

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 511070

(P2003 - 511070A)

(43)公表日 平成15年3月25日(2003.3.25)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/7052	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/7052		48/00	4 B 0 2 4
38/00		A 6 1 P 29/00	4 B 0 6 3
48/00		31/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 29/00		35/00	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 46数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 530471(P2001 - 530471)

(86)(22)出願日 平成12年10月6日(2000.10.6)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月8日(2002.4.8)

(86)国際出願番号 PCT/GB00/03821

(87)国際公開番号 W001/027267

(87)国際公開日 平成13年4月19日(2001.4.19)

(31)優先権主張番号 9923790.1

(32)優先日 平成11年10月8日(1999.10.8)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 アイシス インノベーション リミテッド
イギリス,オーエクス2 7ディーディー オ
ックスフォード,サマータウン,ユ-アート
ブレイス,ユ-アート ハウス(番地なし
)

(72)発明者 アダムズ, エリザベス
イギリス,オーエクス3 0エイチワイ オ
ックスフォード,マーストン,パリュ クロウ
ス 16

(72)発明者 ウォルドマン, ハ-マン
イギリス,オーエクス2 7キューワイ オ
ックスフォード,アプスリー ロード 4

(74)代理人 弁理士 丹羽 宏之

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫調節組成物

(57)【要約】

ある種のT細胞集団で差次的に発現される遺伝子とその発現産物(例えばコグネイトタンパク質)、コグネイト受容体、調節因子、結合パートナー、および阻害物質またはその擬態物と共に記載されている。とりわけ治療介入の標的として、T r e g免疫調節経路の成分について薬理組成物が炎症性または免疫疾患の処置およびその使用に基づく治療および予防方法について記載されている。

。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一つの分離遺伝子であって、

(a) Th1 富化細胞集団、Th2 富化細胞集団およびTreg 富化細胞集団を提供し、

(b) 前記集団での1個またはそれ以上の遺伝子の相対的発現を比較し、それにより

(c) 集団で差次的に発現される遺伝子を同定し、次いで

(d) ステップ(c)で同定される遺伝子を分離する、
ステップより成るプロセスで獲得できることを特徴とする分離遺伝子。

【請求項2】 請求項1記載の遺伝子であって、ここでステップ(c)で同定される遺伝子が、

(a) Th1 およびまたはTh2 細胞に比較してTreg 富化集団で高水準で発現され、あるいは

(b) Th1 およびまたはTh2 細胞に比較してTreg 富化集団で低水準で発現される、
遺伝子であることを特徴とする遺伝子。

【請求項3】 請求項1または請求項2記載の遺伝子であって、ここで遺伝子が表1にリストされた遺伝子のいずれか一つ、または相同体、誘導体、対立遺伝子形態、種変異体、突然変異体形態あるいはその等価物であることを特徴とする遺伝子。

【請求項4】 請求項3記載の遺伝子であって、それが表1にリストされた遺伝子のいずれか一つのヒト変異体であることを特徴とする遺伝子。

【請求項5】 請求項1乃至4のいずれか1項記載の遺伝子であって、ここで相対的発現がSAGE分析によりステップ(b)で比較されることを特徴とする遺伝子。

【請求項6】 請求項1乃至4のいずれか1項記載の遺伝子であって、ここで相対的発現がプロテオーム分析によりステップ(b)で比較されることを特徴とする遺伝子。

【請求項7】 先行請求項のいずれか1項で定義される遺伝子によりコード

化されることを特徴とする一つの分離タンパク質。

【請求項8】 先行請求項のいずれか1項で定義されることを特徴とする遺伝子の一つの分離調節因子。

【請求項9】 請求項8記載の調節因子であって、それが

(a) 遺伝子の転写活性化因子または転写抑制因子、

(b) 遺伝子に一致するアンチセンス核酸、

から選択されることを特徴とする調節因子。

【請求項10】 先行請求項のいずれか1項で定義されることを特徴とするタンパク質の一つの分離調節因子。

【請求項11】 タンパク質の作用薬または拮抗薬であることを特徴とする請求項10記載の調節因子。

【請求項12】 請求項11記載の調節因子であって、

(a) タンパク質のコグネイト受容体、

(b) タンパク質またはそのコグネイト受容体の活性を遮断する抗体または抗体断片、

(c) 擬態物、

(d) タンパク質のコグネイト受容体をコード化する遺伝子の転写活性化因子または転写抑制因子、

(e) (a)乃至(d)のいずれかをコード化する核酸、

(f) (e)の核酸に一致するアンチセンスDNA

から選択されることを特徴とする調節因子。

【請求項13】 請求項1乃至6のいずれか1項で定義された遺伝子のための一つの分離結合パートナー。

【請求項14】 核酸(選択肢として一本鎖核酸)であることを特徴とする請求項13記載の結合パートナー。

【請求項15】 請求項7で定義されたタンパク質のための一つの分離結合パートナー。

【請求項16】 請求項8乃至12のいずれか1項記載の調節因子のための一つの分離結合パートナー。

【請求項17】 タンパク質または調節因子に特異的（または選択的に反応性）である抗体（または抗体誘導体）を含むことを特徴とする請求項15または請求項16記載の結合パートナー。

【請求項18】 請求項1乃至6のいずれか1項で定義された遺伝子のコーディング鎖または非コーディング鎖の補体を含むことを特徴とする分離一本鎖核酸。

【請求項19】 請求項1乃至6のいずれか1項記載の遺伝子に雑種形成可能であることを特徴とする核酸。

【請求項20】 請求項1乃至6のいずれか1項記載の遺伝子に一致することを特徴とする一つのアンチセンスDNA。

【請求項21】 請求項1乃至6のいずれか1項記載の遺伝子を含むことを特徴とする一つのベクター。

【請求項22】 請求項21記載のベクターを含むことを特徴とする一つの宿主細胞。

【請求項23】 一つの薬理組成物であって、この薬理組成物に生物活性を付与するのに十分な濃度で任意に存在する活性成分、遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクターまたは宿主細胞として先行する請求項のいずれか1項で定義された遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクターまたは宿主細胞を含むことを特徴とする組成物。

【請求項24】 抗炎症性組成物であることを特徴とする請求項23記載の組成物。

【請求項25】 免疫調節組成物であることを特徴とする請求項23記載の組成物。

【請求項26】 免疫抑制組成物であることを特徴とする請求項25記載の組成物。

【請求項27】 免疫刺激組成物であることを特徴とする請求項25記載の組成物。

【請求項28】 (a) 薬剤用（例えば治療、予防または診断）で使用され、およびまたは、

(b) 薬理賦形剤で、単位用量形態、あるいは局部もしくは全身投与に適した形態にある、

請求項1乃至22のいずれか1項で定義された遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクターまたは宿主細胞。

【請求項29】 請求項1乃至22のいずれか1項記載の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクターまたは宿主細胞を含むことを特徴とする一つの診断用キットまたは試薬。

【請求項30】 請求項1乃至22のいずれか1項記載の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクターまたは宿主細胞を含むことを特徴とする一つの細胞類別試薬。

【請求項31】 生物サンプルでTreg免疫調節経路の状態を分析するための一つの生体外の方法であって、

(a) 請求項1乃至6のいずれか1項で定義された遺伝子、または

(b) 前記遺伝子のコグネイト発現産物、または

(c) 前記遺伝子の活性の生化学マーカー、

(d) Th1およびまたはTh2およびまたはTreg細胞

の活性の存在を決定するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項32】 生化学サンプルでTh1およびまたはTh2およびまたはTreg細胞を検出するための一つの生体外の方法であって、請求項1乃至17のいずれか1項で定義された遺伝子、タンパク質、調節因子または結合パートナーに選択的に結合する試薬にサンプルを接触させるステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項33】 請求項32記載の方法であって、ここで試薬が請求項30記載の細胞類別試薬を含むことを特徴とする方法。

【請求項34】 請求項32または請求項33記載の方法であって、ここで前記方法が細胞の存在を検出するためのものであることを特徴とする方法。

【請求項35】 請求項32乃至34のいずれか1項記載の方法であって、ここでTh1およびまたはTh2およびまたはTreg細胞の数が決定されることを特徴とする方法。

【請求項36】 請求項35記載の方法であって、ここで、

(a) Th2およびまたはTreg細胞数と比較されたTh1細胞数、または

(b) Th1およびまたはTreg細胞数と比較されたTh2細胞数、または

(c) Th1およびまたはTh2細胞数と比較されたTreg細胞数

が決定されることを特徴とする方法。

【請求項37】 (a) 被験者での抗炎症または免疫調節処置の進捗、または

(b) 被験者での炎症性または免疫疾患の進捗をモニターするための一つの生体外の方法であって、サンプルでのTreg免疫調節経路の状態を分析するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項38】 請求項37記載の方法であって、ここで(a)において処置の効率または終点がモニターされることを特徴とする方法。

【請求項39】 処置を受ける被験者での抗炎症薬または免疫調節薬の投与治療プログラムの薬量を決定する一つの生体外の方法であって、請求項31記載の方法に従ってTreg免疫調節経路の状態を分析するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項40】 炎症性疾患または免疫疾患の処置に使用するための薬剤の製造を目的とした請求項1乃至22のいずれか1項記載の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクターまたは宿主細胞の使用法。

【請求項41】 二部構成抗炎症処置または免疫調節処置に使用するための作用薬の製造を目的とした請求項1乃至22のいずれか1項記載の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクターまたは宿主細胞の使用法であって、第1部は抗炎症薬または免疫調節薬の投与を含み、また第2部は請求項31記載の方法に従ってTreg免疫調節経路の状態を分析することにより処置の進捗をモニターすることを含むことを特徴とする使用法。

【請求項42】 請求項41記載の使用法であって、ここで処置の効率およびまたは終点が請求項37記載の方法によりモニターされることを特徴とする使用法。

【請求項43】 被験者での炎症性疾患または免疫疾患の処置のための薬剤の製造を目的とした抗炎症薬または免疫調節薬の使用法であって、その処置が請

請求項31記載の方法に従って被験者でのT r e g免疫調節経路の状態を分析するステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項44】 請求項43記載の使用法であって

ここで被験者でのT r e g免疫調節経路の状態を分析するステップが、

(a) 抗炎症処置または免疫調節処置の効率をモニターし、

または

(b) 抗炎症薬または免疫調節薬の投与治療プログラムの薬量を決定する、ためのものであることを特徴とする使用法。

【請求項45】 薬理組成物を産生するための一つのプロセスであって、

(a) T r e g免疫調節経路を含む試験システム(またはその部分)を提供し

、

(b) 候補薬剤を提供し、

(c) 試験システムを候補薬剤の1個と接触させ候補薬剤と試験システムとの相互作用を分析することにより候補化合物を選別し、また選択肢として

(d) ステップ(c)で選別された候補薬剤の同一性を基礎にした薬理活性を持つ薬剤を合成しまたは精製する、

ステップを含むことを特徴とするプロセス。

【請求項46】 請求項45記載のプロセスにより産生され(または獲得でき)る一つの薬理組成物、またはその誘導体。

【請求項47】 請求項1乃至21のいずれか1項記載の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸またはベクターを産生する方法であって、

(a) 請求項22記載の宿主細胞を培養し、また

(b) 培養宿主細胞から(例えば培養上澄みまたは細胞分画から)遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸またはベクターを精製する、

ステップを含むことを特徴とするプロセス。

【請求項48】 表1で示される遺伝子発現プロファイルを事実上持つことを特徴とする一つの分離T r e g細胞。

【請求項49】 請求項48記載のT r e g細胞であって、ここで表1にリ

ストされた遺伝子の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%の発現が表1で示された範囲で少なくともTh1およびTh2に對比して上向きまたは下向き調節されているように遺伝子発現プロファイルが存在することを特徴とするTreg細胞。

【請求項50】 請求項48または請求項49記載のTreg細胞であって、ここで細胞がTh1およびTh2細胞の増殖とサイトカイン産出を抑制することを特徴とするTreg細胞。

【請求項51】 治療または予防に使用されることを特徴とする請求項48乃至50のいずれか1項記載の細胞。

【請求項52】 免疫調節（例えば免疫抑制または免疫刺激）あるいは炎症の処置に使用されることを特徴とする請求項51記載の細胞。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の技術分野】**

本発明はT r e g免疫調節経路の成分の解明に少なくとも部分的に基づくものである。とりわけ本発明は、ある種のT細胞集団内で、またその発現産物（例えばコグネイトタンパク質）、コグネイト受容体、調節因子、結合パートナーおよび阻害体またはその擬態物に対して差次的に発現される遺伝子に関する。とりわけ本発明は、治療介入のための標的として、T r e g免疫調節経路の成分の使用に基づく薬理組成物および治療並びに予防方法に関する。

【0002】**【発明の背景】**

免疫調節は各種の疾病と疾患の管理と処置において基本的に重要なものである。免疫調節の一形態である免疫抑制は各種の医学的徴候に用途を見出す。重要な例は移植片拒絶、自己免疫および慢性炎症性疾患である。これとは対照的に、免疫刺激は感染症およびある種の増殖性疾患（癌など）の処置に適応される。

【0003】

かくして免疫調節剤として作用する治療薬の発展に大きな関心が寄せられる。

【0004】

免疫応答およびその調節の主な媒介的の中でもC D 4 + Tヘルパー細胞の各種サブセットが存在する。T細胞受容体（T C R）相互作用を介して一度特発されると、T h 0と名付けられたナイーブC D 4 + Tヘルパー細胞はいくつかの機能的に異なるサブセットに分化する。Tヘルパー1（T h 1）リンパ球は細胞免疫に寄与し、一方Tヘルパー2（T h 2）リンパ球は主として体液免疫に寄与するよう見える。これらのサブセットは特徴的なサイトカインプロファイルを持つ。T h 1リンパ球はI L - 2 , I F N - 、およびT N F - を産生し、一方T h 2リンパ球はI L - 4 , I L - 5およびI L - 1 0を産生する。T h 1細胞はI F N およびI L - 1 2の存在で活性化により誘導され、一方I L - 4はT h 2細胞の分化に指向できる。

【0005】

しかし、CD4⁺T細胞の他のサブセットが免疫調節に関与することが最近になって明らかとなった。これらの細胞はここでT調節細胞(Treg細胞)として引用される。T調節細胞の少なくとも2個の異なるサブセットが今日までに文献に記載されている。グルー他(1997年)、Nature, 389巻、737-742ページはT調節細胞1(Tr1細胞)を記載しており、これはIL-10で駆動され、抗原特異的免疫応答を抑制し、また生体内のある種の異常免疫応答を能動的に下向き調節する。これらのTr1細胞はレッテリオおよびロバーツ(1998年)Ann. Rev. Immunol., 16巻、137-161ページ記載のTGF- β 分泌Th3細胞に類似して(しかし異なっている)いる。

【0006】

しかし、その細胞エレメント(すなわちその構成T細胞サブセットの性質と数)および生化学エレメント(すなわち調節ネットワークの分子構成)の両方でのCD4⁺T細胞免疫調節ネットワークの全範囲は未だに不明瞭なままである。薬物での免疫調節ネットワークの全範囲は未だに不明瞭なままである。薬物での免疫調節の重要性が与えられていても、この領域での知識の欠除は有効な免疫治療薬の開発にとっては著しい障害となる。

【0007】

【発明の要約】

本発明はTreg免疫調節ネットワークのエレメントの解明、およびそのネットワークを研究する一般的アプローチの開発に少なくとも基礎を置く。とりわけTreg細胞で富化されるある種の細胞集団での遺伝子発現のパターンはTh1およびTh2富化集団のそれとは全く異なることが発見された。この発見は全く予期しないものであった。何故ならTreg細胞は差次的遺伝子発現を(すなわちサイトカインまたは抗原提示細胞に対する受動競争)を必要としない機構を経由してTh1およびまたはTh2応答を抑制することがこれまで示唆されてきたからである(ウォルドマンおよびコボルド(1998), Ann. Rev. Immunology, 16巻(619-644ページ参照))。

【0008】

かくして本発明の第1の見地において、(a)Th1富化細胞集団、Th2富

化細胞集団、およびT r e g 富化細胞集団を提供し、(b) 前記細胞集団での1個またはそれ以上の遺伝子の相対的発現を比較し、これにより(c) 細胞集団内で差次的発現される遺伝子を同定し、次いで(d) ステップ(c) で同定された遺伝子を分離する、これらのステップを含むプロセスで獲得される分離遺伝子が提供される。

【0009】

ステップ(a) で提供される集団はクローン集団である必要はなく、従って、それが富化されるT細胞以外の細胞を含む。かくしてT r e g 富化(細胞)集団は補助細胞を含み、これはそれ自身T r e g 細胞ではないがT r e g 細胞で支持およびまたは刺激され、従ってT r e g 調節経路に寄与することは決してない。かくして本発明の遺伝子は全体として試験される時に集団で差次的に発現されるいずれかの遺伝子であり、そのため本発明の遺伝子は細胞水準でT r e g 細胞ではなく他の細胞部分集団で差次的に発現されるものを含む。

【0010】

望ましくはステップ(c) で同定される遺伝子は、T h 1およびT h 2 富化集団と対比してT r e g 富化集団で過発現または低発現されるものである。

【0011】

本発明の差次的発現遺伝子はT r e g 免疫調節ネットワークの構成遺伝子要素を含む。このようにそれは免疫調節薬として広い範囲の新規な標的の同定を可能にする。例えば通常の技術を有する人は与えられた遺伝子の配列(少なくとも配列の部分について)の知識が対応するタンパク質の分離または合成を可能にするということを認識するであろう。このようなタンパク質は本発明のとりわけ重要な見地を形成し、何故ならそれら(またはその作用薬/拮抗薬)を新規な免疫調節薬剤の基礎として使用できるからである。

【0012】

T r e g 富化細胞集団は望ましくはここで記載されたように調製(および以下でT r 1 / T r e g 細胞として引用)されるものである。しかし(例えば、前に述べた公知のT r e g 1およびT h 3細胞に基づく)T r e g サブセットの他の富化細胞集団でも同じように使用することができる。かくしてT r e g 免疫調節

ネットワークの主要な要素は引用集団としていずれかのT r e gサブセットの使用で説明される。

【0013】

ここで使用される「分離された」という用語は、それが天然に生じるものとは異なる物理的環境で物質が存在することを示すために使用される。例えば分離された遺伝子またはタンパク質は、それが天然に生じる複合細胞環境に関連して事実上分離される。純度の絶対水準は重要ではなく、通常の知識を有する人はその物質が置かれる用途に従って純度の適切な水準を容易に決定できる。

【0014】

多くの状況において、分離された物質は組成物の部分（例えば多くの他の物質を含む多少とも粗製抽出物）、緩衝システムまたは例えば他の成分（アルブミンなどのタンパク質を含むもの）を含有する薬理賦形剤を形成するであろう。

【0015】

他の状況において、分離された物質は、例えば（また本発明のタンパク質の場合に）PAGEまたはカラムクロマトグラフィー（例えばHPLCまたは質量分析法）で決定されるように、基本的な均質性に精製されるであろう。物質が薬理組成物の部分を形成するある望ましい実施例において、本発明の分離された物質は基本的に組成物の単独活性成分となる。とりわけ望ましいのは本発明の物質が薬理組成物で単独の活性成分として存在する組成物である。

【0016】

本発明の遺伝子および核酸（RNAとDNAの両方）に適用される「分離された」という用語は、更に遺伝子/核酸が広範囲のベクターのいずれかおよび各種の宿主細胞（または緩衝液、ウイルス、または細胞抽出物）のいずれかで存在することを示す。

【0017】

本発明に基づく遺伝子の例は表1に示される。この表では、各標識の存在度が左側に示され、一方右側の行では95%の統計的信頼で転写が上向き/下向き調節された度合いが示される。

【0018】

【表1】

Th1	Th2	Tr1/ Treg	LN	計	標識配列	信頼限界 95%	
2	0	92	0	94	CGATCTGGCC	MMCP-5 マスト細胞セリンプロテイナーゼ'	24
4	0	85	0	89	AAGTCCTGCA	mMC-CPA カルボキシヘプタダーゼ'A	17
0	0	44	0	44	TCAACTCGAG	ESTs	14
0	0	35	0	35	GAGGTTTTTT	符合しない	11
1	0	50	2	53	AACACTTGGA	符合しない	10
1	2	29	0	32	GATTGTCAGA	gly96:未知の機能、相同体	5.6
1	0	22	0	23	TGGAAGAAAG	ESTs	5.4
0	1	21	0	22	AATGAGTTGC	トリプトファンヒドロキシターゼ'	5.1
0	0	17	0	17	CCACGTGCCT	符合しない	4.8
0	1	24	2	27	GTGGACTCAA	EST	4.5
1	17	54	0	72	GGATATGTGG	egr-1=zif/268=krox-24	4.1
12	17	99	18	146	CCCTGAGTCC	ヘータアクチン	3.7
0	0	16	2	18	AACTGCTTCA	符号しない	3.2
0	6	23	0	29	CTGCTTTGTG	プロエンケファリン	3.2
3	5	31	3	42	ATCAACACCG	Gs アルファサブユニット	3.1
0	0	11	0	11	AGAGAGAGAG	PAF-AH:血小板活性因子	2.9
0	0	11	0	1	CCTGAGCTCC	符号しない	2.9
1	0	12	0	13	ACCCAAGGTT	符号しない	2.7
6	9	34	1	50	ATTGTGGTGC	LAPTM5	2.7
0	0	13	2	15	AAGGCAGAGG	符合しない	2.5
1	2	15	2	20	AACTCACAAT	ESTs	2.1
0	0	8	0	8	TTGGTAGCTG	符号しない	2
1	20	35	3	59	ACAACITTCCT	GM2 活性因子タンパク質(Gm2a)	2
1	4	33	19	57	CCTCAGCCTG	カテプシン D(EC 3.4.23.5)	1.9
0	3	11	0	14	ACCATTACTG	ESTs	1.8
0	1	8	0	9	CTAAGGAGAT	ESTs	1.7
0	0	7	0	7	ATGTAGAAGG	符合しない	1.7
0	0	7	0	7	CAATAAATAG	Fc イブロンRIアルファサブユニット	1.7
0	0	7	0	7	CCTTTAACCC	符合しない	1.7
0	0	7	0	7	GAAGCGTGGG	符号しない	1.7
0	0	7	0	7	GCTGCGAGGG	符号しない	1.7
0	0	7	0	7	TTAAGATATG	インターロイキン-3 受容体ヘータサブユニット	1.7
3	4	24	12	43	CACGGCTTTC	L26 リボソームタンパク質	1.6
1	1	14	5	21	TGTAGTGTA	リボソームタンパク質 S8	1.6
2	9	18	1	30	TTTCTGTATG	符合しない	1.6
0	20	25	0	45	GGGCATTTGA	符号しない	1.6
0	9	15	0	24	AGCAGATTCT	ロイコスタチン	1.5
0	1	7	0	8	AAGCATCCCG	符合しない	1.4
0	0	7	1	8	GAGTGGATTC	CD63	1.4
0	0	7	1	8	TTTACATACA	符合しない	1.4
0	0	6	0	6	CAAAC TAGAA	符合しない	1.4
0	0	6	0	6	CACGTGAATG	符合しない	1.4

0	0	6	0	6	GGGCCCTGCT	ESTs	1.4
0	0	6	0	6	TCAACTCCAG	符合しない	1.4
0	0	6	0	6	TCAGAGACCC	ESTs	1.4
0	0	6	0	6	TCTTGAATCC	符合しない	1.4
0	0	6	0	6	TGCAAAATAA	符合しない	1.4
8	16	29	5	58	TTGGGATACC	EN-7=Rac2 GTP 結合タンパク質	1.4
2	4	11	0	17	AACATACAAG	L1 反復ファミリー領域	1.3
1	2	8	0	11	CCTGGTGCCT	ESTs	1.3
0	3	8	0	11	GTTACTTATG	クラス1サイトカイン受容体(Wsx1)	1.3
9	13	23	1	46	TGGAACAATG	分泌顆粒プロテオグリカン核	1.3
0	6	10	0	16	TAAGCCTTTC	符合しない	1.2
0	0	9	5	14	ATTTGACTGG	ESTs	1.2
2	2	9	1	14	CTAATAAAGC	MNSFb	1.2
1	0	7	1	9	AAAAGGAGAT	符合しない	1.2
0	2	7	0	9	TGAAACACTG	MA-3=TIS(アポトーシス誘導体)	1.2
0	2	7	0	9	TGAGAGGGAA	ESTs	1.2
0	0	6	1	7	CCAAAAAAAAA	クラスリン関連性AP-2 複合体AP50	1.2
0	1	6	0	7	GCTGAACACA	ESTs	1.2
0	1	6	0	7	GTAAGCAAAA	EST	1.2
0	0	5	0	5	AGCGTCGCTG	ESTs	1.2
0	0	5	0	5	GAAAAAAAAA	EST	1.2
0	0	5	0	5	GGTTAAATGT	カテプシンL	1.2
0	0	5	0	5	GTAACAACGC	符合しない	1.2
0	0	5	0	5	GTACTGGTAT	ESTs	1.2
100	110	37	4	251	AGTTGGAAAC	ESTs	-1.6
12	16	1	4	33	CCTGGCAGAG	ESTs	-1.7
40	24	7	18	89	GATTCCGTGA	ESTs	-2
61	69	17	53	200	TTGGTGAAGG	符合しない	-2.5
39	47	4	24	114	TCCCCGTACA	EST	-3.6
149	128	19	6	302	TTTTCAAAA	ペーパー-2 ミクログロブリン	-3.7
7	9	0	2	18	GACAACGCCA	ESTs	-1.3
13	10	2	3	28	TTATATAGTG	インターロイキン3	-1.2
8	7	2	10	27	AGGCTGACAA	ESTs	-1.2
9	7	1	6	23	TCCTATTAAG	EST	-1.2
5	8	1	8	22	GCCTTTATGA	リボソームタンパク質 S24	-1.2
25	22	7	1	55	TTGATCATCA	GDP解離阻害物質	-1.2
41	23	12	18	94	ATGACTGATA	ESTs	-1.4
35	20	9	11	75	CACAAACGGT	ESTs	-1.4
29	27	9	10	75	GAGCGTTTTG	ミクロフィリン(EC 5. 2. 1. 8)	-1.4
57	55	19	18	149	AAGGTGGAAG	ESTs	-1.6
22	25	3	0	50	AGACCGGAAG	CD3デルタ鎖	-1.8
12	15	2	0	29	GTGGCTCATA	TACE=TNF アロハ転換酵素	-1.2

【0019】

表1でリストされたこれらの遺伝子はマウスの遺伝子であるが、本発明は更に相同体、誘導体、対立遺伝子形態、種変異体、突然変異体形態またはその等価物を考慮する。

【0020】

「相同体」という用語はここで2種の異なる意味で使用される。厳密な意味では、それは異なる生体(すなわち種変異体)からの対応する遺伝子を定義するた

めに使用され、ここでの場合遺伝子とその相同体の間に直接進化の関係が存在する。これは構造的および機能的な等価に遺伝子およびその相同体にそれぞれの生体で同じ役割を果たすことに反映される。

【0021】

本発明に基づくとりわけ望ましい種は表1で示されるマウス遺伝子それぞれのヒト相同体である。

【0022】

この相同体の用語は広い意味では与えられた(参照)遺伝子構造的に類似している(すなわち必ずしも前記遺伝子に関連およびまたは構造的機能的に等価ではない)遺伝子を定義するために使用される。この意味では、相同性は核酸配列の存在により純粋に模造的規準を基礎にして認識される。本発明の目的のために、相同体はその対応するDNAが特異的かつ選択的に交差雑種形成できるか、または選択的、適切およびまたは適当な緊縮雑種形成条件の下で交差雑種形成できる一致するDNAの遺伝子として認識される。

【0023】

本前後関係で「選択的または特異的に(交差)雑種形成する」という用語は、相同配列のユニーク(または小クラス)への結合が多少とも緊縮雑種形成条件の下で得られるように対応するDNAの配列がなっていることを意味する。本発明のこの方法は、通常の技術に習熟した人により容易に決定され得るいずれか特定の雑種形成条件に従属するものではない(例えばルーチンの試行錯誤でまたは熱力学的考慮の下でのもの)。使用できる雑種形成条件の1例は、5X SSC SDS 5%, EDTA、1.0mM (pH 8.0)液との前洗浄と5X SSCを用いて一晩55°Cでの雑種形成の試行を伴うものである。

【0024】

本発明の遺伝子によりコード化されるタンパク質に適用されるものとして、相同体は1個以上の欠失、挿入または置換の政で参照タンパク質(例えば生のマウスタンパク質)とは異なるアミノ酸配列を持つタンパク質を定義するためにここで使用される。相同アミノ酸配列は、望ましくは少なくとも20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%または99%

同一である。パーセント同一性は、例えばデブルー他、(1984年)、Nucleic Acid Res. 12巻、387ページに記載のように、GAPコンピュータプログラム、バージョン6.0を用いる配列情報を比較することにより決定される。このプログラムは後にスミスおよびウォーターマン(1981年)、Adv. Appl. Math. 2巻:482ページで改訂されたニードルマンおよびヴンシュ(1970年)、J. Mol. Biol.; 48巻443ページによる整列法を使用する。GAPプログラムへのデフォルトパラメーターは、シュヴァルムおよびデーホフ編(1979年)、タンパク質配列の図表集、ナショナル・バイオメディカル・リサーチ・ファンデーション、353-358ページに記載された、後のグリブスコフおよびバージェス(1986年)Nucleic Acid Res. 14巻:6745ページのヌクレオチドへの同一性が1で非同一性が0の値を含む)ユニタリ比較マトリックスと加重比較マトリックス、(2)各ギャップに対し3.0のペナルティ及び各ギャップでの各シンボルに対し、追加の0.1ペナルティ、および(3)エンドギャップに対してはペナルティなしの内容を含む。

【0025】

タンパク質相同体は与えられたアミノ酸残基が類似の物理化学特性を持つ残基で置換されたことを意味する保存置換配列を含む。保存置換配列は従来技術で公知あり、1個の脂肪族残基のも一つのものへの置換(お互いにIle, Val, CysまたはAla)、あるいは1個の極性残基の他のものへの置換(LysとArg、GluとAsp、またはGlnとAsnの間など)を含む従来手順と方法はこのような相同体を作りまた用いることに使用できる。このような他の保存置換、例えば類似の疎水特性を持つ全領域は従来公知でありルーチンに行われている。

【0026】

遺伝子およびタンパク質両方にここで適用される「誘導体」という用語は、遺伝子およびタンパク質の修飾バージョンを定義するために使用される。このような誘導体は融合タンパク質を含み、ここで本発明のタンパク質は1個以上の異なるタンパク質またはペプチドに融合される(例えば標識として作用し、または精

製を容易にするなどの生物活性を付与する抗体またはタンパク質ドメイン)。誘導体にまた本発明の遺伝子またはタンパク質を出発材料または試薬として使用する合成プロセスの産物でもある。

【0027】

「突然変異形態」という用語は、1個またはそれ以上のヌクレオチドのから加えられ、欠失されまたは置換される遺伝子を定義するためにここでは使用される。従って、本発明の変異形態は断片、切形およびキメラを含む。遺伝子の変異形態は「ミューティーン(突然変異タンパク質)」と名付けられた、対応する突然変異タンパク質をコード化し、これらは1個またはそれ以上のアミノ酸が加えられ、欠失されまたは置換されたタンパク質である。本発明のミューティーンは従って断片、切形および融合タンパク質を含む。

【0028】

本発明のミューティーンは更にタンパク質の1個またはそれ以上の活性を効果的に促進または悪化させるように突然変異が導入され、例えば受容体、認識配列またはエフェクタ結合部位の機能を促進しあるいは悪化させる変異が導入されるタンパク質を含む。

【0029】

ミューティーンはいずれかの従来の方法で産生される。好都合なことに、突然変異発生を高めるオリゴヌクレオチドでの部位指向突然変異誘発が二本鎖鋳型(遺伝子を含むpBluescript KS II™構築物)を使用して採用される。配列化により各変異誘導体を確認後に、変異遺伝子は切除され適切なベクターに挿入され、これにより修飾タンパク質を過発現し精製することができる。

【0030】

ここで使用され、本発明の物質に適用される「等価物」という用語は、本発明の物質のそれと事実上同じ機能を示し但しその構造(例えばヌクレオチドまたはアミノ酸配列)で異なった物質(例えばタンパク質、DNAなど)を定義する。このように等価物は例えば、機能的重要性の配列を同定し(例えば保存または標準配列を確認しまたは突然変異特発に続き機能的検定を行い)それを基礎にしてアミノ酸配列を選択し、次いで選択アミノ酸配列に基づくペプチドを合成するこ

とで生成される。このような合成は(合成ペプチドを生成するための)固定相ペプチド合成およびオリゴヌクレオチドのアセンブリ(次いでクローニング)を含む多くの異なる従来の技術のいずれかにより達成することができる。

【0031】

本発明のタンパク質の相同体、断片、ミューティーン、等価的または誘導体は更にとりわけ本発明のタンパク質に対する抗体と交差反応するタンパク質として定義される。

【0032】

本発明の遺伝子の相対発現は数多くの標準技法のいずれかにより比較される。このような技術は各種の水準、例えば遺伝子転写水準または翻訳水準で発現を測定する。とりわけ好都合な技術はベルキュレスキュ他(1995年)、*Science*, 270巻、484-487ページにも記載されている。遺伝子発現の連続分析(SAGE)として引用されるこの技術は、数多くの転写物の定量同時分析を可能にする。細胞により産生されるタンパク質の性質と量に関する分析(プロテオーム分析)に基づく他の技術も同じように使用される。

【0033】

本発明は更に本発明の遺伝子の分離された調節因子も考慮する。遺伝子調節因子は遺伝子転写の活性化物質または抑制物質であり、または遺伝子に対応するアンチセンス核酸でもある。

【0034】

本発明は更に本発明のタンパク質の分離調節因子を考慮する。タンパク質調節因子はタンパク質の作用薬または拮抗薬であり、またタンパク質のコグネイト受容体、擬態物、タンパク質のコグネイト受容体をコード化する遺伝子の転写の活性化物質または抑制物質、(a)乃至(d)のいずれかをコード化する核酸または(e)の核酸に一致するアンチセンスDNA、前のものの活性を遮断する抗体または抗体断片から選択することができる。

【0035】

本発明は更に本発明の遺伝子のための分離結合パートナーも考慮する。結合パートナーは核酸(選択肢として、一本鎖核酸)である。

【0036】

更に考慮されるのは本発明のタンパク質のための分離結合パートナー並びに本発明の調節因子のための分離結合パートナーである。タンパク質または調節因子のための結合パートナーは望ましくはタンパク質または調節因子に特異的な（または選択的に反応性の）抗体（または抗体誘導体）を含む。抗体はモノクローナル抗体であり標識される。

【0037】

も一つの見地において、本発明は本発明の遺伝子のコーディング鎖または非コーディング鎖の補体を含む分離された一本鎖核酸に関する。更に本発明に従って提供されるのは本発明の遺伝子し雑種形成できる核酸である。このような核酸はプローブとして機能する。

【0038】

本発明のも一つの見地において、本発明遺伝子に対応するアンチセンスDNAが提供される。このようなDNAは生体内でコグネイト遺伝子の発現を調節するために使用され、また従って治療用組成物の主成分を形成する。

【0039】

本発明は更に本発明の遺伝子を含むベクター（例えば発現ベクター）を考慮する。ベクターの性質は本発明に対して重要ではない。プラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、トランスポゾン、ミニクロモソーム、リポソームまたは機械的担体を含むいずれかの適切なベクターが使用される。

【0040】

本発明の発現ベクターは発現に適したDNA構築物であり、それは（a）調節要素（例えばプロモーター、オペレーター、活性化物質、抑制物質、およびまたはエンハンサー）（b）mRNAに転写される構造配列またはコーディング配列、および（c）適切な転写、翻訳、開始および終結配列を含む。これらは各種の標識（例えば親利性（例えばHis）標識などの発現タンパク質の後の精製を促進するような標識）のいずれかをコーディングする配列を更に含む。

【0041】

とりわけ望ましいものは適切な水準で発現を提供するために本発明のDNAに

遺伝子操作で結合された発現要素を含むベクターである。各種の発現要素のいずれかが使用され、その発現要素は例えばプロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、オペレーターおよび活性化配列から選択される。このような発現要素はエンハンサーを含み、また例えば調節可能であり、例えば（誘導物質の追加を介して）誘導可能でもある。

【0042】

ここで使用されるように、「遺伝子操作で連結する」という用語は線型DNA配列の部分が同じ線型DNA配列の他の部分の活性に影響を与えることができる状態を引用する。例えば、シグナルペプチド（分泌リーダー）のDNAは、もしそれがポリペプチドの分泌に関与する前駆細胞として発現されるならポリペプチドのDNAに遺伝子操作で連結されている。

【0043】

プロモーターが配列の転写を制御するならば、そのプロモーターはコーディング配列に遺伝子操作で連結されている。リボソーム結合部位が翻訳開始を可能にするように配置されているならば、それはコーディング配列に遺伝子操作で連結されている。

【0044】

ベクターは更に正の選択マーカールおよびまたは負の選択マーカールを含む。正の選択マーカールの使用はベクターを含む細胞の選択およびまたは同定を促進する。

【0045】

も一つの見地において、本発明は本発明のベクターを含む宿主細胞に関する。原核宿主細胞（大腸菌、ストレプトミセス spp 菌および枯草菌など）および真核宿主細胞を含むすべての適切な宿主細胞が使用される。

【0046】

本発明に基づき更に提供されるのは、本発明の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクターまたは宿主細胞を含む薬理組成物であり、遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクターまたは宿主細胞は薬理組成物に生物活性を付与するのに十分な濃度で選択的に存在する。

【0047】

薬理組成物は患者（例えばヒトまたは動物の患者）への投与に適した形態、濃度および純度の水準で固体または液体組成物であり、その投与に際して、それは望ましい生理学的変化を引き出すことができる。本組成物は免疫調節組成物、例えば免疫抑制組成物、免疫刺激組成物または抗炎症性組成物である。

【0048】

本発明の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクター、または宿主細胞は医療（たとえば治療、予防または診断）で用いられ、およびまたは薬理賦形剤、単位用量形態あるいは局所もしくは全身投与に適した形態で提供される。

【0049】

本発明は更に本発明の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクター、または宿主細胞を含む診断用キットまたは試薬を考慮する。

【0050】

本発明は更に本発明の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクター、または宿主細胞を含む細胞類別試薬を考慮する。

【0051】

も一つの見地において、本発明は生物サンプルでのT r e g免疫調節経路の状態を分析する生体外の方法を提供し、それは（a）本発明の遺伝子、または（b）前記遺伝子のコグネイト発現産物、あるいは（c）前記遺伝子の活性の生化学マーカー、もしくは（d）T h 1およびまたはT h 2およびまたはT r e g細胞の存在あるいは活性を決定するステップを含む。

【0052】

更にも一つの見地において、本発明は生物学サンプルでT h 1およびまたはT h 2およびまたはT r e g細胞を検出する生体外方法を提供し、それは本発明の遺伝子、タンパク質、調節因子または結合パートナーに選択的に結合する試薬に前記サンプルを接触させるステップを含む。望ましくは、試薬は本発明の細胞類別試薬を含む。

【0053】

本発明の検出方法は細胞の存在を検出しまたはT h 1およびまたはT h 2およ

びまたはT r e g細胞の数を決定するためのものである。望ましい実施例において、T h 2およびまたはT r e g細胞に対比したT h 1細胞数、またはT h 1およびまたはT r e g細胞に対比したT h 2細胞数、またはT h 1およびまたはT h 2細胞に対比したT r e g細胞数が決定される。

【0054】

前記の方法は各種処置の効率およびまたは終点の診断およびモニターでの数多くの用途を持つ。かくしても一つの実施例では、本発明は被験者での抗炎症性処置または免疫調節処置の進捗状態、あるいは被験者での炎症性または免疫疾患の進捗状況をモニターする生体外の方法に関し、この方法は被験者からのサンプルでT n e g免疫調節経路の状態を分析するステップを含む。望ましくはこの方法は処置の効率または終点をモニターする。

【0055】

本発明で更に考慮されるのは、処置を受ける被験者での抗炎症性または免疫調節薬剤投与治療プログラムの薬量を決定する生体外の方法であり、これは生物学サンプルでのT r e g免疫調節経路の状態を分析するステップを含み、(a)本発明の遺伝子、または(b)前記遺伝子のコグネイト発現産物、または(c)前記遺伝子の活性の生化学マーカー、またはT h 1およびまたはT h 2およびまたはT r e g細胞の活性の存在を決定するステップを含む。

【0056】

前記方法で使用されるサンプルは入手可能な身体部位からのもの、例えば膣、肛門、鼻、尿道、頸部、皮膚、結膜、口、または咽喉の粘膜からのものである。サンプル液体または半固体(例えば体液または半固体、例えば排泄、嘔吐物、分泌物、尿、痰、血漿、血清または血液)を含む。選択肢として、サンプルは固体(例えば糞便、組織または生検サンプル)あるいは細胞、培養物(例えばリンパ球培養物)を含む。特に望ましいしものは尿、血清、血漿または血液からのサンプルである。

【0057】

本発明で更に考慮されるのは、炎症性または免疫疾患の処置に使用される薬剤のために、本発明の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ペ

クターまたは宿主細胞を使用することである。

【0058】

本発明により更に考慮されるのは、二部構成の炎症性または免疫処置に使用される作用薬の製造に関し、本発明の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、ベクター、または宿主細胞を使用することであり、その第1部分は抗炎症または免疫調節作用薬の投与を含み、また第2部分は生物学的サンプルでのT r e g免疫調節経路の状態を分析して処置の進捗状況をモニターすることを含み、(a)本発明の遺伝子、または(b)本発明の遺伝子のコグネイト発現産物、あるいは(c)前記の遺伝子の活性の生化学マーカーもしくは(d) T h 1 , T h 2 およびまたはT r e g細胞、の活性の存在を決定するステップを含む。望ましいしくは処置の効率およびまたは終点は本発明の方法によりモニターされる。

【0059】

本発明で更に考慮されるのは、被験者での炎症性または免疫疾患の処置のための薬剤製造に抗炎症性または免疫調節作用薬を使用することであり、この処置は、(a)本発明の遺伝子、または(b)前記遺伝子のコグネイト発現産物、または(c)前記遺伝子の活性の生化学マーカー、または(d) T h 1 およびまたはT h 2 およびまたはT r e g細胞の存在または活性を決定して被験者でのT r e g免疫調節経路の状態を分析するステップを含むことを特徴とする。

【0060】

生化学マーカーは例えば遺伝子により直接または間接的に産生され、また従って前記遺伝子の発現の指標として役立つ分子を含む。

【0061】

被験者でのT r e g免疫調節経路の状態を分析するステップは、抗炎症性または免疫調節処置の効率をモニターし、あるいは抗炎症性あるいは免疫調節薬剤投与治療プログラムの薬量を決定するためのものである。

【0062】

も一つの見地において、本発明は薬理組成物を産生するプロセスを提供し、このプロセスは、

- (a) T r e g 免疫調節経路 (またはその成分) を含む試験システムを提供し、
- (b) 候補薬剤を提供し、
- (c) 試験システムを候補薬剤の一つと接触させ候補薬剤と試験システムとの相互作用を分析することにより候補を選別し、ここで相互作用の性質が薬理活性の指標となり、また選択肢として、
- (d) ステップ (c) で選別された候補薬剤の同一性を基礎にする薬理活性を持つ薬剤を合成し精製する、
- ステップを含む。

【 0 0 6 3 】

更に考慮されるのは、前記プロセスで産生 (または獲得) される薬理組成物、または誘導体である。

【 0 0 6 4 】

も一つの見地において、本発明は本発明の遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸またはベクターを産生するプロセスを提供し、このプロセスは、

- (a) 本発明の宿主細胞を培養し、また、
- (b) 培養宿主細胞から (例えば培養上澄みまたは細胞分画から) 遺伝子、タンパク質、調節因子、結合パートナー、核酸、またはベクターを培養する、
- ステップを含む。

【 0 0 6 5 】

も一つの見地において、本発明は (T h 1 および T h 2 細胞の増殖とサイトカイン産生を抑制することのできる) 分離された T r e g 細胞を提供し、前記細胞は表 1 でしめされたように事実上遺伝子発現プロファイルを持つ。望ましくは、遺伝子発現プロファイルは、表 1 でリストされた少なくとも 5 0 % , 6 0 % , 7 0 % , 8 0 % , 9 0 % , 9 5 % または 9 9 % の遺伝子が少なくとも表で示される範囲において T h 1 および T h 2 細胞と対比して上向きまたは下向きに調節されるものである。

【 0 0 6 6 】

本発明の細胞は候補薬剤の調製と選別で、あるいは直接（養子免疫的治療プロトコルで）治療または予防で試験システムとして使用される。治療に用いられる場合には、本発明の細胞はいずれかの便利な方法、例えば、部位特異的点滴注入で（例えばカテーテルを介して毛細血管床にまたは血管に投与される。

【0067】

医療への適用

本発明は治療、予防および診断での使用で広い範囲での新規な薬物と調合薬の分離、合成および合理的な設計を可能にする。本発明の物質が適用を見出す各種の形態の治療、予防および診断はT r e g免疫調節経路を標的設定することを伴う。かくして本発明は免疫調節に基づく治療に用途を見出す。ある実施例では、本発明は免疫抑制を行うために使用され、一方、他の実施例では免疫刺激が達成される。

【0068】

免疫抑制実施例のとりわけ重要な適用例は、炎症の処置、制御または管理である。かくして本発明は広い範囲での適用、例えば慢性炎症性疾患の処置または予防での使用のために抗炎症性薬剤を提供する。本発明は更に炎症応答の作用から生じる細胞への損害を処置するために使用される。かくして本発明は慢性調節リウマチおよび変形性関節症、および糸球体腎炎、糖尿病、炎症性腸疾患、アテローム硬化と脈管炎などの血管疾病および乾癬および皮膚炎などの皮膚疾患の処置にその適用を見出す。本発明は更に移植拒絶を予防または処置するために使用される。

【0069】

本発明に基づき処置される他の疾患は、クローン病（限局性腸炎）、潰瘍性大腸炎、I型糖尿病、紅斑性狼瘡、自己免疫疾患、過敏性疾患および多発性硬化を含む。

【0070】

各種の肺疾患は慢性気管炎、気腫、特発性肺線維症および喘息を含む気管炎症に関連しており、これらのものも本発明に基づき処置できる。

【0071】

本発明の免疫刺激物質は感染および増殖性疾患（例えば癌など）の処置に特定の適用を見出すであろう。

【0072】

診断への適用

疾病または疾患の進捗状況のみでなくその治療をモニターできるようにする必要がある。事実これらの活動は薬剤投与の薬量およびまたは薬剤の選択が処置の応答の影響を与える場合に相補的であり、何故なら効率およびまたは終点が処置の間にモニターできるからである。免疫および関連防衛（炎症）システムが伴う疾病の場合には、これらのシステムの応答行動の手段は治療を導くための有用な情報を提供するであろう。例えば血液C反応性タンパク質の手段は炎症を示す好適な指標を提供したし、適切な処置を管理するのに使用できる。

【0073】

ここで記載された遺伝子およびそのコグネイトタンパク質産物はTreg調節ネットワークの部分を形成する。このようなその活性はネットワークの状態の一つの指標として使用することができる。それらは接近可能な体液および組織（通常は血液、尿、または生検物質）で存在また不在である「マーカー」として使用することができる。

【0074】

リンパ球で仲介される特異的免疫応答の場合では、ほんの僅かな役割の誰かのリンパ球でも何らかの免疫応答に影響を与えることが知られている。しかしこれらは循環する必要があり、もし活性応答が起こりつつある場合には血液リンパ球は、細胞が1箇所から他へ循環するためにこの小さなサブセットの行動を不釣合いに反映するであろう。血液は次いでもし誰かがその行動の変化を測定する敏感で十分な技術を持っていたなら、あるいはもし誰かが少ない抗原特異的細胞をた易く分離または同定できたなら、その血液はリンパ球の小さなサブセットの行動における変化の指標となるであろう。血液はた易く接近できるので、それは疾病の過程での応答でリンパ球および関連する細胞の小さなサブセットの行動における変化をモニターする機会を提供する。これらの細胞は更にその産物を分泌するので、血漿または血清、同じく尿の分析はそのような産物およびその分解した形

態を捕捉することができる。

【0075】

かくして、本発明は多発性硬化の治療の間および治療後をモニターする用途を見出す。血液は脳抗原に向けられたTh1行動の証拠を示し、そこでは疾病の急性繰返し症状での抗原特異的細胞の頻度の増加を示す数多くの実証された例が存在する。これらの細胞はTreg免疫調節ネットワークの特殊な遺伝子を活性化し、本発明に従って同定することができる。成功する処置はこれら遺伝子の発現を減少させその処置の効率または終点を決定されるようにして、この活性化を阻むであろう。

【0076】

多くの疾病、例えば慢性関節リウマチ、乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎、I型糖尿病、紅斑性狼瘡、および他の過敏症およびまたは自己免疫疾患、などはこのアプローチから益することが多い。

【0077】

【実施例】

本発明はこれからいくつかの実施例を引用してより詳細に記載されるであろう。それらは例として役立つ目的のみのためであり、本発明を限定することを意図するものではない。

【0078】

実施例1：Treg/Tr1クローンD1 (Treg富化細胞集団の調製)

調節T細胞クローンが基本的に下記のグループ他(前掲)に従って生のALXRAG-/-マウスの脾臓から生成された(WO99/16867およびゼレニカ他(1998)、Journal of Immunology, 161巻1868-1874ページ参照) 5×10^5 脾臓細胞、 5×10^6 ミトマイシンC処置雄CBA脾臓細胞(雄刺激物質)と共に2ml量で10%胎仔ウシ血清(FCS)と50ng/ml組換えマウスIL-10(ジェンザイム)を含むRPMI、1640培地で7日間培養され、7日の日に使われた培地が除去され新鮮刺激細胞とIL-6を含む培地が加えられた。IL-10での刺激で7日3回のサイクル後、生存細胞はフィコール-ハイパーク法での分離で収穫され、10%FCS

と20U/ml組換えマウスIL-2 (rmIL-2)を含むRPMI、1640でミスマイシン処置雌CBA脾臓フィーダ細胞(10⁷/ml)の存在で抗CD3被覆平板(1452C11、50マイクログラム/ml)での限界希釈(1細胞/200マイクロリッターウェル)によりクローンされた。成長細胞を含むウェルは10%FCS、rmIL-2(20U/ml)および組換えマウスIL-4 (rmIL-4、200U/ml)を含むRPMI、1640で雄刺激物質と共に48×1ml、次いで24×2mlのウェル平板に連続して拡張された。一度確立されると、刺激物質に増殖を続けるクローンは、14日毎にフィコール-ハイパーク法で収穫され、10%FCS、rmIL-2(20U/ml)プラスrmIL-4(20U/mlを含む、RPMI、1640培地で5×10⁶雄CBA刺激細胞/ウェルでの24×2mlウェル平板での2×10⁵細胞を継代して維持された。

【0079】

3個の異なるクローンがこの方法で分離され、1個(Tr1D1)がSAGE分析のために選択された。差次的遺伝子のいくつかは他の2個のクローンを試験することで確認された。

【0080】

分析で使用されたTh1とTh2細胞はゼレニカ他(前掲)に記載されたとおりに調製された。

【0081】

実施例2：定量リアルタイムRT-PCRによる差次的発現Treg遺伝子のmRNA発現の試験

この実施例は異なる細胞または組織サンプルでmRNAの水準、従って遺伝子発現の水準をどのようにして試験をすることが可能であることを示す。この場合、全RNAはTh1、Th2およびTregクローンのそれぞれから、また同じく標準の方法を用いて、B10/BR皮膚移植片を拒絶するプロセスにある正常なCBA/Caマウスからの正常脾臓細胞から得られた。各サンプルは次いでPCR産物が汚染ゲノムDNAから生成されないようにデオキシリボスクレアーゼで処置された。第1鎖cDNAは次いでランダムヘキサマーまたはpol

y Aプライマーのいずれかと共に、逆転写酵素 (RT) を用いて生成された。この物質は次いでパーキン・エルマー・アプライド・バイオシステムズ ABI プリズム 7700 シーケンス (配列) 検出システムのための標準プロトコル (ユーザープレティン # 5 : TaqMan VIC プロブを用いる定量 PCR、およびユーザープレティン # 2 : 遺伝子発現の相対定量) を用いてリアルタイム定量 PCR を受けた。要約すると、これは、対象となる遺伝子に特異的な PCR 産物を生成するために標準 PCR 5 および 3 プライマーを使用し、また蛍光染料 (例えば FAM または VIC) および消光染料 (例えば TAMRA) で二重染色される産物に特異的な内部オリゴヌクレオチドを利用する。この実施例で使用されるプライマーとプロブは表 2 で示される。これらは PE アプライド・バイオシステムズ、ソフトウェア (プライマー・エクスプレス) を用いて適当な遺伝子または cDNA 配列から設計された。蛍光エネルギー移転の故で、この二重標識プロブは FAM または VIC 波長ではそれ自身蛍光を発生しないが、各 PCR サイクルの DNA 産物に定量的にアニーリングするであろう。PCR の次の延伸フェーズの間に、特異的に結合したプロブは Taq ポリメラーゼで切断され、そのサイクルの産物に比例した量の蛍光染料を放出する。この蛍光は各サイクルで多数回光学 96 ウェル平板での PCR 反応を走査することで ABI プリズム 7700 マシンで検出され、各反応に対する閾値サイクル (Ct) を正確に計算することのできる PCR 反応のリアルタイム半対数図面を生成する。すべての細胞と組織で類似の水準で発現される Hprt またはリボソーム RNA (VIC プロブ) などのハウスキーピング遺伝子で対象となるプライマーとプロブ (FAM プロブ) を (異なる波長で蛍光を発する FAM および VIC などの 2 種の染料を用いて) マルチプレックスすることにより、対象となる遺伝子の水準を異なる RNA サンプルを交差して正常化することが可能となり、抽出、デオキシリボヌクレアーゼ処置、または cDNA 世代ステップの間に導入された RNA の量または質での差を修正することができる。表 3 で示される例においては、各サンプルで VIC プロブにより測定される Hprt の量は任意に 1000 ユニットであると定義され (PAFAH = PAF アセチルヒドロラーゼ; エンケファリン = プレプロエンケファリン; TPH = トリプトファンヒドロキラーゼ; Hprt =

ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ)で示される3個の他のTregまたはTreg/Th2マーカーのすべての測定値はこれらのユニットに対して与えられる。

【0082】

このアプローチは、治療のコースの間に患者の状態をモニターするために、処置を受ける患者と対比した正常な個体からの例えば血液のサンプル内の数多くのTh1, Th2および差次的遺伝子の急速な処理量、単純で自動的な測定を可能とするであろう。

【0083】

【表2】

	プライマーとプローブ		
	5' プライマー	3' プライマー	FAM/VIC プローブ
HPRT	gaccggtcccgtcatgc	tcataacctggttcatcatcgc	VIC-accgcagtcaccagcgtcgtg-TAMRA
PAFAH	tgatcagtgaggacctctgg	gagagtgttgcctgagccgg	FAM-ctgggtcaccctttgacgcagtca-TAMRA
エンケファリン	aaatctgggagacctgcaagg	gatctctctccggttcgcttc	FAM-tccaggcccagttcccttgg-TAMRA
TPH	tgcgacatcagccgagaac	tgttggcgcagaagtccag	FAM-cccctgctgaagtcgcacgc-TAMRA

【0084】

【表3】

差次的遺伝子発現のためのリアルタイム定量PCR試験

mRNA 種	Th1	Th2	Tr1	脾臓	
	TaqMan	RT-PCR で測定された任意の単位			
HPRT	1000	1000	1000	1000	定義による
PFAH	<1 [†] ±0	<1 [†] ±0	12,265 [†] ±149	152* ±203	
エンケファリン	±0.01 ±0	3254 ±607	1,898 ±178	<0.01 ±0	
TPH	0.02 ±0.01	0.01 ±0.01	411 ±103	<0.01 ±0	

† 2個の異なる希釈液3組みサンプルの平均値±標準偏差

* 6匹の皮膚移植マウスからの脾臓の平均値±標準値

【0085】

実施例3：生化学産物に特異的な免疫蛍光による差次的発現されたTregの発現の試験

本実施例では、Treg差次的発現遺伝子トリプトファンヒドロキシラーゼの発現が、トリプトファンヒドロキシラーゼが速度限定酵素（すなわちセロトニン）である生化学経路の産物であるTreg細胞または寛容T細胞の累積により間接的に試験される。ポリクローナル抗血清と少なくとも1個のモノクローナル抗体（YC5）は、抗体が認識する特異的なセロトニン-タンパク質複合体を生成するためにホルマリンによる同定の後、セロトニンを含む細胞の同定に広く利用できる。血液細胞、組織細胞または他の源の細胞の与えられたサンプルで試験を行うために、まずサンプルを例えば1%ホルムアルデヒドまたはパラホルムアルデヒドで固定し、次いで0.5%サポニンを含む加リン酸緩衝食塩水を用いて細胞を浸透性のものにし、更にもっとも便宜的にはフルオレセインイソチオシアネート（FITC）などの適切な蛍光染料で直接に、あるいはFITCでまたは適切な染料で結合された抗種特異的免疫グロブリン（Ig）抗体を用いて間接的

に接合された抗セロトニン抗体を用いて免疫蛍光の標準方法で染色する必要がある。この発現がT細胞と関連していることを示すために、フィコエリトリン(P E)、C y 3, C y 5または適切に類似のものなどの異なる分光性を持つ染料と結合できるC D 3またはC D 4などの標準T細胞またはT細胞サブセットマーカーに対する抗体を用いて多重染色の条件下でこの試験を行うことがもっと便宜的である。この細胞は次いでT細胞マーカー蛍光で同定される個体T細胞の代表的なサンプルに蛍光抗体を結合されたセロトニンの量を決定するために、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、蛍光励起細胞分離捕集装置(F A C S)、または蛍光間接撮影のいずれかの観察により分析される(実施例F A C S分析 - 図1参照)。

【0086】

実施例4：14ヌクレオチド標識からの遺伝子クローニング

S A G Eライブラリーで見出された差次的に発現した標識の多くは、公開されたマウス配列のいずれかをも地図化しない。標識にもともと誘導されるc D N A配列を特徴付けるために2個の独立した戦略を使用することができる。

【0087】

バーチャルクローニングはE S T sと名付けられた短いc D N A断片のランダム配列化で産生されたデータを使用する。もし1個またはそれ以上の符号E S Tが見出されるならば、それはウェブ上ですべて利用できる、異なるソフトウェアを用いて分析され、比較される。「バーチャル」c D N A配列はこの手順を用いて産生される。

【0088】

リアルベンチクローニングはどのデータベースにも相同性を見出すことができない場合に必要である。これは異なる分子技術を用いて行うことができる。相対的にた易くまた成功裡に行えることが証明された手続きの一つはR A C E - P C Rによるクローニングを用いるものである。

【0089】

これら二つのアプローチは完全に独立したものであり、事実上相補的である。

【0090】

最初の標識配列はG C A G T G G T T Cである。すべての標識はN 1 a I I I

制限酵素 (CATG) を用いて生成された。従って、それはすべて一致する制限部位で出発する。かくして14ヌクレオチドの完全な標識配列は

CATGGCAGTGGTTC

である。

【0091】

バーチャール・クローニング

下記のEST配列はNCBI site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> を用いてマウスESTsデータベースを通じた調査の後、標識により引き出された。

【0092】

>gi|3733312|gb|AI182674.1|AI182674
ub73g05.r|Soares mouse mammary gland
NMLMG Mus musculus cDNA clone IMAGE
:1383416 5 , mRNA配列

【0093】

GAACACACAATCAAACTTCTCCTGGAATAAATCATCTGACATCAGATCCTTCCCATTGTC
TGTACTGTTTCTGCTGCCCTGGAAACCA7GCAAGGACAGGAACAGACCACCATGGCAGTG
GTTCCTGGAGGTGCTCCAC CTTCAGAGAAT

【0094】

標識はアンダーラインされている。

【0095】

次のステップはコンティグ (組織されたオーバーラッピングESTs断片) を創り出し、それからコンセンサス配列を誘導することであった。これは自由に利用されるソフトウェアを利用して行われた (下記のウェブサイトで利用可能: <http://gcg.tigem.it/BLASTEXTRACT/estextract.html>)。

【0096】

獲得された最終cDNA配列は以下のとおりである。

【0097】

ATTCGGCACGATGGGTGAACACACAATCAAACTTCTCCTGGAATAAATCATCTGACATCA
 GATCCTTCCCATTGTCTGTACTGTTTCTGCTGCCCTGGAAACCAJGCAAGGACAGGAACAG
 ACCACCATGGCAGTGGTTCCTGGAGGTGCTCCACCTTCAGAGAATTCTGTTATGACATCA
 CAAATGTGGAATGAGAAGAAGGAGAAATTCTTGAAGGGGAACCAAAGTCCTTGGGGTTT
 TACAAGTTATGATTGCTATCATAAACCTCAGCTTAGGAATAATAATTTTGACAACCTTTATTT
 TCTGAAACTACCCACTTCAGTGATGTTAATGGTCCCAATTTGGGGATCAATAATGTTTCATT
 GTCTCCGGATCCCTGTCCATTGCAGCAGGAGTGACACCTACAAAATGCCTGGTATGTAATT
 TGGTATGTTTTGCTATGGAAAAGGAGTAATTTTCATCAACTATGCATATATCTGCTAAGATA
 TAAAGGGGTTAATTCTATTTTCCTAAAATCACAGCTATGGGCTTAGAGGCACCTGACTTT
 CAAAAGTGTAGCTGAGCTACTGATTCATAACAAGT

【0098】

標識はアンダーラインされ、それは確かに大抵の3 N1aIII部位の次に位置している。

【0099】

このコンティグは読み取り枠(ORF)を含まない。しかしESTs配列は誤りに満ちており、従ってORFはクローンの配列内にかくされている可能性があった。配列の注意深い分析は長ORFが3個の異なるフレームをとおして転位することで生成できることを示した。「バーチャルcDNA」は次いで相同性調査に使用することができ、この場合著しい相同性がマウスCD20抗原と共に、とりわけ膜貫通ドメインをコーディングする領域内で発見されており、新しいcDNAが膜受容体をコード化することを示している。これは「リアル」クローニングで確認されるであろう。

【0100】

リアルクローニングは技術上完全にバーチャルクローニングとは独立したものである。しかしバーチャルcDNAの獲得はいつでもリアルクローニングの交差チェックに有用であり得る。RACE-PCRによるクローニングは通常はより長い出発配列から使用されるけれども標準技術である。我々の場合は、我々のT細胞クローンから産生されたcDNAsは特異的アダプターにより両末端で連結されている。14ntの標識配列から出発して、2個の断片はcDNAの3ま

たは5 末端に向けてPCRにより生成することかできる。

【0101】

5 断片を生成するために使用されるプライマーはアンダーラインされている。

【0102】

AGCAGTGGTAACAACGCAGAGATTCGGCACGATGGGTGAACACACAATCAAACTTCTC
CTGGAATAAATCATCTGACATCAGATCCTTCCATTGTCTGTACTGTTTCTGCTGCCCTGGA
AACCATGCAAGGACAGGAACAGACCACCATGGCAGTGGTTC

【0103】

5 プライマーの配列 (AGCAGTGGTAACAACGCAGAGA) はクロンテックで設計された5 SMARTアダプターに一致する。3 プライマーは標識それ自身である (CATGGCAGTGGTTC)。

【0104】

3 断片を生成するプライマーはアンダーラインされている。

【0105】

CATGGCAGTGGTTCCCTGGAGGTGCTCCACCTTCAGAGAATTCTGTTATGACATCACAAAT
GTGGAACGAGAAGAAGGAGAAATCTTGAAGGGGAACCAAAGTCCTTGGGGTTTTACAA
GGTATGATTGCTATCATAAACCTCAGCTTAGGAATAATAATTCGACAACCTTTGGTTTTCT
GAACTACCCACTTCAGTGATGTTAATGGTCCCAATTGGGGGATCAGTAGTGTCCATTGTCT
CCGGATCCCTGGCCATTGCAGCAGGAGTGACACCTACAAAATGCCTGGTATGTAATTTGGT
ATGTTTTGCTATGGAAAAGGAGTAATTTTCATCAACTATGCATATATCTGCTAAGATATAAA
GGGGTTAATTCTATTTTCCTAAAATCACAGCTATGGGCTTTAGAGGCACCTGACTTTCAA
AGTGTAGCTGAGCTACTGATTCATAACAAGTCTCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAC
TCGAGTTGACATCGAG

【0106】

5 プライマーの配列は標識それ自身である。3 プライマー配列はpoly A結合3 アダプターから誘導される。

【0107】

PCR (およびクローニング) の第3ラウンドは、5 と3 断片がユニーク

cDNAから生成されてきたことを示すために内部プライマーを使用して行われた。

【0108】

完全cDNA配列は以下の通りである。

【0109】

TTCGGCACGATGGGTGAACACACAATCAAACTTCTCCTGGAATAAATCATCTGACATCAG
ATCCTTCCCATTGTCTGTACTGTTTCTGCTGCCCTGGAAACCATGCAAGGACAGGAACAGA
CCACCCATGGCAGTGGTTCCTGGAGGTGCTCCACCTTCAGAGAATTCTGTTATGACATCA
CAAATGTGGAACGAGAAGAAGGAGAAAATTCTTGAAGGGGAACCAAAGTCCTTGGGGTTT
TACAAGGTATGATTGCTATCATAAACCTCAGCTTAGGAATAATAATTCGACAACCTTGGT
TTTCTGAACTACCCACTTCAGTGATGTTAATGGTCCCAATTGGGGGATCAGTAGTGCCAT
TGTCTCCGGATCCCTGGCCATTGCAGCAGGAGTGACACCTACAAAATGCCTGGTATGTAAT
TTGGTATGTTTTGCTATGGAAAAGGAGTAATTTTCATCAACTATGCATATATCTGCTAAGAT
ATAAAGGGGTTAATTCTATTTTCCTAAAATCACAGCTATGGGCTTTAGAGGCACCTGACTT
TCAAAGGTAGCTGAGCTACTGATTCATAACAAGTCTCAT

【0110】

この新しいcDNA配列はORFを含む。

【0111】

MGEHTIKTSPGINHLTSDPSHCLYCFCCPGNHARTGTDHHGSGSWRCSTFREFCYDITNVEREE
GEILEGGTKVLGVLQGMLAIIINLSLGIHISTTLFSELPTSVMLMVPIGGSVVSIVSGSLAIAAGVTP
TKCLCFAMEKE

【0112】

このORFから推定される予想タンパク質は2個のテトラスパンタンパク質：マウスCD20受容体とヒトFcRIaとの32%相同性を示す。

【0113】

この実施例は2個の独立した方法が表1にリストされた遺伝子に一致する遺伝子転写物のそれぞれの完全配列を決定するのに使用することができ、そのためそれらの合成と分離を可能にする。前に記載の特定の実施例は、(疎水性の分析で示されるように)4個の膜貫通ドメインを持ち、CD20抗原とFcRIaと一

緒にタンパク質の4 T Mファミリーに多分属するこれまで同定されていなかったタンパク質をコード化する。

【0114】

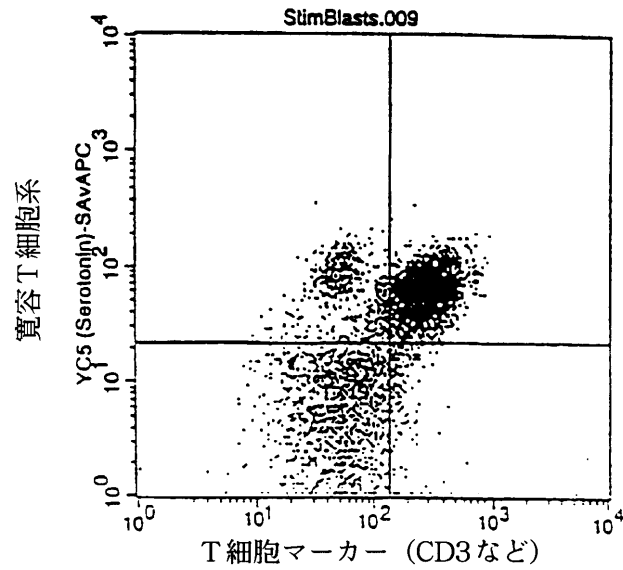
ここに記載されたように、このタンパク質は潜在的にT h 1サブセットのバイオマーカーとして使用される。抗体は標準の方法を用いて予想されたタンパク質に対して高めることができた。このような抗体は予想されるタンパク質（これに対しては更に研究が行われる）の生物機能とは全く無関係の正常および病的状況でT h 1細胞をモニターする非常に有用なツールとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

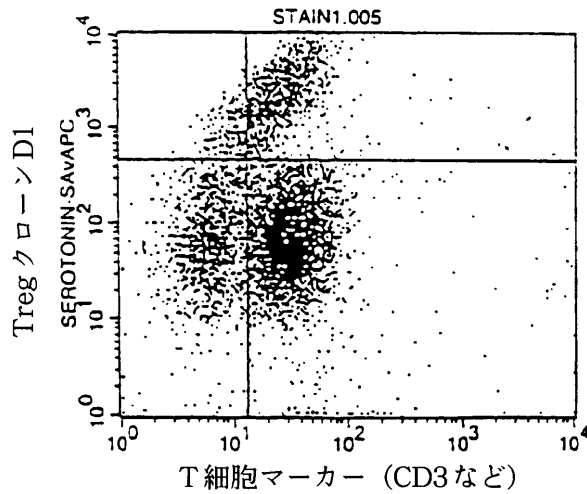
【図1】 セロチニン染色および2色F A C S分析による寛容T細胞とT r e g系T P H遺伝子発現の分析を示す図

【図1】

セロトニン染色および2色FACS分析による寛容T細胞とTreg系でのTPH遺伝子発現の分析



Quad	% Gated	X Geo Mean	Y Geo Mean
UL	9.68	60.02	61.73
UR	65.68	259.90	59.70
LL	21.97	51.40	5.97
LR	2.67	193.50	9.14



Quad	% Gated	X Geo Mean	Y Geo Mean
UL	2.85	9.26	1022.94
UR	16.14	29.94	2230.75
LL	21.10	6.05	57.54
LR	59.92	33.29	61.80

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

					International Application No PCT/GB 00/03821
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	C12N15/12 A61K38/17	C07K14/47 A61K31/70	C12N5/06 C12N15/11	C07K16/18 C12Q1/68	A61K39/395 G01N33/50
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)					
IPC 7 C12N C07K A61K G01N C12Q					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
BIOSIS					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	HUANG CHIFU ET AL: "Regulation and function of mast cell proteases in inflammation." JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 18, no. 3, May 1998 (1998-05), pages 169-183, XP000990876 ISSN: 0271-9142 the whole document				1-30,40, 47
X	HUANG R ET AL: "CLONING AND STRUCTURAL ANALYSIS OF MMCP-1 MMCP-4 AND MMCP-5 THREE MOUSE MAST CELL-SPECIFIC SERINE PROTEASES" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 21, no. 7, 1991, pages 1611-1622, XP000990715 ISSN: 0014-2980 the whole document				1-22,28, 47
--- -/--					
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.			<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:					
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
30 July 2001			23. 10. 01		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer Smalt, R		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No. PCT/GB 00/03821
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAUGHEY G H ET AL: "STRUCTURE CHROMOSOMAL ASSIGNMENT AND DEDUCED AMINO ACID SEQUENCE OF A HUMAN GENE FOR MAST CELL CHYMASE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 266, no. 20, 1991, pages 12956-12963, XP002164694 ISSN: 0021-9258 the whole document	4
X	--- GROUX HERVE ET AL: "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." NATURE (LONDON), vol. 389, no. 6652, 1997, pages 737-742, XP002164695 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document	48-52
A	--- REST R F: "HUMAN NEUTROPHIL AND MAST CELL PROTEASES IMPLICATED IN INFLAMMATION" METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 169, 1988, pages 309-327, XP000990999 ISSN: 0076-6879 the whole document	
A	--- WO 95 09921 A (ICOS CORP) 13 April 1995 (1995-04-13) the whole document	
A	--- EP 0 761 822 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 12 March 1997 (1997-03-12) the whole document	
A	--- STOLL J ET AL: "CHARACTERIZATION AND CHROMOSOMAL MAPPING OF A CDNA ENCODING TRYPTOPHAN HYDROXYLASE FROM A MOUSE MASTOCYTOMA CELL LINE" GENOMICS,US,ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, vol. 7, no. 1, 1 May 1990 (1990-05-01), pages 88-96, XP000431602 ISSN: 0888-7543 the whole document -----	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 00/03821**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 43 and 44 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims 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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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 additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-47, partially and Claims 48-52, completely.

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Present claims 8-20, 23-30, 32-36, 40-42 and 47 relate to regulators, activators, repressors, binding agents, agonists, antagonists, mimetics, binding partners, etc.

The application does not give support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for these compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product/compound/method/apparatus by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds which can be characterized by the tag/gene/protein of the invention, namely antisense nucleic acids, nucleic acids which hybridize under stringent conditions, and in as far as a protein/gene is indicated in table 1 for the invention in question, also antibodies.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: Invention 1: claims 1-47 partially,
and claims 48-52 completely

- 1.1. Claims: claims 1-47, all partially
MMCP-5 gene, as identified in the first line of table 1, and homologues thereof, nucleic acids complementary thereto, proteins encoded thereby, regulator and binding partner of said gene, vector comprising said gene, host cell comprising said vector, and methods for producing them, compositions, diagnostic kits and cell typing reagent comprising said gene, nucleic acid, protein, regulator, binding partner, vector or host cell. Ex vivo method for Treg-related analysis comprising quantification of said gene or products directly or indirectly derived therefrom.

- 1.2. Claims: claims 48-52 completely
An isolated Treg/Tr1 cell.

2. Claims: Inventions 2-84: claims 1-47, all partially

Subject matter as defined for invention 1.1 above, but limited to the respective tags in table 1 of the description, and the genes and/or ESTs associated therewith, whereby invention 2 pertains to mMC-CPA carboxypeptidase A, invention 3 pertains to ESTs associated with tag TCAACTCGAG,, and invention 84 pertains to TACE.

3. Claims: Invention 85: claims 1,2,5-47, all partially

Subject matter as defined for invention 1.1 above, but limited to the gene and the tag associated therewith as disclosed in example 4 of the description, with homology to mousew CD20 antigen and human FcRIa.

For the sake of conciseness, the first subject matter is explicitly defined, the other subject matters are defined by analogy thereto.

Please note that all inventions mentioned under item 1, although not necessarily linked by a common inventive concept, could be searched without effort justifying an additional fee.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 00/03821

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9509921 A	13-04-1995	AT 201905 T	15-06-2001
		CA 2151045 A	13-04-1995
		DE 69427392 D	12-07-2001
		DK 673426 T	27-08-2001
		EP 1096016 A	02-05-2001
		EP 0673426 A	27-09-1995
		JP 8504603 T	21-05-1996
		US 6146625 A	14-11-2000
		US 6099836 A	08-08-2000
		US 5641669 A	24-06-1997
		US 6045794 A	04-04-2000
		US 5532152 A	02-07-1996
		US 5605801 A	25-02-1997
		US 5698403 A	16-12-1997
		US 5656431 A	12-08-1997
		US 5847088 A	08-12-1998
		US 6203790 B	20-03-2001
US 2001021379 A	13-09-2001		
US 5977308 A	02-11-1999		
EP 0761822 A	12-03-1997	US 5695937 A	09-12-1997
		US 5866330 A	02-02-1999
		AU 707846 B	22-07-1999
		AU 6561496 A	20-03-1997
		AU 7018896 A	01-04-1997
		CA 2185379 A	13-03-1997
		DE 761822 T	11-01-2001
		GB 2305241 A,B	02-04-1997
		IE 80465 B	12-08-1998
		JP 10511002 T	27-10-1998
		JP 2001155035 A	08-06-2001
		JP 2001145495 A	29-05-2001
WO 9710363 A	20-03-1997		

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
A 6 1 P	31/00	A 6 1 P	37/02	4 C 0 8 6
	35/00		37/04	4 H 0 4 5
	37/02		37/06	
	37/04	C 0 7 K	14/47	
	37/06	C 1 2 N	1/15	
C 0 7 K	14/47		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 Q	1/02	
	1/21		1/68	A
	5/10	G 0 1 N	33/15	Z
C 1 2 Q	1/02		33/50	Z
	1/68		33/53	D
G 0 1 N	33/15			M
	33/50		33/566	
	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			5/00	A
	33/566			B
		A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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

(72)発明者 ウォルドマン, ハーマン
イギリス, オーエクス2 7キューワイ
オックスフォード, アブスリー ロード
4

(72)発明者 コボルド, スティーブン
イギリス, オーエクス8 8ピーエス ア
クサン, ウィットニー, ストーンズフィー
ルド, チャーチ ストリート, ウッドバー
ン(番地なし)

(72)発明者 ゼレーニカ, ディアーナ
フランス, エフ - 75010 パリ, プールバ
ール マジエンタ, 32

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA14 DA36 FB02
4B024 AA01 AA11 BA31 BA41 CA04
CA06 DA02 EA04 HA01 HA11
4B063 QA01 QA08 QQ08 QQ43 QQ53
QR32 QR55 QS25 QS34
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14
BA02 CA44 CA46
4C084 AA02 AA13 BA44 CA17 NA14
ZB05 ZB07 ZB08 ZB09 ZB26
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14
ZB05 ZB07 ZB08 ZB09 ZB26
4H045 AA10 BA10 CA40 DA86 EA28
FA74

专利名称(译)	免疫调节组成物		
公开(公告)号	JP2003511070A	公开(公告)日	2003-03-25
申请号	JP2001530471	申请日	2000-10-06
[标]申请(专利权)人(译)	Isis在卢武铉凝聚有限公司		
申请(专利权)人(译)	Isis在卢武铉凝聚有限公司		
[标]发明人	アダムズエリザベス ウォルドマンハーマン コボルドステイーブン ゼレーニカディアーナ		
发明人	アダムズ,エリザベス ウォルドマン,ハーマン コボルド,ステイーブン ゼレーニカ,ディアーナ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/70 A61K31/7052 A61K38/00 A61K48/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K31/70 A61K38/00 A61K48/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/47		
FI分类号	A61K31/7052 A61K48/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045 /FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA08 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063 /QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065 /AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/CA17 4C084/NA14 4C084/ZB05 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZB09 4C084/ZB26 4C086 /AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB05 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB09 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA28 4H045 /FA74		
代理人(译)	丹羽浩之		
优先权	1999023790 1999-10-08 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

已经描述了在某些T细胞群体中差异表达的基因及其表达产物(例如同源蛋白),同源受体,调节剂,结合伴侣及其抑制剂或模拟物。特别是作为治疗干预的靶标,已经描述了用于Treg免疫调节途径的组分的药理组合物,用于基于炎症或免疫疾病的治疗和使用的治疗和预防方法。

Th1	Th2	Tri/Trcg	LN	計	標識配列	信頼限界 95%	
2	0	92	0	94	CGATCTGGCC	MMCP-5 マスト細胞セリンプロテイナーゼ	24
4	0	85	0	89	AAGTCTCCA	mMC-CPA カルホキシペプチダーゼA	17
0	0	44	0	44	TCAACTCGAG	ESTs	14
0	0	35	0	35	GAGGTTTTTT	符合しない	11
1	0	50	2	53	AAGACTTGA	符合しない	10
1	2	29	0	32	GATTTGCAGA	g1996未知の機能、相同体	5.6
1	0	22	0	23	TGGAGAAAAG	ESTs	5.4
0	1	21	0	22	AATGAGTTGC	トリプトファン代謝ロキシラーゼ	5.1
0	0	17	0	17	CCACTGGCT	符合しない	4.8
0	1	24	2	27	GTGGACTCAA	EST	4.5
1	17	54	0	72	GGATATGTGG	ogr-1=zf19268=krox-24	4.1
12	17	99	18	146	CCCTGAGTCC	ペニシリン	3.7
0	0	16	2	18	AACTGCTTCA	符合しない	3.2
0	6	23	0	29	CTGCTTTGTG	プロエンケファリン	3.2
3	5	31	3	42	ATGAACACCG	Gs アルファサブユニット	3.1
0	0	11	0	11	AGAGAGAGAG	PAI-AH:血小板活性化因子	2.9
0	0	11	0	1	CCFGAGCTCC	符合しない	2.9
1	0	12	0	13	ACCCAAGGTT	符合しない	2.7
6	9	34	1	50	ATTGGGGTC	LAI/TMS	2.7
0	0	13	2	15	AAGGCAGAGG	符合しない	2.5
1	2	15	2	20	AACTCACAAT	ESTs	2.1
0	0	8	0	8	TTGGTAGCTG	符合しない	2
1	20	35	3	59	ACAACCTTCT	GM2 活性化因子タンパク質(Gm2a)	2
1	4	33	19	57	CCTCAGCCTG	カタレプシン DEEC 3.4.23.5)	1.9
0	3	11	0	14	ACGATFACTG	ESTs	1.8
0	1	8	0	9	CTAAGGAGAT	ESTs	1.7
0	0	7	0	7	ATGTAGAAAGG	符合しない	1.7
0	0	7	0	7	CAATAAATAG	Fc イブロンRIアルファサブユニット	1.7
0	0	7	0	7	CCITTAAGCC	符合しない	1.7
0	0	7	0	7	GAAGCGTGGG	符合しない	1.7
0	0	7	0	7	GCTGCGAGGG	符合しない	1.7
0	0	7	0	7	TAAAGATAIG	インターロイキン-3 受容体ヘータサブユニット	1.7
3	4	24	12	43	CACGGCTTTC	L26 リボソームタンパク質	1.6
1	1	14	5	21	TGTAGTGTAA	リボソームタンパク質 S8	1.6
2	9	18	1	30	TPTCTGTATG	符合しない	1.6
0	20	25	0	45	GGCATTGA	符合しない	1.6
0	9	15	0	24	AGCAGATTCT	ロイシタチン	1.5
0	1	7	0	8	AAGCATCCCG	符合しない	1.4
0	0	7	1	8	GACTGGATTG	CD63	1.4
0	0	7	1	8	TTTACATACA	符合しない	1.4
0	0	6	0	6	CAAACTAGAA	符合しない	1.4
0	0	6	0	6	CACGTGAATG	符合しない	1.4