirus-related* gp38 amino acid sequences can be used to clone additional *Yatapoxvirus-related* gp38 genes and homologs by RT-PCR.

- Based on the amino acid sequences provided by the present invention, degenerate oligonucleotide primers containing restriction sites are synthesized. First strand cDNA is synthesized from RNA prepared from a tissue of interest and PCR is performed with an initial five cycle step, for example, at 37°C for 60s, followed by 25 cycles at 50°C for 60s (denaturation at 95°C for 30s and extension at 72°C for 90s) in order to amplify a *Yatapoxvirus-related* gp38 cDNA fragment that can be subsequently subcloned into Bluescript II KS (Stratagene). Construction of a cDNA library using poly A RNA isolated from the selected tissue is performed using Stratagene ZAP Express Vector according to the directions of the manufacturer. Potential clones are subsequently amplified and an aliquot of this cDNA library containing phage is screened with the *Yatapoxvirus* gp38 cDNA that has been ³²P-labeled with Klenow enzyme. Isolated phagemids are subsequently subjected to automated sequencing on both
- 20
25
30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

strands using Applied Biosystems Instrumentation (model 373a) and the dye-terminator protocol. Sequence analysis is performed using software developed, for example, by the University of Wisconsin genetics computer group (Altschul, *et al. J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990).

5

Yatapoxvirus gp38 mRNA Expression in Different Organs.

Northern blot analysis of total RNA isolated from different mammalian tissue samples is performed to detect expression of any *Yatapoxvirus gp38* gene, homolog or derivative. Mammalian tissues including the brain, bone marrow, skin, intestines, stomach, heart, thymus, lymph node, mammary gland, skeletal muscle, tongue, spleen, liver, testes, and kidney are analyzed. Likewise, cell lines, such as macrophages isolated and cultured from the spleen, a lung epithelial cell line, and a colon adenocarcinoma cell, are analyzed for expression of *Yatapoxvirus gp38* mRNA.

10

15

DNA and RNA analysis.

RNA is isolated by CsCl centrifugation in guanidine isothiocyanate (Chirgwin, *et al. (1979) Biochemistry.* 18:5294-9). Biologically active ribonucleic acid is isolated from sources enriched in ribonuclease. DNA is isolated from these gradients as well. In some cases, RNA is isolated using RNAzol (Biotecx Lab, Inc.) according to the directions of the manufacturer. Poly A RNA is enriched by elution through an oligo dT column (Pharmacia). For example, 10 µg of total RNA, 2 µg of poly A RNA, or 10 µg of restriction endonuclease cut DNA is electrophoresed in agarose, and transferred to Gene Screen (NEN Dupont) membranes. Membranes will be hybridized with ³²P labeled full length cDNA or a fragment encoding the translated protein. High stringency hybridization is performed, for example, in 50% formamide, 10% dextran sulfate, 5X SSC, 1X Denhardt's solution (0.0002% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 0.0002% (w/v) BSA, 0.0002% (w/v) Ficoll 400), 1% (w/v) SDS, 100 µg /ml denatured herring sperm DNA, and 20mM Tris at 42°C and blots are washed with 0.2X SSC, 0.5% SDS at 65°C. Low stringency

20

25

30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

hybridization is performed, for example, in 0.6M NaCl, 80mM TrisCl, 4mM EDTA, 0.1% (w/v) sodium pyrophosphate, 0.1% (w/v) SDS, 10X Denhardt's, 100 µg /ml denatured herring sperm DNA at 50°C and washed with 1XSSC, 0.05% SDS at 50°C. Quantitation of the intensity of band hybridization will be
5 determined using a Phosphor-Imager (Molecular Dynamics).

Yatapoxvirus gp38 Gene Analysis.

A cDNA probe from the coding region of the *Yatapoxvirus gp38* cDNA is ³²P-labeled with Klenow enzyme and used to screen approximately 1 X 10⁶
10 plaques from a mammalian genomic library (*e.g.*, a variety of libraries are available from Stratagene, La Jolla, CA) under conditions of low stringency (hybridization in 0.6 M NaCl, 80mM TrisCl, 4mM EDTA, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% SDS, 10X Denhardt's solution (0.002% polyvinylpyrrolidone, 0.002% BSA, 0.002% Ficoll 400), 100µg/ml denatured herring
15 sperm DNA at 50°C and blots washed with 1X SSC, 0.05% SDS at 50°C). Plaques that hybridize strongly are purified. The genomic DNA is liberated from the phage DNA by restriction digestion with the appropriate enzymes and sub-cloned into pBlue- Script SK II (Stratagene). Any positively identified genomic fragment that hybridizes with the probe is subcloned into, for example,
20 pBlue-Script KS II, and subjected to automated sequencing on both strands using Applied Biosystems Instrumentation (model 373a) and the dye-terminator protocol. Sequence analysis is performed using software developed by, for example, the University of Wisconsin genetics computer group Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990.

25 The *Yatapoxvirus gp38* gene homolog chromosomal localization is determined by the analysis of any identified polymorphisms in the gene. PCR primers flanking this polymorphism will be constructed and genomic DNA is amplified by PCR. Using these primers, a size polymorphism is identified (for example, see Rowe, *et al.*, *Mamm. Gen.* 5: 253-274, 1994).

30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

The identified genomic fragment can be used to screen a mammalian cDNA expression library (Stratagene) under conditions of high stringency (hybridization in 50% formamide, 10% dextran sulfate, 5X SSC, 1X Denhardt's solution, 1% SDS, 100 mcg/ml denatured herring sperm DNA, and 20mM Tris at 42°C and blots were washed with 0.2X SSC, 0.5% SDS at 65°C). Positive plaques are identified, purified, and phagemids are prepared according to the instructions of the library manufacturer. The inserts are completely sequenced on both strands by automated sequencing. Alignment analysis will be determined by the Clustal method using MegAlign software (DNASTAR Inc) (Higgins, *et al.* (1988) *Gene* 73, 237-244), or other standard software.

Construction and Transfection of Protein Expression Vectors.

PCR primers are designed to amplify the coding region of the *Yatapoxvirus* gp38 gene, or homolog or derivative thereof, flanked by convenient restriction sites for subsequent sub-cloning. PCR is performed under standard conditions using *Yatapoxvirus* gp38 cDNA-pBlueScript as a template. The resulting PCR products are subsequently subcloned using, for example, a TA cloning kit (Invitrogen, San Diego, CA) and confirmatory sequencing is performed. *Yatapoxvirus* gp38 cDNA is subcloned into the available restriction sites of pcDNA-I/Amp (Invitrogen). Approximately 4 µg of the *Yatapoxvirus* gp38-pcDNA-I construct is transfected into 100 mm plates containing ~30% confluent COS cells using DEAE-Dextran (Lopata, *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 12, 5707-5717, 1984). In order to measure transfection efficiency, a replicate sample of COS cells will be transfected with a CMV promoter-placental alkaline phosphatase control plasmid (Fields-Berry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 693-697, 1992). RNA expression is confirmed by Northern analysis using the *Yatapoxvirus* gp38 cDNA as a probe. *Yatapoxvirus* gp38 -pcDNA-I transfected or mock transfected COS cell supernatant is obtained after 72 hrs of culture and stored at 4°C. In another set of transfection experiments, *Yatapoxvirus* gp38 cDNA is similarly subcloned into the available site of MoLTR-SV40 I/PA expression vector (for example, see Luster, *et al.*, *J. Exp. Med.* 178, 1057-1065,

WO 02/31115

PCT/US01/32136

1993). 20 µg of linearized *Yatapoxvirus* gp38-MoLTR construct and 1µg of linearized neomycin resistance plasmid pSV7Neo is used to transfect J558L cells by electroporation. G418 resistant cells from single wells are analyzed for *Yatapoxvirus* gp38 mRNA expression by Northern analysis. Cells expressing *Yatapoxvirus* gp38 protein or control untransfected cells (that do not express *Yatapoxvirus* gp38 protein) will be expanded in large cultures. In order to optimize the concentration of *Yatapoxvirus* gp38 protein in the supernatant, the cells are grown at high density (1 X 10⁶ cells/ml) in RPMI without FCS, cultured for 72 hrs, and the conditioned medium is concentrated 5-fold with Centricon 3000 microconcentrators (Amicon, Beverly, MA) before being stored.

Chemotaxis Assays. Leukocytes, for example eosinophils, are isolated. Eosinophils, in particular, can be isolated from IL-5 transgenic mice (Dent, *et al.*, *J. Exp. Med.* 172:1425-1431, 1990). These mice develop splenomegaly, with eosinophils accounting for ~30% of the splenocytes. Eosinophils are purified from the spleen using immuno-magnetic separation to remove the contaminating splenocytes. Briefly, splenocytes are labeled with anti-Thy-1 (M5/49), anti-B220 (6B2), and anti-Lyt-2 (53-6.7). Hybridoma cell lines are obtained, for example, from American Type Culture Collection and hybridoma cell supernatants are used as a source of antibodies. The antibody labeled cells are treated with anti-serum coated-magnetic beads, the anti-serum having specificity for the isotype of the primary antibody, (M450, Dynal, Great Neck, NY), and eosinophils are enriched by negative selection through a magnetic field. Macrophage cells are isolated from the peritoneal cavity of mice that have been pre-treated (2 days prior) with intraperitoneal injection of 2.9% thioglycollate (Difco, Detroit, CA). Peritoneal neutrophils are isolated from mice pre-treated with sodium casein (Luo, *et al.*, *J. Immun.* 153, 4616-4624, 1994). Macrophages and neutrophils are purified by Percoll gradients (Luo, *et al.*, *J. Immun.* 153, 4616-4624, 1994). Eosinophils or macrophages are suspended in HBSS with 0.05% BSA at 2 X 10⁶ cells/ml, respectively, and 50 ml of replicate cells are placed in the top well of a 48 well micro-chemotaxis chamber (Neuro Probe, Inc, Cabin John, MD). A polycarbonate filter with 5-µm pores are used to separate the cells from buffer (30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

- ml) alone or buffer containing recombinant COS cell supernatant and a positive (for example MCP-1 (Rollins, & Pober, *Am. J. Path.*, 138, 1315-1319, 1991)) and negative control (for example, supernatant from mock-transfected COS cells) so that a comparison can be made and the immunosuppressive (inhibition of chemotaxis) properties of the *Yatapoxvirus* gp38 protein assessed. Cells are incubated at 37°C for 60 minutes (eosinophils and neutrophils) or 90 minutes (macrophages) and the cells that migrate across the filter and adhere to the bottom side of the filter are stained with Diff-Quick (Baxter Scientific, McGaw Park, IL). The number of cells per 400X field is counted.
- 10 *Statistical Analysis.* The statistical significance of differences between means is determined by analysis of variance (ANOVA). $P < 0.05$ is considered significant. When ANOVA indicates a significant difference, the Newman-Keuls test is used to determine which groups are significantly different from each other.

15 Other Embodiments

All publications and patent applications mentioned in this specification are herein incorporated by reference to the same extent as if each independent publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

- 20 While the invention has been described in connection with specific embodiments thereof, it will be understood that it is capable of further modifications and this application is intended to cover any variations, uses, or adaptations of the invention following, in general, the principles of the invention and including such departures from the present disclosure come within known or customary practice within the art to which the invention pertains and may be applied to the essential features hereinbefore set forth, and follows in the scope of the appended claims.

What is claimed is:

WO 02/31115

PCT/US01/32136

CLAIMS

1. A substantially pure *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide.
5
2. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide is derived from yaba monkey tumor virus.
3. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide is derived from
10 tanapox virus.
4. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence that encodes an identifiable signal sequence.
- 15 5. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide is selected from the group consisting of a chemokine binding polypeptide, a cytokine binding polypeptide, an immunomodulator, and an anti-inflammatory polypeptide.
6. The polypeptide of claim 5, wherein said chemokine is selected from the
20 group consisting of human interferon- γ , human interleukin-2, and human interleukin-5.
7. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide is glycosylated.
- 25 8. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide has anti-cytokine activity.
9. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID
30 NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

10. The polypeptide of claim 9, wherein said polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.
- 5 11. A substantially pure *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule, wherein said nucleic acid molecule encodes a *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide.
12. The nucleic acid molecule of claim 11, wherein said nucleic acid molecule is selected from the group consisting of genomic DNA, cDNA, and mRNA.
- 10 13. The nucleic acid molecule of claim 11, wherein said nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that encodes a polypeptide with an identifiable signal sequence.
- 15 14. The nucleic acid molecule of claim 11, wherein said nucleic acid molecule encodes a yaba monkey tumor virus polypeptide.
15. The nucleic acid molecule of claim 11, wherein said nucleic acid molecule encodes a tanapox virus polypeptide.
- 20 16. The nucleic acid molecule of claim 11, wherein said nucleic acid molecule encodes a polypeptide comprising an amino sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.
- 25 17. The nucleic acid molecule of claim 16, wherein said nucleic acid molecule encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

18. The nucleic acid molecule of claim 11, wherein said nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence that is substantially identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 7.
- 5 19. A nucleic acid molecule having at least 50% nucleic acid sequence identity to a sequence encoding a *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide or a fragment thereof, wherein said fragment comprises at least six amino acids and said nucleic acid molecule hybridizes under high stringency conditions to at least a portion of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule.
- 10 20. The nucleic acid molecule of claim 19, wherein said nucleic acid molecule has 100% complementarity to a nucleic acid molecule encoding a *Yatapoxvirus* immunomodulatory polypeptide or a fragment thereof comprising at least six amino acids, and said nucleic acid molecule hybridizes under high stringency
15 conditions to at least a portion of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule.
21. A nucleic acid molecule, wherein said nucleic acid molecule comprises a sequence that is antisense to the coding strand of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule or a fragment thereof.
- 20 22. A vector comprising the nucleic acid molecule of claim 11.
23. The vector of claim 22, wherein said vector is a gene therapy vector.
- 25 24. A cell comprising the vector of claim 22.
25. The vector of claim 22, wherein said nucleic acid molecule is operably linked to regulatory sequences for expression of a *Yatapoxvirus* polypeptide and wherein said regulatory sequences comprise a promoter.
- 30

WO 02/31115

PCT/US01/32136

26. The cell of claim 24, wherein said cell is selected from the group consisting of a human cell, a primate cell, and a rodent cell.
27. A non-human transgenic animal comprising the nucleic acid molecule of claim 11.
28. A cell from the non-human transgenic animal of claim 27.
29. A non-human transgenic animal having a knockout mutation in one or both alleles encoding a polypeptide substantially identical to a *Yatapoxvirus* polypeptide.
30. An antibody that specifically binds to a *Yatapoxvirus* polypeptide.
31. The antibody of claim 30, wherein said polypeptide comprises an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.
32. A probe for analyzing a *Yatapoxvirus* gene or a *Yatapoxvirus* gene homolog or fragment thereof, said probe having at least 50% nucleotide sequence identity to a sequence encoding a *Yatapoxvirus* polypeptide or fragment thereof, wherein said fragment comprises at least six amino acids, and said probe hybridizes under high stringency conditions to at least a portion of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule.
33. The probe of claim 32, wherein said probe has 100% complementarity to a nucleic acid molecule encoding a *Yatapoxvirus* polypeptide or fragment thereof, wherein said fragment comprises at least six amino acids, and said probe hybridizes under high stringency conditions to at least a portion of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

34. A method of detecting a *Yatapoxvirus* polypeptide in a sample, said method comprising contacting said sample with the antibody of claim 30, and assaying for the binding of said antibody to said polypeptide.
- 5 35. A method of detecting a *Yatapoxvirus* gene or a *Yatapoxvirus* gene homolog or fragment thereof in a cell, said method comprising contacting the nucleic acid molecule of claim 11 or a fragment thereof, wherein said fragment is greater than about 18 nucleotides in length, with a preparation of genomic DNA from said cell, under hybridization conditions providing detection of DNA
10 sequences having about 50% or greater nucleotide sequence identity to SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 7.
36. A method of identifying an immunomodulatory *Yatapoxvirus* gene or a *Yatapoxvirus* immunomodulatory gene homolog or fragment thereof comprising:
15 (a) providing a mammalian cell sample;
(b) introducing into said cell sample a candidate gene;
(c) expressing said candidate gene; and
(d) determining whether said candidate gene elicits an alteration in the level of immune function in said cell sample, wherein an alteration in the level of
20 immune function identifies said immunomodulatory *Yatapoxvirus* gene or said *Yatapoxvirus* immunomodulatory gene homolog, or fragment thereof.
37. A method for identifying a test compound that modulates the expression or activity of a *Yatapoxvirus* polypeptide, said method comprising contacting said
25 *Yatapoxvirus* polypeptide with said test compound, and determining the effect of said test compound on said *Yatapoxvirus* polypeptide expression or activity.
38. A method of targeting proteins for secretion from a cell, comprising attaching an identifiable signal sequence selected from a *Yatapoxvirus*
30 polypeptide to a protein of interest, wherein said protein of interest is secreted from said cell.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

39. A method of immunomodulation in a mammal, said method comprising:
administering to said mammal a therapeutically effective amount of a
Yatapoxvirus polypeptide or fragment thereof, wherein said polypeptide has an
5 immunomodulatory effect in said mammal.
40. A method of immunomodulation in a mammal, said method comprising:
administering to said mammal a therapeutically effective amount of a compound
that modulates the activity of a *Yatapoxvirus* polypeptide, wherein said
10 compound has an immunomodulatory effect in said mammal.
41. A method of treating a mammal having an immunomodulatory disorder,
said method comprising:
administering to said mammal a therapeutically effective amount of a compound
15 that modulates the activity of a *Yatapoxvirus* polypeptide, wherein said
compound has an immunomodulatory effect in said mammal.
42. A pharmaceutical composition comprising at least one dose of a
therapeutically effective amount of a *Yatapoxvirus* polypeptide or fragment
20 thereof, in a pharmaceutically acceptable carrier, said composition being
formulated for the treatment of an immunomodulatory disorder.
43. The method of claims 37 to 42, wherein the *Yatapoxvirus* polypeptide
comprises an amino acid sequence substantially identical to the amino acid
25 sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6,
and fragments and analogs thereof.
44. The method of claim 39 or 40, wherein said immunomodulation is selected
from the group consisting of immunosuppression, immunostimulation, cell
30 proliferation, apoptosis, decreasing T cell stimulation, and decreasing
inflammation in a mammal.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

45. The method of claims 39 to 41, wherein said mammal is a human.
46. The method of claims 39 to 41, wherein said mammal has a condition
5 selected from the group consisting of acute inflammation, rheumatoid arthritis,
transplant rejection, asthma, inflammatory bowel disease, uveitis, restenosis,
multiple sclerosis, psoriasis, wound healing, lupus erythematosus, allergic
rhinitis, atopic dermatitis, food allergies, type 1 insulin-dependent diabetes
10 mellitus, dermatitis, meningitis, thrombotic thrombocytopenic purpura,
Sjogren's syndrome, encephalitis, leukocyte adhesion deficiency, rheumatic
fever, Reiter's syndrome, psoriatic arthritis, progressive systemic sclerosis,
primary biliary cirrhosis, pemphigus, pemphigoid, necrotizing vasculitis,
myasthenia gravis, lupus erythematosus, polymyositis, sarcoidosis,
15 granulomatosis, vasculitis, pernicious anemia, CNS inflammatory disorder,
antigen-antibody complex mediated diseases, autoimmune hemolytic anemia,
Hashimoto's thyroiditis, Graves disease, habitual spontaneous abortions,
Reynard's syndrome, glomerulonephritis, dermatomyositis, chronic active
hepatitis, celiac disease, autoimmune complications of AIDS, atrophic gastritis,
20 ankylosing spondylitis, Addison's disease, psoriasis, pemphigus vulgaris, Behcet's
syndrome, acute respiratory distress syndrome (ARDS), ischemic heart disease,
atherosclerosis, post-dialysis syndrome, leukemia, acquired immune deficiency
syndrome septic shock and other type of acute inflammation, and lipid
histiocytosis.
- 25 47. A kit for the analysis of a *Yatapoxvirus* nucleic acid molecule, said kit
comprising a nucleic acid molecule probe for analyzing a *Yatapoxvirus* nucleic
acid molecule present in a test subject.
- 30 48. A kit for the analysis of a *Yatapoxvirus* polypeptide, said kit comprising
an antibody for analyzing a *Yatapoxvirus* polypeptide present in a test subject.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

49. A method for identifying a test compound that modulates the expression or activity of a polypeptide comprising an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, said method comprising contacting said polypeptide with said test compound, and determining the effect of said test compound on said polypeptide expression or activity.

50. A method of targeting proteins for secretion from a cell, comprising attaching an identifiable signal sequence selected from a polypeptide comprising an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8 to a protein of interest, wherein said protein of interest is secreted from said cell.

51. A method of immunomodulation in a mammal, said method comprising: administering to said mammal a therapeutically effective amount of a polypeptide comprising an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, or fragment thereof, wherein said polypeptide has an immunomodulatory effect in said mammal.

52. A method of immunomodulation in a mammal, said method comprising: administering to said mammal a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of a polypeptide comprising an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, wherein said compound has an immunomodulatory effect in said mammal.

53. A method of treating a mammal having an immunomodulatory disorder, said method comprising: administering to said mammal a therapeutically effective amount of a compound that modulates the activity of a polypeptide comprising an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, wherein said compound has an immunomodulatory effect in said mammal.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

54. A pharmaceutical composition comprising at least one dose of a therapeutically effective amount of a polypeptide comprising an amino acid sequence that is substantially identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, or fragment thereof, in a pharmaceutically acceptable carrier, said composition being formulated for the treatment of an immunomodulatory disorder.
55. The method of claims 49 to 54, wherein the polypeptide has an amino acid sequence of SEQ ID NO: 8.
- 10 56. The method of claim 51 or 52, wherein said immunomodulation is selected from the group consisting of immunosuppression, immunostimulation, cell proliferation, apoptosis, decreasing T cell stimulation, and decreasing inflammation in a mammal.
- 15 57. The method of claims 51 to 53, wherein said mammal is a human.

WO 02/31115

PCT/US01/32136

58. The method of claim 51 to 53, wherein said mammal has a condition selected from the group consisting of acute inflammation, rheumatoid arthritis, transplant rejection, asthma, inflammatory bowel disease, uveitis, restenosis, multiple sclerosis, psoriasis, wound healing, lupus erythematosus, allergic rhinitis, atopic dermatitis, food allergies, type I insulin-dependent diabetes mellitus, deramatitis, meningitis, thrombotic thrombocytopenic purpura, Sjogren's syndrome, encephalitis, leukocyte adhesion deficiency, rheumatic fever, Reiter's syndrome, psoriatic arthritic, progressive systemic sclerosis, primary biliary cirrhosis, pemphigus, pemphigoid, necrotizing vasculitis, mayasthenia gravis, lupus erythmatosus, polymyositis, sarcoidosis, granulomatorsis, vasculitis, pernicious anemia, CNS inflamunatory disorder, antigen-antibody complex mediated diseases, autoimmune hemolytic anemia, Hashimoto's thyroiditis, Graves disease, habitual spontaneous abortions, Reynard's syndrome, glomerulonephritis, dermatomyositis, chronic active hepatitis, celiac disease, autoimmune complications of AIDS, atrophic gastritis, ankylosing spondylitis, Addison's disease, psoriasis, penphigus vularis, Behcet's syndrome, acute respiratory distress syndrome (ARDS), ischemic heart disease, atherosclerosis, post-dialysis syndrome, leukemia, acquired immune deficiency syndrome septic shock and other type of acute inflammation, and lipid

20 histiocytosis.

1/9

FIG. 1

```

TPVgp38aa      1      TLKCYVTVLKDKGLVDKVFYCHYN      25
YabaGF38      1  MNKLLSLGFEVATCNCITLRANNTVTK-NGLIDGVEFFDINDQLVTRI 49
                **.* ****.* ***** **.* **
TPVgp38aa      26      25 (SEQ ID NO: 1)
YabaGF38      50  SYNHETKKGNYN 61 (SEQ ID NO: 2)

```

WO 02/31115

PCT/US01/32136

2/9

FIG. 2

YMTV partial gp38 gene (183 nucleotide):
5'
ATGAAATAGTAAATTTTATCCTGCTGTTGGGTTTGGCACTTGCATTTGTATATACCTTAAGATATAAATTATACCGTTA
CGGTAAGAAATGGATTATACGACGGGATTTTTTGGATTATTACACGATCATCAGTATAGTAAAGGATATCATATATCA
TGAACCCAAACGAGGAATGTAAAT (SEQ ID NO: 3)
YMTV partial gp38 gene (61 amino acid):
5'
MVKLLSLGLGFVATCNCITLRNVTYVYKNGHLDGVFFDYNDQLVTRISYKHETKGNVN (SEQ ID NO: 2)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

3/9

FIG. 3

SEQ ID NO: 4

MNKLIFFTIVAVNCNITLKNYVTVLKNGLDGVFDHNDQIVYKISNHEHFGNINFPADWPKIS
RSPTFGNDINFNWYSLAKETLEEINRNDSTKTSLSLITCCEYETGLLFGSYGVETANGPLARIHTGD
KRFKMTHTKGFVKYGMIVKNTLWKDVKTVLGGFETMGCSLALDYQRMAKGEIIPADTFTVKVGTNELE
DGNWTLCCSVNSFYPPDVTIKWIESHFKEYYVNGRYYPWGRKSDYEFGEFGEFPWNKKDKDANTYS
LTDLVRTSRKSSQIVCVVFDHTEAIVYTCSEGCNGBELYDHLVYRKTTEBGRGDEED*

FIG. 4 SEQ ID NO: 5

Tana gp38:

AAGCTTCATGATAAGTTAATATTATTAGCACAATTGTAGCAGTTTGTAACT
GCATAACITTTAAAATATAAATTAATCTGTTACGTTAAAAGATAATGGGTTATAC
GATGGAGTATTTTACGATCAITTAACAACGATCAGTTAGTAAACGAAAATATCAT
ATAACCCGAAACTAGACACGGAACGTAAATTTTAGGGCTGATTGGTTTAA
TATTTCTAGGAGTCCCCACACGCGCAGTTAACGATTACAACITTTAACTTTTGGT
ATTCITTAATGAAGAACITTTAGAAATAATTAATAAAAACGATAGCACAAA
AACTACTTCGCTTTCAITTAATCACTGGGTGTTATGAACAACAGGATTTATTTTG
GTAGTTATGGGTATGTAGAAAACGGCCAAACGGACCGTTGGCCAGATACCATAC
AGGAGATAAAAAGGTTTACGAAAATGACACATAAAGGTTTTCCCAAGTTGGGA
ATGTTAACTGTAAAACACTCTTTGGAAAAGATGAAAAACTTATCTAGGGCG
GTTTTGAATACATGGGATGTTCAATAGCTATTTTAGATTCCCAAAAATGGCT
AAAGGTGAAATACCAAAGATACAAACACCTACACAGTGAAGTAACTTTTACC
GAGTTAGAAAGATGGTAAACATGACTCTTTGATGCAATGCAATTCATTTTACC
TCCTGACGTAATTAAGTGGATAGAAAAGCAATTTTAAAGTGAATAT
AAATATGTTAACCGAAGATACTATCCAGAAATGGGGGAGAAAATCCGATTTAG
AGCCAGGAGAGCCAGGTTTTCCATGGAAATTTAAAAGATAAAGATGCCAA
ACACATATAGTTTACAGATTTAGTACGTACAACATCAAAAATGAGTAGTCA
ACTAGTATGTTGTTTTCCATGACACTTTAGAACGCCAAGTTTATACTTGT
CTGAAGGATGCCAATGGAGAGCTATACGACCACCTATATAGAAAAACAGA
AGAAGGAGAAGGTGAAGAGGATGAAAGAACGCGAAACCCCTCGAG

5/9

FIG. 5

SEQ ID NO: 6

MDKLLLFSTIVAVNCITLKYNYVTLKDDGLYDGVFDHNDQIVTKISINHEIHHGNVFRADWFNIS
 RSPHTPGNDYNFNFYSLNKEITLBEINKNDSTKTSLSLITGCYETGLLFGSYVETANGFLARYHTGD
 KRFTKMTHTKGFPRVGMVTKNTLWADYKAYLGGFYMGCSLAILDYQKMAKGIKPKDITPTVVKVTGNELE
 DGNMLECTVNSFPYFDVITKWLESEHFKGEYKAVNGRYYPWGRKSNVEPGEFPMNKKKDKDANTYS
 LADDVRFTRKMSQPVVVVFDLLEAQVYTCSEGCNGELYDHLRYKTEBEGEGEDED*

6/9

FIG. 6

SEQ ID NO: 7

YLD gp38:

ATGGATAAGTTACTATTATTAGCAAAITGTAGCAGTTTGTAACTGCATAAC
 TTAAAATAATAATTACTGTACGTTAAAAGATGATGGTTATACGATGGAG
 TATTTACGATCAITACAACGATCAGTTAGTGACGAAATATCATAAACCAT
 GAAACTAGACACCGGAAACGTAATTTAGGGCTGATTTGTTAAATTTCTTA
 GGAGTCCCCACACCGCCAGGTAACGTTATAACITTTAAGTTGGTATCTTTA
 ATGAAAGAAACTTTAGAAGAAATTAATAAAACGATAGCACAAAACACTACTT
 CGCTTTCATTAATCCTGGGTGTTATGAAACAGGATTTATTTGGTAGTTAT
 GGGTATGTAGAAACGGCCAAACGGCCGTTGGCCAGATACACAGGAT
 AAAAGGTTTACGAAAATGACACATAAAGGTTTTCCCAAGGTTGGAAATGTTA
 CTGTA AAAACACTCTTTGGAAAGATGTA AAGCTTATTTAGCGCGGTTTGA
 ATATATGGGATGTTTCATTTAGCTATTTTAGATTACCAAAAATGGCTAAAGGTA
 AAATACCAAAAGATACAAACCTACAGTGAAGTAACCGGTTAATGAGTTAG
 AAGATGGTAAACATGACTCTTGTGAATGCACTGAAATTCATTTACCCTCTGAC
 GTAAATTAAGTGGATAGAAACGCAACATTTAAAGGTGAATATAAATATG
 TTAACGGAAGATCTATCCAGAAATGGGGAAGAAATCCAAITATGAGCCAGG
 AGAGCCAGTTTTCCATGGAAATATCAAAAAGATAAAGATGCAAAATACATAT
 AGTTTAAACAGATTTAGTACGTACAAACATCAAAAATGATGATCAACAGTAT
 GTGTTGTTTTCCATGACACTTTAGAGCGCAAGTTTATCTTGTCTGAAGG
 TGCAATGGAGGCTATACGATCACCTATATAGAAAAACAGAAAGGG
 GAAAGGTGAGAGGATGAGAAAGACTGA

WO 02/31115

PCT/US01/32136

7/9

FIG. 7

SEQ ID NO: 8

MITKAIILSIITAVVDASAFVYNYTYLQDDNHRDYDFVTDYFNDLILKRLKLNSETGRPELRNEPPT
 WFNETKIRIYYPKNNVNFMLNRMSETLDEINKLPETSNPKYKMSLTIGCTDLROLQVNFVYVYVGGNIW
 TRFDPKKRFSKVRSTFEKVGMLTVKSQHWERVMEHLGSMVTLICFPFADDDYKLSKGYIDKPKVPTWT
 VTGIERGDNNTLICTFDNHYPSSVAVKWNIEDFAFDYRDFYVNEALLFDYDLPFPEEGYPTITRRLGDK
 YLFTSSPRVMVPTIMSNRLACVGFHSTLEPSTIYRCVNCSPPEPVLQYQGDRENDLEDEED

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 8

SEQ ID NO: 9

Swinepox CIL

ATGATTACTAAAGCGGATTGTGATATTGCTATTATTACAGCATATGTAGATGC
 TTCGCCAITTCITTAGTATACAAATTATACATACTACTTTACAAGATGATAATCATC
 GATATGACTTCGAAGTCCACCGATTATTTTAAATGATATACTAATAAACCAGTTTA
 AAACATAATAGCGAGACAGGAAGACCAGAAATTAAGAAATGAACCCACCAACA
 TGGTTAATGAGACTAAGATTAGATATTCCGAAAATAATTAATTTTAT
 GTTCTGGCTAAATAGATGAGTGAACCGCTAGATGAGATAAATAAACCITCCA
 GAAACGAGTAACTCTTACAAGACTATGTCCTTGACAATGGATGACTGATCT
 AAGACAACITCAAGTAAATTCGGTTATGTTACTGTAGGTTGGTAAATATATGGA
 CACGATTCGACCCCAAGAAATAACCGCTTTAGTAAAGTTAGATCACGTACATT
 TCCAAGGTAGGAATGTTAACTGTTAAATCACAACACTGGGAACCGTGTATG
 GAACATCTTGGATCAATGGTAACTAATTAACATGTCCTTTACAGCGGATGATTA
 TTATAAATTTCTAAGGGATATATAGATAAGCCAGTTAAGCCTACTGTTACAG
 TTACAGGAATTGAAAGAGGAGATAATACTACATTGATATGCACATTTGATAA
 TCATTATCCGTCGTCGGTGGTAAATGGTAAATGATTAACATCGAGGACITTGCTC
 CGGACTATCGTTATGATCCGTAGTAAATGAATGCTTCTCGTATACGGACTAT
 CTACCGGTGAACCCAGGATACTCCGACTAACTAGGAGATTAGGTGATAAAT
 ATTATTACATCACTACCTAGGGTATGGTACCACCTATCATGCTAAATAGA
 ATAGCATGTGTTGGATTTCATAGTACGTTAGAACCAAGCATATATAGATGTGT
 AAACGTCTCGGGACCTGAGCCTGTTTTACAATACCAGGGAGAT
 AGAAGGAATGACTTGGAGGATGAGGAGGATTA

FIG. 9

ClustalW Formatted Alignments



WO 02/31115

PCT/US01/32136

SEQUENCE LISTING

<110> VIRION THERAPEUTICS, INC.

<120> NUCLEIC ACID MOLECULES AND POLYPEPTIDES
FOR IMMUNE MODULATION

<130> 50082/015W02

<150> US 60/239,354

<151> 2000-10-11

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> Tanapox virus

<400> 1

Ile	Thr	Leu	Lys	Tyr	Cys	Tyr	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Asn	Gly	Leu
1				5					10					15	
Tyr	Asp	Lys	Val	Phe	Tyr	Cys	His	Tyr	Asn						
			20						25						

<210> 2

<211> 338

<212> PRT

<213> Yaba Monkey tumor virus

<400> 2

Met	Asn	Lys	Leu	Ile	Leu	Phe	Ser	Thr	Ile	Val	Ala	Val	Cys	Asn	Cys
1				5					10					15	
Ile	Thr	Leu	Lys	Tyr	Asn	Tyr	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Asn	Gly	Leu
				20					25					30	
Tyr	Asp	Gly	Val	Phe	Tyr	Asp	His	Tyr	Asn	Asp	Gln	Leu	Val	Thr	Lys
				35					40					45	
Ile	Ser	Tyr	Asn	His	Glu	Thr	Arg	His	Gly	Asn	Val	Asn	Phe	Arg	Ala
50															
55															
60															
Asp	Trp	Phe	Lys	Ile	Ser	Arg	Ser	Pro	His	Thr	Pro	Gly	Asn	Asp	Tyr
65															
70															
75															
80															
Asn	Phe	Asn	Phe	Trp	Tyr	Ser	Leu	Met	Lys	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile
85															
90															
95															
Asn	Lys	Asn	Asp	Ser	Thr	Lys	Thr	Thr	Ser	Leu	Ser	Leu	Ile	Thr	Gly
100															
105															
110															
Cys	Tyr	Glu	Thr	Gly	Leu	Leu	Phe	Gly	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Val	Glu	Thr
115															
120															
125															
Ala	Asn	Gly	Pro	Leu	Ala	Arg	Tyr	His	Thr	Gly	Asp	Lys	Arg	Phe	Thr
130															
135															
140															
Lys	Met	Thr	His	Lys	Gly	Phe	Pro	Lys	Val	Gly	Met	Leu	Thr	Val	Lys
145															
150															
155															
160															
Asn	Thr	Leu	Trp	Lys	Asp	Val	Lys	Thr	Tyr	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	Tyr

WO 02/31115

PCT/US01/32136

Met Gly Cys Ser	165	170	175
Leu Ala Ile Leu Asp Tyr Gln Lys Met Ala Lys Gly			
180	185	190	
Glu Ile Pro Lys Asp Thr Thr Pro Thr Val Lys Val Thr Gly Asn Glu			
195	200	205	
Leu Glu Asp Gly Asn Met Thr Leu Glu Cys Ser Val Asn Ser Phe Tyr			
210	215	220	
Pro Pro Asp Val Ile Thr Lys Trp Ile Glu Ser Glu His Phe Lys Gly			
225	230	235	
Glu Tyr Lys Tyr Val Asn Gly Arg Tyr Tyr Pro Glu Trp Gly Arg Lys			
245	250	255	
Ser Asp Tyr Glu Pro Gly Glu Pro Gly Phe Pro Trp Asn Ile Lys Lys			
260	265	270	
Asp Lys Asp Ala Asn Thr Tyr Ser Leu Thr Asp Leu Val Arg Thr Thr			
275	280	285	
Ser Lys Met Ser Ser Gln Leu Val Cys Val Val Phe His Asp Thr Leu			
290	295	300	
Glu Ala Gln Val Tyr Thr Cys Ser Glu Gly Cys Asn Gly Glu Leu Tyr			
305	310	315	
Asp His Leu Tyr Arg Lys Thr Glu Glu Gly Glu Gly Glu Asp Glu			
325	330	335	
Glu Asp			

<210> 3
 <211> 1183
 <212> DNA
 <213> Yaba Monkey tumor virus

<400> 3
 atgaataaagt taattttatc gttgttgggt ttgtggccaa cttgcaattg tataacctta 60
 agabataaatt ataccgttac ggtaaagaat ggatbatacg acggggfatt ttttgabbat 120
 tacaacgatc agtttgatca gaggatafca tataaccatg aaactagaca cggaaacgta 180
 aattctagag cttoatggtt tgatatctct aaaagccctc atactccggg tgacgattac 240
 cactttaact ttgggtaccg gtbtaatgaa gatactttgg agtccatcaa tagtaataaa 300
 aacgaaagcg ataaatgttc ttctgtgtcg ttaattttgg ggtgttatga aacgggatct 360
 ctttttggga gttacggata cgttgagtca agtggcggac cgttggctag gtatagcaag 420
 aaagataaaa agttttttaa aatgacagat aaaggatttc caaaggttgg aatgttaacc 480
 gttcaaggic ctagtggca aacagtlaaa aaatcgttgg gaggtttgt gtacgttga 540
 tttttgtcag ctatttttga ttatcaaaaa atggctaaga ataacatacc tagtaabgta 600
 atgccaactg ttacggtaac gggtaggaa ctgcaagatg gtaaccacaac gcttaagtgt 660
 aacgtaaaat ctttttaacc tcaagagta atgatacaat ggaatgaaag taatatttt 720
 aacggggaat atagatacgt taatggaga gaatcccgg aatggggaag gcaatcagat 780
 tatgagcccg gagagccagg ttctccgtta catccaataa aagatgacgg taaaccact 840
 lacagccttt tagattttgg tgcactacg tcaggatbaa ctagtcaagt agtttgtgtt 900
 gttttccatg acccgtttga atcgcaggtt aatacatggt ccgaagggtg tgaaggtaaa 960
 ttatacagat acctatatag aaaatcggaa gaaggagacg aggttgggga ggacgaagaa 1020
 gactgaaaac aagtcgtggt ggaagctgtt ctgatacgcg gtttacgttt ccgctagacg 1080
 gaagtttgcc gcccgagagg gcyatgtttt ttttaaaaa tgaanaagta gatgataccg 1140
 agcagtgacc gcgaaatgga ggttattaca gacggcgtgt tgc 1183

<210> 4
 <211> 338
 <212> FRT
 <213> Tanapox virus

<400> 4

WO 02/31115

PCT/US01/32136

Met Asn Lys Leu Ile Leu Phe Ser Thr Ile Val Ala Val Cys Asn Cys
1 5 10 15
Ile Thr Leu Lys Tyr Asn Tyr Thr Val Thr Leu Lys Asp Asn Gly Leu
20 25 30
Tyr Asp Gly Val Phe Tyr Asp His Tyr Asn Asp Gln Leu Val Thr Lys
35 40 45
Ile Ser Tyr Asn His Glu Thr Arg His Gly Asn Val Asn Phe Arg Ala
50 55 60
Asp Trp Phe Lys Ile Ser Arg Ser Pro His Thr Pro Gly Asn Asp Tyr
65 70 75 80
Asn Phe Asn Phe Trp Tyr Ser Leu Met Lys Glu Thr Leu Glu Glu Ile
85 90 95
Asn Lys Asn Asp Ser Thr Lys Thr Thr Ser Leu Ser Leu Ile Thr Gly
100 105 110
Cys Tyr Glu Thr Gly Leu Leu Phe Gly Ser Tyr Gly Tyr Val Glu Thr
115 120 125
Ala Asn Gly Pro Leu Ala Arg Tyr His Thr Gly Asp Lys Arg Phe Thr
130 135 140
Lys Met Thr His Lys Gly Phe Pro Lys Val Gly Met Leu Thr Val Lys
145 150 155 160
Asn Thr Leu Trp Lys Asp Val Lys Thr Tyr Leu Gly Gly Phe Glu Tyr
165 170 175
Met Gly Cys Ser Leu Ala Ile Leu Asp Tyr Gln Lys Met Ala Lys Gly
180 185 190
Glu Ile Pro Lys Asp Thr Thr Pro Thr Val Lys Val Thr Gly Asn Glu
195 200 205
Leu Glu Asp Gly Asn Met Thr Leu Glu Cys Ser Val Asn Ser Phe Tyr
210 215 220
Pro Pro Asp Val Ile Thr Lys Trp Ile Glu Ser Glu His Phe Lys Gly
225 230 235 240
Glu Tyr Lys Tyr Val Asn Gly Arg Tyr Tyr Pro Glu Trp Gly Arg Lys
245 250 255
Ser Asp Tyr Glu Pro Gly Glu Pro Gly Phe Pro Trp Asn Ile Lys Lys
260 265 270
Asp Lys Asp Ala Asn Thr Tyr Ser Leu Thr Asp Leu Val Arg Thr Thr
275 280 285
Ser Lys Met Ser Ser Gln Leu Val Cys Val Val Phe His Asp Thr Leu
290 300
Glu Ala Gln Val Tyr Thr Cys Ser Glu Gly Cys Asn Gly Glu Leu Tyr
305 310 315 320
Asp His Leu Tyr Arg Lys Thr Glu Glu Gly Glu Gly Glu Asp Glu
325 330 335
Glu Asp

<210> 5
<211> 3034
<212> DNA
<213> Tanapox virus

<400> 5
aagcttcacg aataagttaa tattatttag cacaaattgta gcagtttgta actgcataac 60
tttaaaatat aattatactg ttacgttaaa agataatggg ttatcacgatg gagtatttta 120
cgatcattac aacgatcagt taqtaacgaa aatatacatat aaccacgaaa ctgacacgg 180
aaacgtaaat tttagggcgt attgggttaa tatttctagg agtccccaca cgcacagtaa 240
cgattacaac tttaactttt ggtabbtttt aatgaaagaa actttagaag aaattaataa 300
aaacgatagc acaaaaacta cttgcgtttc attaatcact ggggtgttatg aaacaggatt 360

WO 02/31115

PCT/US01/32136

```

attatttggg agtbatgggt atgtagaaac ggccaacgga ccggtggcca gataccatac 420
aggagataaa eggtttacga aaatgacaca taaaggtttt cccaaggttg gaatgtaac 480
tgtaaaaaac acbctbtgga aaagtgtaaa aacttatcta ggcggttttg aatacatggg 540
agtbtccatta gctatttttag atbaccacaaa aatggctaaa ggtgaaabac caaaagatac 600
aacacctaca gtgaaagtaa cgggtaatga gttagaagat ggtaacatga ctcttgaatg 660
cagfgtaaat tcattttacc ctcttgacgt aattactaag tggatagaaa gcgaacatbt 720
taaaagtgaa tataaatatg ttaacggaaq alactatcca gaatggggga gaaatccga 780
tbatgagcca ggaagpcag gttttccotg gaattatnaa aaagataaag atgcaaacac 840
atatagttta acagatttag taccgtacac atcaaaaatg agtagtcaac tagtatgtgt 900
tgttttccat gacactttag aagcgcaagt ttatacttgt tctgaagatg gcaatggaga 960
gctatcagac cacctatata gaaaaacaga agaaggagaa ggtgaagagg atgaagaaga 1020
cggaaacctt cgag 1034

```

```

<210> 6
<211> 338
<212> PRT
<213> Yaba-like disease virus

```

```

<400> 6
Met Asp Lys Leu Leu Leu Phe Ser Thr Ile Val Ala Val Cys Asn Cys
1 5 10 15
Ile Thr Leu Lys Tyr Asn Tyr Thr Val Thr Leu Lys Asp Asp Gly Leu
20 25 30
Tyr Asp Gly Val Phe Tyr Asp His Tyr Asn Asp Gln Leu Val Thr Lys
35 40 45
Ile Ser Tyr Asn His Glu Thr Arg His Gly Asn Val Asn Phe Arg Ala
50 55 60
Asp Trp Phe Asn Ile Ser Arg Ser Pro His Thr Pro Gly Asn Asp Tyr
65 70 75 80
Asn Phe Asn Phe Trp Tyr Ser Leu Met Lys Glu Thr Leu Glu Glu Ile
85 90 95
Asn Lys Asn Asp Ser Thr Lys Thr Thr Ser Leu Ser Leu Ile Thr Gly
100 105 110
Cys Tyr Glu Thr Gly Leu Leu Phe Gly Ser Tyr Gly Tyr Val Glu Thr
115 120 125
Ala Asn Gly Pro Leu Ala Arg Tyr His Thr Gly Asp Lys Arg Phe Thr
130 135 140
Lys Met Thr His Lys Gly Phe Pro Lys Val Gly Met Leu Thr Val Lys
145 150 155 160
Asn Thr Leu Trp Lys Asp Val Lys Ala Tyr Leu Gly Gly Phe Glu Tyr
165 170 175
Met Gly Cys Ser Leu Ala Ile Leu Asp Tyr Gln Lys Met Ala Lys Gly
180 185 190
Lys Ile Pro Lys Asp Thr Thr Pro Thr Val Lys Val Thr Gly Asn Glu
195 200 205
Leu Glu Asp Gly Asn Met Thr Leu Glu Cys Thr Val Asn Ser Phe Tyr
210 215 220
Pro Pro Asp Val Ile Thr Lys Trp Ile Glu Ser Glu His Phe Lys Gly
225 230 235 240
Glu Tyr Lys Tyr Val Asn Gly Arg Tyr Tyr Pro Glu Trp Gly Arg Lys
245 250 255
Ser Asn Tyr Glu Pro Gly Glu Pro Gly Phe Pro Trp Asn Ile Lys Lys
260 265 270
Asp Lys Asp Ala Asn Thr Tyr Ser Leu Thr Asp Leu Val Arg Thr Thr
275 280 285
Ser Lys Met Ser Ser Gln Pro Val Cys Val Val Phe His Asp Thr Leu
290 295 300
Glu Ala Gln Val Tyr Thr Cys Ser Glu Gly Cys Asn Gly Glu Leu Tyr

```


WO 02/31115

PCT/US01/32136

165 170 175
 His Leu Gly Ser Met Val Thr Leu Thr Cys Pro Phe Thr Ala Asp Asp
 180 185 190
 Tyr Tyr Lys Ile Ser Lys Gly Tyr Ile Asp Lys Pro Val Lys Pro Thr
 195 200
 Val Thr Val Thr Gly Ile Glu Arg Gly Asp Asn Thr Thr Leu Ile Cys
 210 215 220
 Thr Phe Asp Asn His Tyr Pro Ser Ser Val Ala Val Lys Trp Tyr Asn
 225 230 235 240
 Ile Glu Asp Phe Ala Pro Asp Tyr Arg Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Glu
 245 250 255
 Leu Leu Pro Asp Thr Asp Tyr Leu Pro Gly Glu Pro Gly Tyr Pro Thr
 260 265 270
 Ile Thr Arg Arg Leu Gly Asp Lys Tyr Leu Phe Thr Ser Ser Pro Arg
 275 280 285
 Val Met Val Pro Thr Ile Met Ser Asn Arg Ile Ala Cys Val Gly Phe
 290 295 300
 His Ser Thr Leu Glu Pro Ser Ile Tyr Arg Cys Val Asn Cys Ser Gly
 305 310 315 320
 Pro Glu Pro Val Leu Gln Tyr Gln Gly Asp Arg Arg Asn Asp Leu Glu
 325 330 335
 Asp Glu Glu Asp
 340

<210> 9
 <211> 1023
 <212> DNA
 <213> Swinepox virus (C1L)

<400> 9
 atgattacta aagcgattgt gatattgtct attattacag catatgtaga tgcttcgca 60
 ttcttagtat acaattatac atatacttta caagatgata atcatcgata tgacttcgaa 120
 gtcaccgatt attttaatga tatactaata aacggttaa aactaatag cgagacagga 180
 agaccagaat taagaaatga accaccaaca tggttlaatg agactaagat tagatattat 240
 ccgaaaaata attataabtt tatgtttctgg ctaaatagaa tgagtgaac gctagatgag 300
 ataaatgac tccagaanc gagtaacct tacaagacta tctccttgac aattggatgt 360
 actgatctaa gcaactica agtaaatcc ggttatgta ctgtagtgg taataatgg 420
 acacgattcg acccaagaa taacgctttt agtbaagtta gatcagtac atttccaag 480
 gtgggaatgl taactgttaa atcacaacac tgggaactgt ttatggaaca tcttggatca 540
 atggtaaact taactatgcc gtttacagcg gatgattatt ataaaatttc taagggatatt 600
 atagataaagc cagttaagcc taactgttaca gttacaggaa ttgaaagagg agataatac 660
 acattgatat gcacatttga taactcattat ccgtcgtcgg tcgctgttaa atggtataac 720
 atcggaggacb ttgctccgga ctatcgttat gatccgtacg taatgaatt gcttccgtgat 780
 accgactatc taccgggtga accaggatct ccgactataa ctaggagatt aggtgataaa 840
 tattttatba catcatcaac tagggttatg gtaccactaa tcatgtctaa tagaatagca 900
 tggtttggat ttcatagtac gttagaacca agcabatata gatgtgtaaa ctgctcggga 960
 ctgagctctg tttacaata ccaggagat agaaggaatg acttgaggaa tgaggaggat 1020
 taa 1023

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
18 April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/031115 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 39/275 (74) Agent: BIEKER-BRADY, Kristina; Clark & Elbing LLP, 176 Federal Street, Boston, MA 02110-2214 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/32136 (81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 11 October 2001 (11.10.2001) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NI, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/239,354 11 October 2000 (11.10.2000) US (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/239,354 (CIP) filed on 11 October 2000 (11.10.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): VIRON THERAPEUTICS, INC. [CA/CA], Suite 103, 100 Collip Circle, London, Ontario N6G 4X8 (CA).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): McFADDEN, Grant [CA/CA]; 1435 Corley Drive, South, London, Ontario N6G 2K5 (CA). ESSANI, Karim [US/US]; 9528 Autumnwood Circle, Kalamazoo, MI 49009 (US).
- Published: with international search report (88) Date of publication of the international search report: 13 February 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/031115 A3

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES AND POLYPEPTIDES FOR IMMUNE MODULATION

(57) Abstract: The invention provides gp38 polypeptides, which play a role in immunomodulation, nucleic acid molecules encoding these polypeptides, and therapeutic and diagnostic methods employing these polypeptides and nucleic acid molecules. The invention also provides methods for identifying compounds that modulate the biological activities of gp38 nucleic acid molecules and polypeptides, and therapeutic methods employing these compounds.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/32136
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/275 US CL : 424/232.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/186.1, 232.1, 435/69.1, 183, 235.1, 530/300, 350, 536/23.2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	ESSANI et al. Multiple anti-cytokine activities secreted from tanapox virus infected cells. Microbial Pathogenesis. 1994, Vol. 17, pp. 347-353, see entire document.	1, 3-8 -----
Y		9, 10, 42, 43
X ---	PAULOSE et al. Selective inhibition of TNF-alpha induced cell adhesion molecule gene expression by tanapoxvirus. Microbial Pathogenesis. 1998, Vol. 25, pp. 33-41, see entire document.	1, 3, 8 -----
Y		9, 10, 42, 43
X, P ---	LEE et al. The Genome Sequence of Yaba-like Disease Virus, a Yatapoxvirus. Virology. 2001, Vol. 281, pp. 170-192, see table 1.	1, 2, 4-9 -----
Y, P		3, 10, 42, 43
X ---	FENGER et al. Proteins of Yaba monkey tumor virus I. Structural proteins. Journal of Virology. May 1976, Vol. 18, No. 2, pp. 757-763, see figure 5.	1, 2 -----
A		
Y	AMANO et al. Identification and characterization of the thymidine kinase gene of Yaba virus. Journal of General Virology. 1995, Vol. 76, pp. 1109-1115, see figure 5.	1, 2 -----
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	**	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
B earlier application or patent published on or after the international filing date	*X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z*	document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 March 2002 (15.03.2002)	Date of making of the international search report 09 AUG 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Ulrike Winkler, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/32136

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OLSEN et al. Immunodiffusion analysis of Yaba poxvirus structural and associated antigens. Journal of Virology. February 1970, Vol. 5, No. 2, pp. 212-220, see figure 1.	1, 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/32136
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: See Continuation		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-10, 42 and 43 as they read on SEQ ID NO: 1
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/32136

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

- Group 1, claim(s) 1-10, 42 and 43 drawn to a polypeptide of a Yatapoxvirus and a pharmaceutical composition comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 1, a Tanapox virus protein sequence.
- Group 2, claim(s) 1-10, 42 and 43 drawn to a polypeptide of a Yatapoxvirus and a pharmaceutical composition comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 2, a Yaba Monkey Tumor Virus protein sequence.
- Group 3, claim(s) 1-10, 42 and 43 drawn to a polypeptide of a Yatapoxvirus and a pharmaceutical composition comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 4, a Tanapox virus protein sequence.
- Group 4, claim(s) 1-10, 42 and 43 drawn to a polypeptide of a Yatapoxvirus and a pharmaceutical composition comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 6, a Yaba-like disease virus protein sequence.
- Group 5, claim(s) 1-10, 42 and 43 drawn to a polypeptide of a Yatapoxvirus and a pharmaceutical composition comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 8, a Swinepox virus protein sequence.
- Group 6, claim(s) 11-26, 32, 33 and 47, drawn to the nucleic acid encoding a Yatapoxvirus protein, the nucleotide sequence comprises SEQ ID NO: 3.
- Group 7, claim(s) 11-26, 32, 33 and 47, drawn to the nucleic acid encoding a Yatapoxvirus protein, the nucleotide sequence comprises SEQ ID NO: 5.
- Group 8, claim(s) 11-26, 32, 33 and 47, drawn to the nucleic acid encoding a Yatapoxvirus protein, the nucleotide sequence comprises SEQ ID NO: 7.
- Group 9, claim(s) 27-29, drawn to a transgenic animal comprising a Yatapoxvirus gene.
- Group 10, claim(s) 30, 31 and 48, drawn to an antibody to a Yatapoxvirus protein. Selection of one of the following species SEQ ID NO: 1, a Tanapox virus protein sequence.
- Group 11, claim(s) 30, 31 and 48, drawn to an antibody to a Yatapoxvirus protein. Selection of one of the following species SEQ ID NO: 2, a Yaba Monkey Tumor Virus protein sequence.
- Group 12, claim(s) 30, 31 and 48, drawn to an antibody to a Yatapoxvirus protein. Selection of one of the following species SEQ ID NO: 4, a Tanapox virus protein sequence.
- Group 13, claim(s) 30, 31 and 48, drawn to an antibody to a Yatapoxvirus protein. Selection of one of the following species SEQ ID NO: 6, a Yaba-like disease virus protein sequence.
- Group 14, claim(s) 34, drawn to a method of detecting a polypeptide of a Yatapoxvirus.
- Group 15, claim(s) 35, drawn to a method of detecting a gene of a Yatapoxvirus comprising SEQ ID NO: 3.
- Group 16, claim(s) 35, drawn to a method of detecting a gene of a Yatapoxvirus comprising species SEQ ID NO: 5.
- Group 17, claim(s) 35, drawn to a method of detecting a gene of a Yatapoxvirus comprising SEQ ID NO: 7.
- Group 18, claim(s) 36, drawn to a method of identifying an immunomodulator gene of a Yatapoxvirus.
- Group 19, claim(s) 37 and 43, drawn to identifying a test compound that modulates the expression of a Yatapoxvirus gene comprising a substantially identical sequence to SEQ ID NO: 1.
- Group 20, claim(s) 37 and 43, drawn to identifying a test compound that modulates the expression of a Yatapoxvirus gene comprising a substantially identical sequence to SEQ ID NO: 2.
- Group 21, claim(s) 37 and 43, drawn to identifying a test compound that modulates the expression of a Yatapoxvirus gene comprising a substantially identical sequence to SEQ ID NO: 4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/32136

Group 22, claim(s) 37 and 43, drawn to identifying a test compound that modulates the expression of a Yatapoxvirus gene comprising a substantially identical sequence to SEQ ID NO: 6.

Group 23, claim(s) 49 and 55, drawn to identifying a test compound that modulates the expression of a Yatapoxvirus gene comprising a substantially identical sequence to SEQ ID NO: 8.

Group 24, claim(s) 38 and 43, drawn to a method of targeting protein for secretion from a cell, the protein comprising a sequence substantially identical to SEQ ID NO: 1.

Group 25, claim(s) 38 and 43, drawn to a method of targeting protein for secretion from a cell, the protein comprising a sequence substantially identical to SEQ ID NO: 2.

Group 26, claim(s) 38 and 43, drawn to a method of targeting protein for secretion from a cell, the protein comprising a sequence substantially identical to SEQ ID NO: 4.

Group 27, claim(s) 38 and 43, drawn to a method of targeting protein for secretion from a cell, the protein comprising a sequence substantially identical to SEQ ID NO: 6.

Group 28, claim(s) 50 and 55, drawn to a method of targeting protein for secretion from a cell, the protein comprising a sequence substantially identical to SEQ ID NO: 8.

Group 29, claim(s) 39-41, 43 and 44-46, drawn to a method of immunomodulating a response in an animal, the protein comprising a sequence substantially identical to SEQ ID NO: 1.

Group 30, claim(s) 39-41, 43 and 44-46, drawn to a method of immunomodulating a response in an animal, the protein comprising a sequence substantially identical to SEQ ID NO: 2.

Group 31, claim(s) 39-41, 43 and 44-46, drawn to a method of immunomodulating a response in an animal, the protein comprising a sequence substantially identical to SEQ ID NO: 4.

Group 32, claim(s) 39-41, 43 and 44-46, drawn to a method of immunomodulating a response in an animal, the protein comprising a sequence substantially identical to SEQ ID NO: 6.

Group 33, claim(s) 51-53 and 55-58, drawn to a method of immunomodulating a response in an animal, the protein comprising a sequence substantially identical to SEQ ID NO: 8.

The inventions listed as Groups 1-10 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The technical feature linking groups 1-10 appears to be the polypeptide of a Yatapoxvirus. Fenger et al. (Journal of Virology 1976) identify the proteins associated with Yaba Monkey tumor virus, a Yatapoxvirus (see figure 4 and 5). Therefore, the technical feature linking the inventions of groups 1-10 does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2, as it does not define a contribution over the prior art.

The special technical feature of group 1-5 is considered to be the polypeptide of a Yatapoxvirus, each group encompasses different sequences.

The special technical feature of group 6-8 is considered to be the polynucleotide of a Yatapoxvirus, each group encompasses different sequences.

The special technical feature of group 9 is considered to be a transgenic animal comprising the gene of a Yatapoxvirus.

The special technical feature of group 10-13 is considered to be an antibody that recognizes a Yatapoxvirus, each group recognizes different sequences.

The special technical feature of group 14 is considered to be a method of detecting a Yatapoxvirus polypeptide.

The special technical feature of group 15-17 is considered to be a method of identifying a Yatapoxvirus gene, each group encompasses different sequences.

The special technical feature of group 18 is considered to be a method of identifying an immunomodulator of Yatapoxvirus.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/32136

The special technical feature of group 19-23 is considered to be a method of identifying a Yatapoxvirus polynucleotide that modulates the expression of a gene, each group encompasses different sequences.

The special technical feature of group 24-28 is considered to be a method of targeting the secretion of a protein from a cell using a Yatapoxvirus gene sequence, each group encompasses different sequences.

The special technical feature of group 29-33 is considered to be a method of immunomodulating an immune response in an animal with Yatapoxvirus polypeptide, each group encompasses different sequences.

Accordingly, groups 1-33 are not so linked by the same or corresponding technical feature as to form a single general inventive concept.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, DEWWENT, MEDLINE, BIOSIS, STIC

SEQ ID NO: 1, Yatapoxvirus, Tanspoxvirus, DNA virus, Yaba Monkey Virus, . poxviridae

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 5/16	4 H 0 4 5
A 6 1 P 5/16	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/08	
A 6 1 P 7/08	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 15/06	
A 6 1 P 15/06	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 21/02	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/065	A 6 1 P 43/00	1 0 7
C 0 7 K 16/08	C 0 7 K 14/065	
C 1 2 N 5/10	C 0 7 K 16/08	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/566	
	G 0 1 N 33/569	L
	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

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

U, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100117813

弁理士 深澤 憲広

(72)発明者 マクファデン, グラント

カナダ国オンタリオ エヌ6ジー・2ケイ5, ロンドン, サウス, コーレイ・ドライブ 1435

(72)発明者 エッサーニ, カリム

アメリカ合衆国ミシガン州49009, カラマズー, オータムウッド・サークル 9528

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36

DA37 DA44 FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 BA32 BA51 CA04 CA09 DA02 EA02 EA04 FA02

GA11 HA12 HA15

4B063 QA18 QQ42 QQ52 QQ79 QR55 QR59 QR62 QR69 QR77 QR80

QS24 QS25 QS28 QS34

4B065 AA26X AA90X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46

4C084 AA02 AA07 BA01 BA22 BA23 CA01 NA14 ZA02 ZA34 ZA36

ZA39 ZA55 ZA59 ZA60 ZA68 ZA75 ZA81 ZA94 ZA96 ZB05

ZB08 ZB09 ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZB22 ZB27 ZB33 ZC06

ZC11 ZC35 ZC55

4C085 AA11 BA85 BB11 BB12 CC08 CC21

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA53 CA40 DA76 DA86 EA22 EA50

FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004528010A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002534485	申请日	2001-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	バイロンセラピューティックスインコーポレーテッド		
申请(专利权)人(译)	拜伦Therapeutics公司		
[标]发明人	マクファデングラント エッサーニカリム		
发明人	マクファデン,グラント エッサーニ,カリム		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K39/275 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/16 A61P7/00 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/12 A61P31 /18 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/065 C07K16/08 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33 /569		
CPC分类号	A01K2217/05 A01K2217/075 A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P11/08 A61P13/12 A61P15/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P19 /02 A61P21/00 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 C07K14/005 C12N2710/24022		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K39/275 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/16 A61P7/00 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/00 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/28 A61P29/00 A61P29 /00.101 A61P31/12 A61P31/18 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00. 105 A61P43/00.107 C07K14/065 C07K16/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.L C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045 /DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA44 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA32 4B024/BA51 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024 /EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063 /QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA95Y 4B065 /AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA01 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA34 4C084 /ZA36 4C084/ZA39 4C084/ZA55 4C084/ZA59 4C084/ZA60 4C084/ZA68 4C084/ZA75 4C084/ZA81 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB05 4C084/ZB08 4C084/ZB09 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084 /ZB15 4C084/ZB21 4C084/ZB22 4C084/ZB27 4C084/ZB33 4C084/ZC06 4C084/ZC11 4C084/ZC35 4C084/ZC55 4C085/AA11 4C085/BA85 4C085/BB11 4C085/BB12 4C085/CC08 4C085/CC21 4H045 /AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/239354 2000-10-11 US		
其他公开文献	JP2004528010A		

摘要(译)

本发明提供了在免疫调节中起作用的gp38多肽，编码这些多肽的核酸分子，以及使用这些多肽和核酸分子的治疗和诊断方法。本发明进一步提供了鉴定调节gp38核酸分子和多肽的生物活性的化合物的方法，以及使用这些化合物的治疗方法。