

(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2006-508191
(P2006-508191A)

(43) 公表日 平成18年3月9日(2006.3.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 B O 6 5
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-507126 (P2005-507126)	(71) 出願人	505131946
(86) (22) 出願日	平成15年11月10日 (2003.11.10)		トーラーレックス, インク.
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月1日 (2005.7.1)		TOLERRX, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/035719		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(87) 国際公開番号	W02004/043386		2 1 3 9 ケンブリッジ テクノロジー
(87) 国際公開日	平成16年5月27日 (2004.5.27)		スクエア 300
(31) 優先権主張番号	60/424,777		300 Technology Squa
(32) 優先日	平成14年11月8日 (2002.11.8)		re, Cambridge, MA O2
(33) 優先権主張国	米国 (US)		1 3 9 (US) .
(31) 優先権主張番号	60/467,477	(74) 代理人	100136630
(32) 優先日	平成15年5月2日 (2003.5.2)		弁理士 水野 祐啓
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100127878
			弁理士 遠藤 淳二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エフェクタT細胞に優先的に関連する分子及びそれらの使用法

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも部分的に、例えばプロテインキナーゼCシータ (PKCシータ) など、T調節性細胞上には存在せず、エフェクタ細胞 (Th1及びTh2) 上には存在する特定の遺伝子の発見に基づく。さらに、炎症性サイトカインの産生や、炎症性のエフェクタT細胞の細胞増殖にとって重要な経路は、調節性T細胞によっては用いられていない。従って、ある局面では、本発明は、免疫細胞中の調節性T細胞機能をエフェクタT細胞機能に対して促進する方法を提供するものであり、本方法は、免疫細胞を、この免疫細胞中のプロテインキナーゼCシータ経路を阻害する作用薬に接触させるステップを含む。

別の局面では、本発明は、対象における調節性T細胞機能をエフェクタT細胞機能に対して促進すると有益であろう状態を有する対象を治療する方法を提供し、本方法は、対象における免疫細胞中のプロテインキナーゼCシータ経路を阻害する作用薬を投与するステップを含む。更に別の局面では、本発明は、調節性T細胞機能を調節することなく、エフェクタT細胞機能を特異的に調節する化合物をスクリーニングするための検定法を提供するものであり、本検定法は、プロテインキナーゼCシータ経路分子を検査化合物に接触させるステップと、該検査化合物の、プロテインキナーゼCシータ経路分子活性の調節能を判定するステップとを含み、プロテインキナーゼCシータ経路分子活性の調節は、当該検査化合物が、エフェクタT細胞機能の特異的モジュレータであることの指標である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテインキナーゼCシータ経路成分の発現又は活性を調節する作用薬を投与するステップを含む、このような治療を必要とする対象における状態を治療する方法であって、但しこのような治療の効果は、対象においてエフェクタT細胞機能の調節性T細胞機能に対するバランスを調節することである、方法。

【請求項 2】

前記成分が、配列番号 1, 3, 5, 7, 9, 及び 11 から成る群より選択される核酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記成分が、配列番号：2, 4, 6, 8, 10, 及び 12 から成る群より選択されるポリペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記作用薬が、タンパク質、ペプチド、低分子又は核酸である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記状態が移植、アレルギー異常、自己免疫異常、ウィルス感染、微生物感染、寄生虫感染又は癌である、請求項 1, 2, 3 又は 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

細胞集団を、PKCシータ経路成分の発現又は活性を調節する作用薬に接触させるステップを含む、プロテインキナーゼCシータ経路成分の発現又は活性を調節する方法であって、但し前記細胞集団が、T細胞；未刺激T細胞；調節性T細胞；エフェクタT細胞；又は末梢血リンパ球のうちの一つ以上を含み、またこのような接触の効果は、前記細胞集団においてエフェクタT細胞機能の調節性T細胞機能に対するバランスを調節することである、方法。

【請求項 7】

ある作用薬に接触させてある細胞集団を、ある状態に罹患している対象に投与するステップを更に含み、その効果が前記状態を治療することである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記作用薬が、タンパク質、ペプチド、低分子又は核酸である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記状態が、移植、アレルギー異常、自己免疫異常、ウィルス感染、微生物感染、寄生虫感染又は癌である、請求項 6, 7 又は 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

プロテインキナーゼCシータ経路成分の発現又は活性を調節する作用薬を特定する検定法であって、

プロテインキナーゼCシータ経路成分を含む指標組成物を複数の検査作用薬に接触させるステップと；

前記検査作用薬の、プロテインキナーゼCシータ経路成分の発現又は活性の調節能を判定するステップと

を含み、但し、特定される前記作用薬は、エフェクタT細胞機能の調節性T細胞機能に対するバランスを調節することができるものである、検定法。

【請求項 11】

前記作用薬が、タンパク質、ペプチド、低分子又は核酸である、請求項 10 に記載の検定法。

【請求項 12】

前記指標組成物が、PKCシータ経路成分発現細胞である、請求項 10 に記載の検定法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

10

20

30

40

50

関連出願

本出願は、2003年5月2日出願の標題「エフェクタT細胞機能に対して免疫細胞中の調節性T細胞機能を促進する方法」の米国仮出願第60/467,477号に基づく優先権を主張するものである。この出願は、さらに、2002年11月8日出願の標題「Th1及び/又はTh2細胞の細胞内タンパク質及び免疫応答の調節」の米国仮出願第60/424,777号に基づく優先権を主張するものである。これらの出願の各々の内容全体を、引用をもってここに援用することとする。

【0002】

発明の背景

プロテインキナーゼC (PKC) は、1,2-ジアシルグリセロール (DAG) 及び他の脂質によって生理学的に活性化する酵素の一ファ入りである。活性化すると、このイソ酵素は膜リン脂質に結合するか、又は、膜受容体に結合して、この酵素を細胞レベル下区画に繋ぎ止める

(reviewed in Liu and Heckman, *Cell. Signal.*, 1998, 10, 529-542)。

【0003】

プロテインキナーゼCイソ酵素は、異なる細胞系及び組織において、数及び発現レベルが異なる。今日までのところ、11種の異なるイソ酵素(アルファ、ベータI、ベータII、ガンマ、デルタ、イプシロン、ニュー、ラムダ、ミュー、シータ及び及びゼータ)が同定されており、これらはそれらの示差的な発現パターン及びコファクタ要件に基づいて、3つのグループに分類されている。治療薬ターゲットとしてのプロテインキナーゼへの関心は、それが主要な細胞受容体であり、この受容体を介して、ホルボールエステルと呼ばれる一クラスの腫瘍促進因子が、それらの多面発現作用を細胞に及ぼしているという発見により生まれた (Liu and Heckman, *Cell. Signal.*, 1998, 10, 529-542)。

【0004】

プロテインキナーゼCシータ (PKC-シータ、PKCT、PRKCT、nPKC-シータ及びPRKCQとしても知られる) は、新規なセリン/スレオニンプロテインキナーゼCアイソフォーム (nPKC) の1つであり、数々の組織で広汎に発現し、T細胞及び胸腺細胞を含め、造血細胞系で最も高いレベルで見られる (Baier et al., *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 4997-5004; Keenan et al., *Immunology*, 1997, 90, 557-563; Meller et al., *Cell. Immunol.*, 1999, 193, 185-193; Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, 191, 240-246)。このイソ酵素は、末梢T細胞において抗原により誘導される活性化事象を特異的に担うことが示されている。プロテインキナーゼCシータ・ノックアウトマウスが、正常な数の末梢T細胞を発生させるように、プロテインキナーゼCシータは胸腺中のT細胞の発生に必要なではない。しかしながら、これらのマウスに抗原刺激を与えた場合には、これらはT細胞応答を行えない。

【0005】

発明の概要

本発明は、少なくとも部分的に、特定の分子がエフェクタT細胞 (Th1及びTh2) 又は調節性T細胞に優先的に関連するという発見に基づく。例えば、プロテインキナーゼCシータ (PKCシータ) はTh1及びTh2系譜の細胞によって優先的に発現することが見出されている。従って、一方又は他方のサブセットの細胞による免疫応答を優先的に調節することができる。本発明は、調節性T細胞及びエフェクタT細胞の間の活性化の間のバランスを、調節(例えば上方もしくは下方調節するなど)することで、免疫応答を調節する方法などに関し、そして、このような応答を調節する上で有用な組成物にも関する。さらに本発明は、対象においてエフェクタT細胞機能を調節性T細胞機能に対して調節したり、あるいは、調節性T細胞機能をエフェクタT細胞機能に対して調節すると有益であろう状態を診断、治療又は予防する上で有用な方法にも関する。当該の方法及び組成物は、当該状態に関連する抗原に対するエフェクタT細胞応答が強すぎることを特徴とする状態の診断、治療又は予防、エフェクタT細胞応答が弱いことを特徴とする状態の診断、治療又は予防、

10

20

30

40

50

あるいは、調節性T細胞応答が弱いことを特徴とする状態の診断、治療又は予防において特に有用である。

【0006】

従って、ある局面では、本発明は、プロテインキナーゼCシータ経路成分の発現又は活性を調節する作用薬を投与するステップを含む、このような治療を必要とする対象における状態を治療する方法に関し、但しこのような治療の効果は、対象においてエフェクタT細胞機能の調節性T細胞機能に対するバランスを調節することである。ある実施態様では、該成分は、

配列番号1, 3, 5, 7, 9, 及び11から成る群より選択される核酸である。別の実施態様では、該成分は、配列番号: 2, 4, 6, 8, 10, 及び12から成る群より選択されるポリペプチドである。さらに別の実施態様では、該作用薬は、タンパク質、ペプチド、低分子又は核酸である。更なる実施態様では、該状態は移植、アレルギー疾患、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染又は癌である。

10

【0007】

別の局面では、本発明は、細胞集団を、PKCシータ経路成分の発現又は活性を調節する作用薬に接触させるステップを含む、プロテインキナーゼCシータ経路成分の発現又は活性を調節する方法に関し、但し前記細胞集団は、以下

T細胞; 未刺激T細胞; 調節性T細胞; エフェクタT細胞; 又は末梢血リンパ球のうちの1つ以上を含み、またこのような接触の効果は、当該細胞集団においてエフェクタT細胞機能の調節性T細胞機能に対するバランスを調節することである。ある実施態様では、本方法は、さらに、ある作用薬に接触させてある細胞集団を、ある状態に罹患している対象に投与するステップを含み、その効果が前記状態を治療することである。別の実施態様では、該作用薬は、タンパク質、ペプチド、低分子又は核酸である。更なる実施態様では、該状態は、移植、アレルギー疾患、自己免疫疾患、ウイルス感染、細菌感染、寄生虫感染又は癌である。

20

【0008】

別の局面では、本発明は、プロテインキナーゼCシータ経路成分の発現又は活性を調節する作用薬を特定する検定法に関し、該検定法は、プロテインキナーゼCシータ経路成分を含む指標組成物を複数の検査作用薬に接触させるステップと; 前記検査作用薬の、プロテインキナーゼCシータ経路成分の発現又は活性の調節能を判定するステップと、を含み、但し、特定される該作用薬は、エフェクタT細胞機能の調節性T細胞機能に対するバランスを調節することができるものである。ある実施態様では、該作用薬は、タンパク質、ペプチド、低分子又は核酸である。別の実施態様では、該指標組成物は、プロテインキナーゼCシータ経路成分発現細胞である。

30

【0009】

発明の詳細な説明

伝統的な免疫応答においては、エフェクタT細胞(Teff)応答が、調節性細胞(Treg)の応答よりも優勢になって、抗原が除去される。寛容は、伝統的活性化経路と同じステップ(即ち、抗原提示及びT細胞活性化)で開始するが、抗原の豊富さ、T細胞にそれが提示される手段、CD4+細胞支援の相対的利用能を含む、しかしこれらに限定はしないが、といった因子が、調節性T細胞と呼ばれる、異なるクラスのリンパ球の増殖を引き起こす。エフェクタT細胞が伝統的な免疫応答を媒介するのと同様に、調節性T細胞は寛容原性応答を媒介する。しかしながら、例えばアレルギー、自己免疫疾患、臓器拒絶、治療的タンパク質の慢性投与又は等に伴うものなど、不要なもしくは方向の誤った応答は、望ましくなく、かつ、場合によっては致命的になることもある身体内の状態に結び付くことがある。調節性T細胞のエフェクタT細胞に対するバランスが優勢になる又はシフトする。抗原が保持され、免疫寛容が起きる。

40

【0010】

本発明は、少なくとも部分的には、エフェクタT細胞(Th1及びTh2)及び調節性T細胞間で示差的に発現する遺伝子の同定に基づく。エフェクタT細胞が優先的に発現する遺

50

伝の中に、PKCシータの遺伝子や、T細胞においてNF Bを通じたPKCシータからのシグナル伝達に必要であることが公知の他のタンパク質メンバの遺伝子がある(図1)。PKCシータ経路のタンパク質メンバは、PKCシータを含め、限定はしないが、望ましくない免疫応答を遮断することのできるであろう化合物を含む種々の化合物を同定するために用いることができる。同定された化合物の所望の特性には、限定はしないが、調節性T細胞媒介性応答が優勢となるような、エフェクタT細胞及び調節性T細胞間のバランスへの影響能がある。このような調節性応答が優勢に発生すると、将来の望ましくない免疫応答を制御及び/又は予防することができるであろう。

【0011】

調節性T細胞は、T細胞受容体刺激に対して活性化及び分裂することができるが、PKCシータシグナル伝達系を用いていないようであるため、PKCシータ及びこの経路のメンバを選択的に標的にし、下方調節するなど調節する化合物は、エフェクタT細胞応答の優先的モジュレータとして有用である。これらの化合物は、エフェクタT細胞機能を促進するなど、優先的な調節を行うと有益であろう状態の治療又は予防に有用である。ある実施態様では、このような化合物は、対象において調節性T細胞応答機能を調節しない(あるいは、例えば付加的な作用薬又はプロトコルの使用を通じて、このような応答を好ましい方向で調節する)。同様に、これらの化合物は、当該状態に関連する抗原に対して、エフェクタT細胞応答が強すぎることを特徴とすると同時に、調節性T細胞の応答が強固になると助けられるであろう状態の治療又は予防において有用である。

【0012】

本発明のある実施態様では、PKCシータ経路のメンバのいずれか(例えば図1を参照されたい)を発現させ、高スループットのスクリーニング検定法などのスクリーニング検定で用いて、これらのタンパク質に結合してその機能を阻害するであろう化合物を同定できよう。この経路を遮断すると、炎症性応答が優先的に阻害される。従って、この経路を狙った化合物は、臓器移植片の破壊など、望ましくない炎症性応答を軽減、予防又は停止させると共に、T調節性細胞集団への影響を抑えるか、あるいは、T調節性集団へ正味で正の効果を与えることができるであろう。ある実施態様では、このような化合物は、調節性T細胞集団の好ましい展開を可能にし、ひいては、移植臓器への将来のあらゆる攻撃を、付加的な化合物を用いることなく最終的に制御することになるであろう。

【0013】

さらにこれらの化合物は、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、又は炎症性腸疾患などの数多くの疾患における自己免疫攻撃を停止させる上でも有用であろう。例えば移植片拒絶の場合と同様に、これらの薬物は、エフェクタT細胞による組織破壊を停止させると同時に、免疫系の調節部門に優勢を発揮し直させ、最終的には付加的な薬物治療なくとも当該疾患を制御することを可能にするであろう。

【0014】

調節性T細胞はまた、抗体応答を制御する働きもすることが示されている。いくつかの自己免疫疾患は、大部分を自己抗体によって媒介されている。この治療法は、エフェクタT細胞によりB細胞に提供されるT細胞支援を阻害するため、重症筋無力症などの自己抗体媒介性自己免疫疾患を治療する上でも有用であろう。

【0015】

本発明のある実施態様では、現在用いられている免疫抑制剤とは異なり、ここで解説された化合物は、恒常性免疫調節機序の発生を促すため、望ましくない免疫応答を制御するためにも、中期の治療法や、又は、長期間もしくは長いコースの治療法ではなく、ある短期間、投与するだけでよい。本発明のある実施態様では、ここで解説された化合物を、複数回の短期間治療法で投与してよい。ここで解説された化合物を、2回の治療法、又は3回の治療法、あるいは4回以上の治療法で投与してもよい。本発明の別の実施態様では、検査を、本治療を受けている患者に行って、前記治療法の効験を判定し、更なる治療期間が必要であるかを判定してもよい。行われる前記検査には、限定はしないが、生検、血液検査、腎臓移植片が適正に機能しているかを判定する検定、X線、MRI又は身体検査、が

10

20

30

40

50

含まれよう。その結果の免疫調節が天然のT細胞機序によって媒介されと考えられるため、免疫調節を維持するために付加的な薬物が必要になる必要性は、調節性T細胞応答の優勢がいったん確立されれば、低減又はなくすることができる。ある実施態様では、免疫抑制剤による長期又は生涯の治療をなくことができ、自己免疫性及び臓器移植などの治療法に現在伴う副作用の、全てではないにしてもその数多くが無くなるであろう。

【0016】

図1に見られるように、T細胞の活性化には、抗原(TCR)及びCD28のためのT細胞受容体の両方を通じたシグナル伝達が必要である。CD4分子は付加的なキナーゼ・シグナルとなり、完全で強力な細胞応答が行われる。これらの初期T細胞活性化事象によりリン酸化する分子の中に、アダプタンパク質vavがある。リン酸化vavは、接着分子を相互作用して細胞の形状を変え、またPKCシータを活性化する役目もすることが示されている。活性化したPKCシータは細胞膜に遊走してそこでスカフォードタンパク質CARMA1に付着する。さらにCARMA1と相互作用するのはタンパク質Bcl 10である。Bcl 10はPKCシータによりリン酸化した後、阻害性分子であるI BをNF Bから遊離させることができ、こうしてNF Bを活性化させることができる。こうして活性化したNF Bは核内に入り、そこでDNAの特異的部位に結合して、炎症性免疫応答に特徴的であり、かつ炎症性免疫応答を媒介する分子の数多くをコードする遺伝子のmRNAの転写を起こさせる。

10

【0017】

I. 定義

ここで用いられる用語「プロテインキナーゼCシータ」とは、PKCT、PRKCT、nPKC-シータ及びPRKCQとしても公知のセリン/スレオニンプロテインキナーゼを言う。プロテインキナーゼCシータのヌクレオチド配列を配列番号：1に示し、そしてプロテインキナーゼCシータのアミノ酸配列を配列番号：2に示す。PKCシータは種々の組織に広汎に発現するが高レベルで見られるのは、T細胞及び胸腺細胞を含む造血細胞系である (Baier et al., J. Biol. Chem., 1993, 268, 4997-5004; Keenan et al., Immunology, 1997, 90, 557-563; Meller et al., Cell. Immunol., 1999, 193, 185-193; Wang, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, 191, 240-246)。このイソ酵素は、カルシウム独立的な態様で働き、当該タンパク質をがマウス胸腺腫細胞で一過性に過剰発現させたところ、インターロイキン2プロモータ誘導性コンストラクトが転写活性化した (Baier et al., Eur. J. Biochem., 1994, 225, 195-203)。

20

30

【0018】

用語「プロテインキナーゼCシータ経路」は、細胞が細胞外からの影響又はシグナル(例えばサイトカイン受容体又は抗原受容体など、細胞の表面上の受容体により伝達されるシグナル)を細胞応答(例えば遺伝子転写の調節)に変換する手段を包含するものであり、PKCシータは、当該シグナルの転写に関与する分子の1つである。ここで用いられる「PKCシータ経路成分」又は「経路成分」は、細胞外からの影響又はシグナルを細胞応答に伝達することに関与する、例えばPKCシータや、又は、PKCシータの上流もしくは下流の分子など、PKCシータに関与するシグナル伝達経路中の分子を包含する。好ましくは、PKCシータ経路成分が調節されると、PKCシータの生物学的活性の調節が起きるとよい。PKCシータ経路の成分の例は当業者に公知であり、概略的には図1に概観されているが、その中には、PKCシータ、vav、CARMA1、Bcl10、I B及びNF B、がある。vavのヌクレオチド配列を配列番号：3に示し、そしてvavのアミノ酸配列を配列番号：4に示す；CARMA1のヌクレオチド配列を配列番号：5に示し、そしてCARMA1のアミノ酸配列を配列番号：6に示す；Bcl 10のヌクレオチド配列を配列番号：7に示し、そしてBcl 10のアミノ酸配列を配列番号：8に示す；I Bのヌクレオチド配列を配列番号：9に示し、そしてI Bのアミノ酸配列を配列番号：10に示す；NF Bのヌクレオチド配列を配列番号：11に示し、そしてNF Bのアミノ酸配列を配列番号：12に示す。

40

【0019】

ここで用いられる場合の用語「CARMA1」とは、TCR誘導性NF B活性化及びCD28共刺激依

50

存的 Jnk活性化の脂質ラフト関連調節因子を言い、CARD 11としても公知である。CARMA はスカフォードタンパク質である。CARMA1 は、細胞膜の特化した領域で多重タンパク質複合体が集合するための分子スカフォードとして働く一クラスのタンパク質である膜結合グアニル酸キナーゼ (MAGUK) ファミリに属する。このタンパク質は、特徴的なカスパーゼ関連動員ドメイン (CARD) を持つことで定義される、CARDタンパク質ファミリのメンバーでもある。このタンパク質は、CARD14 タンパク質のそれと同様なドメイン構造を有する。両タンパク質のCARDドメインは、細胞アポトーシス及びNF- κ B活性化の正の調節因子として働くことが公知のタンパク質であるBCL10と特異的に相互作用することが示されている。このタンパク質は、細胞内で発現すると、NF- κ Bを活性化し、BCL10のリン酸化を誘導した。

Gaide, O. et al. *Nat. Immunol.* 3 (9), 836-843

(2002) Wang, D., et al. *Nat. Immunol.* 3 (9), 830-835 (2002); Gaide, O., et

al. *FEBS Lett.* 496 (2-3), 121-127 (2001); Bertin, J., et al. *J. Biol.*

Chem. 276 (15), 11877-11882 (2001)

【0020】

ここで用いられる用語「Bcl 10」とは、カスパーゼ動員ドメイン (CARD) を含有するタンパク質を言い、アポトーシスを誘導し、NF- κ Bを活性化することが示されている。このタンパク質は、NF- κ Bシグナル伝達において上流の調節因子として働くと考えられている、CARD9、10、11 及び14を含むタンパク質を含有する他のCARDドメインと相互作用すると報告されている。Bcl10 遺伝子は、粘膜関連リンパ系組織 (MALT) リンパ腫の場合のその転座により、同定された。このタンパク質は、MALTリンパ腫で転座していることが公知の別の遺伝子にコードされたタンパク質であるMALT1と複合体を形成することが見出されている。MALT1 及びこのタンパク質は、NF- κ Bの活性化において相乗作用すると考えられており、これらのいずれの調節不能も、悪性病変につながる同じ病原性プロセスに寄与しているかも知れない (例えば GenBank 登録番号NM_003921; Maes, B. et al.

Blood 99 (4), 1398-1404 (2002);

Kawano, T. et al. *Anticancer Res.* 22 (1A), 305-309 (2002); Wang, L., et

al. *J. Biol. Chem.* 276 (24), 21405-21409 (2001); Lucas, P.C., et al.

J. Biol. Chem. 276 (22), 19012-19019 (2001); Bertin, J., et al. *J. Biol. Chem.*

276 (15),

11877-11882 (2001); Ruland, J., et al. *Cell* 104 (1), 33-42 (2001);

Bertin, J., et al. *J. Biol.*

Chem. 275 (52), 41082-41086 (2000) を参照されたい。

【0021】

ここで用いられる用語「エフェクタT細胞」は、(例えば他の細胞の活性化を調節するサイトカインを産生したり、あるいは細胞傷害性活性により) 抗原を消失させる働きをするT細胞を包含するものである。用語「エフェクタT細胞」は、Tヘルパ細胞(例えばTh1 及びTh2 細部) 及び細胞傷害性T細胞を包含する。Th1細胞は、遅延型過敏反応やマクロファージ活性化を媒介するが、他方 Th2細胞は、B細胞を支援し、アレルギー反応において重要である (Mosmann and

Coffman, 1989, *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173; Paul and Seder, 1994, *Cell*

76, 241-251; Arthur and Mason, 1986, *J. Exp. Med.* 163, 774-786;

Paliard et al., 1988, *J. Immunol.* 141, 849-855; Finkelman et

al., 1988, *J. Immunol.* 141, 2335-2341)。

【0022】

ここで用いられる用語「Tヘルパ1型応答」

(Th1応答) とは、IFN- γ 、IL-2、TNF、及びリンホトキシン (LT) や、Th2細胞でなくTh1細胞によって優先的又は排他的に産生される他のサイトカイン、から選択される一種以上のサイトカインの産生を特徴とする応答を言う。ここで用いられる「Tヘルパ2型応答」(Th2応答) とは、IL-4、IL-5、IL-6 及びIL-10から選択される一種以上のサイトカイン

10

20

30

40

50

の産生を特徴とすると共に、Th2細胞により提供される効率的なB細胞「支援」(例えば、IgG1及び/又はIgE産生の亢進など)と関連するCD4⁺T細胞による応答を言う。

【0023】

ここで用いられる用語「調節性T細胞」は、低レベルのIL-2、IL-4、IL-5、及びIL-12を産生するT細胞を包含する。調節性T細胞は、TNF、TGF、IFN-、及びIL-10を、エフェクタT細胞よりは低レベルではあるが、産生する。TGFは、調節性T細胞により産生される主なサイトカインであるが、このサイトカインは、例えばTh1又はTh2細胞よりも一桁少ないなど、Th1又はTh2細胞が産生するそれよりも低いレベル又は同等なレベルで、産生される。調節性T細胞は、CD4+CD25+集団の細胞に見えることができる(例えばWaldmann and Cobbold, 2001.

10

Immunity, 14:399を参照されたい)。調節性T細胞活性は、培養において活性化シグナル(例えば抗原及び抗原提示細胞で、又は、抗CD3抗体や、抗CD28抗体など、MHCの関係で抗原を模倣するシグナルで)で刺激を受けたTh1、Th2、又は未刺激T細胞の増殖及びサイトカイン産生を能動的に抑制する。

【0024】

ここで用いられる文言「調節性T細胞機能のエフェクタT細胞機能に対するバランスを調節する」又は「調節性T細胞機能をエフェクタT細胞機能に対して調節する」は、TEフェクタ/T調節性細胞活性のバランスが治療前のバランスに比較してシフトしているように、少なくとも1つの調節性T細胞機能(Tエフェクタ細胞及びT調節性細胞の両方を含む一細胞集団において)を優先的に変化させることを包含する。

20

【0025】

ここで用いられる文言「エフェクタT細胞機能の調節性T細胞機能に対するバランスを調節する」又は「エフェクタT細胞機能を調節性T細胞機能に対して調節する」は、TEフェクタ/T調節性細胞活性のバランスが、治療前のバランスに比較してシフトしているように、少なくとも1つのエフェクタT細胞機能(Tエフェクタ細胞及びT調節性細胞の両方を含む一細胞集団において)を優先的に変化させることを包含する。

【0026】

ここで用いられる用語「作用薬」は、本発明の分子の発現及び/又は活性を、例えば上方調節もしくは刺激したり、そして下方調節もしくは阻害するなど、調節する化合物を包含する。ここで用いられる用語「阻害剤」又は「阻害性作用薬」は、本発明の分子の発現及び/又は活性を阻害する作用薬を包含するものである。阻害剤の例には、抗体、RNAi、RNAiを媒介する化合物(例えばsiRNA)、アンチセンスRNA、本発明の分子のドミナント/ネガティブ変異体、ペプチド、及び/又はペプチドミメティック、がある。

30

【0027】

用語「刺激因子」又は「刺激剤」には、本発明の分子の発現及び/又は活性を増加させる、アゴニストなごの作用薬が含まれる。刺激剤の例には、活性タンパク質及び核酸分子や、本発明の分子のペプチド及びペプチドミメティックがある。本発明の作用薬は、本発明の分子の発現及び/又は活性を、増加又は減少させるなど、直接調節することができる。作用薬の例はここに解説されているか、又は、以下に詳述するように、このような化合物を選抜するスクリーニング検定法を用いて同定することができる。

40

【0028】

本発明のスクリーニング検定法に関し、好ましくは、スクリーニングされる「検査化合物又は作用薬」には、例えばTEフェクタ細胞の相対的活性をT調節性細胞の相対的活性に比較して、あるいはその逆など、T細胞活性化のバランスを調節することが当業で公知でない分子が含まれる。好ましくは、複数の作用薬を本方法を用いて検査するとよい。

【0029】

ある実施態様では、本発明のスクリーニング検定法を、活性化剤の存在下で行うことができる。ここで用いられる用語「活性化剤」は、T細胞活性化(例えばサイトカイン産生、標的細胞の増殖、及び/又は溶解などのエフェクタ機能)を刺激する一種以上の作用薬を包含する。活性化剤の例は当業で公知であり、その中には、限定はしないが、例えばマ

50

イトジェン（例えばフィットヘムアグルチニン又はコンカナバリンA）、T細胞受容体又はCD3と（ときには、抗原提示細胞又はCD28と反応する抗体と組み合わせられて）反応する抗体、又は、抗原や抗原提示細胞がある。

【0030】

好ましくは、本発明の調節性作用薬を、長期又は長い治療期間ではなく、短期の治療期間にわたって用いるとよい。ここで用いられる言語「短期の治療」には、治療しようとする疾病の経過に対して、比較的短期の治療計画が包含される。例えば、短期の治療は、約1週間から約8週間の間、続くかも知れない。対照的に、「中期の治療」には、短期の治療よりも長い期間の治療計画が含まれる。例えば、中期の治療は、2ヶ月を越えて約4ヶ月まで続くかも知れない（例えば約8乃至約16週など）。「長期の治療」には、例えば約5ヶ月以上など、約4ヶ月よりも長く続く治療計画が含まれる。例えば、長期の治療は、約6ヶ月続く場合から、疾病が続く限り長く続く場合までであるであろう。ある一対体に対する、上述した治療経過のうちの一つ以上の妥当性は当業者であれば容易に判断することができる。加えて、ある対象にとって適当な治療は必要に応じて、時間と共に変わるであろう。

10

【0031】

ここで用いる用語「寛容」には、活性化性の受容体が媒介する刺激に対する不応性が包含される。このような不応性は、一般に抗原特異的であり、寛容性抗原への曝露が終わった後も続く。例えば寛容は、IL-2などのサイトカイン産生がないことを特徴とする。寛容は自己抗原や、又は外来抗原に対しても起き得る。

20

【0032】

ここで用いる場合の用語「T細胞」（即ちTリンパ球）には、胸腺細胞、未熟T細胞、成熟T細胞等を含め、哺乳動物（例えばヒト）由来のT細胞系譜のあらゆる細胞が含まれるものと、意図されている。好ましくは、T細胞は、CD4又はCD8の両者ではなくいずれかと、T細胞受容体とを発現する成熟T細胞であるとよい。ここで解説された多様なT細胞集団を、それらのサイトカイン・プロファイル及びそれらの機能に基づいて、定義することができる。

【0033】

ここで用いる用語「未刺激T細胞」は、コグネート抗原に曝露されておらず、従って活性化もしくは記憶細胞ではないT細胞を包含する。未刺激T細胞は循環しておらず、そしてヒト未刺激T細胞はCD45RA+である。未刺激T細胞が抗原を認識し、限定はしないが抗原量、投与経路及び投与のタイミングに応じて付加的なシグナルを受け取ると、これらは増殖及び分化して、エフェクタT細胞など、多様なT細胞のサブセットになることができる。

30

【0034】

ここで用いる用語「記憶T細胞」は、抗原への曝露後に、機能的に休止期になり、かつ、抗原の非存在下でも長期間、生存することのできるリンパ球を包含する。ヒト記憶T細胞はCD45RA-である。

【0035】

「本発明の分子」（例えば核酸又はポリペプチド分子）は、特定の細胞種、例えばエフェクタT細胞又は調節性T細胞で優先的に発現する（及び/又は、TEフェクタ細胞及びT調節性細胞の間のバランスを調節する上で優先的に活性である）とよい。このような分子は、この細胞種の分化につながるプロセスで必要であってもよく、そして、この細胞種の分化の前又は初期段階で発現するものでもよい。このような分子は、細胞によって分泌されても、細胞外（細胞表面上で発現）に分泌されても、あるいは細胞内で発現してもよく、分化につながるシグナル伝達経路に関与していてもよい。本発明のモジュレータ分子には、本発明の分子や、本発明の分子の発現を調節する分子（例えば薬物）が含まれる。

40

【0036】

ここで用いる用語「TEフェクタ（Teff）分子」には、エフェクタT細胞中で優先的に

50

発現する、及び/又は、優先的に活性な分子が含まれる。

【0037】

ここで用いる用語「T調節性(Treg)分子」には、調節性T細胞中で優先的に発現する、及び/又は、優先的な活性な分子が含まれる。

【0038】

ある実施態様では、低分子を検査化合物として用いることができる。用語「低分子」は、当業の用語であり、約1000分子量未満、又は、約500分子量未満、である分子を包含する。ある実施態様では、低分子はペプチド結合を排他的に含まない。別の実施態様では、低分子はオリゴマではない。活性についてスクリーニングすることのできる低分子化合物の例には、限定はしないが、ペプチド、ペプチドミメティック、核酸、糖、低有機分子(例えばポリケチド)(Cane et al. 1998. Science 282:63)、及び天然生成物抽出ライブラリ、がある。別の実施態様では、当該の化合物は、低分子の、有機非ペプチド性化合物である。更なる実施態様では、低分子は生合成によるものではない。

10

【0039】

ここで用いる用語「オリゴヌクレオチド」は、結合(例えばホストジエステル結合)又は置換結合により互いに共有結合した2つ以上のヌクレオチドを含む。

【0040】

ここで用いる用語「ペプチド」は、ペプチド結合により連結したアミノ酸の比較的短い鎖を包含する。用語「ペプチドミメティック」は、ペプチドを模倣又は拮抗することのできる非ペプチド性構造要素を含有する化合物を包含する。

20

【0041】

ここで用いる用語「レポータ遺伝子」は、RNA又はタンパク質でよい検出可能な遺伝子産物を発現する遺伝子を包含する。好適なレポータ遺伝子は、容易に検出可能なものである。当該のレポータ遺伝子は、さらに、所望の転写調節配列を含む遺伝子との融合遺伝子や、又は、他の所望の特性を示す遺伝子との融合遺伝子の形のコンストラクト中に含まれていてもよい。レポータ遺伝子の例には、限定はしないが、CAT (chloramphenicol acetyl transferase) (Alton and Vapnek (1979), Nature 282: 864-869) ルシフェラーゼ、及び他の酵素検出系、例えばベータ-ガラクトシダーゼ; ホタルルシフェラーゼ (deWet et al. (1987), Mol. Cell. Biol. 7:725-737); 細菌ルシフェラーゼ (Engebrecht and Silverman (1984), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 1: 4154-4158; Baldwin et al. (1984), Biochemistry 23: 3663-3667); アルカリホスファターゼ (Toh et al. (1989) Eur. J. Biochem. 182: 231-238, Hall et al. (1983) J. Mol. Appl. Gen. 2: 101)、ヒト胎盤分泌性アルカリホスファターゼ (Cullen and Malim (1992) Methods in Enzymol. 216:362-368) 及び緑色蛍光タンパク質 (米国特許第5,491,084号; WO 96/23898)、がある。

30

【0042】

ここで用いられる「治療」は、ある疾患もしくは異常、疾患もしくは異常の症状、あるいは、ある疾患もしくは異常に対する素因、を有する患者への、又は、前記患者由来の摘出組織又は細胞株への、前記疾患もしくは異常、疾患もしくは異常の少なくとも1つの症状、を治癒させる、治す、軽減する、緩和する、変化させる、治療する、改善させる、向上させる又は影響したり、あるいはエフェクタT細胞機能の調節性T細胞機能に対するバランスを調節することを目的とした、治療薬の適用又は投与であると、定義しておく。

40

【0043】

II . 調節性作用薬

A . 刺激剤

本発明の調節法では、細胞内のプロテインキナーゼCシータ経路の発現及び/又は活性、及び/又は、プロテインキナーゼCシータ経路成分の発現及び/又は活性を、前記細胞を刺激剤に接触させることにより、刺激する。このような刺激剤の例には、細胞内の

50

プロテインキナーゼCシータ経路成分の発現及び/又は活性を増加させるために前記細胞に導入される活性タンパク質及び核酸分子が含まれる。

【0044】

好適な刺激剤は、プロテインキナーゼCシータ経路成分のタンパク質産物をコードする核酸分子であり、この場合、前記核酸分子を、細胞内に、この細胞内でのプロテインキナーゼCシータ経路の活性化タンパク質の発現に適した形で導入する。細胞内であるタンパク質を発現させるためには、典型的には、経路成分の一ポリペプチドをコードする核酸分子をまず組換え発現ベクタ内に、ここで解説されたものなど、標準的な分子学技術を用いて導入する。ある経路成分の一ポリペプチドをコードする核酸分子は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を用い、経路成分のヌクレオチド配列に基づいたプライマを用いた増幅などにより、得ることができる。ある経路成分の一ポリペプチドをコードする核酸分子を単離又は増幅後に、このDNA断片を発現ベクタ内に導入し、標的細胞に、ここで解説した通りの標準的な方法により、トランスフェクトする。

10

【0045】

生物活性を保持したポリペプチドをコードする、ここで解説されたヌクレオチド配列のバリエーションも、本発明の包含するところである。例えば、開示された核酸分子と高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸分子。ここで用いる用語「高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、互いに実質的な相同性(例えば典型的には70%を越える)を有するヌクレオチド配列が互いに安定にハイブリダイズしたままであるようなハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を記述するものと、意図されている。高ストリンジェントな条件の好適な非限定的例は、約45の温度の6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)を含有するハイブリダイゼーション緩衝液で数時間乃至一晩、ハイブリダイゼーションした後、約50乃至65の温度の0.2×SSC、0.1% SDSを含有する洗浄緩衝液中で1回以上、洗浄する、というものである。

20

【0046】

本発明の別の局面は、融合タンパク質を作製する際の使用に適したポリペプチド断片を含め、プロテインキナーゼCシータ経路成分の生物学的に活性な部分(即ち、対生物活性断片)を特徴とする。

【0047】

ある実施態様では、プロテインキナーゼCシータ経路成分又はその対生物活性断片を、細胞又は組織源から、適した精製スキームにより、標準的なタンパク質精製技術を用いて得ることができる。別の実施態様では、経路成分イムノゲン又は対生物活性断片を組換えDNA技術により、作製する。組換え発現の代わりに、経路成分又は対生物活性断片を、標準的なペプチド合成技術を用いて化学合成することもできる。

30

【0048】

ここで用いられるポリペプチド、対生物活性断片又は融合タンパク質は、好ましくは、「単離されている」か、又は「精製されている」とよい。用語「単離された」及び「精製された」はここでは交換可能に用いられている。「単離された」又は「精製された」とは、当該のポリペプチド、対生物活性断片又は融合タンパク質が、そのポリペプチドの元の細胞又は組織由来の細胞物質又は他の混入タンパク質を実質的に含まないか、消化混合物中の不要な断片などの他のタンパク質断片を実質的に含まないか、あるいは、化学合成された場合には、化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まないことを意味する。言語「細胞物質を実質的に含まない」は、当該ポリペプチドが、それが単離された又は組換えにより作製された元の細胞の他の成分から分離されているような製剤を包含する。ある実施態様では、言語「細胞物質を実質的に含まない」は、(乾燥重量で)約30%未満の混入タンパク質、より好ましくは約20%未満の混入タンパク質、さらにより好ましくは約10%未満の混入タンパク質、さらにより好ましくは約10%未満の混入タンパク質、そして最も好ましくは約5%未満の混入タンパク質を有するポリペプチドの製剤を包含する。ポリペプチドを組換えにより作製した場合、それが培養基を実質的に含まないことも好ましく、即ち培養基がポリペプチド製剤の体積の約20%未満、より好ましくは約10%

40

50

未満、そして最も好ましくは約5%未満を占めるとよい。ポリペプチドを化学的もしくは酵素処理などにより、単離されたもしくは精製されたタンパク質から作製する場合は、当該製材は、好ましくは、酵素反応成分又は化学反応成分を実質的に含まず、また、不要な断片を含まないとよく、即ち所望のポリペプチドが、製剤の(乾燥重量で)少なくとも75%を占め、好ましくは製剤の少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、そしてさらにより好ましくは少なくとも90%、95%、99%、又はそれ以上を占めるとよい。

【0049】

言語「化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない」は、当該のポリペプチドが、当該ポリペプチドの合成に関与した化学的前駆体又は他の化学物質から分離されているようなポリペプチドの製剤を包含する。ある実施態様では、言語「化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない」は、(乾燥重量で)約30%未満の化学的前駆体又は試薬、より好ましくは約20%未満の化学的前駆体又は試薬、さらにより好ましくは約10%未満の化学的前駆体又は試薬、そして最も好ましくは約5%未満の化学的前駆体又は試薬を有する製剤を包含する。

10

【0050】

プロテインキナーゼCシータ経路成分のポリペプチドの対生物活性断片は、完全長タンパク質よりは少ないアミノ酸を含有すると共に、完全長タンパク質の少なくとも1つの生物学的活性を示すような、ある経路成分のポリペプチドのアミノ酸配列と充分同一な、又は、由来とする、アミノ酸配列を含むポリペプチドを包含する。典型的には、生物学的活性部分は、完全長タンパク質の少なくとも1つの活性を持つドメイン又はモチーフを含む。本発明のポリペプチドの生物学的活性部分は、例えば10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000又はそれ以上のアミノ酸長であるポリペプチドであってよい。さらに、当該タンパク質の他の領域が欠失しているような他の生物学的活性部分も組換え技術により作製でき、本来のタンパク質の機能的活性のうちの一つ以上について、評価することができる。変異体を検定試薬として用いることもでき、例えば、生物学的特性を減少させた、高めた又は変化させた変異体を、ここで解説された活性検定のうちの一つで同定することができる。

20

【0051】

生物活性を保持した、プロテインキナーゼCシータ経路成分のポリペプチド分子のバリエーションも、本発明の包含するところである。ある実施態様では、このようなバリエーション・ポリペプチドは、少なくとも約80%、85%、90%、95%、98%の同一性を有する。

30

【0052】

二つのアミノ酸配列(又は二つのヌクレオチド又はアミノ酸配列)間のパーセント同一性を決定するには、これら配列を最適な比較ができるようにアライメントする(例えば、最適にアライメントするには、第一及び第二のアミノ酸にギャップを導入することができる)。次に、相当するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第一の配列中のある位置に、第二の配列中の相当する位置にあるのと同じ残基が来ていれば、これら分子はその位置において同一である。二つの配列間のパーセント同一性は、導入したギャップの数、及び/又は、導入したギャップの長さを、選択的にペナルティーとして得点に科したときの、これら配列に共通の同一位置の数の関数である(即ち、%相同性 = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100)。

40

【0053】

二つの配列間の配列の比較及びパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。ある実施態様では、該アライメントは、十分な同一性を有するようないアライメントされたある特定の部分にわたっては行われるが、同一性の程度の低い部分にわたっては行われない(即ち局部的アライメント)。配列の比較のために用いられる局部的アライメント・アルゴリズムの好適な非限定的例は、カーリン及びアルチュル(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77の通りに改良したカーリン及びアルチュル

50

(1990) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 87:2264-68のアルゴリズムである。このようなアルチュルのアルゴリズムを、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 のBLASTプログラム(バージョン2.0) に導入する。ある経路成分のポリペプチドの配列又はその一部分をクエリーとして用いて、スコア = 50、ワード長 = 3として、BLASTアライメントを作製し、パーセント同一性を、BLASTタンパク質検索(例えばXBLASTプログラム)を用いて計算することができる。

【0054】

別の実施態様では、適したギャップを導入することによりアライメントを最適化し、パーセント同一性を、このアライメント後の配列の長さによって決定する(即ちギャップのあるアライメント)。比較を目的としてギャップのあるアライメントを行うには、Gapped BLASTをAltschul et

al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402が解説するとおりに利用できる。別の実施態様では、適したギャップを導入することによりアライメントを最適化し、パーセント同一性を、このアライメント後の配列の全長によって決定する

(即ち包括的アライメント)。配列の包括的な比較のために用いられる数学的アルゴリズムの好適な非限定的例は、Myers and Miller, CABIOS (1989)のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムを、GCG配列アライメント・ソフトウェア・パッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に導入する。ALIGNプログラムをアミノ酸配列の比較のために用いる場合、PAM120ウェイト残基表、12のギャップ長ペナルティ、及び4

【0055】

さらに本発明は、プロテインキナーゼCシータ経路成分のキメラ又は融合タンパク質を提供するものである。ここで用いられる「キメラタンパク質」又は「融合タンパク質」は、ある経路成分のあるポリペプチド

を、異なるポリペプチドに作動的に連結させて含む。ある融合タンパク質内に、ある経路成分のポリペプチド全体が存在していても、あるいは、当該ポリペプチドの対生物活性部分が存在していてもよい。このような融合タンパク質は、プロテインキナーゼCシータ経路成分の活性を変調するために用いることができる。

【0056】

好ましくは、本発明のキメラ又は融合タンパク質を、標準的な組換えDNA技術により作製するとよい。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片を、平滑末端又は付着末端を連結に用いたり、適した末端にする制限酵素消化、適当な場合の付着末端の充填、望ましくない接合を避けるためにアルカリホスファターゼ処理、及び酵素連結などの従来技術に従って、相互にイン-フレームで連結する。別の実施態様では、自動DNA合成装置を含む従来技術により、融合遺伝子を合成することができる。代替的には、遺伝子断片のPCR増幅を、2つの連続した遺伝子断片の間に相補な張り出し部分を生じさせるアンカー・プライマを用いて行った後、これらの張り出し部分をアニールし、再増幅することで、キメラ遺伝子配列を作製することもできる(例えばCurrent Protocols in Molecular Biology,

eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照されたい)。さらに、融合部分を既にコードしている数多くの発現ベクタが市販されている。ある経路成分のポリペプチドをコードする核酸分子を、このような発現ベクタ内に、このような融合部分がある経路成分のポリペプチドにイン-フレームで連結しているように、クローニングすることができる。

【0057】

プロテインキナーゼCシータ経路成分タンパク質の活性を刺激するために用いることのできる他の刺激剤は、細胞内のある経路成分の発現又は活性を刺激する化合物であり、例えば、ある経路成分のタンパク質産物を直接、刺激する化合物や、ある経路成分のタンパク質産物と、基質又は標的DNA結合部位との間の相互作用を促進する化合物である。この

ような化合物は、以下に詳述するように、このような化合物を選抜するスクリーニング検定を用いて、同定することができる。

【0058】

B. 阻害剤

本発明の阻害剤には、例えば、あるPKC 経路成分の発現又は活性を阻害するよう作用する細胞内結合分子であってよい。細胞内で発現する分子については、細胞内結合分子は、発現及び/又は活性を調節するために用いることができる。ここで用いる用語「細胞内結合分子」には、当該タンパク質自体に結合したり、当該タンパク質をコードする核酸（例えばmRNA分子）に結合したり、あるいは、当該タンパク質が通常相互作用する相手である標的に（例えば、マーカが結合する先のDNA標的配列に）結合することで、このタンパク質の発現又は活性を阻害するよう細胞内で作用する分子を包含するものと、意図されている。以下にさらに詳述される、細胞内結合分子の例には、アンチセンス・マーカ核酸分子（例えばmRNAの翻訳を阻害するため）、細胞内抗体（例えばタンパク質の活性を阻害するため）、及び、当該の経路成分タンパク質のドミナント・ネガティブ変異体、がある。細胞表面上に分泌又は発現する分子の場合、細胞内結合分子（例えばアンチセンス核酸分子、又は、RNAiを媒介する分子）による阻害に加えて、このような分子の活性を、例えばリガンドと、抗体などのその受容体との間の結合を破壊するなど、細胞外で作用する作用薬を用いて阻害することができる。

【0059】

ある実施態様では、本発明の阻害剤は、プロテインキナーゼCシータ経路成分をコードする遺伝子もしくは前記遺伝子の一部に対して相補的なアンチセンス核酸分子、あるいは、前記アンチセンス核酸分子をコードする発現ベクタ、である。

細胞内である特定のタンパク質の発現を下方調節するためのアンチセンス核酸の使用は当業で公知である（例えば Weintraub, H. et al., Antisense RNA as a molecular tool for

genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986; Askari, F.K. and McDonnell, W.M. (1996) N. Eng. J. Med. 334:316-318; Bennett, M.R. and Schwartz, S.M. (1995) Circulation 92:1981-1993; Mercola, D. and Cohen, J.S. (1995) Cancer Gene Ther. 2:47-59; Rossi, J.J. (1995) Br.

Med. Bull. 51:217-225; Wagner, R.W. (1994) Nature 372:333-335を参照されたい)。アンチセンス核酸分子は、別の核酸分子のコーディング鎖に対して相補的なヌクレオチド配列（例えばmRNA配列）を含み、従って、他方の核酸分子のコーディング鎖に水素結合することができる。あるmRNAの配列に対して相補的なアンチセンス配列は、当該mRNAのコーディング領域中、当該mRNAの5'側もしくは3'側非翻訳領域中、又は、コーディング領域と非翻訳領域との間の橋渡しをしている領域中（例えば、5'側非翻訳領域とコーディング領域との間の接合部）、に見られる一配列に相補的であってよい。さらに、アンチセンス核酸は、例えば転写開始配列又は調節因子など、当該mRNAをコードする遺伝子のうちの一調節領域に対して配列上、相補的であってよい。好ましくは、アンチセンス核酸は、コーディング鎖上の開始コドン、又は、mRNAの3'側非翻訳領域、の前、又はこれに延びる領域に対して相補的であるようにデザインされているとよい。細胞内でタンパク質発現を阻害するためのアンチセンス核酸分子は、ワトソン及びクリックの塩基対の規則に従って構築されたタンパク質をコードするヌクレオチド配列に基づいて、デザインすることができる。

【0060】

アンチセンス核酸分子は、様々な形で存在し得る。例えば、当該のアンチセンス核酸は、ある遺伝子の一部に対してのみ、相補的なオリゴヌクレオチドであってよい。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、当業で公知の化学合成法を用いて構築することができる。アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、天然型ヌクレオチドを用いても、あるいは、当該分子の生物学的安定性を高めるように、又は、アンチセンス及びセンス核酸の間で形成される二重鎖の物理的安定性を高めるように、デザインされた様々な修飾されたヌクレオチドを用いても、化学合成することができ、例えばホスホロチオエート誘導体及びアクリ

ジン置換ヌクレオチドを用いることができる。培養細胞での発現を阻害するためには、1つ以上のアンチセンス・オリゴヌクレオチドを、典型的には約200 μ gのオリゴヌクレオチド/mlなどで、培養基中の細胞に添加することができる。

【0061】

代替的には、アンチセンス核酸分子を、核酸がアンチセンス方向で中にサブクローニングしてある発現ベクタを用いて生物学的に作製することができる（即ち、挿入された核酸から転写される核酸は、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向になる）。アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動的に連結した調節配列としては、目的細胞内で当該アンチセンスRNA分子の発現を命令するものを選ぶことができ、アンチセンスRNAの構成的、組織特異的又は誘導性発現を命令するようなプロモータ及び/又はエンハンサ又は他の調節配列を選ぶことができる。例えば、アンチセンスRNAの誘導性発現には、Tet系（

例えばGossen, M. and Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) Science 268:1766-1769; PCT 公報No. WO

94/29442; 及びPCT公報 No. WO 96/01313に解説されているように)などの誘導性真核性調節系を用いることができる。当該のアンチセンス発現ベクタは、組換え発現ベクタに関して以下に解説されているように調製されるが、例外としてcDNA(又はその部分)は、アンチセンス方向でベクタ内にクローニングされる。当該のアンチセンス発現ベクタは、例えば組換えプラスミド、ファージミド又は弱毒化ウィルスなどの形であってよい。当該のアンチセンス発現ベクタは、組換え発現ベクタに関してここで解説するように、標準的なトランスフェクション技術を用いて細胞内に導入される。

【0062】

別の実施態様では、RNAiを媒介する化合物を用いてプロテインキナーゼCシータ経路成分を阻害することができる。RNA干渉は、二本鎖RNA(dsRNA)を用いて、このdsRNAと同じ配列を含有するメッセンジャRNA(mRNA)を破壊する、転写後の標的決定された遺伝子サイレンシング技術である(Sharp, P.A. and Zamore, P.D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D., et

al. Cell 101, 25-33 (2000).

Tuschl, T. et al. Genes Dev. 13, 3191-3197 (1999))。このプロセスは、内因性のリボヌクレアーゼが、長いdsRNA配列を、小型干渉RNA又はsiRNAと呼ばれる、より短い21乃至22ヌクレオチド長のRNAに切断するとき起きる。その後、この小型のRNAセグメントは、標的mRNAの分解を媒介する。RNAiの合成のためのキットが、例えばニューイングランド・バイオラプズ社及びアンピオン社から市販されている。ある実施態様では、アンチセンスRNAに関して上述した化学法の1つ以上を用いることができる。

【0063】

別の実施態様では、阻害剤として用いられるアンチセンス核酸はリボ酵素である。リボ酵素は、それらが相補的な領域を有する相手のmRNAなどの一本鎖核酸を切断することのできるリボヌクレアーゼ活性を持つ触媒性RNA分子である。(リボ酵素のレビューについては、例えばOhkawa, J. et al. (1995) J. Biochem. 118:251-258;

Sigurdsson, S.T. and Eckstein, F. (1995) Trends Biotechnol. 13:286-289;

Rossi, J.J. (1995) Trends Biotechnol. 13:301-306; Kiehntopf, M. et

al. (1995) J. Mol. Med. 73:65-71を参照されたい)。ある経路成分のmRNAに対して特異性を有するリボ酵素は、プロテインキナーゼCシータ経路成分 cDNA配列のヌクレオチド配列に基づいてデザインすることができる。例えば、活性部位の塩基配列が、ある経路成分のmRNA中で切断しようとする塩基配列に対して相補的になっているようなテトラヒメナル-19 IVS RNA の誘導体を構築することができる。例えば両者ともCechらの米国特許第4,987,071号及び第5,116,742号を参照されたい。代替的には、経路成分 mRNAを用いて、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを、RNA分子のプールから選抜することができる。例えばBartel, D. and Szostak,

J.W. (1993) Science 261: 1411-1418を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0064】

プロテインキナーゼCシータ経路成分、又は、プロテインキナーゼCシータ経路成分の一部又は断片、のポリペプチド分子をイムノゲンとして用いることで、ポリクローナル及びモノクローナル抗体調製のための標準的技術を用いて、経路成分に結合したり、又は、経路成分結合を遮断する抗体を作製することもできる。

【0065】

抗体を作製するためには、完全長ポリペプチドを用いることもできるが、あるいは代替的に本発明は、イムノゲンとして用いるための抗原性ペプチド断片を提供するものである。好ましくは、当該ペプチドに対して生じた抗体が、ある経路成分のポリペプチドと特異的に免疫複合体を形成するように、抗原性断片は、あるプロテインキナーゼCシータ経路成分のあるポリペプチドのアミノ酸配列のうちで少なくとも8個のアミノ酸残基を含み、そして当該ポリペプチドのエピトープを包含するとよい。好ましくは、該抗原性ペプチドが、少なくとも10個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも15個のアミノ酸残基、さらにより好ましくは、少なくとも20個のアミノ酸残基、そして最も好ましくは少なくとも30個のアミノ酸残基を含むとよい。該抗原性ペプチドに包含される好適なエピトープは、親水性領域など、当該タンパク質の表面上に位置するポリペプチド領域である。このような領域は、当業で公知の方法を用いて容易に特定することができる。

【0066】

イムノゲンは、典型的には、適した対象（例えばウサギ、ヤギ、マウス又は他の哺乳動物）をイムノゲンで免疫することにより、抗体を調製するために用いられる。適した免疫原性製剤には、例えば、組換え発現させたポリペプチド又は化学合成したポリペプチドなどを含めることができる。当該の製剤には、さらに、フロイント完全もしくは不完全アジュバントなどのアジュバント、又は、同様の免疫刺激剤を含めることもできる。免疫原性製剤で適した対象を免疫すると、それぞれポリクローナル抗体応答が誘導される。

【0067】

ある実施態様では、本発明の阻害化合物は抗体又は修飾された抗体分子である。用語「抗体」はここで用いられる場合、免疫グロブリン分子、及び、免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、即ち、抗原と特異的に結合（免疫反応）する抗原結合部位を含有する分子、を言う。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例には、ペプシンなどの酵素で抗体を処理すると作製することのできるF(ab)及びF(ab')₂断片や、抗体分子からクローニングすることができると共に、ミニボディ又はジアボディなどの修飾された抗原結合分子を作製するために用いることもできるVH及びVLドメインがある。

【0068】

本発明はポリクローナル及びモノクローナル抗体を提供するものである。用語「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」は、ここで用いられる場合、ある抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位を一種のみ、含有する抗体分子の集団を言う。モノクローナル抗体組成物は、このように、典型的には、それが免疫反応する相手である特定の抗原又はポリペプチドに対して単一の結合親和性を示す。

【0069】

ポリクローナル抗体は、適した対象をイムノゲンで免疫することにより、上述したように調製することができる。免疫後の対象の抗体価は、固定した抗原を用いた酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）など、標準的な技術により、経時的に観察することができる。必要に応じ、抗体分子を哺乳動物から（例えば血液から）単離し、IgG画分を得るためのプロテインAクロマトグラフィなど、公知の技術により更に精製することができる。免疫から適当な時間後、例えば抗体価が最高になったとき、に、抗体産生細胞を対象から得、例えばケーラー及びミルスタインが最初に解説したハイブリドーマ技術（1975）Nature 256:495-497）（Brown et al. (1981) J.

Immunol. 127:539-46; Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yeh et al. (1976) PNAS 76:2927-31; and Yeh et al. (1982) Int. J. Cancer

10

20

30

40

50

29:269-75も参照されたい)、より最近のヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al. (1983)

Immunol Today 4:72)、EBV-ハイブリドーマ技術 (Cole et al. (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) 又はトリオーマ技術など、標準的な技術によりモノクローナル抗体を調製するために用いることができる。モノクローナル抗体ハイブリドーマを作製する技術は公知である (概略的にはR. H. Kennet h, in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54:387-402; M. L. Gefter et al. (1977) Somatic Cell Genet. 3:231-36を参照されたい)。

簡単に説明すると、不死細胞株 (典型的には骨髓腫) を、上述したようにイムノゲンで免疫した動物由来のリンパ球 (典型的は脾細胞) に融合させ、その結果できたハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングして、当該抗原に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを特定する。

【0070】

リンパ球及び不死化細胞株を融合させるために用いられる数多くある公知のプロトコルのいずれも、モノクローナル抗体を作製する目的で応用することができる (例えばG. Gal fre et al. (1977) Nature 266:55052; 上に引用したGefter et al. Somatic Cell Genet.; 上に引用した Lerner, Yale

J. Biol. Med.; 上に引用したKenneth, Monoclonal

Antibodiesを参照されたい)。さらに、当業者であれば、有用であるこのような方法の数多くの変更例があることを認識されよう。典型手には、不死細胞株 (例えば骨髓腫細胞株) は、リンパ球と同じ哺乳動物種を由来とする。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性製剤で免疫したマウス由来のリンパ球を、不死化させたマウス細胞株と融合させることにより、作製することができる。

好適な不死細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含有する培養基 (「培養媒質」) に対して感受性あるマウス骨髓腫細胞株である。P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653 又は Sp2/0-Ag14 骨髓腫株など、数多くの骨髓腫細胞株のいずれも、標準的な技術に従って融合相手として用いることができる。これらの骨髓腫株はATCCから入手可能である。典型的には、HAT感受性マウス骨髓腫細胞をマウス脾細胞にポリエチレングリコール (「PEG」) を用いて融合させる。次にこの融合で出来たハイブリドーマ細胞を、未融合の骨髓腫細胞及び非生産的に融合した骨髓腫細胞 (未融合の脾細胞は形質転換していないために数日後に死滅する) を致死させるHAT培地を用いて選抜する。プロテインキナーゼCシータ経路のモノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマ細胞を、例えば標準的なELISA検定法を用いるなどして、当該抗原に結合する抗体について、ハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることにより、検出する。

【0071】

モノクローナル抗体分泌性ハイブリドーマを調製する代わりに、組換えコンビナトリアル免疫グロブリン・ライブラリ (例えば抗体ファージ・ディスプレイ・ライブラリ) を抗原でスクリーニングして、この抗原に結合する免疫グロブリン・ライブラリ・メンバを単離することでも、モノクローナル抗体を同定及び単離することができる。ファージ・ディスプレイ・ライブラリを作製し、スクリーニングするためのキットは市販されている (例えばファルマシア・リコンビナント・ファージ抗体系、カタログ番号27-9400-01; 及びストラタジーンSurfZAPTM ファージ・ディスプレイ・キット、カタログ番号240612)。加えて、抗体ディスプレイ・ライブラリを作製し、スクリーニングする上での使用に特に適した方法及び試薬の例は、例えば Ladner et al. 米国特許第5,223,409号; Kang et al. PCT 国際公報 No. WO 92/18619; Dower et al. PCT国際公報 No. WO 91/17271; Winter et al. PCT 国際公報 WO 92/20791; Markland et al. PCT 国際公報 No. WO 92/15679; Breitling et

al. PCT 国際公報 WO 93/01288;

McCafferty et al. PCT 国際公報No. WO 92/01047; Garrard et al. PCT 国際公報No. WO 92/09690; Ladner et al. PCT 国際公報No. WO 90/02809; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Clarkson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc. Acid Res. 19:4133-4137; Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982; 及び McCafferty et al. Nature (1990) 348:552-554に見ることができる。

10

【 0 0 7 2 】

細胞内のプロテインキナーゼCシータ経路の発現及び/又は活性を阻害するために用いることのできる別の種類の阻害剤は、プロテインキナーゼCシータ経路に特異的な細胞内抗体、好ましくは本発明の細胞内分子、である。細胞内のタンパク質機能を阻害するための細胞内抗体の使用は当業において公知である(例えばCarlson, J. R. (1988) Mol. Cell Biol. 8:2638-2646; Biocca, S. et al. (1990) EMBO J. 9:101-108; Werge, T.M. et al. (1990) FEBS Letters 274:193-198; Carlson, J.R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7427-7428; Marasco, W.A. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893; Biocca, S. et al. (1994) Bio/Technology 12:396-399; Chen, S-Y. et al. (1994) Human Gene Therapy 5:595-601; Duan, L et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5075-5079; Chen, S-Y. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5932-5936; Beerli, R.R. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:23931-23936; Beerli, R.R. et al. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 204:666-672; Mhashilkar, A.M. et al. (1995) EMBO J. 14:1542-1551; Richardson, J.H. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-3141; PCT 公報No. WO 94/02610 by Marasco et al.; 及びPCT 公報 No. WO 95/03832 by Duan et al.を参照されたい)。

20

30

【 0 0 7 3 】

細胞内抗体を用いて活性を阻害するためには、ベクタを細胞内に導入すると、抗体鎖がこの細胞の細胞区画内で機能的抗体として発現するような形の抗体鎖をコードする組換え発現ベクタを調製する。本発明の阻害法に従ってプロテインキナーゼCシータ経路の活性を阻害するためには、プロテインキナーゼCシータ経路のタンパク質産物に特異的に結合する細胞内抗体を、当該細胞の細胞質内で発現させる。細胞内抗体発現ベクタを調製するためには、目的の標的タンパク質に特異的な抗体鎖をコードする抗体軽鎖及び重鎖cDNAを、典型的には当該プロテインキナーゼCシータ経路に特異的なモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマから単離する。抗プロテインキナーゼCシータ経路モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ、又は、組換えモノクローナル抗体、は、以下に解説するように調製することができる。マーカタンパク質に特異的なモノクローナル抗体を同定したら(例えばハイブリドーマ由来モノクローナル抗体、又は、コンビナトリアル・ライブラリ由来の組換え抗体など)、このモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖をコードするDNAを標準的な分子生物学技術により、単離する。ハイブリドーマ由来抗体の場合、軽鎖及び重鎖cDNAを、例えばPCR増幅又はcDNAライブラリ・スクリーニングにより、得ることができる。ファージ・ディスプレイ・ライブラリなどを由来とする組換え抗体の場合、軽鎖及び重鎖をコードするcDNAを、当該ライブラリ・スクリーニング・プロセスで単離されたディスプレイ・パッケージ(例えばファージ)から回収することができる。PCRプライマ又はcDNAライブラリ・プローブを調製することのできる元となる抗体軽鎖及び重鎖遺伝子の

40

50

ヌクレオチド配列は当業で公知である。例えば、数多くのこのような配列がKabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 及び「Vbase」ヒト生殖細胞系配列データベースに開示されている。

【0074】

得られた抗体軽鎖及び重鎖配列を組換え発現ベクタ内に標準的な方法を用い手クローニングする。この軽鎖及び重鎖の細胞質内発現を可能にするため、軽鎖及び重鎖の疎水性リニドをコードするヌクレオチド配列を取り除く。細胞内抗体発現ベクタには、いくつか様々な形の1つで細胞内抗体をコードさせることができる。例えば、ある実施態様では、完全長抗体が細胞内で発現するように、当該ベクタは完全長抗体軽鎖及び重鎖をコードする。別の実施態様では、当該ベクタは、完全長軽鎖はコードしているが、Fab断片が細胞内で発現するように、重鎖はVH/CH1領域しかコードしていない。最も好適な実施態様では、当該のベクタは一本鎖抗体 (scFv) をコードしているが、この場合、軽鎖及び重鎖の可変領域は、可撓性のペプチド・リンカ (例えば (Gly4Ser)₃) により連結されており、胃一本鎖抗体として発現する。細胞内のプロテインキナーゼCシータ経路の活性を阻害するためには、細胞内抗体をコードする発現ベクタを、ここで解説するように、標準的なトランスフェクション法により、細胞内に導入する。

10

【0075】

本発明の阻害剤のさらに別の形は、例えばドミナント・ネガティブ阻害剤など、プロテインキナーゼCシータ経路のポリペプチドの阻害形である。例えば、ある実施態様では、活性部位 (例えば酵素活性部位又はDNA結合ドメイン) を変異させることができる。このようなドミナント・ネガティブタンパク質は、標準的なトランスフェクション法により細胞内に導入される、当該タンパク質をコードする組換え発現ベクタを用いて、細胞内で発現させることができる。

20

【0076】

マーカタンパク質の活性を阻害するために使用できる他の阻害剤は、マーカ活性を直接、阻害する、あるいは、マーカと、標的DNA又は別のタンパク質との間の相互作用を阻害する、化合物である。このような化合物は、以下に詳述するように、このような化合物を選抜するスクリーニング検定法を用いて、同定することができる。

30

【0077】

III. スクリーニング検定法

本発明は、調節性T細胞に対し、エフェクタT細胞中で、プロテインキナーゼCシータ経路成分に対して調節効果を有するモジュレータ、即ち候補又は検査化合物又は作用薬 (例えばペプチド、ペプチドミメティック、低分子又は他の薬物)、を同定する方法 (ここでは「スクリーニング検定法」とも呼ばれる) を提供するものである。

【0078】

A. 無細胞検定法

ある実施態様では、本スクリーニング検定法を無細胞の形で行うことができる。例えばPKCシータや、又は、PKCシータに關与する経路中のPKCシータの上流又は下流で作用する非PKCシータポリペプチドなど、プロテインキナーゼCシータ経路成分、例えばPKCシータ、例えばCARMA1、vav 又は Bcl 10を、宿主細胞内で組換え法により発現させ、このポリペプチドを、宿主細胞培養基から、例えばイオン交換クロマトグラフィ、ゲル濾過クロマトグラフィ、限外濾過、電気泳動、及び/又は、無細胞組成物中で用いることのできるタンパク質を作製するためにプロテインキナーゼCシータ経路成分に特異的な抗体を用いたイムノアフィニティ精製法など、ポリペプチドを精製するための標準的な方法を用いて単離することができる。代替的には、ある経路成分の抽出物、又は、ある経路成分を発現する細胞、を、無細胞組成物として用いるために調製することもできる。

40

【0079】

ある実施態様では、次に当該のプロテインキナーゼCシータ経路成分を検査化合物に接

50

触させ、この検査化合物の経路成分又はその対生物活性断片への結合能を判定する。検査化合物の経路成分への結合は、例えば、検査化合物の経路成分への結合を、標識された化合物又は経路成分を複合体中で検出することで判定できるように、検査化合物又は経路成分（例えばポリペプチド又はその断片）を酵素標識又は放射性同位体標識に結び付けることにより達成することができる。例えば、検査化合物又は経路成分（例えばポリペプチド）は、

125I、35S、14C、又は3H、で、直接又は間接的に標識することができ、該放射性同位体を、電波放出を直接計数したり、あるいはシンチレーション計数により、検出することができる。代替的には、検査化合物又は経路成分（例えばポリペプチド）を、例えば西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、又はルシフェラーゼで酵素標識し、この酵素標識を、適した基質の生成物への転化を判定することにより、検出することができる。

10

【0080】

検査化合物のプロテインキナーゼCシータ経路成分への結合は、リアルタイム・バイオモラキュラー・インターアクション・アナリシス（BIA）などの技術を用いても達成することができる。Sjolander, S. and Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem.

63:2338-2345 and Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol.

5:699-705。ここで用いられる「BIA」は、相互作用物質のいずれも標識することなく、生物特異的な相互作用をリアルタイムで研究する技術である（例えばBIAcoreTM）。表面プラズモン共鳴（SPR）の光学的現象の変化を、生物分子間のリアルタイム反応の指標として用いることができる。ある好適な実施態様では、当該の検定は、ポリペプチド経路成分又はその生物学的に活性な部分を、経路成分の標的分子に接触させて検定混合物を形成するステップと、該検定混合物を検査化合物に接触させるステップと、検査化合物のポリペプチド経路成分との相互作用能を判定するステップとを含み、但し、検査化合物の経路成分との相互作用能を判定する該ステップは、検査化合物が、コントロール分子に比較して経路成分又はその対生物活性部分に優先的に結合する能力を判定するステップを含む。別の実施態様では、当該の検定は、ポリペプチド経路成分又はその生物学的に活性な部分を経路成分の標的分子に接触させて検定混合物を形成するステップと、該検定混合物を検査化合物に接触させるステップと、検査化合物の、ポリペプチドプロテインキナーゼCシータ経路成分と当該ポリペプチドの公知のモジュレータとの間の結合の調節能を判定するステップを含む。

20

30

【0081】

別の実施態様では、例えばvav、CARMA1、及びBcl 10など、本発明の分子の結合相手が既知である場合、この結合相手をスクリーニング検定法で用いて、モジュレータ化合物を同定することができる。

【0082】

別の実施態様では、当該の検定は、ポリペプチド経路成分又はその対生物活性部分を検査化合物に接触させ、この検査化合物の、ポリペプチド経路成分又はその生物学的に活性な部分の活性の調節（例えば刺激又は阻害）能を判定するような無細胞検定である。本発明のこの実施態様は、当該経路成分が細胞内分子であり、その活性を無細胞系で測定することができる場合に特に有用である。

40

【0083】

さらに別の実施態様では、該無細胞検定は、ポリペプチドプロテインキナーゼCシータ経路成分又はその生物学的に活性な部分を、プロテインキナーゼCシータ経路成分が結合する相手（例えば既知の結合相手）である分子に接触させて検定混合物を形成するステップと、該検定混合物を検査化合物に接触させるステップと、コントロール化合物に比較したときの検査化合物の、経路成分の活性の調節能を判定するステップとを含む。標的分子の活性は、例えば、vav又はBcl 10などの適した基質のリン酸化を検出したり、標的の触媒/酵素活性を適した基質を用いて検出したり、（ルシフェラーゼなどの検出可能なマーカをコードする核酸に作動的に連結させた標的応答性調節因子を含む）レポータ遺

50

伝子の誘導を検出したり、あるいは、標的により調節される細胞応答を検出するなどにより、判定することができる。

【0084】

ある実施態様では、検査化合物の存在下におけるプロテインキナーゼCシータ経路成分の標的分子への結合量は、検査化合物の非存在下におけるプロテインキナーゼCシータ経路成分の標的分子への結合量よりも多く、この場合、該検査化合物は、プロテインキナーゼCシータ経路成分の結合を促進する化合物として同定される。別の実施態様では、検査化合物の存在下におけるプロテインキナーゼCシータ経路成分の標的分子への結合量は、検査化合物の非存在下におけるプロテインキナーゼCシータ経路成分の標的分子への結合量よりも少なく、この場合、該検査化合物は、プロテインキナーゼCシータ経路成分の結合を阻害する化合物として同定される。

10

【0085】

該検査化合物のポリペプチド プロテインキナーゼCシータ経路成分への結合は、上述したように直接でも、又は間接的にも判定することができる。

【0086】

ポリペプチド経路成分と標的分子の間の相互作用を調節する検査化合物を同定する本発明の方法においては、完全長ポリペプチド経路成分を本方法に用いてもよいが、あるいは代替的には、経路成分の数部分のみを用いてもよい。ポリペプチド経路成分と標的分子との間の相互作用の程度は、例えば、当該のポリペプチドの1つは、検出可能な物質（例えば放射性標識）で標識し、未標識のポリペプチドを単離し、未標識のポリペプチドと関連付けられた検出可能な物質を提供することにより、判定することができる。本検定は、経路成分タンパク質と標的分子との間の相互作用を刺激又は阻害する検査化合物を同定するために用いることができる。アゴニストなど、ポリペプチド経路成分と標的分子との間の相互作用を刺激する検査化合物は、ポリペプチド経路成分と標的分子との間の相互作用の程度を、検査化合物の非存在下での相互作用の程度と比較して増加させるその能力に基づいて同定される。アンタゴニストなど、ポリペプチド経路成分と標的分子との間の相互作用を阻害する検査化合物は、ポリペプチド経路成分と標的分子との間の相互作用の程度を、検査化合物の非存在下での相互作用の程度と比較して減少させるその能力に基づいて同定される。

20

【0087】

本発明の検定の2つ以上の実施態様において、プロテインキナーゼCシータ経路成分又は経路成分標的分子のいずれかを固定することが、例えば当該ポリペプチドの一方又は両方の未複合体形成型からの複合体形成型の分離を容易にしたり、あるいは、検定の自動化に適合させるために、好ましいであろう。検査化合物のポリペプチド経路成分への結合、あるいは、ポリペプチド経路成分と経路成分標的分子との相互作用を、検査化合物の存在下及び非存在下で行わせるには、反応体を容れるのに適していればいずれの容器でも可能である。このような容器の例には、微量定量プレート、試験管、及びマイクロ遠心管、がある。ある実施態様では、当該ポリペプチドのうち的一方又は両方をマトリックスに結合できるようにするドメインを加えた融合タンパク質を提供することができる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/経路成分融合タンパク質又はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的タンパク質をグルタチオン・セファロース・ビーズ（ミズーリ州セントルイス、シグマケミカル社）又はグルタチオン誘導体微量定量プレートに吸着させることができ、その後、検査化合物が、又は、検査化合物と吸着させていない標的ポリペプチドもしくはポリペプチド経路成分に配合し、この混合物を、複合体形成につながる条件下（例えば塩及びpHに関して生理条件）でインキュベートする。インキュベート後、このビーズ又は微量定量プレートのウェルを洗浄して未結合の成分を取り除き、ビーズの場合には当該マトリックスを固定し、そして複合体形成を、直接又は間接的に、例えば上述した通りに判定する。代替的には、当該複合体をマトリックスから解離させ、経路成分の結合又は活性レベルを、標準的な技術を用いて判定することができる。

30

40

【0088】

50

ポリペプチドをマトリックス上に固定する他の技術も、本発明のスクリーニング検定法で用いることができる。例えば、ポリペプチド経路成分又は経路成分標的分子を、ビオチン及びストレプトアビジンの結合を利用して固定することができる。ビオチン化ポリペプチド経路成分又は標的分子を、当業で公知の技術を用いてビオチン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) から調製し (例えばイリノイ州ロックフォード、ピアース・ケミカルズ社のビオチン化キット)、ストレプトアビジンで被覆した96ウェル・プレート (ピアース・ケミカル社) のウェルに固定することができる。代替的には、経路成分又は標的分子に対しては反応性であるが、経路成分のその標的分子への結合には干渉しないような抗体をプレートのウェルに誘導体化することができ、未結合の標識又は経路成分を抗体結合によりウェル内に捕捉する。GST固定化複合体に関して上述したものに加え、このような複合体を検出する方法には、経路成分又は標的分子と反応性の抗体を用いた、複合体の免疫検出や、ポリペプチド経路成分又は標的分子に関連する酵素活性の検出に依拠する酵素結合検定法がある。

10

【0089】

B. 細胞ベースの検定

ある実施態様では、プロテインキナーゼCシータ経路成分を天然で発現する細胞、又は、より好ましくは、当該ポリペプチドをコードする発現ベクタを細胞内に導入するなどにより発現するように操作された細胞を、本発明のスクリーニング法で用いるとよい。代替的には、ポリペプチド経路成分 (例えばプロテインキナーゼCシータ経路成分発現細胞からの細胞抽出物、又は、天然もしくは組換えのプロテインキナーゼCシータ経路成分の精製済み分子を含む組成物) を用いることができる。

20

【0090】

プロテインキナーゼCシータ経路成分 (又は、プロテインキナーゼCシータ経路成分の上流又は下流で作用する分子) の発現及び/又は活性を調節する化合物は、多様な「リード・アウト」を用いて同定することができる。経路成分の発現、及び/又は、発現プロファイル、の変化を検出する方法は当業で公知であり、その中には、例えば、示差的ディスプレイ法、ノーザン・プロット分析、定量的RT-PCR、及びウェスタン・プロット分析、がある。

【0091】

「リード・アウト」の一例は、発現ベクタでトランスフェクトし、検査化合物の存在下及び非存在下でインキュベートし、当該化合物の、経路成分の発現に及ぼす効果、又は、経路成分により調節される生物学的応答に及ぼす効果、を判定することのできる指標細胞の使用である。生物学的活性には、各プロテインキナーゼCシータ経路成分について標準的な技術に従って *in vivo* 又は *in vitro* で判定される活性がある。生物学的活性は直接的な活性でも、又は、間接的な活性でもよい。このような活性の例には、PKCシータの細胞膜への泳動、Bcl

30

10などの適した基質のリン酸化の検出、あるいはNF Bの活性化、又は、その核への転位の検出、あるいは、転写がNF Bにより調節される遺伝子の転写の検出、(例えばmRNAが測定される場合、遺伝子産物が測定される場合、あるいは、レポータ遺伝子の転写が測定される場合)、がある。

40

【0092】

ある実施態様では、例えばBcl 10のリン酸化、NF Bの活性化もしくはその核への転位、あるいはサイトカイン産生など、本発明の分子の1つの生物学的活性が調節される。別の実施態様では、例えばサイトカイン産生及びBcl 10のリン酸化など、本発明の分子の2つの生物学的活性が調節される。

【0093】

ある検査化合物の、プロテインキナーゼCシータ経路成分の標的分子への結合の調節能、又は、それ自体への結合の調節能、を判定することもできる。検査化合物の、プロテインキナーゼCシータ経路成分の標的分子 (例えば結合相手、例えば vav 又はCARMA1) への結合の調節能の判定は、標識された経路成分-標的分子の複合体を複合体中で検出する

50

ことにより検査化合物の経路成分への結合が判定されるように、経路成分の標的分子を放射性同位体、酵素又は蛍光標識に結合させることにより、上述したように達成することができる。

【0094】

別の実施態様では、経路成分に關与する経路中の上流又は下流で作用する異なる分子（即ち、経路成分ではない分子）を、スクリーニング検定法で用いる指標組成物中に含めることができる。上流又は下流の指標として用いてもよい分子の非限定的な例には、NF-カッパB及びNFATシグナル伝達経路のメンバがある。このような分子を用いたスクリーニング検定法で同定される化合物は、間接的ではあっても、本発明の分子の活性を調節する上でも有用であろう。

10

【0095】

本検定で用いられる細胞は、真核性由来でも、又は原核性由来でもよい。

【0096】

あるポリペプチド、又は、当該経路成分の上流又は下流で作用する非ポリペプチド経路成分を指標細胞内で発現させるために使用できる組換え発現ベクタは当業で公知である。ある実施態様では、この発現ベクタ内で、コーディング配列を、指標細胞内での当該ポリペプチドの誘導性又は構成的発現を可能にする調節配列に作動的に連結させる（例えばサイトメガロ・プロモータ/エンハンサなどのウィルス調節配列を用いることができる）。指標細胞内での当該ポリペプチドの誘導性又は構成的発現を可能にする組換え発現ベクタの使用は、プロテインキナーゼCシータ経路成分の活性を亢進又は阻害する化合物の同定

20

【0097】

ある実施態様では、検定は細胞ベースの検定法であり、この場合、プロテインキナーゼCシータ経路成分を発現する細胞を検査化合物に接触させ、この検査化合物の、経路成分の活性の調節能を判定する。当該の細胞は、例えば、哺乳動物由来でも、又は酵母細胞由来でもよい。本成分（例えばポリペプチド経路成分、又はその生物学的に活性な部分）は

30

、例えば、細胞にとって異種のもを発現させることも、又は天然のもを発現させることもできる。当該検査化合物の、本成分の活性の調節能の判定は、ここで解説されたように、プロテインキナーゼCシータ経路成分の活性のいずれかを検定することにより、行うことができる。

【0098】

例えば、当該検査化合物の、あるポリペプチド経路成分の活性の調節能の判定は、例えばプロテインキナーゼCシータ経路成分又はその標的分子の活性を検定することにより、行うことができる。別の実施態様では、当該検査化合物の、あるポリペプチド又はその生物学的に活性な部分の活性の調節能の判定は、標的分子又はその対生物活性部分への結合能について検定することにより、行うことができる。ある好適な実施態様では、あるポリペプチド又はその生物学的に活性な部分を発現する該細胞は、さらに標的分子又はその生物学的活性な部分を発現する。別の好適な実施態様では、当該細胞は、三種以上のプロテインキナーゼCシータ経路成分又はその生物学的に活性な部分を発現する。

40

【0099】

本発明のための細胞ベースの検定法によれば、当該検査化合物の、あるポリペプチド又はその生物学的に活性な部分の活性の調節能の判定は、あるポリペプチドの天然の活性のいずれかについて検定したり、あるいは、ここで解説するように、あるポリペプチドの活性と一致する間接的な活性、例えばサイトカイン産生や、又は、未刺激T細胞のエフェクタT細胞への分化など、を検定したり、あるいは、応答因子を有する遺伝子にコードされ

50

たタンパク質の活性を検定することにより、行うことができる。

【0100】

さらに、当該検査化合物の、あるポリペプチド又はその生物学的に活性な部分の活性の調節能の判定は、当該ポリペプチドにとって天然ではないが、そのために細胞が組換え操作されているような活性について検定することにより、行うことができる。例えば、当該細胞は、本発明のポリペプチドの調節を受ける遺伝子に作動的に連結されたレポータ・タンパク質をコードするDNAを含むレポータ遺伝子コンストラクトを発現するように、操作することができる。さらに、好適な実施態様では、本発明の細胞ベースの検定法は、経路成分活性のモジュレータとして当該化合物を同定する最終ステップを含む。

【0101】

ここで交換可能に用いられているように、用語「作動的に連結された」及び「作動的に連結された」は、当該ヌクレオチド配列が、宿主細胞内（又は細胞抽出物により）でこのヌクレオチド配列の発現が可能な態様で調節配列に連結されていることを意味するものと、意図されている。調節配列は当業で公知であり、所望のポリペプチドに適した宿主細胞内で直接発現させるように、選択することができる。調節配列という用語には、プロモータ、エンハンサ、ポリアデニレーション・シグナル、及び他の発現調節配列が含まれるものと、意図されている。このような調節配列は当業で公知であり、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に解説されている。発現ベクタのデザインは、トランスフェクトしようとする宿主細胞、及び/又は、発現させたいポリペプチドの種類及び/又は量、などの因子に応じ

10

20

【0102】

多種のレポータ遺伝子が当業で公知であり、本発明のスクリーニング検定法で用いるために適している。適したレポータ遺伝子の例には、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ又はルシフェラーゼをコードするものが含まれる。これらの遺伝子産物の活性を測定するための標準的な方法は当業で公知である。

【0103】

本発明の更に別の局面では、ポリペプチド経路成分を二種ハイブリッド検定法又は三種ハイブリッド検定法で「ベイト・タンパク質」として用いて（例えば米国特許第5,283,317号； Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232; Madura et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696; 及びBrent W094/10300を参照されたい）、PKCシータ経路成分に結合又は相互作用すると共に、当該経路成分の活性に関与する他のタンパク質を同定することができる。このような経路成分-標的分子も、一ポリペプチド経路成分により調節される細胞活性の調節に関与している可能性が高い。

30

【0104】

少なくとも1例の二種ハイブリッド系は、分離可能なDNA結合ドメイン及び活性化ドメインから成る、大半の転写因子のモジュール性に基づく。簡単に説明すると、本検定は、2つの異なるDNAコンストラクトを利用する。1つのコンストラクトでは、あるポリペプチド経路成分をコードする遺伝子を、公知の転写因子（例えばGAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合させる。他方のコンストラクトでは、未同定のタンパク質（「プレイ」又は「試料」）をコードする、DNA配列のライブラリ由来のDNA配列を、公知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合させる。該「ベイト」及び「プレイ」タンパク質がin vivoで相互作用して経路成分依存的複合体を形成することができれば、該転写因子の該DNA結合ドメイン及び活性化ドメインは近くに来ている。この近さにより、該転写因子に対して応答性の転写調節部位に作動的に連結されたレポータ遺伝子（例えばLacZ）の転写が可能である。このレポータ遺伝子の発現を検出し、機能的転写因子を含有する細胞コロニを単離し、ポリペプチド経路成分と相互作用するタンパク質をコード

40

50

するクローニングされた遺伝子を得ることができる。

【0105】

当業でCytoTrapTMシステムと呼ばれる、別の二種ハイブリッド系の例は、Rasシグナル伝達カスケードの分子のモジュール性に基づくものである。簡単に説明すると、該検定法は、「ベイト」タンパク質及びSon-of-Sevenless (SOS)及び未同定のタンパク質(「プレイ」タンパク質)のcDNAを、ミリスチル化標的タンパク質をコードするベクタ内に含む融合タンパク質を特徴とする。適したベイト-プレイの組合せが発現すると、SOSが細胞膜に転位して、そこでRasを活性化させる。Rasシグナリング経路を細胞質で再構築されると、PKCシータ経路成分タンパク質など、目的のベイトタンパク質と相互作用するタンパク質の同定が可能である。

10

更なる哺乳動物二種ハイブリッド系も当業で公知であり、経路成分と相互作用するタンパク質を同定するために利用することができる。

【0106】

別の局面では、本発明は、ここで解説された2つ以上の検定法の組合せに関する。例えば、調節性作用薬を細胞ベースの検定法又は無細胞検定法を用いて同定することができ、この作用薬の、経路成分タンパク質の活性及び/又は発現の調節能を、当業で公知の技術や、又は、ここで解説する通りに、細胞培養などのin vitro系や、あるいは、炎症の動物モデルなどの動物などin vivoで、確認することができる。

【0107】

本発明のスクリーニング検定法ある実施態様においては、ある検査化合物がPKCシータ経路成分を調節すると明らかになったら、この検査化合物の効果を、T調節性細胞機能に対するエフェクタT細胞機能の調節能について検定し、例えばin vitro(例えば細胞株又は対象由来の細胞を用いて)又はin vivo(例えば動物モデルを用いて)のいずれかで、免疫細胞における効果の測定に基づいて、エフェクタT細胞モジュレータとして確認することができる。従って、本発明のスクリーニング法には、さらに、少なくとも1つのTエフェクタ細胞活性及び/又は少なくとも1つのT調節性活性に対する当該化合物の効果を判定し、それにより、ある化合物が所望の効果を有することを確認するステップを含めることができる。

20

【0108】

ある実施態様では、化合物を、例えばTEフェクタ細胞による増殖又はサイトカイン産生又は細胞傷害性など、TEフェクタ細胞に関連する活性の調節能についてさらに検定する。更なる実施態様では、化合物の能力を、さらに、調節性T細胞による増殖又はサイトカイン産生など、T調節性細胞に関連する活性の調節能、TEフェクタ細胞の下方調節能又は寛容の誘導能について、検定する。例えば、ある検査化合物の寛容調節能の判定は、二次T細胞応答を検定することにより、行うことができる。T細胞がIL-2合成及び/又はT細胞増殖で判断される、後続の活性化の試みに無応答であれば、寛容状態が誘導されたことになり、例えばT調節性細胞が活性化したことになる。反対に、IL-2合成が刺激され、T細胞が増殖すれば、TEフェクタ細胞が活性化したことになる。本発明に基づく検定での基礎として用いることのできる検定系などについては、例えばGimmi, C.D. et al.

30

(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90,

40

6586-6590; 及びSchwartz (1990) Science,

248, 1349-1356を参照されたい。T細胞増殖は、例えば[3H]チミジン取り込みや、MAPキナーゼ・カスケードのメンバのタンパク質レベルを測定する方法や、又は、AP-1複合体の活性化でも、測定することができる。サイトカイン・レベルは、限定はしないがカリフォルニア州ラ・ホーヤのストラータジーン社を含め、免疫検定用に市販されているキットのいかなる数によっても、検定することができる。寛容化したT細胞は、刺激を受けたT細胞に比べて減少したIL-2産生を有するであろう。寛容化T細胞の減衰した活性を測定する方法には、限定はしないが、細胞内カルシウム移動を測定する、MAPキナーゼ・カスケードのメンバ、NFATカスケードのメンバ、のタンパク質レベルを測定する、及び/又は、そのT細胞受容体との結合時のT細胞中の転写因子のAP-1複合体の活性を測定する、方法

50

がある。

【0109】

別の実施態様では、T調節性及び/又はTエフェクタ細胞の集団の増殖の検定は、ここで解説された技術又は当業で公知の技術を用いて、一方又は他方の集団に関連するマーカーを発現している細胞を検出することによる。

【0110】

代替的には、ここで解説されたとおりに同定されたプロテインキナーゼCシータ経路成分のモジュレータを動物モデルで用いて、このようなモジュレータの作用機序を判定することができる。例えば、作用薬を、ヒト疾患の公知の動物モデル（例えば多発性硬化症のモデルとしてのEAE、及び、糖尿病のモデルとしてのNODマウスなど）や、又は、ヒト自己免疫疾患のよく特徴付けられた他の動物モデルで、検査することができる。このような動物モデルには、全身性エリテマトーデスのモデルであるmrl/lpr/lprマウス、リウマチ性関節炎のモデルであるマウスコラーゲン誘導性関節炎、及びマウス実験的重症筋無力症（Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-856を参照されたい）、がある。本発明の調節性（即ち刺激性もしくは阻害性）作用薬を検査動物に投与することができ、その後、この検査動物での疾患の経過を、用いる特定のモデルにとって標準的な方法を用いて観察することができる。調節性作用薬の有効性は、未治療の動物（又はコントロール作用薬で治療した動物）に比較したときの、当該作用薬で治療した動物における疾患状態の改善が証左となる。

10

【0111】

このような化合物を細胞に接触させる前に、これらを（上に解説した）医薬組成物として調合することが好ましいだろうと理解されよう。

20

【0112】

ある局面では、ここに解説したような細胞ベースの系を用いて、例えばエフェクタT細胞機能をT調節性細胞機能に対して調節するように作用するであろう作用薬を同定できよう。例えば、このような細胞系を、エフェクタT細胞機能をT調節性細胞機能に対して調節する能力を示すと思われる作用薬に、曝露された細胞で応答を惹起するために十分な濃度、及び十分な時間、曝露してもよい。曝露後、細胞を調べて、一つ以上の応答が変化したかを判定する。

【0113】

加えて、ある実施態様では、化合物の、エフェクタT細胞マーカー及び/又はエフェクタT細胞マーカーの調節能を測定することができる。

30

【0114】

加えて、ここで解説したものなど、動物ベースの疾患系を、例えばエフェクタT細胞機能をT調節性細胞機能に対して調節することの出来る作用薬を同定するなどのために用いてよい。このような動物モデルを、エフェクタT細胞機能をT調節性細胞機能に対して調節する上で有効であろう薬物、医薬、治療法及び介入の特定のための検査基体として用いてよい。加えて、ここで解説された通りに同定された作用薬（例えば本発明の分子の調節性作用薬）を動物モデルで用いて、このような作用薬を用いた治療の効験、毒性、又は副作用を判定することもできる。代替的には、ここで解説された通りに同定された作用薬を動物モデルで用いて、このような作用薬の作用機序を判定することができる。

40

【0115】

加えて、遺伝子発現パターンを用いて、ある作用薬の、エフェクタT細胞機能をT調節性細胞機能に対して調節する能力を評価することもできよう。例えば、一つ以上の遺伝子の発現パターンが、「発現プロファイル」又は「転写プロファイル」の一部を成していることがあり、この場合、これらプロファイルをこのような評価で用いてもよい。「遺伝子発現プロファイル」又は「転写プロファイル」は、ここで用いる場合、特定の組合せの条件下で特定の組織又は細胞種で得られるmRNA発現パターンを包含する。遺伝子発現プロファイルは、例えば、示差的ディスプレイ法、ノーザン分析及び/又はRT-PCRを用いるなどにより、作製できよう。

50

【0116】

ある実施態様では、本発明の分子の配列を、このような遺伝子発現プロファイルの作製及び確認のためのプローブ及び/又はPCRプライマとして用いてよい。

【0117】

遺伝子発現プロファイルは、細胞もしくは動物ベースのモデル系内の既知の状態に関して特徴付けられよう。次に、検査作用薬が有する、このような遺伝子発現プロファイルを修飾する効果を確認したり、そして、このプロファイルを、より好ましいプロファイルのそれにより似たものにするために、これらの既知の遺伝子発現プロファイルを比較してもよいだろう。

【0118】

更に、本発明は、ここで解説した通りの治療に関する上述のスクリーニング検定法により同定された新規な作用薬の使用に関する。

【0119】

IV. 検査化合物

本発明の検査化合物又は作用薬は、生物学的ライブラリ；空間指定可能なパラレル固相又は液相ライブラリ；逆重畳積分を要する合成ライブラリ法；「ワン-ピース・ワン-コンパウンド」ライブラリ法；及びアフィニティ・クロマトグラフィ選抜法を用いた合成ライブラリ法、を含め、当業で公知のコンビナトリアル・ライブラリ法における数多くのアプローチのいずれかを用いて得ることができる。生物学的・ライブラリ・アプローチはペプチド・ライブラリに限られているが、他の4つのアプローチは、化合物のペプチド、非ペ

10

20

【0120】

分子ライブラリの合成の方法の例は、例えば DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6909; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91:11422; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37:2678; Cho et al. (1993) Science 261:1303; Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carrell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061; and in Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37:1233でなど、当業に見ることができる。

30

【0121】

化合物のライブラリは、溶液中（例えば Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421）、又はビーズ上（Lam (1991) Nature 354:82-84）、チップ上（Fodor (1993) Nature 364:555-556）、細菌（Ladner USP 5,223,409）、胞子（Ladner USP '409）、プラスミド（Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:1865-1869）又はファージ上（Scott and Smith (1990) Science 249:386-390）；（Devlin (1990) Science 249:404-406）；（Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87:6378-6382）；（Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310）；（Ladner supra.）に提示させることができる。ある好適な実施態様では、本ライブラリは天然生成物ライブラリである。

40

【0122】

活性に関してスクリーニングすることのできる化合物の非限定的な例には、限定はしないが、ペプチド、核酸、糖、低有機分子、及び天然生成物抽出物ライブラリ、がある。

【0123】

候補/検査化合物又は作用薬には、例えば、1) ペプチド、例えば Igを尾に持つ融合ペプチド及びランダム・ペプチド・ライブラリ（例えば、Lam, K.S. et al. (1991) Nature 354:82-84; Houghten, R. et al. (1991) Nature 354:84-86を参照されたい）並びにD型及び/又はL型立体配置アミノ酸から作製されたコンビナトリアル化学由来分子ラ

50

イブラリを含む可溶性ペプチド； 2) ホスホペプチド

(例えばランダム及び部分的に縮重した、配向したホスホペプチド・ライブラリのメンバ、例えば Songyang,

Z. et al. (1993) Cell

72:767-778を参照されたい)； 3) 抗体 (例えばポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、抗イデオタイプ、キメラ、及び一本鎖抗体や、抗体の Fab、F(ab')₂、Fab発現ライブラリ断片、及びエピトープ結合断片)； 4) 低有機及び無機分子 (例えば、コンビナトリアル及び天然生成物ライブラリから得られる分子)； 5) 酵素

(例えばエンドリボヌクレアーゼ、ヒドロラーゼ、ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、シントターゼ、イソメラーゼ、ポリメラーゼ、キナーゼ、ホスファターゼ、オキシド-レダクターゼ及び ATPases)、 6) プロテインキナーゼ C シータ経路成分の変異型、例えばプロテインキナーゼ C シータ経路成分のドミナント・ネガティブ変異型、及び 7) アンチセンス RNA分子、又は、RNAiを媒介する分子、がある。

【0124】

構造ベースの薬物をデザインする当業で公知の技術を用いても、1つ以上のプロテインキナーゼ C シータ経路成分の発現又は活性を調節する化合物を同定することができる。

【0125】

V. 診断検定法

さらに本発明は、生物学的試料 (血液、血清、細胞、組織など) の関連から、プロテインキナーゼ C シータ経路成分の発現を判定して、ある個体が疾患又は異常に罹患しているか、あるいは、このような疾患又は異常を発症するリスクがあるかを判定したり、あるいは、治療の効験及び/又は疾患の寛解を評価する観察法としての使用に向けた、診断検定法も特徴とする。さらに本発明は、ある個体に、このような異常 (例えばプロテインキナーゼ C シータ経路成分の発現又は活性に関連する異常) のリスクがあるかどうかを判定する予後 (又は予測) 検定法、あるいは、疾患又は異常の再発を防ぐ方法、を提供するものである。このような検定法は、予後又は予測目的で、ひいては、ある疾患又は異常の発症前に個体を予防的に治療するために用いることができる。プロテインキナーゼ C シータ経路成分タンパク質を検出するために好適な作用薬は、経路成分タンパク質に結合することのできる抗体、好ましくは、経路成分をコードする遺伝子を増幅するための検出可能な標識又はプライマの付いた抗体、である。用語「生物試料」は、対象から単離された組織、細胞及び生物学的流体や、対象内に存在する流体を包含するものと、意図されている。さらに本発明は、対象において特定の抗原に対する T

エフェクタ細胞と T 調節性細胞との間のバランスを評価するために、生物試料中の経路成分の発現又は活性を検出するためのキットも包含する。例えば、該キットには、生物試料中の経路成分又はその活性を検出することのできる標識済み化合物又は作用薬；生物試料中の経路成分の量を判定するための手段；及び/又は、試料中の経路成分の量を標準と比較するための手段、を含めることができる。該化合物又は作用薬を適した容器内に梱包することができる。該キットには、さらに、該キットを用いるために指示も含めることができる。

【0126】

VI. 組換え発現ベクタ

本発明の別の局面は、本発明のタンパク質試薬 (例えば融合タンパク質試薬) を作製したり、あるいは、プロテインキナーゼ C シータ経路成分を、in vitro 又は in vivo などの患者の細胞など、細胞内で発現させるための、ベクタ、好ましくは発現ベクタ、に関する。ここで用いる用語「ベクタ」とは、連結された先の別の核酸を輸送することのできる核酸分子を言う。好適なベクタは、付加的な DNA セグメントをライゲートすることのできる環状の二本鎖 DNA ループを言う「プラスミド」である。プラスミドが最も普通に用いられている形のベクタであるため、本明細書において、「プラスミド」及び「ベクタ」は交換可能に用いられている場合がある。好適なタンパク質試薬には、プロテインキナーゼ C シータ経路成分のポリペプチド又はその対生物活性断片、が含まれる。

10

20

30

40

50

【0127】

本発明の組換え発現ベクタは、本発明のポリペプチドをコードする核酸を、宿主細胞内でこの核酸が発現するために適した形で含むが、このことは、当該の組換え発現ベクタが、発現に用いようとする宿主細胞に基づいて選択されると共に、発現させようとする核酸配列に作動的に連結された一つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクタにおいて、「作動的に連結された」とは、目的のヌクレオチド配列が、このヌクレオチド配列の発現が可能な態様で（例えば in vitro 転写 / 翻訳系で、又は、ベクタを宿主細胞内に導入する場合には宿主細胞内で）調節配列に連結されていることを意味するものと、意図されている。用語「調節配列」には、プロモータ、エンハンサ及び他の発現制御配列（例えばポリアデニレーション・シグナル）が含まれるものと、意図されている。当該の発現ベクタを宿主細胞内に導入し、それにより、融合タンパク質又はペプチドを含むタンパク質を作製することができる。代替的には、レトロウイルス発現ベクタ及び / 又はアデノウイルス発現ベクタを利用して、本発明のタンパク質を発現させることができる。

10

【0128】

本発明の組換え発現ベクタを、原核もしくは真核細胞でのポリペプチドの発現用にデザインすることができる。例えば、ポリペプチドを E. coli などの細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクタを用いて）酵母細胞又は哺乳動物細胞で発現させることができる。適した宿主細胞はさらに Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) に論じられている。

20

【0129】

原核生物でのタンパク質発現は、融合もしくは非融合タンパク質の発現を命令する構成的又は誘導性プロモータを含有するベクタを持つ E. coli 内で最も頻繁に行われている。融合ベクタは、その中にコードされたタンパク質に数多くのアミノ酸を、通常は組換えタンパク質のアミノ末端に付け加える。このような融合タンパク質は、典型的に、3つの目的に役立つ：1) 組換えタンパク質の発現を増加させる；2) 組換えタンパク質の可溶性を増す；及び3) アフィニティ精製時のリガンドとして作用することにより、組換えタンパク質の精製を助ける。しばしば、融合発現ベクタにおいては、原核性のタンパク質切断部位を融合部分と組換えタンパク質部分との間の接合部に導入して、融合タンパク質の精製後に、この融合部分から組換えタンパク質を分離できるようにする。精製済みの融合タンパク質は、本発明の無細胞検定法において特に有用である。

30

【0130】

さらに別の実施態様では、プロテインキナーゼCシータ経路成分のポリペプチドをコードする核酸分子を、例えばここで解説された細胞ベースの検定で用いるなどのために、哺乳動物細胞で発現させる。哺乳動物細胞で用いる場合の発現ベクタの制御機能は、しばしば、ウイルス調節配列に提供させる。別の実施態様では、当該の組換え哺乳動物発現ベクタは、特定の細胞種で優先的に核酸の発現を命令することができる（例えば組織特異的調節配列を用いて核酸を発現させる）。

【0131】

本発明の別の局面は、組換え発現ベクタが導入された検定細胞に関する。検定細胞は原核性でも、又は真核性でもよいが、好ましくは真核性である。好適な検定細胞はT細胞、例えばヒトT細胞、である。T細胞をヒト血液から得、本発明の検定での使用前に ex vivo で増殖させることができる。ベクタDNAは、原核もしくは真核細胞に従来の形質転換又はトランスフェクション技術により導入することができる。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするために適した方法は、Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)、及び他の研究室用手順に見ることができる。

40

【0132】

50

V I I . 発明の方法

A . 使用の方法

本発明の調節法は、(例えば細胞を本作用薬と一緒に培養するか、又は、本作用薬を培養細胞に導入することにより) *in vitro*で行うことも、あるいは代替的には(例えば対象に本作用薬を投与したり、あるいは、本作用薬を対象の細胞に、例えば遺伝子治療などにより、導入することにより) *in vivo*で行うこともできる。

【0133】

ある実施態様では、対象を、TエフェクタT調節性細胞との間のバランスの調節を、PKCシータ経路成分を調節する治療の前に行うと有益であろうものとして特定する。例えば、ある実施態様では、T調節性及びTエフェクタ細胞の相対的活性を測定することができる。別の実施態様では、Tエフェクタ細胞及びT調節性細胞の相対数を計算することができる。別の実施態様では、Tエフェクタ及びT調節性細胞の存在を、移植の部位など、特定の部位で検出することができる。

10

【0134】

ある実施態様では、Tエフェクタ又はT調節性細胞の調節を行うと有益であろう対象を特定するために、対象の細胞を、経路成分のうちの一つ以上の活性及び/又は発現について、(ここで解説された通りに同定された)経路成分のモジュレータによる治療の前に、検定する。

【0135】

別の実施態様では、対象を、従来の免疫調節性試薬による治療後に観察して、この患者にとって、Tエフェクタ及びT調節性細胞間のバランスの調節を行うと有益であろうかどうかを判断することができる。

20

【0136】

別の実施態様では、抗原への曝露前、又は、抗原への曝露と同時に、経路成分のモジュレータを *in vivo* 又は *in vitro* で対象に投与する。ある実施態様では、本治療法は、V I I I 因子治療など、反復投与のための治療的タンパク質である。

【0137】

*in vitro*で調節法を実施するためには、細胞を標準的な方法で対象から得、この細胞内での経路成分の活性を調節するために、*in vitro* で本発明の調節性作用薬と一緒にインキュベート(即ち培養)する。例えば、末梢血単核細胞(PBMC)を対象から得、フィッコール/ハイパックなどの密度勾配遠心分離法により、単離することができる。標準的な方法を用いて特定の細胞集団を枯渇させたり、又は濃縮することができる。例えば、特異一次モノクローナル抗体(mAb)と一緒に細胞をインキュベートした後、mAbに結合する細胞を、この一次mAbに結合する二次抗体で被覆した磁気ビーズを用いて単離するなど、T細胞表面マーカに対する抗体を用いた正の選抜法により、T細胞を濃縮することができる。特定の細胞集団は、標準的な方法に従った蛍光活性化セル・ソーティング法によっても、単離することができる。必要に応じ、本発明の調節性作用薬で *in vitro* で処理された細胞を対象に再投与することができる。対象への投与に際し、まず細胞由来の残余物質を培養物から取り除いてから、これらを対象に投与することが好ましいであろう。これは、例えば細胞のフィッコール/ハイパック勾配遠心分子法などによって、行うことができる。細胞を *ex vivo* で遺伝子改変した後、対象に再投与することに関する更なる議論については、W.F. Anderson らによる米国特許第 5,399,346号も参照されたい。

30

40

【0138】

対象において本調節法を *in vivo* で実施する場合は、本調節性作用薬を、対象に、この対象の細胞内で経路成分の活性が調節されるように、投与することができる。用語「対象」には、免疫応答を惹起することのできる生物が包含されるものと、意図されている。好適な対象は哺乳動物である。対象の例にはヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ヤギ及びヒツジがある。

【0139】

50

(マーカタンパク質、アンチセンスRNA、細胞内抗体又はドミナント・ネガティブ阻害剤をコードする組換え発現ベクターを含む)核酸を含む刺激剤又は阻害剤の場合、本作用薬を、対象の細胞内に、核酸(例えばDNA)をin vivoの細胞に導入するための当業で公知の方法を用いて、導入することができる。このような方法の例は、以下、非ウイルス法及びウイルス法の両方を包含する:

直接の注射:裸のDNAをin vivoの細胞内に、当該DNAを細胞に直接注射することにより、導入することができる(例えば Acsadi et al. (1991) Nature 332:815-818; Wolff, et al. (1990) Science 247:1465-1468を参照されたい)。例えば、DNAをin vivoの細胞に注射する送達器具(例えば「遺伝子ガン」)を用いることができる。このような器具は(例えばバイオラド社から)市販されている。

陽イオンリピド:裸のDNAをin vivoの細胞内に、このDNAを陽イオンリピドと複合体形成させたり、あるいは、このDNAを陽イオン性リポソームに封入することにより、導入することができる。適した陽イオンリピド調合物の例には、N-[-1-(2,3-ジオレオイルオキシ)プロピル]N,N,N-トリエチルアンモニウムクロリド(DOTMA)及び1:1のモル比の1,2-ジミリスチルオキシ-プロピル-3-ジメチルヒドロキシエチルアンモニウムプロミド(DMR1E)及びジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)(例えば Logan, J.J. et al. (1995) Gene Therapy 2:38-49; San, H. et al. (1993) Human Gene Therapy 4:781-788を参照されたい)。

受容体媒介性DNA取り込み:さらに、裸のDNAをin vivoの細胞内に、細胞表面受容体に対するリガンドに結合させたポリリジンなどの陽イオンにDNAを複合体形成させることでも、導入することができる(例えば Wu, G. and Wu, C.H. (1988) J. Biol. Chem. 263:14621; Wilson, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:963-967; 及び米国特許第5,166,320号を参照されたい)。受容体へのDNA-リガンド複合体を結合により、受容体媒介性エンドサイトーシスにより、DNAの取り込みが促される。天然でエンドソームを破壊することで、細胞質内に物質を放出するアデノウイルス・カプシドに連結させたDNA-リガンド複合体を用いると、細胞内ライソゾームによる複合体の分解を避けることができる(例えば Curiel, et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci., USA

88:8850; Cristiano, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:2122-2126を参照されたい)。

レトロウイルス:欠陥レトロウイルスは、遺伝子治療を目的とした遺伝子輸送での使用に関し、よく特徴付けられている(レビューについてはMiller, A.D. (1990) Blood 76:271を参照されたい)。目的のヌクレオチド配列を、レトロウイルスゲノムに取り入れて有する組換えレトロウイルスを構築することができる。加えて、レトロウイルス・ゲノムの数部分を取り除いて、このレトロウイルスを複製欠陥にすることができる。次にこの複製欠陥レトロウイルスをビリオンにパッケージすれば、このビリオンを用いて、標準的な技術によりヘルパウイルスの使用を通じて標的細胞を感染させることができる。組換えレトロウイルスを作製するためのプロトコルや、in vitro 又は in vivo の細胞をこのようなウイルスに感染させるためのプロトコルは、Current

Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates, (1989), Sections 9.10-9.14 及び他の標準的な研究室用手引きに見ることができる。適したレトロウイルスの例には、当業者に公知のpLJ、pZIP、pWE 及びpEMがある。適したパッケージング・ウイルス系の例には、Crip、Cre、 Δ 及びAm、がある。レトロウイルスは、in vitro 及び/又は in vivoの上皮細胞、内皮細胞、リンパ球、筋原細胞、肝細胞、骨髄細胞を、含む多種の様々な細胞種に遺伝子を導入するために用いられてきた(例えば Eglitis, et al. (1985) Science 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85:3014-3018; Armentano et

10

20

30

40

50

al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 87:6141-6145; Huber et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88:8039-8043; Ferry, et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 88:8377-8381; Chowdhury, et al. (1991) Science 254:1802-1805; van Beusechem, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:7640-7644; Kay, et al. (1992) Human Gene Therapy 3:641-647; Dai, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:10892-10895; Hwu, et al. (1993) J. Immunol. 150:4104-4115; 米国特許第4,868,116号; 米国特許第4,980,286号; PCT 出願WO 89/07136; PCT 出願WO 89/02468; PCT 出願WO 89/05345; 及び PCT 出願WO 92/07573を参照されたい)。レトロウイルス・ベクタには、レトロウイルス・ゲノム(及びそれに挿入された外来核酸)が宿主ゲノムに組み込まれて細胞内に核酸を安定に導入するためには、標的細胞の分裂が必要である。このように、標的細胞の複製を刺激する必要があるであろう。

アデノウイルス:アデノウイルスのゲノムは、目的の遺伝子産物をコードし、発現はするが、通常の溶解によるウイルス生命周期という点でのその複製能が不活性化しているように操作することができる。例えばBerkner, et al. (1988) BioTechniques 6:616; Rosenfeld, et al. (1991) Science 252:431-434; and Rosenfeld et al. (1992) Cell 68:143-155を参照されたい。アデノウイルス株 Ad タイプ5 dl324 又は他のアデノウイルス株(例えばAd2、Ad3、及びAd7等)を由来とする適したアデノウイルス株は当業者に公知である。組換えアデノウイルスは、有効な遺伝子送達賦形剤となるためにも分裂細胞を必要としないため有利であり、気道上皮(Rosenfeld, et al. (1992) cited supra)、内皮細胞(Lemarchand, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:6482-6486)、肝細胞(Herz and Gerard (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90:2812-2816)

及び筋細胞(Quantin, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89:2581-2584)を含め、多種の細胞種を感染させるために用いることができる。加えて、導入されたアデノウイルスDNA(及びそこに含まれた外来のDNA)は宿主細胞のゲノムに組み込まれず、エピソームのまま留まるため、導入されたDNAが宿主ゲノム(例えばレトロウイルスDNA)に組み込まれた場合の挿入的変異誘発の結果起きかねない潜在的問題が避けられる。さらに、外来のDNAのためのアデノウイルス・ゲノムの運搬能力は他の遺伝子送達ベクタに比較して大きい(最高で8キロベース)(Berkner, et al. cited supra; Haj-Ahmand and Graham (1986) J. Virol. 57:267)。現在用いられている大半の複製欠陥アデノウイルス・ベクタは、ウイルスE1及びE3 遺伝子の全部又は一部を欠失させてあるが、アデノウイルス遺伝物質の80%もを留めている。

アデノ随伴ウイルス: アデノ随伴ウイルス(AAV)は、アデノウイルス又は疱疹ウイルスなどの別のウイルスを、効率的な複製及び増殖能ある生命周期のためのヘルパウイルスとして必要とする天然で発生する欠陥ウイルスである。(レビューについてはMuzyczka, et al. Curr. Topics in Micro. Immunol. (1992) 158:97-129を参照されたい)。それはまた、非分裂細胞にそのDNAを組み込ませ、高頻度で安定した組込みを示す数少ないウイルスのうちの1つでもある(例えば Flotte, et al. (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356; Samulski et al. (1989) J. Virol. 63:3822-3828; 及びMcLaughlin, et al. (1989) J.

Virol. 62:1963-1973を参照されたい)。300塩基対といった少ないAAVを含有するベクタをパッケージし、組み込むことができる。外因性のDNAのためのスペースは、約4,5kbと限られている。Tratschin, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260 に解説されたものなどのAAVベクタは、DNAを細胞に導入するために用いることができる。多種の核酸が様々な細胞種に、AAVベクタを用いて導入されてきた。(例えばHermonat, et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81:6466-6470;

Tratschin, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081;
Wondisford, et al. (1988) Mol. Endocrinol. 2:32-39; Tratschin, et
al. (1984) J. Virol. 51:611-619; 及び Flotte, et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:3
781-3790を参照されたい)。

【0140】

特定の発現ベクタ系の効験や、核酸を細胞に導入する方法は、当業で慣例的に用いられている標準的なアプローチにより、評価することができる。例えば、細胞に導入されたDNAは、フィルタ・ハイブリダイゼーション技術(例えばサザン・プロット法)により検出することができ、導入されたDNAの転写で生じるRNAは、例えばノーザン・プロット法、RNase保護法又はリバーシ-トランスクリプターゼ-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)になど
10

【0141】

ある実施態様では、マーカをコードするレトロウィルス発現ベクタを用いて、マーカタンパク質を *in vivo* の細胞内で発現させることで、マーカタンパク質の *in vivo* での発現又は活性を刺激する。このようなレトロウィルス・ベクタは、(例えば上述したように)当業で公知の標準的な方法に従って調製することができる。

【0142】

化合物などの調節性作用薬を対象に医薬組成物として投与することもできる。このような組成物は、典型的に、本調節性作用薬と薬学的に許容可能な担体とを含む。ここで用いられる用語「薬学的に許容可能な担体」には、医薬投与に適合性あるあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤等が含まれるものと、意図されている。薬学的に活性な物質のためのこのような媒質及び薬剤の使用は、当業で公知である。従来は媒質又は薬剤が当該活性化合物に対して不適合でない限り、組成物中へのその使用は考察されたところである。補助的な活性化合物も本組成物中に取り入れることができる。医薬組成物は下記のように調製することができる。

【0143】

B. 治療の方法

エフェクタT細胞機能が優勢なことに関連する数多くの疾患状態が公知であり、該疾患状態に罹患した個体で生じた応答の種類を調節すると有益であろう。本方法には、調節性作用薬を、このような治療を必要とする対象に直接、投与することや、又は、当該対象から得られた細胞を作用薬で *ex vivo* 処理した後、この細胞を対象へ再投与することを含めることができる。該治療を、さらに、他の免疫調節性作用薬を投与することで向上させてもよい。本発明の免疫調節性作用薬のこのような疾患への応用は、以下で更に詳述する。

【0144】

数多くの自己免疫異常は、活性化Tエフェクタ細胞の不適切又は望ましくない活性化が原因で、当該疾患の病理に關与するサイトカイン及び自己抗体が産生した結果である。加えて、Tエフェクタ細胞機能は移植片拒絶にも關与している。アレルギーもまた、Tエフェクタ細胞によって媒介される。従って、エフェクタT細胞又は抗体応答を低下させたい場合、本発明の方法を用いて、例えば少なくとも1つのTエフェクタ細胞機能が少なくとも1つのT調節性細胞機能に対して下方調節されるように、Tエフェクタ細胞に優先的に關連する分子の発現及び/又は活性を下方調節することができる。別の実施態様では、このような異常を、例えば少なくとも1つのT調節性細胞機能が
40
少なくとも1つのTエフェクタ細胞機能に対して上方調節されるように、T調節性細胞に優先的に關連する分子の発現及び/又は活性を上方調節することにより、改善することができる。

【0145】

対照的に、Tエフェクタ細胞の少なくとも1つの活性を高める、及び/又は、T調節性細胞の少なくとも1つの活性を下方調節する、と有益であろう状態もある。例えば、免
50

疫エフェクタ細胞は、癌細胞に対して有効に反応することがしばしばできない。従って、エフェクタT細胞又は抗体応答の亢進が好ましい場合、本発明の方法を用いることで、例えば少なくとも1つのTエフェクタ細胞機能が少なくとも1つのT調節性細胞機能に対して上方調節されるように、Tエフェクタ細胞に優先的に関する分子の発現及び/又は活性を上方調節することができる。

【0146】

ある実施態様では、これらの調節法をある1つの抗原と組み合わせて用いて、この抗原に対する免疫応答を高める又は軽減することができる。例えば、Tエフェクタ細胞応答を、ワクチン製剤において高めたり、あるいは、V I I I 因子など、対象に慢性的に投与せねばならない治療的タンパク質に対するエフェクタ細胞応答を減らすために、軽減すること

10

【0147】

より具体的には、対象において調節性T細胞機能の少なくとも1つの活性を調節することに比べ、エフェクタT細胞の少なくとも1つの活性を優先的に下方調節することは、例えば皮膚、組織及び臓器移植、移植片対宿主疾患（GVHD）、あるいは、全身性エリテマトーデス及び多発性硬化症などの自己免疫疾患の場合などに有用である。例えば、調節性T細胞機能を優先的に促進する、及び/又は、エフェクタT細胞機能を低下させると、組織移植において組織破壊が減少する。典型的には、組織移植片において、組織片の拒絶は、それが免疫細胞によって異物と認識されることで惹起され、この移植片を破壊する免疫反応が起きる。ここで解説された通りの作用薬又はモジュレータを、単独又は別の免疫調節性作用薬と組み合わせて、移植前又は移植時に投与すると、対象におけるエフェクタT細胞機能や調節性T細胞機能を調節することができる。

20

【0148】

数多くの自己免疫異常は、自己組織に対して反応性であると共に、この疾患の病理に関与するサイトカイン及び自己抗体の産生を促進する免疫細胞の不適切な活性化が原因である。自己反応性の免疫細胞の活性化を妨げると、疾患の症状が軽減又は消失するであろう。自己免疫異常を防止又は軽減する上での試薬の効験は、ヒト自己免疫疾患の良く特徴付けられた多くの動物モデルを用いて判断することができる。例には、マウス実験的自己免疫脳炎、MRL/lpr/lpr マウス又はNZBハイブリッド・マウスの全身性エリテマトーデス、あるいは、マウス自己免疫コラーゲン性関節炎、NOD マウス及びBB ラットの糖尿病、及びマウス実験的重症筋無力症（Paul ed., Fundamental

30

Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-856を参照されたい）。

【0149】

ここで用いる用語「自己免疫性」とは、対象の免疫系（例えばT及びB細胞）が彼又は彼女自身の組織に対して反応を始める状態を言う。

本発明に従って治療できると思われる自己免疫成分を有する自己免疫疾患及び異常の非限定的例には、1型糖尿病、（リウマチ性関節炎、若年性リウマチ性関節炎、乾癬性関節炎を含む）関節炎、多発性硬化症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、自己免疫甲状腺炎、（アトピー性皮膚炎及び湿疹性皮膚炎を含む）皮膚炎、乾癬、シェーグレン症候群に続発する乾性角結膜炎を含むシェーグレン症候群、円形脱毛症、節足動物の咬創を原因とするアレルギー性応答、クローン病、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、潰瘍性大腸炎、喘息、アレルギー性喘息、皮膚性エリテマトーデス、強皮症、薬疹、らい反転反応、らい性結節性紅斑、自己免疫ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳症、特発性両側性進行性感音性難聴、再生不良性貧血、真性赤血球性貧血、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ウェグナー肉芽腫症、慢性進行性肝炎、スティーブンス-ジョンソン症候群、特発性スプルー、扁平苔癬、クローン病、グレーブズ眼症、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎、及び間質性肺線維症、がある。

40

【0150】

好ましくは、エフェクタ細胞機能の阻害が、例えばIgE産生を阻害するなどにより、アレルギー及びアレルギー性反応の治療において治療上、有用であるとよい。エフェクタ

50

T細胞機能の阻害、及び/又は、調節性T細胞機能の促進は、適したMHC分子と共に、アレルゲンへの曝露に伴わせることができる。アレルギー性反応は、アレルゲンの進入経路や、マスト細胞又は好塩基球上のIgEの付着パターンに応じて、本来全身性でも、又は局所性でもよい。このように、エフェクタT細胞媒介性アレルギー性応答の阻害は、作用薬又は阻害剤の投与により、局所的でも、又は全身でも、起き得る。

【0151】

好ましくは、少なくとも1つのエフェクタT細胞機能の阻害が、免疫細胞のウィルス感染においても治療上有用であるとよい。例えば、後天性免疫不全症候群(AIDS)においては、ウィルスの複製は、免疫細胞の活性化により刺激される。エフェクタT細胞機能を阻害するとウィルス複製が阻害され、ひいてはAIDSの経過が改善するであろう。

10

【0152】

Tエフェクタ細胞の上方調節も治療において有用である。少なくとも1つのTエフェクタ活性の上方調節は、既存の免疫応答を高めたり、あるいは、最初の免疫応答を惹起する上で有用であろう。例えば、好ましくは少なくとも1つのTエフェクタ細胞活性を、エフェクタT細胞中の本発明の分子を刺激する作用薬を用いて増加させることが、細菌、ウィルス、又は寄生虫などの微生物感染の場合に有用である。これらには、疱疹又は帯状ヘルペスなどのウィルス性皮膚疾患が含まれ、この場合、このような作用薬を皮膚に局所的に送達することができる。加えて、インフルエンザ、通常の風邪、及び脳炎などの全身性ウィルス性疾患は、このような作用薬の全身投与により、軽減するであろう。別の実施態様では、T調節性細胞に関連する本発明の少なくとも1つの分子の発現及び/又は活性を下方調節することができる。

20

【0153】

ウィルスなどの病原体に対する免疫性は、ウィルスタンパク質に、適したアジュバントに入れたエフェクタT細胞機能を活性化する作用薬と一緒にしてワクチン接種することにより、誘導することができる。核酸ワクチンは、例えば注射(例えば筋肉内、皮内、あるいは、粒子加速器又は圧縮ガスを用いて粒子を皮膚に注射する銃を用いて、DNAで被覆された金粒子を上皮にバイオリスティック注射するなど)多種の手段により投与することができる(Haynes et al. 1996.

J. Biotechnol.

44:37))。代替的には、核酸ワクチンを非侵襲的手段で投与することもできる。例えば、純粋なもしくは脂質で調合されたDNAを呼吸系又は標的決定された他の箇所に送達することができ、例えばペイヤーズ・パッチは、DNAの経口送達である(Schubbert. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:961)。弱毒化した微生物は、粘膜表面への送達に用いることができる(Sizemore et al. (1995) Science. 270:29)。ワクチンが有用である病原体には、B型肝炎、C型肝炎、エプスタイン-バーウィルス、サイトメガロウィルス、HIV-1、HIV-2、結核、マラリア及び住血吸虫がある。

30

【0154】

別の用途では、少なくとも1つのエフェクタT細胞機能の優先的上方調節又は亢進は、腫瘍免疫の誘導において有用である。別の実施態様では、免疫応答を活性化シグナルの伝播により刺激することができる。例えば、腫瘍特異抗原などの自己由来抗原など、対象が十分な免疫応答を生じられないような抗原に対する免疫応答をこの態様で誘導することができる。

40

【0155】

本発明は、少なくとも1つのエフェクタT細胞機能を優先的に調節しながらも、T調節性応答にはほとんど効果を有さない、あるいはその逆を行うと有用であろう異常の危険性のある(又は易罹患性の)、あるいは、疾患、異常又は状態を有する、対象を治療する予防法及び治療法の両方を提供するものである。予防的作用薬の投与は、疾患又は異常が予防、又は代替的には、その進行が遅らされるように、症状の発現前に行うことができる。

50

【0156】

これらの作用薬を *in vitro*（例えば細胞を本作用薬に接触させるなどにより）で投与することも、あるいは代替的には、*in vivo*（例えば本作用薬を対象に投与するなどにより）で投与することもできる。従って、本発明は、Tエフェクタ細胞を上方もしくは下方調節しながらも、調節性T細胞には影響しないと有益であろう疾患又は異常に罹患した個体を治療する方法を提供するものである。

【0157】

本発明の調節性作用薬は単独で投与することも、あるいは、一つ以上の付加的な作用薬と組み合わせて投与することもできる。例えば、ある実施態様では、ここで解説された2つの作用薬を対象に投与することができる。別の実施態様では、ここで解説された作用薬を、他の免疫調節性作用薬と組み合わせて投与することができる。他の免疫調節性試薬の例には、共刺激シグナルを遮断する抗体、（例えば抗CD28、ICOS）、阻害性シグナルをCTLA4を介して活性化する抗体、及び/又は、他の免疫細胞マーカーに対する抗体（例えば抗CD40、抗CD40リガンド、又は抗サイトカイン）、融合タンパク質（例えばCTLA4-Fc、PD-1-Fc）、及び免疫抑制剤、（例えばラパマイシン、シクロスポリンA又はFK506）、がある。場合によっては、免疫応答を惹起又は増強するために、T細胞活性化シグナルを送達する作用薬など、免疫応答を上方調節する他の作用薬を更に投与することが好ましいであろう。

10

【0158】

現在の免疫抑制剤とは異なり、ここで解説された作用薬又は阻害剤は、恒常性免疫調節機序の発生を促すため、望ましくない免疫応答を制御するために、長期治療ではなく、短期投与（例えば数週間から数ヶ月間）を要するであろう。本作用薬又は阻害剤による、又は一般的な免疫抑制剤による、長期治療は、対象に、当該状態に関連する抗原（例えばドナー抗原、自己抗原）に対する強固な調節性T細胞応答が生ずるために不要である。その結果の免疫調節は天然のT細胞機序により媒介されるため、調節性T細胞応答がいったん優勢に生ずれば、免疫調節を維持するためにも薬物は必要でないであろう。免疫抑制剤による生涯にわたる治療を無くすことで、自己免疫の治療及び臓器移植に現在伴う副作用が、全部ではないにしても、その多くが無くなるであろう。

20

【0159】

ある実施態様では、患者から免疫細胞を取り出し、免疫細胞を *in vitro* で、エフェクタT細胞機能を活性化する作用薬に接触させ、この *in vitro* で刺激を受けた免疫細胞を患者に再導入することにより、感染患者における免疫応答を高めることができる。

30

【0160】

V I I I . 医薬組成物

ここで解説した通りの阻害剤又は刺激剤など、調節性作用薬を、投与に適した医薬組成物に取り入れることができる。このような組成物は、典型的には、本作用薬と、薬学的に許容可能な担体とを含む。ここで用いる言語「薬学的に許容可能な担体」には、医薬投与に適合性あるあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤等が含まれるものと、意図されている。薬学的に活性化物質のためのこのような媒質及び薬剤の使用は、当業で公知である。従来媒質又は薬剤が当該活性化化合物に対して不適合でない限り、組成物中へのその使用は考察されたところである。補助的な活性化化合物も本組成物中に取り入れることができる。

40

【0161】

本発明の医薬組成物は、それに意図された投与経路と適合性があるように調合される。投与経路の例には、非経口、例えば静脈内、皮内、筋肉内、皮下、経口（例えば吸入）、経皮（局所）、経粘膜、及び直腸投与がある。非経口、皮内、又は皮下用途に用いられる溶液又は懸濁液には、以下の成分を含めることができる：無菌の希釈剤、例えば注射用の水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒；抗菌剤、例えばベンジルアルコール又はメチルパラベン；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジア

50

ミン四酢酸；緩衝剤、例えば酢酸、クエン酸又はリン酸並びに塩化ナトリウム又はデキストロースなど、張性の調節用の薬剤。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調節することができる。非経口用製剤は、ガラス製又はプラスチック製のアンプル、使い捨て用シリンジ又は多人数用バイアルに封入することができる。

【0162】

注射による使用に適した医薬組成物には、無菌の水溶液（水溶性の場合）又は分散液、及び、無菌の注射用溶液又は分散液の即時調製用の無菌粉末、がある。静脈内投与の場合、適した担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor ELTM（ニュージャージー州パーシパニー、BASF社）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、がある。いずれの場合も、当該組成物は無菌でなくてはならず、注射筒への注入が容易な程度に流動性でなくてはならない。それは製造及び保管条件下で安定でなくてはならず、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から保護されていなければならない。当該担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、及びこれらの適した混合物を含有する溶媒又は分散媒であってよい。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを用いたり、分散液の場合には必要な粒子サイズを維持したり、界面活性剤を用いるなどして、維持することができる。微生物の活動を防止するには、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等の多様な抗菌剤及び抗カビ剤により、達成することができる。多くの場合、例えば糖類、マンニトールなどの多価アルコール、ソルビトール、及び塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含めることが好ましい。注射用組成物の吸収を長引かせるには、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなど、吸収を遅らせる薬剤を組成物中に含めることで、可能である。

10

20

【0163】

無菌の注射用溶液は、必要量の活性化化合物を適した溶媒に、必要に応じて上に列挙した成分の1つ又は組み合わせと一緒に加えた後、滅菌マイクロ濾過を行うことにより、調製できる。分散液は一般的には、塩基性の分散媒と、上に列挙したのものの中で必要な他の成分とを含有する無菌の賦形剤に当該活性化化合物を加えることで、調製されている。無菌の注射用溶液の調製用の無菌粉末の場合、好適な調製法は真空乾燥及び凍結乾燥であり、その結果、活性成分及び付加的な所望の成分の粉末が、予め殺菌濾過されたその溶液から生じる。

30

【0164】

経口用組成物は一般に、不活性の希釈剤及び食用の担体を含む。これらをゼラチン・カプセルに封入することも、又は圧縮して錠剤にすることもできる。経口による治療的投与の場合、活性化化合物を医薬品添加物と一緒に取り入れ、錠剤、トローチ、又はカプセルの形で用いることができる。経口用組成物は、さらに、口内洗浄剤として用いる流動性の担体を用いて調製することができ、この場合、この流動性の担体中の化合物は経口利用され、さっと口に入れて嚥出されるか、又は飲み込まれる。薬学的に適合性ある結合剤、及び/又は、アジュバント物質を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ等は以下の成分、又は同様の性質の化合物のいずれかを含有することができる：微結晶セルロース、トラガカントゴム又はゼラチンなどの結合剤；でんぷん又はラクトースなどの医薬品添加物、アルギン酸、Primogel、又はコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム又はSterotesなどの潤滑剤；コロイド状二酸化珪素などの推進剤；ショ糖又はサッカリンなどの甘味料；又は、ペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ着香料などの着香料。

40

【0165】

吸入による投与の場合、当該化合物を、二酸化炭素などのガスなど、適した推進剤を含有する加圧された容器又はディスペンサヤ、又はネブライザからのエアロゾル・スプレーの形で送達する。

【0166】

全身投与はまた、経粘膜又は経皮手段によってもよい。経粘膜又は経皮投与の場合、透

50

過させようとする障壁に適した浸透剤を調合物中に用いる。このような浸透剤は一般に当業で公知であるが、その中には、例えば、経粘膜投与用の場合、界面活性剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体、がある。経粘膜投与は、鼻孔用スプレー又は座薬の使用を通じて行うことができる。経皮投与の場合、当該活性化化合物を、当業で広く公知のように、軟膏、軟膏剤、ゲル、又はクリームに調合する。

【0167】

さらに本化合物を（例えばココアバター及び多のグリセリドなどの従来の座薬用基剤を用いて）座薬の形で調製することも、又は、直腸送達用の停留浣腸剤の形で調製することもできる。

【0168】

ある実施態様では、調節性作用薬を、インプラント及びマイクロ封入送達系を含め、制御放出調合物など、身体から当該化合物が急速に失われないように保護するであろう担体と一緒に調製する。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸など、生分解性で生体適合性あるポリマを用いることができる。このような調合物の調製法が数多く、当業者には明白なはずである。当該材料はアルザ・コーポレーション及びノヴァ・ファーマシューティカルズ社から市販のものも得ることができる。リポソーム性懸濁液は、薬学的に許容可能な担体として用いることもできる。これらは、例えば米国特許第4,522,811号に解説されているように、当業者に公知の方法に従って調製することができる。

【0169】

投与の容易さ及び投薬量の均一性のためには、経口又は非経口用組成物を単位剤形で調合することが特に有利である。ここで用いる単位剤形とは、治療しようとする対象にとって単位型の投薬量として調整された物理的に別個の単位を言う。各単位は、必要な薬品用担体との関連から所望の治療効果を生ずるよう計算された所定量の活性化化合物を含有する。本発明の単位剤形の詳細は、活性化化合物の固有の特徴、及び、達成しようとする特定の治療効果、及びこのような活性化化合物を、個体の治療に向けて配合する技術に内在する限界、によって決定され、またこれらに直接依存する。

【0170】

このような化合物の毒性及び治療上の効験は、例えばLD50（集団の50%にとって致命的な用量）及びED50（集団の50%において治療上有効な用量）を決定するためなど、細胞培養又は実験動物での標準的薬学的手法により、判定することができる。毒性効果及び治療効果の間の用量比が治療指数であり、それを比LD50/ED50で表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を用いることも可能であるが、非感染細胞への潜在的損害を抑え、ひいては副作用を減らすために、罹患組織の部位をこのような化合物が標的とする送達系をデザインするように注意せねばならない。

【0171】

細胞培養検定及び動物研究から得られたデータを、ヒトでの使用に向けた一定の範囲の投薬量を処方する上で用いることができる。このような化合物の投薬量は、好ましくは、毒性が少ないか、又は全くない、ED50を含むような血中濃度の範囲内であるとよい。投薬量は、用いる剤形及び利用する投与経路に応じて、この範囲内で様々であってよい。本発明の方法で用いられるいずれの化合物についても、治療上の有効量は、細胞培養検定からまず、推定することができる。用量を動物モデルで調合して、細胞培養で判定されたIC50（即ち、症状の半分から最大の阻害を達成する検査化合物の濃度）を含むような循環血漿濃度範囲を達成することができる。このような上方は、ヒトで有用な用量をより精確に決定するためにも、用いることができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィにより、測定することができる。

【0172】

本医薬組成物を、投与に関する指示と一緒に容器、パック、又はディスペンサ内に含めることができる。

10

20

30

40

50

【0173】

IX. 調節性作用薬の投与

本発明の調節性作用薬は、in vivoでの医薬投与に適した生物学的に適合性ある形で対象に投与される。「in vivoでの医薬投与に適した生物学的に適合性ある形」とは、毒性の効果が、当該作用薬の治療効果よりも小さいような作用薬の形を意味する。

【0174】

本発明の治療用組成物の治療上有効量の投与とは、所望の結果を達成するために必要な投薬量及び期間で有効である量と、定義しておく。例えば、作用薬の治療上有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重や、その個体において所望の応答を惹起する上での作用薬の能力に応じて様々であろう。投薬計画を、最適な治療上の応答が得られるように調節することができる。例えば、複数回に分けた用量を毎日投与することも、あるいは、治療状況の緊急度が示す場合には、用量を比例的に減少させることもできる。

10

【0175】

本作用薬は、例えば注射（皮下、静脈内など）、経口投与、経皮適用、又は直腸投与など、便利な態様で投与することができる。投与経路によっては、活性化化合物を、この化合物を失活させかねない酵素、酸及び他の天然条件の作用から保護する物質で被覆することができる。例えば、非経口投与以外で本作用薬を投与するには、本作用薬を、その失活を防ぐ物質で被覆したり、又は、一緒に同時投与することが好ましいであろう。

【0176】

作用薬を、酵素阻害剤と一緒に投与することも、あるいはリポソームなどの適した担体に入れて投与することもできる。薬学的に許容可能な希釈剤には生理食塩水及び水性の緩衝剤水溶液がある。アジュバントはその最も広い意味で用いられており、その中には、インターフェロンなど、いずれかの免疫刺激性化合物が含まれる。ここで考察されるアジュバントには、レゾルシノール、ポリオキシエチレンオレイルエーテル及びn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルなどの非イオン性界面活性剤が含まれる。酵素阻害剤には、膵臓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロホスフェート(DEEP)及びトラジロールがある。リポソームには、水中油中水乳濁液や、従来のリポソームがある (Sterna et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

20

【0177】

また、本活性化化合物を非経口投与しても、又は腹腔内投与してもよい。懸濁液はグリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びこれらの混合物中や、油中に調製することもできる。通常の保管及び使用条件下では、これらに製剤に、微生物の成長を防ぐ保存剤を含めてもよい。

30

【0178】

活性化化合物が上述したように適宜保護されていれば、本作用薬を、例えば不活性の希釈剤又は同和可能な食用の担体と一緒に経口投与することができる。ここで用いられる「薬学的に許容可能な担体」には、あらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤等が含まれる。薬学的に活性な物質のためのこのような媒質及び薬剤の使用は、当業で公知である。従来の媒質又は薬剤が当該活性化化合物に対して不適合でない限り、治療用組成物中へのその使用は考察されたところである。補助的な活性化化合物も本組成物中に取り入れることができる。

40

【0179】

本発明をさらに以下の実施例で説明することとするが、以下の実施例を限定的なものとして捉えられてはならない。本出願全体を通じて引用された全参考文献、特許及び公開済み特許出願の内容や、図面及び添付物を、引用をもってここに援用することとする。

【0180】

実施例

実施例 1: Tエフェクタ細胞又はT調節性細胞内で優先的に発現する遺伝子の、AffymetrixTM 遺伝子チップを用いた特定

この実施例では、特定のT細胞種には存在するが、他のT細胞種では存在しない遺伝子

50

の特定を解説する。具体的には、エフェクタ T 細胞 (Th1 及び Th2) 及び調節性 T 細胞の間で示差的に用いられる遺伝子を特定する。

【0181】

方法

T 細胞株の培養

分化細胞株を、ヒト臍帯血又は末梢血 CD4+CD45RA+

未刺激 T 細胞から調製された細胞から、フローサイトメトリ及び磁気ビーズ分離法を含む様々な方法で作製した。開始集団の純度は 95% を越えた。次に、細胞を、10% FCS 及び 1% ヒト AB 血清を加え、サイトカイン及び抗サイトカイン中和化抗体の規定混合物を加えた CD3 及び CD28 抗体の RPMI 1640 溶液で刺激して、分化細胞種を生じさせた。Th1 細胞は、IL12

10

(62U/ml) 及び抗 IL4 (0.2ug/ml) との培養により生じさせた。Th2 細胞は、IL4 (145U/ml) 及び抗 IL12

(10ug/ml) 及び抗 IFN (10ug/ml) 中での培養により生じさせた。そして調節性 T 細胞は、TGF (32U/ml)、IL9 (42U/ml)、抗 IL4 (10ug/ml) 及び抗 IL12 (10ug/ml)

及び抗 IFN (10ug/ml) 中での培養により生じさせた。

(注：抗 IL12 はすべての実験で用いた訳ではない)。全ての培養物に IL2 (65U/ml) 及び IL15 (4500U/ml) を添加した。細胞を、細胞分裂で可能になったときにより大きな培養皿に分割した。一回目の細胞分化の終了時 (7 乃至 12 日目) に、細胞を、遺伝子チップ実験で用いるための全 RNA の調製用に採集した。

20

【0182】

Affymetrix™ 遺伝子チップ実験

各細胞種由来の RNA を、Qiagen™ RNeasy キットをメーカーの解説通りに用いて調製した。高品質の全 RNA を各細胞種から単離した後、この RNA をビオチン標識し、Affymetrix™ が推奨する通りに Affymetrix™ 遺伝子チップで用いるように断片化した。簡単に説明すると、RNA を Superscript™ II ポリメラーゼ及び T7 プライマを用いてコピーして cDNA にした。次にその相補鎖を、E. coli DNA ポリメラーゼ I を用いて合成した。その産物である dsDNA をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈降させた。次に、in vitro 転写を、ビオチン化させたヌクレオチドを用いて行わせて増幅し、ENZO™

バイオアレイ高収率 RNA 転写産物ラベリング・キットを用いて RNA を増幅した。標識済みの産物を、Qiagen RNeasy キットに解説された清浄法を用いて清浄にした。標識済みの RNA を 200mM Tris アセテート、500mM 酢酸カリウム及び 150mM 酢酸マグネシウム中でのインキュベーションで断片化し、推奨された量を Affymetrix™

Hu133 遺伝子アレイのチップ A 及び B に載せた。Affymetrix™ チップを、メーカーの指示通りにハイブリダイズさせ、Affymetrix™ 自動化チップ洗浄機に推奨された通りに洗浄した。ビオチン化 RNA 断片の洗浄及び蛍光体による標識後に、チップを Affymetrix™ チップ・リーダーで読み取った。

30

【0183】

各細胞種及び各チップ毎に、ほぼ合計 34,000 個のヒト遺伝子を表す全プローブ・セットを、チップのセンス及び非センス部分上の蛍光シグナルの統計学的分析に基づき、Affymetrix™ マイクロアレイ・スーツ・ソフトウェアを用いて「有り」又は「無し」と採点した。各プローブセットに対するこれらの「有り」及び「無し」のコールは、シグナル輝度と一緒に Microsoft™ アクセス・データベースに送った。クエリを用いて、各細胞種に関して有りと採点された全遺伝子のデータファイルを作製した。全部の細胞種で有りと採点された遺伝子を、クエリを用いたその後の研究から取り除いた。ある細胞種に固有であるか、あるいは、別のものに対してある細胞種で優先的に発現する遺伝子のデータファイルをクエリを用いて作製して、Th1、Th2 又は調節性 T 細胞上でのみ、有りと採点された遺伝子を選抜した。加えて、エフェクタ (Th1 及び Th2) 細胞でのみ存在し、調節性 T 細胞では存在しないか、あるいは、調節性 T 細胞でのみ存在し、エフェクタ T 細胞では存在しない遺伝子のデータファイルも作製した。

40

50

【0184】

調節性T細胞に対して活性化エフェクタT細胞で優先的に用いられていると思われた遺伝子の中に、プロテインキナーゼCシータを通じた活性化T細胞でのシグナル伝達に必要であることが公知の一連のタンパク質のための遺伝子があった。PKCシータシグナリング経路に関連する遺伝子の存在に関して得られたデータを調べると、エフェクタT細胞は、この経路で用いられる分子に関するメッセージを活発に転写しているようであるが、調節性T細胞はそうではないことが明らかになった。

図2は、関連するプローブセットに関する遺伝子チップ発現データを示す。

【0185】

実施例2： PKCシータは、調節性T細胞を活性化するためには必要ではない

10

PKCシータシグナリングが、調節性T細胞よりもエフェクタT細胞で優先的に用いられ、エフェクタT細胞活性化には必要であるが、調節性細胞活性化には必要でないことを証明するために、実験を行った。一番目の実験では、調節性T細胞におけるPKCシータタンパク質の発現の現象が証明された。Th1、Th2及び調節性T細胞の集団は上述の通りに調製された。これらの細胞を、顕微鏡用スライドに向かって遠心分離し、TCR及びPKCシータに特異的な抗体を用いて染色した。様々な細胞種を検査したところ(図3)、細胞種のすべてがTCRを発現していたが、PKCシータは、末梢血T細胞及びTh2細胞でのみ、強く発現され、他方、それは、Th1細胞の細胞質全体に散らばって発現していることも明らかになった。調節性T細胞ではほとんど、乃至全く、発現は見られなかった。

【0186】

20

機能的PKCシータにとっての必要条件が調節性T細胞にないことを、Th1、Th2及び調節性T細胞を、新規なプロテインキナーゼC酵素(PKC及びPKC)の市販の阻害剤であるロットルリン(原語: Rottlerin)で処理して実証した。上述のように調製した分化細胞を、CD3及びCD28を、一定の濃度範囲の市販の阻害剤ロットルリンの存在下で用いて再刺激した。3つの実験のうち3つで、ロットルリンはTh1及びTh2細胞による細胞分裂を、5µMで阻害したが、調節性T細胞の増殖は阻害しなかった(図4)。

【0187】

実施例3： PKCを阻害すると、Th1及びTh2細胞増殖が選択的に阻害される。

プロテインキナーゼCシータの化学的阻害剤であるロットルリンは、より高い濃度では、細胞分裂にとって重要な他の細胞内酵素に対しても更なる阻害効果を有することが示されている(Davies, SP, et al. (2000) Biochem. J. 351:95-105)。従って、PKC阻害剤が、TGFβ由来Treg細胞よりもより完全にTh1及びTh2細胞の増殖を阻害する能力を有することを実証するために、より選択的な分子を利用した。

30

【0188】

in vitroにおいて、PKCのPDPK1(配列番号: 13及び配列番号: 14)相互作用部分を由来とするペプチドが、PKC活性を特異的に阻害できることが示されている(Ghosh, S. and, D'Acquisto F., WO 03/004612)。これらのペプチドの特異性は、入手可能ないずれの低分子阻害剤について実証された特異性よりも遙かに大きく、これらのペプチドは、他のPKCファミリー・メンバに比較してPKCを特異的に阻害することが示されている。

40

【0189】

しかしながら、細胞内酵素のペプチド阻害剤は細胞膜を透過せず、従って、全細胞を用いたin vitro検定では有効ではない。この問題を避けるために、そのN末端でアンテナペディア・ホメオドメインの第三ヘリックスに付着させたPKC阻害性ペプチドを合成することができる。このペプチドは、細胞には何の明白な損傷を与えることなく、ペプチド及びタンパク質の生体膜を通った進入を可能にするものである(Fenton, M., et al. (1998) J. Immunol. Methods 212:41-48; Dostmann, WRG, et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 97:14772-14777)。これらの研究で用いたペプチドの配列は:

NH₂-RQIKIWFQRRMKWKKMDQNMFRNFSFNMP-COOH

50

(配列番号：15)

だった。

【0190】

TGF 由来Treg細胞の増殖は阻害せず、Th1及びTh2の増殖を選択的に阻害するというこのアンテナペディア-PKC ペプチドの能力を検査するために、分化細胞をCD3及びCD28で被覆したウェル内で、当業で公知のプロトコルに従い、該ペプチド阻害剤の存在下又は非存在下で培養した。この培養開始から3日後に、各細胞種に対して各条件に関する3つの複製組織培養ウェルに、³H-チミジンを含む媒質を与えて細胞分裂を観察した。ウェルから18時間後に採集し、取り込まれた³Hを、シンチレーション計数により測定した。複製ウェルを平均化し、阻害剤を加えない細胞と、次第に濃度を高くした阻害剤を加えた細胞との間で、各細胞種に関して、増殖の比較を行ったところ、アンテナペディア-PKC 阻害性ペプチドが、Th1及びTh2細胞の増殖を、コントロール・レベルの16%まで阻害し、TGF 由来Treg細胞は、それらのコントロール・レベルの50乃至80%の間、増殖したことが見出された(図5)。

10

【0191】

均等物

当業者であれば、日常的な実験によって、ここに解説した本発明の具体的な実施態様の均等物を数多く、認識し、又は確認できることであろう。このような均等物は以下の請求の範囲の包含するところと、意図されている。

20

【図面の簡単な説明】

【0192】

【図1】図1は、T細胞活性化経路の図である。

【図2】図2A-Cは、AffymetrixTM遺伝子チップ上で観察されたシグナルを描いたグラフを示し、3つの細胞種、Th1、Th2、及び調節性T細胞中でのPKCシータシグナリング経路に関連する遺伝子の発現を示す。図1Aは、調節性T細胞ではなく、Th1及びTh2細胞でのPKCシータの発現を示す。図1Bは、調節性T細胞ではなく、Th1及びTh2細胞でのBcl10の発現を示す。図1Cは、調節性T細胞ではなく、Th1細胞でのCARMA1の発現を示す。「無し」のコールは、シグナル無しとして示されている。

30

【図3】図3は、末梢血リンパ球(PBL)、Th1、Th2、及び調節性T細胞における抗TCR及び抗PKCシータ抗体によるヒトリンパ球の染色結果を示す。PBL又は分化Th1、Th2及び調節性T細胞を、FITC-抗TCR又はHRP-anti-PKCシータで染色した後、TRITC抗HRPで染色した。

【図4】図4は、調節性T細胞でなく、PKC酵素の市販の阻害剤であるロットルリンによる、Th1及びTh2細胞の増殖阻害を示す。分化細胞を、CD3及びCD28で、PKC阻害剤ロットルリンの存在下又は非存在下で刺激した。³H-チミジンの取り込みを用いて細胞増殖を観察した。各細胞種の増殖を、阻害剤の非存在下で観察された増殖に正規化した。

【図5】図5は、アンテナペディア-PKC ペプチドが、TGF 由来Treg細胞ではなく、Th1及びTh2の増殖を選択的に阻害することを示す代表的データを図解により示す。

40

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TolerRx, Inc., et al.

<120> MOLECULES PREFERENTIALLY ASSOCIATED WITH EFFECTOR T CELLS AND METHODS OF THEIR USE

<130> TLN-026CPPC

<150> 60/467477

<151> 2003-05-02

<150> 60/424777

<151> 2002-11-08

<160> 15

10

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2705

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

tgctcgctcc agggcgcaac catgtcgcca tttcttcgga ttggcttgc caactttgac 60
tgcggttcct gccagtccttg tcagggcgag gctgttaacc cttactgtgc tgtgctcgtc 120
aaagagtatg tcgaatcaga gaacgggcag atgtatatcc agaaaaagcc taccatgtac 180
ccaccctggg acagcacttt tgatgccc atcaacaagg gaagagtcac gcagatcatt 240
gtgaaaggca aaaacgtgga cctcatctct gaaaccaccg tggagctcta ctgctggct 300
gagaggtgca ggaagaacaa cgggaagaca gaaatatggt tagagctgaa acctcaaggc 360
cgaatgctaa tgaatgcaag atactttctg gaaatgagtg acacaaagga catgaatgaa 420
tttgagacgg aaggcttctt tgctttgcat cagcgccggg gtgcatcaa gcaggcaaaag 480
gtccaccacg tcaagtgcc aagcttctt gccaccttct tcccacagcc cacattttgc 540
tctgtctgcc acgagtttgt ctggggcctg aacaaacagg gctaccagtg ccgacaatgc 600
aatgcagcaa ttcacaagaa gtgtattgat aaagttatag caaagtgcac aggatcagct 660
atcaatagcc gaaaaacct gttccacaag gagagattca aaatgacat gccacacaga 720
tttaagctc tcaattcaaa gagcccgacc ttctgtgaac actgtgggac cctgctgtgg 780
ggactggcac ggcaaggact caagtgtgat gcatgtggca tgaatgtgca tcatagatgc 840
cagacaaaag tggccaacct ttgtggcata aaccagaagc taatggctga agcgtggcc 900
atgattgaga gcaactcaaca ggctcgctgc ttaagagata ctgaacagat cttcagagaa 960
ggctccggtg aaattggtct cccatgctcc atcaaaaatg aagcaaggcc gccatgttta 1020
ccgacaccgg gaaaaagaga gcctcagggc atttctctgg agtctccgtt ggatgaggtg 1080
gataaaatgt gccatcttcc agaacctgaa ctgaacaaag aaagaccatc tctgcagatt 1140
aaactaaaaa ttgaggattt tatcttgcac aaaatggttg ggaaaggaag ttttggcaag 1200
gtcttctctg cagaattcaa gaaaaccaat caattttctg caataaaggc cttaaagaaa 1260
gatgtggtct tgatggacga tgatgttgag tgcacgatgg tagagaagag agttctttcc 1320
ttggcctggg agcatccgtt tctgacgcac atgttttcta cattccagac caaggaaaac 1380
ctcttttttg tgatggagta cctcaacgga ggggacttaa tgtaccacat ccaaagctgc 1440
cacaagttcg acctttccag agcgacgttt tatgctgctg aaatcattct tggctctgcag 1500
ttccttcatt ccaaaggaat agtctacagg gacctgaagc tagataacat cctgttagac 1560
aaagatggac atatcaagat cgcggatttt ggaatgtgca aggagaacat gttaggagat 1620
gccaagacga ataccttctg tgggacacct gactacatcg ccccagagat cttgctgggt 1680
cagaaataca accactctgt ggactggttg tccttcgggg ttctccttta tgaatgctg 1740
attggtcagt cgctttcca cgggcaggat gaggaggagc tcttccactc catccgcatg 1800
gacaatccct tttaccacg gtggctggag aaggaaagcaa aggaccttct ggtgaagctc 1860
ttcgtgagag aacctgagaa gaggtgggc gtgaggggag acatccgcca gcacctttg 1920
tttcgggaga tcaactggga ggaactttaa cggaaaggaga ttgaccacc gttccggccg 1980
aaagtgaat caccatttga ctgcagcaat ttcgacaaag aattctttaa cgagaagccc 2040
cggctgtcat ttgccgacag agcactgatc aacagcatgg accagaatat gttcaggaac 2100
tttctcttca tgaaccccg gatggagcgg ctgatctct gaatcttgc cctccagaga 2160

```

20

30

```

caggaaagaa ttgccttct cctgggaac tggttcaaga gacactgctt gggttccttt 2220
ttcaacttgg aaaaagaaaag aaacactcaa caataaagac tgagaccgt tgcgcccat 2280
gtgactttat ctgtagcaga aaccaagtct acttactaa tgacgatgcc gtgtgtctcg 2340
tctcctgaca tgtctcacag acgctcctga agttaggta ttactaacca tagttattta 2400
cttgaagat gggctccgc acttggaag gttcaagac ttgatactgc aataaattat 2460
ggctcttcac ctgggcgcca actgctgac aacgaaatgc ttgttgaatc aggggcaaac 2520
ggagtacaga cgtctcaaga ctgaaacggc cccattgcct ggtctagtag cggatctcac 2580
tcagcccgag acaagtaatc actaaccgt tttattctat cctatctgtg gatgtataaa 2640
tgctgggggc cagccctgga taggttttta tgggaattct ttacaataaa catagcttgt 2700
acttg

```

```

<210> 2
<211> 706
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

10

```

<400> 2
Met Ser Pro Phe Leu Arg Ile Gly Leu Ser Asn Phe Asp Cys Gly Ser
1 5 10 15
Cys Gln Ser Cys Gln Gly Glu Ala Val Asn Pro Tyr Cys Ala Val Leu
20 25 30
Val Lys Glu Tyr Val Glu Ser Glu Asn Gly Gln Met Tyr Ile Gln Lys
35 40 45
Lys Pro Thr Met Tyr Pro Pro Trp Asp Ser Thr Phe Asp Ala His Ile
50 55 60
Asn Lys Gly Arg Val Met Gln Ile Ile Val Lys Gly Lys Asn Val Asp
65 70 75 80
Leu Ile Ser Glu Thr Thr Val Glu Leu Tyr Ser Leu Ala Glu Arg Cys
85 90 95
Arg Lys Asn Asn Gly Lys Thr Glu Ile Trp Leu Glu Leu Lys Pro Gln
100 105 110
Gly Arg Met Leu Met Asn Ala Arg Tyr Phe Leu Glu Met Ser Asp Thr
115 120 125
Lys Asp Met Asn Glu Phe Glu Thr Glu Gly Phe Phe Ala Leu His Gln
130 135 140
Arg Arg Gly Ala Ile Lys Gln Ala Lys Val His His Val Lys Cys His
145 150 155 160
Glu Phe Thr Ala Thr Phe Phe Pro Gln Pro Thr Phe Cys Ser Val Cys
165 170 175
His Glu Phe Val Trp Gly Leu Asn Lys Gln Gly Tyr Gln Cys Arg Gln
180 185 190
Cys Asn Ala Ala Ile His Lys Lys Cys Ile Asp Lys Val Ile Ala Lys
195 200 205
Cys Thr Gly Ser Ala Ile Asn Ser Arg Glu Thr Met Phe His Lys Glu
210 215 220
Arg Phe Lys Ile Asp Met Pro His Arg Phe Lys Val Tyr Asn Tyr Lys
225 230 235 240
Ser Pro Thr Phe Cys Glu His Cys Gly Thr Leu Leu Trp Gly Leu Ala
245 250 255
Arg Gln Gly Leu Lys Cys Asp Ala Cys Gly Met Asn Val His His Arg
260 265 270
Cys Gln Thr Lys Val Ala Asn Leu Cys Gly Ile Asn Gln Lys Leu Met
275 280 285
Ala Glu Ala Leu Ala Met Ile Glu Ser Thr Gln Gln Ala Arg Cys Leu
290 295 300
Arg Asp Thr Glu Gln Ile Phe Arg Glu Gly Pro Val Glu Ile Gly Leu
305 310 315 320
Pro Cys Ser Ile Lys Asn Glu Ala Arg Pro Pro Cys Leu Pro Thr Pro
325 330 335
Gly Lys Arg Glu Pro Gln Gly Ile Ser Trp Glu Ser Pro Leu Asp Glu
340 345 350

```

20

30

40

Val Asp Lys Met Cys His Leu Pro Glu Pro Glu Leu Asn Lys Glu Arg
 355 360 365
 Pro Ser Leu Gln Ile Lys Leu Lys Ile Glu Asp Phe Ile Leu His Lys
 370 375 380
 Met Leu Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Phe Leu Ala Glu Phe Lys
 385 390 395 400
 Lys Thr Asn Gln Phe Phe Ala Ile Lys Ala Leu Lys Lys Asp Val Val
 405 410 415
 Leu Met Asp Asp Val Glu Cys Thr Met Val Glu Lys Arg Val Leu
 420 425 430
 Ser Leu Ala Trp Glu His Pro Phe Leu Thr His Met Phe Cys Thr Phe
 435 440 445
 Gln Thr Lys Glu Asn Leu Phe Phe Val Met Glu Tyr Leu Asn Gly Gly
 450 455 460
 Asp Leu Met Tyr His Ile Gln Ser Cys His Lys Phe Asp Leu Ser Arg
 465 470 475 480
 Ala Thr Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ile Leu Gly Leu Gln Phe Leu His
 485 490 495
 Ser Lys Gly Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys Leu Asp Asn Ile Leu Leu
 500 505 510
 Asp Lys Asp Gly His Ile Lys Ile Ala Asp Phe Gly Met Cys Lys Glu
 515 520 525
 Asn Met Leu Gly Asp Ala Lys Thr Asn Thr Phe Cys Gly Thr Pro Asp
 530 535 540
 Tyr Ile Ala Pro Glu Ile Leu Leu Gly Gln Lys Tyr Asn His Ser Val
 545 550 555 560
 Asp Trp Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Tyr Glu Met Leu Ile Gly Gln
 565 570 575
 Ser Pro Phe His Gly Gln Asp Glu Glu Leu Phe His Ser Ile Arg
 580 585 590
 Met Asp Asn Pro Phe Tyr Pro Arg Trp Leu Glu Lys Glu Ala Lys Asp
 595 600 605
 Leu Leu Val Lys Leu Phe Val Arg Glu Pro Glu Lys Arg Leu Gly Val
 610 615 620
 Arg Gly Asp Ile Arg Gln His Pro Leu Phe Arg Glu Ile Asn Trp Glu
 625 630 635 640
 Glu Leu Glu Arg Lys Glu Ile Asp Pro Pro Phe Arg Pro Lys Val Lys
 645 650 655
 Ser Pro Phe Asp Cys Ser Asn Phe Asp Lys Glu Phe Leu Asn Glu Lys
 660 665 670
 Pro Arg Leu Ser Phe Ala Asp Arg Ala Leu Ile Asn Ser Met Asp Gln
 675 680 685
 Asn Met Phe Arg Asn Phe Ser Phe Met Asn Pro Gly Met Glu Arg Leu
 690 695 700
 Ile Ser
 705

10

20

30

<210> 3
 <211> 2888
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 actagctgtc gctccacagg cgagcagggc aggcgtgctg gcggggtgggt ggtggaggct 60
 gcgagggtgc acggccggcc ctgggcaggc ggtagccatg gagctgtggc gccaatgcac 120
 ccaactggctc atccagtgcc ggggtctgcc gccacggcc cgcgtgacct gggatggggc 180
 tcagggtgtgt gaactggccc aggcctccg ggatgggtgc cttctgtgtc agctgcttaa 240
 caacctgcta ccccatgcca tcaacctgcg tgaggtcaac ctgcgcccc agatgtccca 300
 gttctctgtc cttaagaaca ttagaacctt cctgtccacc tgctgtgaga agttcggcct 360
 caagcggagc gagctcttcg aagcctttga cctcttcgat gtgcaggatt ttggcaaggt 420

```

catctacacc ctgtctgctc tgtcctggac cccgatcgcc cagaacaggg ggatcatgcc 480
cttccccacc gaggaggaga gtgtaggatg tgaagacatc tacagtggcc tgtccgacca 540
gatcgcagac acgggtggagg aggatgaggc cctgtatgac tgcgtggaga atgaggaggc 600
ggaaggcgac gagatctatg aggacctcat gcgctcggag cccgtgtcca tgcgcccaa 660
gatgacagag tatgacaagc gctgctgctg cctgcgggag atccagcaga cggaggagaa 720
gtacactgac acgctgggct ccatccagca gcatttcttg aagcccctgc aacggttctt 780
gaaacctcaa gacattgaga tcatctttat caacattgag gacctgcttc gtgttcatac 840
tcacttctta aaggagatga aggaagccct gggcaccctt ggcgcagcca atctctacca 900
ggtcttcatc aaatacaagg agaggttcct cgtctatggc cgctactgca gccagggtga 960
gtcagccagc aaacacctgg accgtgtggc cgcagcccgg gaggacgtgc agatgaagct 1020
ggaggaatgt tctcagagag ccaacaacgg gaggttcacc ctgcgggacc tgctgatggt 1080
gcctatgcag cgagtcttca aatatcacct ccttctccag gagctgggtg aacacacgca 1140
ggaggcagat gagaaggaga acctgcggct ggcctggat gccatgaggg acctggctca 1200
gtgcgtgaac gagggtcaagc gagacaacga gacctgcga cagatcacca atttccagct 1260
gtccattgag aacctggacc agtctctggc tcactatggc cggcccaaga tgcacgggga 1320
actcaagatc acctcggtgg aacggcgctc caagatggac aggtatgcct tctgctcga 1380
caaagctcta ctcatctgta agcgcagggg agactcctat gacctcaagg actttgtaa 1440
cctgcacagc ttcaggttc gggatgactc ttcaggagac cgagacaaca agaagtggag 1500
ccacatgttc ctctgatcg aggaccaagg tccccaggc tatgagctgt tcttcaagac 1560
aagagaattg aagaagaagt ggatggagca gtttgagatg gccatctcca acatctatcc 1620
ggagaatgcc accgccaacg ggcagactt ccagatgttc tctttgagg agaccacatc 1680
ctgcaaggcc tgcagatgc tgccttagag taccttctat cagggtacc gctgccatcg 1740
gtgcccggca tctgcacaca aggagtgtct ggggagggtc cctccatgtg gccgacatgg 1800
gcaagatttc ccaggaacta tgaagaagga caaactacat ccaggggtc aggacaaaaa 1860
gaggaatgag ctgggtctgc ccaagatgga ggtgtttcag gaatactacg ggcttctctc 1920
acccctgga gccattggac ccttctacg gctcaacctt ggagacattg tggagctcac 1980
gaaggctgag gctgaacaga actggtggga gggcagaaat acatctacta atgaaattgg 2040
ctggttctct tgtaacaggg tgaagcccta tgtccatggc cctcctcagg acctgtctgt 2100
tcctctctgg taocgaggcc ccatggagcg ggcaggggca gagagcatcc tggccaaccg 2160
ctcggacggg acttctctgg tgcggcagag ggtgaaggat gcagcagaat ttgccatcag 2220
cattaaatat aacgtcgagg tcaagcacat taaaatcatg acagcagaag gactgtaccg 2280
gatcacagag aaaaaggctt tccggggctt tacggagctg gtggagttt accagcagaa 2340
ctctctaaag gattgcttca agtctctgga caccacctg cagttcccct tcaaggagcc 2400
tgaaaagaga accatcagca gccagcagc ggaagcaca aagtattttg gcacagccaa 2460
agcccgtat gacttctgcg cccgagaccg atcagagctg tcgctcaagg agggtgacat 2520
catcaagatc cttaacaaga agggacagca aggtggtgg cgaggggaga tctatggccg 2580
ggttggctgg ttcctgcca actacgtgga ggaagattat tctgaatact gctgagccct 2640
ggtgccttgg cagagagacg agaaactcca ggctctgagc ccggcgtggg caggcagcgg 2700
agccaggggc tbtgacagct cccggcgggt ggagactttg ggtggactg gaggagcga 2760
gcgtccagct ggcggtgctc ccgggatgtg cctgacatg gttaatattt aacaccccga 2820
ttcctcttg ggtcccctca agcagacggg gctcaagggg gttacattta ataaaaggat 2880
gaagatgg 2888

```

10

20

```

<210> 4
<211> 845
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

30

```

<400> 4
Met Glu Leu Trp Arg Gln Cys Thr His Trp Leu Ile Gln Cys Arg Val
1 5 10 15
Leu Pro Pro Ser His Arg Val Thr Trp Asp Gly Ala Gln Val Cys Glu
20 25 30
Leu Ala Gln Ala Leu Arg Asp Gly Val Leu Leu Cys Gln Leu Leu Asn
35 40 45
Asn Leu Leu Pro His Ala Ile Asn Leu Arg Glu Val Asn Leu Arg Pro
50 55 60
Gln Met Ser Gln Phe Leu Cys Leu Lys Asn Ile Arg Thr Phe Leu Ser
65 70 75 80
Thr Cys Cys Glu Lys Phe Gly Leu Lys Arg Ser Glu Leu Phe Glu Ala
85 90 95

```

40

Phe Asp Leu Phe Asp Val Gln Asp Phe Gly Lys Val Ile Tyr Thr Leu
 100 105 110
 Ser Ala Leu Ser Trp Thr Pro Ile Ala Gln Asn Arg Gly Ile Met Pro
 115 120 125
 Phe Pro Thr Glu Glu Glu Ser Val Gly Asp Glu Asp Ile Tyr Ser Gly
 130 135 140
 Leu Ser Asp Gln Ile Asp Asp Thr Val Glu Glu Asp Glu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160
 Asp Cys Val Glu Asn Glu Glu Ala Glu Gly Asp Glu Ile Tyr Glu Asp
 165 170 175
 Leu Met Arg Ser Glu Pro Val Ser Met Pro Pro Lys Met Thr Glu Tyr
 180 185 190
 Asp Lys Arg Cys Cys Cys Leu Arg Glu Ile Gln Gln Thr Glu Glu Lys
 195 200 205
 Tyr Thr Asp Thr Leu Gly Ser Ile Gln Gln His Phe Leu Lys Pro Leu
 210 215 220
 Gln Arg Phe Leu Lys Pro Gln Asp Ile Glu Ile Ile Phe Ile Asn Ile
 225 230 235 240
 Glu Asp Leu Leu Arg Val His Thr His Phe Leu Lys Glu Met Lys Glu
 245 250 255
 Ala Leu Gly Thr Pro Gly Ala Ala Asn Leu Tyr Gln Val Phe Ile Lys
 260 265 270
 Tyr Lys Glu Arg Phe Leu Val Tyr Gly Arg Tyr Cys Ser Gln Val Glu
 275 280 285
 Ser Ala Ser Lys His Leu Asp Arg Val Ala Ala Ala Arg Glu Asp Val
 290 295 300
 Gln Met Lys Leu Glu Glu Cys Ser Gln Arg Ala Asn Asn Gly Arg Phe
 305 310 315 320
 Thr Leu Arg Asp Leu Leu Met Val Pro Met Gln Arg Val Leu Lys Tyr
 325 330 335
 His Leu Leu Leu Gln Glu Leu Val Lys His Thr Gln Glu Ala Met Glu
 340 345 350
 Lys Glu Asn Leu Arg Leu Ala Leu Asp Ala Met Arg Asp Leu Ala Gln
 355 360 365
 Cys Val Asn Glu Val Lys Arg Asp Asn Glu Thr Leu Arg Gln Ile Thr
 370 375 380
 Asn Phe Gln Leu Ser Ile Glu Asn Leu Asp Gln Ser Leu Ala His Tyr
 385 390 395 400
 Gly Arg Pro Lys Ile Asp Gly Glu Leu Lys Ile Thr Ser Val Glu Arg
 405 410 415
 Arg Ser Lys Met Asp Arg Tyr Ala Phe Leu Leu Asp Lys Ala Leu Leu
 420 425 430
 Ile Cys Lys Arg Arg Gly Asp Ser Tyr Asp Leu Lys Asp Phe Val Asn
 435 440 445
 Leu His Ser Phe Gln Val Arg Asp Ser Ser Gly Asp Arg Asp Asn
 450 455 460
 Lys Lys Trp Ser His Met Phe Leu Leu Ile Glu Asp Gln Gly Ala Gln
 465 470 475 480
 Gly Tyr Glu Leu Phe Phe Lys Thr Arg Glu Leu Lys Lys Lys Trp Met
 485 490 495
 Glu Gln Phe Glu Met Ala Ile Ser Asn Ile Tyr Pro Glu Asn Ala Thr
 500 505 510
 Ala Asn Gly His Asp Phe Gln Met Phe Ser Phe Glu Glu Thr Thr Ser
 515 520 525
 Cys Lys Ala Cys Gln Met Leu Leu Arg Gly Thr Phe Tyr Gln Gly Tyr
 530 535 540
 Arg Cys His Arg Cys Arg Ala Ser Ala His Lys Glu Cys Leu Gly Arg
 545 550 555 560
 Val Pro Pro Cys Gly Arg His Gly Gln Asp Phe Pro Gly Thr Met Lys
 565 570 575

10

20

30

40

Lys Asp Lys Leu His Arg Arg Ala Gln Asp Lys Lys Arg Asn Glu Leu
580 585 590
Gly Leu Pro Lys Met Glu Val Phe Gln Glu Tyr Tyr Gly Leu Pro Pro
595 600 605
Pro Pro Gly Ala Ile Gly Pro Phe Leu Arg Leu Asn Pro Gly Asp Ile
610 615 620
Val Glu Leu Thr Lys Ala Glu Ala Glu Gln Asn Trp Trp Glu Gly Arg
625 630 635 640
Asn Thr Ser Thr Asn Glu Ile Gly Trp Phe Pro Cys Asn Arg Val Lys
645 650 655
Pro Tyr Val His Gly Pro Pro Gln Asp Leu Ser Val His Leu Trp Tyr
660 665 670
Ala Gly Pro Met Glu Arg Ala Gly Ala Glu Ser Ile Leu Ala Asn Arg
675 680 685
Ser Asp Gly Thr Phe Leu Val Arg Gln Arg Val Lys Asp Ala Ala Glu
690 695 700
Phe Ala Ile Ser Ile Lys Tyr Asn Val Glu Val Lys His Ile Lys Ile
705 710 715 720
Met Thr Ala Glu Gly Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Lys Lys Ala Phe Arg
725 730 735
Gly Leu Thr Glu Leu Val Glu Phe Tyr Gln Gln Asn Ser Leu Lys Asp
740 745 750
Cys Phe Lys Ser Leu Asp Thr Thr Leu Gln Phe Pro Phe Lys Glu Pro
755 760 765
Glu Lys Arg Thr Ile Ser Arg Pro Ala Val Gly Ser Thr Lys Tyr Phe
770 775 780
Gly Thr Ala Lys Ala Arg Tyr Asp Phe Cys Ala Arg Asp Arg Ser Glu
785 790 795 800
Leu Ser Leu Lys Glu Gly Asp Ile Ile Lys Ile Leu Asn Lys Lys Gly
805 810 815
Gln Gln Gly Trp Trp Arg Gly Glu Ile Tyr Gly Arg Val Gly Trp Phe
820 825 830
Pro Ala Asn Tyr Val Glu Glu Asp Tyr Ser Glu Tyr Cys
835 840 845

10

20

<210> 5
<211> 4276
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
ccacgcgtcc gccgcggcgc ccgcagccccc ctcccggccc tgcagcccct gggcgggccc 60
cgccccctcg aggacggctc cgggcccggg gggacggagg gcctgggtgc ctggagggaag 120
ccggaggcct gcgtggagga ggcgccccgc gcagctggct ggcggagcat gagcgcccca 180
gatcccaagc actgcaagtc cagatgcaac gggagcctgg ctcaaggac gacaagatcc 240
agccgaaaag tgtagaagtc acaccccaat ggcgggatag cagcccctgt gtgtgagcac 300
ccctccatgc caggaggagg gccagagatg gatgactaca tggagacgct gaaggatgaa 360
gaggacgcct tgtgggagaa tgtggagtgt aaccggcaca tgctcagccg ctatatcaac 420
cctgccaagc tcacgcccta cctgcgtcag tctaaggtca ttgatgagca ggatgaagat 480
gaagtgctta atgcccctat gctgccatcc aagatcaacc gagcaggccg gctggtggac 540
attctacata ccaaggggca aaggggctat gtggtcttct tggagagcct agaattttat 600
taccagaaac tgtacaaact ggtgactggg aaagagccca ctcggagatt ctccaccatt 660
gtggtggagg aaggccacga ggcctcacg cacttcctga tgaacgaggt catcaagctg 720
cagcagcaga tgaaggccaa ggacctgcaa cgctgcgagc tgctggccag gttgcccag 780
ctggaggatg agaagaagca gatgacgctg acgcgcgtgg agctgctaac cttccaggag 840
cggtaactaca agatgaagga agagcgggac agctacaatg acgagctggt caaggatgaa 900
gacgacaact acaacttagc catgcgctac gcacagctca gtgaggagaa gaacatggcg 960
gtcatgagga gccgagacct ccaactcgag atcgatcagc taaagcaccg gttgaataag 1020
atggaggagg aatgtaagct ggagagaaat cagtctctaa aactgaagaa tgacattgaa 1080
aatcggccca agaaggagca ggttctggaa ctggagcggg agaataaat gctgaagacc 1140

30

40

```

aaaaaccagg agctgcagtc catcatccag gccgggaagc gcagcctgcc agactcagac 1200
aaggccatcc tggacatctt ggaacacgac cgcaaggagg ccctggagga caggcaggag 1260
ctgggtcaaca ggatctacaa cctgcaggag gaggcccgcc aggcagagga gctgcgagac 1320
aagtacctgg aggagaagga ggacctggag ctcaagtgtc cgacctggg aaaggactgt 1380
gaaatgtaca agcaccgcat gaacacggtc atgctgcagc tggaggagggt ggagcgggag 1440
cgggaccagg ccttccactc ccgagatgaa gctcagacac agtactcgca gtgcttaatc 1500
gaaaagaca agtacaggaa gcagatccgc gagctggagg agaagaacga cgagatgagg 1560
atcgagatgg tgcggcgga ggctgcatc gtcaacctgg agagcaagct gcggcgcctc 1620
tccaaggaca gcaacaacct ggaccagagt ctgcccagga acctgccagt aaccatcadc 1680
tctcaggact ttggggatgc cagccccagg accaatggtc aagaagctga cgattctctc 1740
acctcgagg agtacacctg agacagcaag tacttcctgc cctaccatcc gccccagcgc 1800
aggatgaacc tgaaggcctc ccagctgcag agagccaaat cccccatcag cctgaagcga 1860
acatcagatt ttcaagccaa ggggcacgag gaagaaggca cggacgccag ccttagctcc 1920
tgcggatctc tgcccacac caactcctc accaagatgc agccccccg gagccgcagc 1980
agcatcatgt caatcacccg cgagccccg ggaacgact ccatcgtcag acgctacaag 2040
gaggacgagc cagctgcagc cacagtgcga gaagacaatg acagcggcgg gtttgacgcc 2100
ttagatctgg atgatgacag tcacgaacgc tactcctcgc gacctcctc catccactcc 2160
tcctcctcct cccaccatc cgaggcctg gatgcctacg acctggagca ggtcaacctc 2220
atggtcagga agttctctc ggaaagacc ttccggcctt cggtcacctc tgtggggcac 2280
gtgcggggcc cagtgccctc ggtgcagcac acgacgtgga atggcgacag cctcacctcc 2340
cagctcacc tgctgggggg caacgcgcga gggagctcgc tgcactcggc caagcctggc 2400
tctctggccc agaaagccgg cctccgtgag gccaccagc tgcctgctgt agaaggctgc 2460
atccgaggg agaggcagag tgtcccgtt gacacatgca ccaaagagga agcccactgg 2520
accatccaga ggtgcagcgg ccccgtcacg ctgcactaca aggtcaacca cgaagggtac 2580
cggaaactgg tgaaggacat ggaggacggc ctgatcacat cgggggactc gttctacatc 2640
cggctgaacc tgaacatctc cagccagctg gacgcctgca ccatgtccct gaagtgtgac 2700
gatgtgtgac acgtccgtga caccatgtac caggacaggc acgagtggtc gtgcgcgcgg 2760
gtcgaccctt tcacagacca tgacctggat atggggacca taccagcta cagccgagcc 2820
cagcagctcc tcctggtgaa actgcagcgc ctgatgcacc gaggcagccg ggaggaggta 2880
gacggcacc accacacct gcgggactc cggaaacacc tcagccgga agaagcgtt 2940
tcaacaagc acccccgggt cagccccgt ctctcgcgag caagctcct ttttggccag 3000
ctcctcagc tgcgcagcag gtccgagaac aagtabaagc ggatgaacag caacgagcgg 3060
gtccgcata tcctggggag tccgctaggg agcctggccc ggtcctcgt ggacgccacc 3120
aagctcttga ctgagaagca ggaagagctg gacctgaga gcgagctgg caagaacctc 3180
agcctcacc cctacagcct ggtacgcgc ttctactgag agcgcgcgg gcccgctgc 3240
ttcacaccca cagtgcctgg caagacgctg gtgcagaggc tgcactcact gggagggtgc 3300
atggagttca ccatctgcaa gtcagatcgc gtcacaagag atgagttcct cagaaggcag 3360
aagacggaga ccatcatcta ctccgagag aagaacccca acgcttctga atgcatcgc 3420
cctgccaaca ttgaagctgt ggccgccaa aacaagcact gcctgctgga ggctgggatc 3480
ggctgcaaa gagacttgat caagtccaac atctaccca tcgtgctct catccgggtg 3540
tgtgagaaga acatcaagag gttcagaaag ctgctgcccc ggctgagac ggaggaggag 3600
ttcctgcgag tgtgccggct gaaggagaag gagctggagg ccctgccgtg cctgtacgcc 3660
acggtggaac ctgacatgtg gggcagcgtg gaggagctgc tccgcgttgt caaggacaag 3720
atcggcgagg agcagcga gacctctgg gtggacgagg accagctgtg agggggcgc 3780
cctgggcaga gagactctgt ggcgcggggc atcctatgag gcaggcacc tgggcagaga 3840
gatgcagtgg gtgcgggggg atcctgtggc ccacagagct gcccagcag acgctccgcc 3900
ccaccgggtg atggagcccc ggggggacag tcgtgcctgg ggaggagcag ggtacagccc 3960
attccccag ccctggctga cctggcctag cagtttggcc ctgctggcct tagcaggggag 4020
acaggggagc aaagaacgcc aagccggagg cccgagcca gccggcctc cgagagccag 4080
agcagcagtt gaatgtaatg ctggggacag gcatgctgcc gccagtaggg cggggaccgc 4140
gacagccagg tgactaccag tcctggggac acactacca taaacacatc ccagggcagg 4200
acagatcggg gaaggggtgt gtaccaggct atgatttctc ttgcattaaa atgtattatt 4260
aaaaaaaa aaaaaa

```

10

20

30

```

<210> 6
<211> 1147
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 6
 Met Asp Asp Tyr Met Glu Thr Leu Lys Asp Glu Glu Asp Ala Leu Trp
 1 5 10 15
 Glu Asn Val Glu Cys Asn Arg His Met Leu Ser Arg Tyr Ile Asn Pro
 20 25 30
 Ala Lys Leu Thr Pro Tyr Leu Arg Gln Cys Lys Val Ile Asp Glu Gln
 35 40 45
 Asp Glu Asp Glu Val Leu Asn Ala Pro Met Leu Pro Ser Lys Ile Asn
 50 55 60
 Arg Ala Gly Arg Leu Leu Asp Ile Leu His Thr Lys Gly Gln Arg Gly
 65 70 75 80
 Tyr Val Val Phe Leu Glu Ser Leu Glu Phe Tyr Tyr Pro Glu Leu Tyr
 85 90 95
 Lys Leu Val Thr Gly Lys Glu Pro Thr Arg Arg Phe Ser Thr Ile Val
 100 105 110
 Val Glu Glu Gly His Glu Gly Leu Thr His Phe Leu Met Asn Glu Val
 115 120 125
 Ile Lys Leu Gln Gln Gln Met Lys Ala Lys Asp Leu Gln Arg Cys Glu
 130 135 140
 Leu Leu Ala Arg Leu Arg Gln Leu Glu Asp Glu Lys Lys Gln Met Thr
 145 150 155 160
 Leu Thr Arg Val Glu Leu Leu Thr Phe Gln Glu Arg Tyr Tyr Lys Met
 165 170 175
 Lys Glu Glu Arg Asp Ser Tyr Asn Asp Glu Leu Val Lys Val Lys Asp
 180 185 190
 Asp Asn Tyr Asn Leu Ala Met Arg Tyr Ala Gln Leu Ser Glu Glu Lys
 195 200 205
 Asn Met Ala Val Met Arg Ser Arg Asp Leu Gln Leu Glu Ile Asp Gln
 210 215 220
 Leu Lys His Arg Leu Asn Lys Met Glu Glu Glu Cys Lys Leu Glu Arg
 225 230 235 240
 Asn Gln Ser Leu Lys Leu Lys Asn Asp Ile Glu Asn Arg Pro Lys Lys
 245 250 255
 Glu Gln Val Leu Glu Leu Glu Arg Glu Asn Glu Met Leu Lys Thr Lys
 260 265 270
 Asn Gln Glu Leu Gln Ser Ile Ile Gln Ala Gly Lys Arg Ser Leu Pro
 275 280 285
 Asp Ser Asp Lys Ala Ile Leu Asp Ile Leu Glu His Asp Arg Lys Glu
 290 295 300
 Ala Leu Glu Asp Arg Gln Glu Leu Val Asn Arg Ile Tyr Asn Leu Gln
 305 310 315 320
 Glu Glu Ala Arg Gln Ala Glu Glu Leu Arg Asp Lys Tyr Leu Glu Glu
 325 330 335
 Lys Glu Asp Leu Glu Leu Lys Cys Ser Thr Leu Gly Lys Asp Cys Glu
 340 345 350
 Met Tyr Lys His Arg Met Asn Thr Val Met Leu Gln Leu Glu Glu Val
 355 360 365
 Glu Arg Glu Arg Asp Gln Ala Phe His Ser Arg Asp Glu Ala Gln Thr
 370 375 380
 Gln Tyr Ser Gln Cys Leu Ile Glu Lys Asp Lys Tyr Arg Lys Gln Ile
 385 390 395 400
 Arg Glu Leu Glu Glu Lys Asn Asp Glu Met Arg Ile Glu Met Val Arg
 405 410 415
 Arg Glu Ala Cys Ile Val Asn Leu Glu Ser Lys Leu Arg Arg Leu Ser
 420 425 430
 Lys Asp Ser Asn Asn Leu Asp Gln Ser Leu Pro Arg Asn Leu Pro Val
 435 440 445
 Thr Ile Ile Ser Gln Asp Phe Gly Asp Ala Ser Pro Arg Thr Asn Gly
 450 455 460
 Gln Glu Ala Asp Asp Ser Ser Thr Ser Glu Glu Ser Pro Glu Asp Ser
 465 470 475 480

10

20

30

Lys Tyr Phe Leu Pro Tyr His Pro Pro Gln Arg Arg Met Asn Leu Lys
 485 490 495
 Gly Ile Gln Leu Gln Arg Ala Lys Ser Pro Ile Ser Leu Lys Arg Thr
 500 505 510
 Ser Asp Phe Gln Ala Lys Gly His Glu Glu Gly Thr Asp Ala Ser
 515 520 525
 Pro Ser Ser Cys Gly Ser Leu Pro Ile Thr Asn Ser Phe Thr Lys Met
 530 535 540
 Gln Pro Pro Arg Ser Arg Ser Ser Ile Met Ser Ile Thr Ala Glu Pro
 545 550 555 560
 Pro Gly Asn Asp Ser Ile Val Arg Arg Tyr Lys Glu Asp Ala Pro His
 565 570 575
 Arg Ser Thr Val Glu Glu Asp Asn Asp Ser Gly Gly Phe Asp Ala Leu
 580 585 590
 Asp Leu Asp Asp Asp Ser His Glu Arg Tyr Ser Phe Gly Pro Ser Ser
 595 600 605
 Ile His Ser Ser Ser Ser Ser His Gln Ser Glu Gly Leu Asp Ala Tyr
 610 615 620
 Asp Leu Glu Gln Val Asn Leu Met Phe Arg Lys Phe Ser Leu Glu Arg
 625 630 635 640
 Pro Phe Arg Pro Ser Val Thr Ser Val Gly His Val Arg Gly Pro Gly
 645 650 655
 Pro Ser Val Gln His Thr Thr Leu Asn Gly Asp Ser Leu Thr Ser Gln
 660 665 670
 Leu Thr Leu Leu Gly Gly Asn Ala Arg Gly Ser Phe Val His Ser Val
 675 680 685
 Lys Pro Gly Ser Leu Ala Glu Lys Ala Gly Leu Arg Glu Gly His Gln
 690 695 700
 Leu Leu Leu Leu Glu Gly Cys Ile Arg Gly Glu Arg Gln Ser Val Pro
 705 710 715 720
 Leu Asp Thr Cys Thr Lys Glu Glu Ala His Trp Thr Ile Gln Arg Cys
 725 730 735
 Ser Gly Pro Val Thr Leu His Tyr Lys Val Asn His Glu Gly Tyr Arg
 740 745 750
 Lys Leu Val Lys Asp Met Glu Asp Gly Leu Ile Thr Ser Gly Asp Ser
 755 760 765
 Phe Tyr Ile Arg Leu Asn Leu Asn Ile Ser Ser Gln Leu Asp Ala Cys
 770 775 780
 Thr Met Ser Leu Lys Cys Asp Asp Val Val His Val Arg Asp Thr Met
 785 790 795 800
 Tyr Gln Asp Arg His Glu Trp Leu Cys Ala Arg Val Asp Pro Phe Thr
 805 810 815
 Asp His Asp Leu Asp Met Gly Thr Ile Pro Ser Tyr Ser Arg Ala Gln
 820 825 830
 Gln Leu Leu Leu Val Lys Leu Gln Arg Leu Met His Arg Gly Ser Arg
 835 840 845
 Glu Glu Val Asp Gly Thr His His Thr Leu Arg Ala Leu Arg Asn Thr
 850 855 860
 Leu Gln Pro Glu Glu Ala Leu Ser Thr Ser Asp Pro Arg Val Ser Pro
 865 870 875 880
 Arg Leu Ser Arg Ala Ser Phe Leu Phe Gly Gln Leu Leu Gln Phe Val
 885 890 895
 Ser Arg Ser Glu Asn Lys Tyr Lys Arg Met Asn Ser Asn Glu Arg Val
 900 905 910
 Arg Ile Ile Ser Gly Ser Pro Leu Gly Ser Leu Ala Arg Ser Ser Leu
 915 920 925
 Asp Ala Thr Lys Leu Leu Thr Glu Lys Gln Glu Glu Leu Asp Pro Glu
 930 935 940
 Ser Glu Leu Gly Lys Asn Leu Ser Leu Ile Pro Tyr Ser Leu Val Arg
 945 950 955 960

10

20

30

Ala Phe Tyr Cys Glu Arg Arg Arg Pro Val Leu Phe Thr Pro Thr Val
965 970 975
Leu Ala Lys Thr Leu Val Gln Arg Leu Leu Asn Ser Gly Gly Ala Met
980 985 990
Glu Phe Thr Ile Cys Lys Ser Asp Ile Val Thr Arg Asp Glu Phe Leu
995 1000 1005
Arg Arg Gln Lys Thr Glu Thr Ile Ile Tyr Ser Arg Glu Lys Asn Pro
1010 1015 1020
Asn Ala Phe Glu Cys Ile Ala Pro Ala Asn Ile Glu Ala Val Ala Ala
1025 1030 1035 1040
Lys Asn Lys His Cys Leu Leu Glu Ala Gly Ile Gly Cys Thr Arg Asp
1045 1050 1055
Leu Ile Lys Ser Asn Ile Tyr Pro Ile Val Leu Phe Ile Arg Val Cys
1060 1065 1070
Glu Lys Asn Ile Lys Arg Phe Arg Lys Leu Leu Pro Arg Pro Glu Thr
1075 1080 1085
Glu Glu Glu Phe Leu Arg Val Cys Arg Leu Lys Glu Lys Glu Leu Glu
1090 1095 1100
Ala Leu Pro Cys Leu Tyr Ala Thr Val Glu Pro Asp Met Trp Gly Ser
1105 1110 1115 1120
Val Glu Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Asp Lys Ile Gly Glu Glu Gln
1125 1130 1135
Arg Lys Thr Ile Trp Val Asp Glu Asp Gln Leu
1140 1145

10

<210> 7
<211> 2809
<212> DNA
<213> Homo sapiens

20

<400> 7
tttttttttt tttttgcttt cccgtttctt aaacattggc gttcccaagt ttctccttgg 60
tctctcctgt atttttatct actctcgtag cttcaaatac catctagttt atagttttatt 120
tagcatgttg tccaagccac cgtcttgggc ccagggtctt acctgtagct tttcatccac 180
acttctcagg ttgcttctta cacagcgcga tagtagttaa aatacggctt ggggatagtc 240
gtctcttcat cagtctcccc cgacgacctg cgcaggcgtg gcttgaggaa acgcccgtg 300
tgggaggagc caccgaaaag gctccggctg ggggcgggaa caggatcggc ccgcccgtg 360
ggctcgatag gctgcccag agacaggcg ggctctgcta agggacgcgc ctccgctg 420
ggcgggtcct gcgctgagc ctctacgaga gggaaggaa gctgctccga gctccgctc 480
gcgtcgcgta gattcgcgct gccgtcgacc tcagaggcgg ggccggaagc gctacggtt 540
gacccccgag tccctctgtt cccgaagggg cggccgtctt tctcccgacc cgtccgct 600
cctctccttc ttcccatta cccggaggcc gaagccccc gccagggcgg ggccggcgag 660
cccgagctcc cggaccggga agaagcgcca tctcccgcct ccaccatgga gccaccgca 720
ccgtccctca ccgaggagga cctcactgaa gtgaagaagg acgccttaga aaatttacgt 780
gtatacctgt gtgagaaaat catagctgag agacattttg atcatctacg tgcacaaaaa 840
atactcagta gagaagacac tgaagaaatt tcttgtcgaa catcaagtag aaaaagggt 900
ggaaaaattgt tagactactt acaggaaac ccaaaaggtc tggacacct tgttgaatct 960
attcggcgag aaaaaacaca gaacttctg atacagaaga ttacagatga agtgctgaaa 1020
cttagaaaata taaaactaga acatctgaaa ggactaaaat gtagcagttg tgaacctttt 1080
ccagatggag ccacgaacaa cctctccaga tcaaattcag atgagagtaa tttctctgaa 1140
aaactgaggg catccactgt catgtacat ccagaaggag aatccagcac gacgcccttt 1200
tttttacta attcttctct gaatttgctt gttctagaag taggcagaac tgaataatcc 1260
atcttctctt caactacact tcccagacct ggggaccag gggctcctcc tttgccacca 1320
gatctacagt tagaagaaga aggaacttgt gcaaaactcta gtgagatggt tcttccctta 1380
agatcacgta ctgtttcacg acaatgacac tttattgcct ttaattttt aatgatgaca 1440
aaaaatgttt taaagaatat gactttttat aaaatggctg taatcatttg tttacatttg 1500
atgcatgtct ttaaaaatgc aatgtaagca tactttgtaa ataggatttt tagaattaaa 1560
aaagcatact tctaggatag ctaactgtaa atcatgttga tcatgtactt tttagtaatt 1620
cttttttttc ctttttaagg tctttcagta cttttttaa tttttctat ttaagactg 1680
attttaatag ggaatatatc tctatttgag aatagacct tactaggaag aacgtttttt 1740

30

40

```

cctcagtgca tttgtgctag aaatthtcaa gagtctaata gtctttgcca gtcattcagc 1800
agcaaatttt cagcattaag ctgttcctgt tcagtaataa aaccgggtcac tgatgggaaa 1860
actgccaata tagaaaaata aaaatctctt ttccactcca ttgtcgtata ggcattgtaa 1920
cagcctcttt ttgatactgg aggaacactt gatggagtgt gagccaccta agatctcggg 1980
ttgccaataat tcatttctaa ttaaccttac taattatact actttgttag gattttcaca 2040
ttcttggtt aatcattttc attcctaaag aaaaatatct tggcctaaac ctcagttatt 2100
acatgtaatt tgatgaggta ttttttcctt tttttttttt tttttttttg agacagtctt 2160
gctctatcgc ccaggctgga gtgcagtgge gcattctagg ctcactgcaa cttctgcctc 2220
ccatgcttac gtgatcctct cacctcagcc tctcaagtaa tatagctgag actacaagtg 2280
tgtgccacca tgcctcacta atttttgtat tttttttgta gagacggtgt tttgccatgt 2340
tggccaggct ggtcttgaac tcctggactc aagcaacctc cccagcgtgg cctcccaaag 2400
tgctgggatt acagacacga gccacctcac cttagcctgat gagattttta aaaaatattt 2460
tctctgtact tttcattctc ttttaatgag gaccaatgta cagttgaaat aactggaaca 2520
aattattttt ggtgtgtgtg acaattctgt ttttaatgct atttgaacaa gtggggccatt 2580
agccagattt gtctttttgt tgtaaaacaa aatttgacta attttacatg tttataaatc 2640
ttatgctctc actgtttgtt tttatttaaa ttacaatttt atctgtttcc tgacattgtc 2700
tcctatatat ttctattatt aattgcaaaa acatagaaat ggaaattttg ctatcaacaa 2760
taaaattttt ttaaagtaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2809

```

10

```

<210> 8
<211> 233
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 8
Met  Lys  Lys  Asp  Ala  Leu  Glu  Asn  Leu  Arg  Val  Tyr  Leu  Cys  Glu  Lys  Ile
1      5      10      15
Lys  Lys  Asp  Ala  Leu  Glu  Asn  Leu  Arg  Val  Tyr  Leu  Cys  Glu  Lys  Ile
20     25     30
Ile  Ala  Glu  Arg  His  Phe  Asp  His  Leu  Arg  Ala  Lys  Lys  Ile  Leu  Ser
35     40     45
Arg  Glu  Asp  Thr  Glu  Glu  Ile  Ser  Cys  Arg  Thr  Ser  Ser  Arg  Lys  Arg
50     55     60
Ala  Gly  Lys  Leu  Leu  Asp  Tyr  Leu  Gln  Glu  Asn  Pro  Lys  Gly  Leu  Asp
65     70     75     80
Thr  Leu  Val  Glu  Ser  Ile  Arg  Arg  Glu  Lys  Thr  Gln  Asn  Phe  Leu  Ile
85     90     95
Gln  Lys  Ile  Thr  Asp  Glu  Val  Leu  Lys  Leu  Arg  Asn  Ile  Lys  Leu  Glu
100    105    110
His  Leu  Lys  Gly  Leu  Lys  Cys  Ser  Ser  Cys  Glu  Pro  Phe  Pro  Asp  Gly
115    120    125
Ala  Thr  Asn  Asn  Leu  Ser  Arg  Ser  Asn  Ser  Asp  Glu  Ser  Asn  Phe  Ser
130    135    140
Glu  Lys  Leu  Arg  Ala  Ser  Thr  Val  Met  Tyr  His  Pro  Glu  Gly  Glu  Ser
145    150    155    160
Ser  Thr  Thr  Pro  Phe  Ser  Thr  Asn  Ser  Ser  Leu  Asn  Leu  Pro  Val
165    170    175
Leu  Glu  Val  Gly  Arg  Thr  Glu  Asn  Thr  Ile  Phe  Ser  Ser  Thr  Thr  Leu
180    185    190
Pro  Arg  Pro  Gly  Asp  Pro  Gly  Ala  Pro  Pro  Leu  Pro  Pro  Asp  Leu  Gln
195    200    205
Leu  Glu  Glu  Glu  Gly  Thr  Cys  Ala  Asn  Ser  Ser  Glu  Met  Phe  Leu  Pro
210    215    220
Leu  Arg  Ser  Arg  Thr  Val  Ser  Arg  Gln
225    230

```

20

30

```

<210> 9
<211> 1550
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

<400> 9

```

tgcgcgcgct cgcgccgcca ggcgccagc gaggaagcag cgcgcagccc gcgccccagc 60
gcaccgcgag cagcgccgcg agctcgtccg cgccatgttc caggcggccg agcgcccca 120
ggagtgggccc atggagggcc cccgcgacgg gctgaagaag gagcggctac tggacgaccg 180
ccacgacagc ggccctggact ccatgaaaga cgaggagtac gagcagatgg tcaaggagct 240
gcaggagatc cgctcagagc cgcaggaggt gccgcgcggc tcggagccct ggaagcagca 300
gctcaccgag gacggggact cgttcctgca cttggccatc atccatgaag aaaaggcact 360
gaccatggaa gtgatccgcc aggtgaaggg agacctggct ttcctcaact tccagaacaa 420
cctgcagcag actccactcc acttggctgt gatcaccaac cagccagaaa ttgctgaggc 480
acttctggga gctggctgtg atcctgagct ccgagacttt cgaggaaata ccccctaca 540
ccttgcctgt gacgagggct gcctggccag cgtggggagt ctagactcagt cctgcaccac 600
cccgcacctc cactccatcc tgaaggctac caactacaat ggccacacgt gtctacactt 660
agcctctatc catggctacc tgggcatcgt ggagcttttg gtgtccttgg gtgctgatgt 720
caatgtctag gagccctgta atggccggac tgccttcac ctgcagtggt acctgcaaaa 780
tcctgacgtg gtgtcactcc tgttgaagtg tggggctgat gtcaacagag ttacctacca 840
gggctattct ccctaccagc tcacctgggg ccgccaagc acccggatac agcagcagct 900
gggcagctg aactagaaa accttcagat gctccagag agtgaggatg aggagagcta 960
tgacacagag tcagagttca cggagttcac agaggacgag ctgccctatg atgactgtgt 1020
gtttgagcgc cagcgtctga cgttatgagt gcaaaggggc tgaagaaca tggacttgta 1080
tatttgtaca aaaaaaagt tttattttc taaaaaaga aaaaagaaga aaaaatttaa 1140
agggtgtact tataaccaca ctgcacactg cctagcccaa aacgtcttat tgtgtagga 1200
tcagccctca ttttgttget tttgtgaact tttgtaggg gacgagaaag atcattgaaa 1260
ttctgagaaa acttctttta aacctcacct ttgtgggggt tttggagaag gttatcaaaa 1320
atctcatgga aggaccacat tttatattta ttgtgcttcg agtgactgac cccagtggta 1380
tcctgtgaca tgtaacagcc aggagtgtta agcgttcagt gatgtgggtt gaaaagttac 1440
tacctgtcaa ggtttgtgtt acctcctgtt aaatggtgta cataatgat tgttggtaat 1500
tattttggtg cttttatgat gtatatttat taaagagatt tttacaaatg 1550

```

10

<210> 10

<211> 317

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 10

```

Met Phe Gln Ala Ala Glu Arg Pro Gln Glu Trp Ala Met Glu Gly Pro
1          5          10          15
Arg Asp Gly Leu Lys Lys Glu Arg Leu Leu Asp Asp Arg His Asp Ser
          20          25          30
Gly Leu Asp Ser Met Lys Asp Glu Tyr Glu Gln Met Val Lys Glu
          35          40          45
Leu Gln Glu Ile Arg Leu Glu Pro Gln Glu Val Pro Arg Gly Ser Glu
          50          55          60
Pro Trp Lys Gln Gln Leu Thr Glu Asp Gly Asp Ser Phe Leu His Leu
65          70          75          80
Ala Ile Ile His Glu Glu Lys Ala Leu Thr Met Glu Val Ile Arg Gln
          85          90          95
Val Lys Gly Asp Leu Ala Phe Leu Asn Phe Gln Asn Asn Leu Gln Gln
          100          105          110
Thr Pro Leu His Leu Ala Val Ile Thr Asn Gln Pro Glu Ile Ala Glu
          115          120          125
Ala Leu Leu Gly Ala Gly Cys Asp Pro Glu Leu Arg Asp Phe Arg Gly
          130          135          140
Asn Thr Pro Leu His Leu Ala Cys Glu Gln Gly Cys Leu Ala Ser Val
          145          150          155          160
Gly Val Leu Thr Gln Ser Cys Thr Thr Pro His Leu His Ser Ile Leu
          165          170          175
Lys Ala Thr Asn Tyr Asn Gly His Thr Cys Leu His Leu Ala Ser Ile
          180          185          190
His Gly Tyr Leu Gly Ile Val Glu Leu Leu Val Ser Leu Gly Ala Asp
          195          200          205

```

30

Val Asn Ala Gln Glu Pro Cys Asn Gly Arg Thr Ala Leu His Leu Ala
 210 215 220
 Val Asp Leu Gln Asn Pro Asp Leu Val Ser Leu Leu Leu Lys Cys Gly
 225 230 235 240
 Ala Asp Val Asn Arg Val Thr Tyr Gln Gly Tyr Ser Pro Tyr Gln Leu
 245 250 255
 Thr Trp Gly Arg Pro Ser Thr Arg Ile Gln Gln Gln Leu Gly Gln Leu
 260 265 270
 Thr Leu Glu Asn Leu Gln Met Leu Pro Glu Ser Glu Asp Glu Glu Ser
 275 280 285
 Tyr Asp Thr Glu Ser Glu Phe Thr Glu Phe Thr Glu Asp Glu Leu Pro
 290 295 300
 Tyr Asp Asp Cys Val Phe Gly Gly Gln Arg Leu Thr Leu
 305 310 315

10

<210> 11
 <211> 3625
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 ggccaccgga gggcccggc gacgatcgt gacagcttc cctgcccttc ccgtcggctc 60
 ggccgcccagc cgcgcagcc ctccggcctgc acgcagccac cggccccgct cccggagccc 120
 agcgcgcccg aggcgcagc cgcggccca gtaaggcggc ggcgcgcgc gccaccgcg 180
 gccctgccgt tccctccgcc gcgctgcgcc atggcgcggc gctgactggc ctggcccggc 240
 cccgcgcgc tcccgcctgc ccgaccgc actcggggcc gccggggctc cggcctgcgc 300
 ccgcctcttc cttctccagc cggcaggccc cgcgccttag gaggagagc ccaccgcgc 360
 caggaggccg aacgcggact cgccaccgg cttcagaatg gcagaagatg atccatatt 420
 gggaaggcct gaacaaatgt ttcatttga tccttcttg actcatacaa tattaatcc 480
 agaagtattt caaccacaga tggcactgcc aacagatggc ccataccttc aaatattaga 540
 gcaacctaaa cagagaggat ttcgcttccg ttatgtatg gaaggcccat cccatggtgg 600
 actacctggt gcctctagt aaaagaacaa gaagtcttac cctcaggtca aaatctgcaa 660
 ctatgtggga ccagcaaagg ttattgttca gttggtcaca aatggaaaaa atatccacct 720
 gcatgcccac agcctggtgg gaaaacactg tgaggatggg atctgcactg taactgctgg 780
 acccaaggac atggtggtcg gcttcgaaa cctgggtata cttcatgtga caaagaaaa 840
 agtatttgaa acactggaag cacgaatgac agaggcgtgt ataaggggct ataatcctgg 900
 actcctgggt caccctgacc ttgcctattt gcaagcagaa ggtggagggg accggcagct 960
 gggagatcgg gaaaaagagc taatccgcca agcagctctg cagcagacca aggagatgga 1020
 cctcagcgtg gtgcggtcga tgtttacagc ttttcttccg gatagcactg gcagcttcac 1080
 aaggcgcctg gaaccctggt tatcagacgc catctatgac agtaaagccc ccaatgcatc 1140
 caacttgaaa attgtaagaa tggacaggac agctggatgt gtgactggag gggaggaat 1200
 ttatcttctt tgtgacaaaag ttcagaaaga tgacatccag attcgtttt atgaagagga 1260
 agaaaaatgg ggagtctggg aaggatttgg agatttttcc cccacagatg ttcatagaca 1320
 atttgccatt gtcttcaaaa ctccaaagta taaagatatt aatattacaa aaccagcctc 1380
 tgtgtttgtc cagcttcgga ggaaatctga cttggaaact agtgaaccaa aaccttctc 1440
 ctactatcct gaaatcaaag ataaagaaga agtcagagg aaacgtcaga agctcatgcc 1500
 caatttttcg gatagtttcc gcggtggtag tgggtccgga gctggaggcg gaggcatggt 1560
 tggtagtggc ggtggaggag ggggactgg aagtacaggt ccagggtata gcttcccaca 1620
 ctatggattt cctacttatg gtgggattac tttccatcct ggaactacta aatctaagc 1680
 tgggatgaag atgggaacca tggacactga atctaaaaag gaccctgaag gttgtgacaa 1740
 aagtgatgac aaaaacactg taaacctctt tgggaaagt attgaaacca cagagcaaga 1800
 tcaggagccc agcaggccca ccgttgggaa tggtagggtc actctaacgt atgcaacagg 1860
 aacaaaagaa gagagtgtg gagttcagga taacctctt ctagagaagg ctatgcagct 1920
 tgcaaaagag catgccaatg cccttttca ctacgcggtg acaggagacg tgaagatgct 1980
 gctggccgct cagcgcctc tcaactgctg gcaggatgag aatggggaca gtgtcttaca 2040
 cttagcaatc atccacctc attctcaact tgtgagggat ctactagaag tcacatctgg 2100
 tttgatttct gatgacatta tcaacatgag aaatgatctg taccagacgc ccttgcactt 2160
 ggcagtgatc actaagcagg aagatgtggt ggaggatttg ctgagggctg gggccgacct 2220
 gagccttctg gaccgcttgg gtaactctgt tttgcacct gctgccaag aaggacatga 2280
 taaagtctc agtatcttac tcaagcacia aaaggcagca ctacttctg accaccctaa 2340

20

30

```

cggggacggt ctgaatgccca ttcattctagc catgatgagc aatagcctgc catgtttgct 2400
gctgctgggtg gccgctgggg ctgacgtcaa tgctcaggag cagaagtccg ggcgcacagc 2460
actgcacctg gctgtgggagc acgacaacat ctcatggca ggctgcctgc tcctggaggg 2520
tgatgcccat gtggacagta ctacctacga tggaaaccaca cccctgcata tagcagctgg 2580
gagagggtcc accaggctgg cagctcttct caaagcagca ggagcagatc ccctggtgga 2640
gaactttgag cctctctatg acctggatga ctcttgggaa aatgcaggag aggatgaagg 2700
agttgtgctt ggaaccacgc ctctagatat ggccaccagc tggcaggat ttgacatatt 2760
aatgggaaa ccatatgagc cagagtttac atctgatgat ttactagcac aaggagacat 2820
gaaacagctg gctgaagatg tgaagctgca gctgtataag ttactagaaa ttctgatcc 2880
agacaaaaac tgggctactc tggcgcagaa attaggtctg gggatactta ataatgcctt 2940
ccggctgagt cctgctectt ccaaaacact tatggacaac tatgaggctc ctgggggtac 3000
agtcagagag ctggtggagg ccctgagaca aatgggctac accgaagcaa tgaagtgat 3060
ccaggcagcc tccagcccag tgaagaccac ctctcaggcc cactcgctgc ctctctgcc 3120
tgcctccaca aggcagcaaa tagacgagct ccgagacagt gacagtgtct ggcacacggg 3180
cgtggagaca tccttccgca aactcagctt taccgagtct ctgaccagtg gtgcctcact 3240
gctaactctc aacaaaatgc cccatgatta tgggcaggaa ggacctctag aaggcaaaat 3300
ttagcctgct gacaatttcc cacaccgtgt aaaccaaagc cctaaaatc cactgcgttg 3360
tccacaagag agaagctgaa gtgcaccaa aggtgctcag agagccggcc cgctgaatc 3420
attctcgatt taactcgaga ccttttcaac ttggcttctc ttcttggttc ataaatgaat 3480
tttagtttg ttacttaca gatagtatct agcaatcaca aactggctg agcggatgca 3540
tctgggatg aggttgctta ctaagctttg ccagctgctg ctggatcaca gctgctttct 3600
gttgtcattg ctgtgtccc tctgc 3625

```

10

```

<210> 12
<211> 968
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 12
Met Ala Glu Asp Asp Pro Tyr Leu Gly Arg Pro Glu Gln Met Phe His
1 5 10 15
Leu Asp Pro Ser Leu Thr His Thr Ile Phe Asn Pro Glu Val Phe Gln
20 25 30
Pro Gln Met Ala Leu Pro Thr Asp Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu Glu
35 40 45
Gln Pro Lys Gln Arg Gly Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly Pro
50 55 60
Ser His Gly Gly Leu Pro Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys Ser
65 70 75 80
Tyr Pro Gln Val Lys Ile Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val Ile
85 90 95
Val Gln Leu Val Thr Asn Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His Ser
100 105 110
Leu Val Gly Lys His Cys Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val Thr Ala Gly
115 120 125
Pro Lys Asp Met Val Val Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His Val
130 135 140
Thr Lys Lys Lys Val Phe Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu Ala
145 150 155 160
Cys Ile Arg Gly Tyr Asn Pro Gly Leu Leu Val His Pro Asp Leu Ala
165 170 175
Tyr Leu Gln Ala Glu Gly Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly Asp Arg Glu
180 185 190
Lys Glu Leu Ile Arg Gln Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys Glu Met Asp
195 200 205
Leu Ser Val Val Arg Leu Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser Thr
210 215 220
Gly Ser Phe Thr Arg Arg Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile Tyr
225 230 235 240
Asp Ser Lys Ala Pro Asn Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met Asp
245 250 255

```

20

30

40

Arg Thr Ala Gly Cys Val Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu Cys
 260 265 270
 Asp Lys Val Gln Lys Asp Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu Glu
 275 280 285
 Glu Asn Gly Gly Val Trp Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr Asp
 290 295 300
 Val His Arg Gln Phe Ala Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Asp
 305 310 315 320
 Ile Asn Ile Thr Lys Pro Ala Ser Val Phe Val Gln Leu Arg Arg Lys
 325 330 335
 Ser Asp Leu Glu Thr Ser Glu Pro Lys Pro Phe Leu Tyr Tyr Pro Glu
 340 345 350
 Ile Lys Asp Lys Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Gln Lys Leu Met Pro
 355 360 365
 Asn Phe Ser Asp Ser Phe Gly Gly Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Gly
 370 375 380
 Gly Gly Met Phe Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Thr Gly Ser Thr
 385 390 395 400
 Gly Pro Gly Tyr Ser Phe Pro His Tyr Gly Phe Pro Thr Tyr Gly Gly
 405 410 415
 Ile Thr Phe His Pro Gly Thr Thr Lys Ser Asn Ala Gly Met Lys His
 420 425 430
 Gly Thr Met Asp Thr Glu Ser Lys Lys Asp Pro Glu Gly Cys Asp Lys
 435 440 445
 Ser Asp Asp Lys Asn Thr Val Asn Leu Phe Gly Lys Val Ile Glu Thr
 450 455 460
 Thr Glu Gln Asp Gln Glu Pro Ser Glu Ala Thr Val Gly Asn Gly Glu
 465 470 475 480
 Val Thr Leu Thr Tyr Ala Thr Gly Thr Lys Glu Glu Ser Ala Gly Val
 485 490 495
 Gln Asp Asn Leu Phe Leu Glu Lys Ala Met Gln Leu Ala Lys Arg His
 500 505 510
 Ala Asn Ala Leu Phe Asp Tyr Ala Val Thr Gly Asp Val Lys Met Leu
 515 520 525
 Leu Ala Val Gln Arg His Leu Thr Ala Val Gln Asp Glu Asn Gly Asp
 530 535 540
 Ser Val Leu His Leu Ala Ile Ile His Leu His Ser Gln Leu Val Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Leu Glu Val Thr Ser Gly Leu Ile Ser Asp Asp Ile Ile Asn
 565 570 575
 Met Arg Asn Asp Leu Tyr Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Val Ile Thr
 580 585 590
 Lys Gln Glu Asp Val Val Glu Asp Leu Leu Arg Ala Gly Ala Asp Leu
 595 600 605
 Ser Leu Leu Asp Arg Leu Gly Asn Ser Val Leu His Leu Ala Ala Lys
 610 615 620
 Glu Gly His Asp Lys Val Leu Ser Ile Leu Leu Lys His Lys Lys Ala
 625 630 635 640
 Ala Leu Leu Leu Asp His Pro Asn Gly Asp Gly Leu Asn Ala Ile His
 645 650 655
 Leu Ala Met Met Ser Asn Ser Leu Pro Cys Leu Leu Leu Val Ala
 660 665 670
 Ala Gly Ala Asp Val Asn Ala Gln Glu Gln Lys Ser Gly Arg Thr Ala
 675 680 685
 Leu His Leu Ala Val Glu His Asp Asn Ile Ser Leu Ala Gly Cys Leu
 690 695 700
 Leu Leu Glu Gly Asp Ala His Val Asp Ser Thr Thr Tyr Asp Gly Thr
 705 710 715 720
 Thr Pro Leu His Ile Ala Ala Gly Arg Gly Ser Thr Arg Leu Ala Ala
 725 730 735

10

20

30

Leu Leu Lys Ala Ala Gly Ala Asp Pro Leu Val Glu Asn Phe Glu Pro
740 745 750
Leu Tyr Asp Leu Asp Asp Ser Trp Glu Asn Ala Gly Glu Asp Glu Gly
755 760 765
Val Val Pro Gly Thr Thr Pro Leu Asp Met Ala Thr Ser Trp Gln Val
770 775 780
Phe Asp Ile Leu Asn Gly Lys Pro Tyr Glu Pro Glu Phe Thr Ser Asp
785 790 795 800
Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asp Met Lys Gln Leu Ala Glu Asp Val Lys
805 810 815
Leu Gln Leu Tyr Lys Leu Leu Glu Ile Pro Asp Pro Asp Lys Asn Trp
820 825 830
Ala Thr Leu Ala Gln Lys Leu Gly Leu Gly Ile Leu Asn Asn Ala Phe
835 840 845
Arg Leu Ser Pro Ala Pro Ser Lys Thr Leu Met Asp Asn Tyr Glu Val
850 855 860
Ser Gly Gly Thr Val Arg Glu Leu Val Glu Ala Leu Arg Gln Met Gly
865 870 875 880
Tyr Thr Glu Ala Ile Glu Val Ile Gln Ala Ala Ser Ser Pro Val Lys
885 890 895
Thr Thr Ser Gln Ala His Ser Leu Pro Leu Ser Pro Ala Ser Thr Arg
900 905 910
Gln Gln Ile Asp Glu Leu Arg Asp Ser Asp Ser Val Cys Asp Thr Gly
915 920 925
Val Glu Thr Ser Phe Arg Lys Leu Ser Phe Thr Glu Ser Leu Thr Ser
930 935 940
Gly Ala Ser Leu Leu Thr Leu Asn Lys Met Pro His Asp Tyr Gly Gln
945 950 955 960
Glu Gly Pro Leu Glu Gly Lys Ile
965

10

<210> 13
<211> 1891
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 13
ccgcttcggg gaggaggacg ctgaggaggc gccgagccgc gcagegctgc gggggaggcg 60
ccgcgcccga cgcggggccc atggccagga ccaccagcca gctgtatgac gcogtgccca 120
tccagtccag cgtggtggtta tgttcctgcc catccccatc aatggtgagg acccagactg 180
agtccagcac gccccctggc attcctggtg gcagcaggca gggccccgcc atggacggca 240
ctgcagccga gctcggccc ggcgcccggct cctgcagca tgcccagcct ccgccgcagc 300
ctcggaaaga cggcctgag gacttcaagt ttgggaaaat ccttggggaa ggctctttt 360
ccacggttgt cctggctcga gaactggcaa cctccagaga atatgcgatt aaaattctgg 420
agaagegaca tatcataaaa gagaacaagg tcccctatgt aaccagagag cgggatgtca 480
tgtcgcgcct ggatcacccc ttctttgtta agctttactt cacatttcag gacgacgaga 540
agctgtatth cggccttagt tatgcaaaaa atggagaact acttaaatat attcgcaaaa 600
tcggttcatt cgatgagacc tgtaccgat tttacacggc tgagatcgtg tctgctttag 660
agtacttgca cggcaagggc atcattcaca gggaccttaa accggaaaac attttgttaa 720
atgaagatat gcacatccag atcacagatt ttggaacagc aaaagtctta tcccagaga 780
gcaacaagc cagggccaac tcattcgtgg gaacagcgca gtacgtttct ccagagctgc 840
tcacggagaa gtccgctgt aagagttcag accttgggc tcttggatgc ataatabacc 900
agcttgtggc aggactccca ccattccgag ctggaaacga gtatcttata tttcagaaga 960
tcattaagtt ggaatatgac tttccagaaa aattcttccc taaggcaaga gacctcgtgg 1020
agaaaactttt ggttttagat gccacaaagc ggttaggctg tgaggaaatg gaaggatagc 1080
gacctcttaa agcacaccgc ttcttcgagt ccgtcacgtg ggagaacctg caccagcaga 1140
cgcctccgaa gctcaccgct tacctgcccg ctatgtcgga agacgacgag gactgctatg 1200
gcaattatga caatctcctg agccagtttg gctgcatgca ggtgtcttcg tctcctcct 1260
cacactccct gtcagcctcc gacacgggcc tgccccagag gtcaggcagc aacatagagc 1320
agtacattca cgatctggac tcgaactcct ttgaactgga cttacagttt tccgaagatg 1380

30

40

```

agaagagggtt gttgttggag aagcaggctg gcggaaccc ttggcaccag tttgtagaaa 1440
ataatttaat actaaagatg ggcccagtgg ataagcggaa gggtttattt gcaagacgac 1500
gacagctgtt gctcacagaa ggaccacatt tatattatgt ggatcctgtc aacaaagtcc 1560
tgaaagggtga aattccttgg tcacaagaac ttcgaccaga ggccaagaat tttaaaactt 1620
tctttgtcca cagcctaac aggacgtatt atctgatgga ccccagcggg aacgcacaca 1680
agtgtgagcag gaagatccag gaggtttgga ggcagcgata ccagagccac cgggacgccc 1740
ctgtgcagtg acgtggcctg cggccgggct gcccttcgct gccaggacac ctgccccagc 1800
gcggtttggc cgccatccgg gacgcttcca gaccacctgc cagccatcac aaggggaacg 1860
cagaggcggga aaccttgcag catttttatt t 1891

```

```

<210> 14
<211> 556
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 14
Met Ala Arg Thr Thr Ser Gln Leu Tyr Asp Ala Val Pro Ile Gln Ser
1 5 10 15
Ser Val Val Leu Cys Ser Cys Pro Ser Pro Ser Met Val Arg Thr Gln
20 25 30
Thr Glu Ser Ser Thr Pro Pro Gly Ile Pro Gly Gly Ser Arg Gln Gly
35 40 45
Pro Ala Met Asp Gly Thr Ala Ala Glu Pro Arg Pro Gly Ala Gly Ser
50 55 60
Leu Gln His Ala Gln Pro Pro Gln Pro Arg Lys Lys Arg Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Lys Phe Gly Lys Ile Leu Gly Glu Gly Ser Phe Ser Thr Val
85 90 95
Val Leu Ala Arg Glu Leu Ala Thr Ser Arg Glu Tyr Ala Ile Lys Ile
100 105 110
Leu Glu Lys Arg His Ile Ile Lys Glu Asn Lys Val Pro Tyr Val Thr
115 120 125
Arg Glu Arg Asp Val Met Ser Arg Leu Asp His Pro Phe Phe Val Lys
130 135 140
Leu Tyr Phe Thr Phe Gln Asp Asp Glu Lys Leu Tyr Phe Gly Leu Ser
145 150 155 160
Tyr Ala Lys Asn Gly Glu Leu Leu Lys Tyr Ile Arg Lys Ile Gly Ser
165 170 175
Phe Asp Glu Thr Cys Thr Arg Phe Tyr Thr Ala Glu Ile Val Ser Ala
180 185 190
Leu Glu Tyr Leu His Gly Lys Gly Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro
195 200 205
Glu Asn Ile Leu Leu Asn Glu Asp Met His Ile Gln Ile Thr Asp Phe
210 215 220
Gly Thr Ala Lys Val Leu Ser Pro Glu Ser Lys Gln Ala Arg Ala Asn
225 230 235 240
Ser Phe Val Gly Thr Ala Gln Tyr Val Ser Pro Glu Leu Leu Thr Glu
245 250 255
Lys Ser Ala Cys Lys Ser Ser Asp Leu Trp Ala Leu Gly Cys Ile Ile
260 265 270
Tyr Gln Leu Val Ala Gly Leu Pro Pro Phe Arg Ala Gly Asn Glu Tyr
275 280 285
Leu Ile Phe Gln Lys Ile Ile Lys Leu Glu Tyr Asp Phe Pro Glu Lys
290 295 300
Phe Phe Pro Lys Ala Arg Asp Leu Val Glu Lys Leu Leu Val Leu Asp
305 310 315 320
Ala Thr Lys Arg Leu Gly Cys Glu Glu Met Glu Gly Tyr Gly Pro Leu
325 330 335
Lys Ala His Pro Phe Phe Glu Ser Val Thr Trp Glu Asn Leu His Gln
340 345 350

```

10

20

30

Gln Thr Pro Pro Lys Leu Thr Ala Tyr Leu Pro Ala Met Ser Glu Asp
 355 360 365
 Asp Glu Asp Cys Tyr Gly Asn Tyr Asp Asn Leu Leu Ser Gln Phe Gly
 370 375 380
 Cys Met Gln Val Ser Ser Ser Ser Ser Ser His Ser Leu Ser Ala Ser
 385 390 395 400
 Asp Thr Gly Leu Pro Gln Arg Ser Gly Ser Asn Ile Glu Gln Tyr Ile
 405 410 415
 His Asp Leu Asp Ser Asn Ser Phe Glu Leu Asp Leu Gln Phe Ser Glu
 420 425 430
 Asp Glu Lys Arg Leu Leu Leu Glu Lys Gln Ala Gly Gly Asn Pro Trp
 435 440 445
 His Gln Phe Val Glu Asn Asn Leu Ile Leu Lys Met Gly Pro Val Asp
 450 455 460
 Lys Arg Lys Gly Leu Phe Ala Arg Arg Arg Gln Leu Leu Leu Thr Glu
 465 470 475 480
 Gly Pro His Leu Tyr Tyr Val Asp Pro Val Asn Lys Val Leu Lys Gly
 485 490 495
 Glu Ile Pro Trp Ser Gln Glu Leu Arg Pro Glu Ala Lys Asn Phe Lys
 500 505 510
 Thr Phe Phe Val His Thr Pro Asn Arg Thr Tyr Tyr Leu Met Asp Pro
 515 520 525
 Ser Gly Asn Ala His Lys Trp Cys Arg Lys Ile Gln Glu Val Trp Arg
 530 535 540
 Gln Arg Tyr Gln Ser His Pro Asp Ala Ala Val Gln
 545 550 555

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence .

<220>

<223> Synthetic Peptide

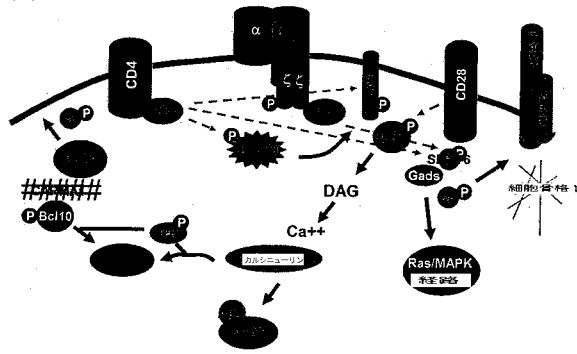
<400> 15

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15
 Met Asp Gln Asn Met Phe Arg Asn Phe Ser Phe Asn Met Pro
 20 25 30

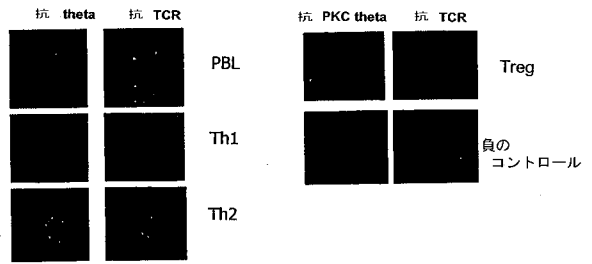
10

20

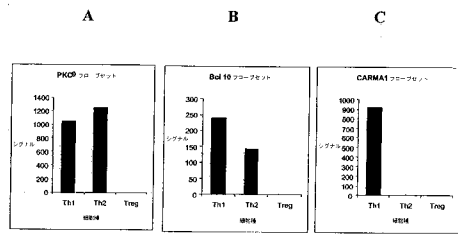
【 図 1 】



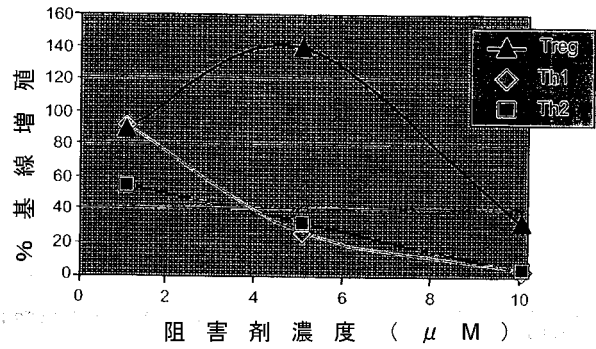
【 図 3 】



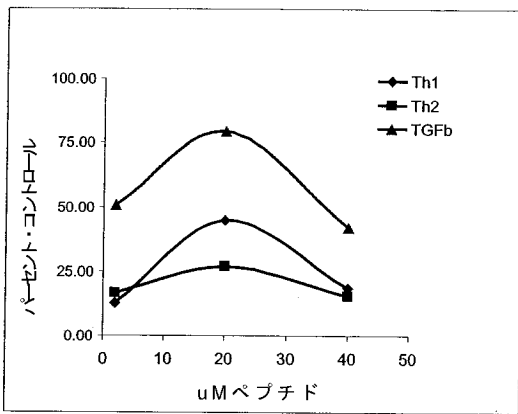
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/35719		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : A61K 48/00; C12Q 1/70; G01N 33/53; C07K 1/00, 17/00; C12N 5/00; 15/00 US CL : 514/44, 2; 435/5, 6, 7.1, 320.1, 325; 530/350; 536/23.72, 23.2 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. : 514/44, 2; 435/5, 6, 7.1, 320.1, 325; 530/350; 536/23.72, 23.2				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched None				
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	US 2002/0068271 A1 (ALTMAN et al) 6 June 2002 (06.06.2002), see entire document.	1-12		
X --- Y	US 6,190,869 B1 (BENNETT et al.) 20 February 2001 (20.02.2001), see entire document.	1-5, 10-12 ----- 6-9		
X	US 6,040,152 A (KUPFER et al.) 21 March 2000 (21.03.2000), see entire document.	1-12		
X --- Y	WO 00/36083 A2 (LA JOLLA INSTITUTE FOR ALLERGY AND IMMUNOLOGY) 22 June 2000 (22.06.2000), see entire document.	1-5, 10-12 ----- 6-9		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "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 "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 20 August 2004 (20.08.2004)		Date of mailing of the international search report 17 SEP 2004		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Anne Marie S. Wehbe <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/35719

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

DIALOG-Medline, Embase, Cancerlit, Scisearch, Biosis: EAST/BRS-USPatful, EPO, JPO, Derwint, PG-Pubs search terms: pkc, theta, pkct, prkct, prkeq, protein kinase c theta, vav, ikk, nfkb, carnal, bel-10

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/06	E
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ラオ, パトリシア

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 1 7 2 0 アクトン ポープ ロード 1 1 2

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA20 CB01 FB01 FB02 FB03 FB05
 4B024 AA01 AA11 BA80 DA03 HA11
 4B063 QA01 QA05 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ53 QQ61 QQ79 QQ89
 QQ91 QR48 QR77
 4B065 AA93X BA30 CA44
 4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 CA18 NA14 ZB02 ZB05
 ZB07 ZB08 ZB13 ZB21 ZB26 ZB33 ZB35 ZB37
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB02 ZB05 ZB07 ZB08
 ZB13 ZB21 ZB26
 4H045 AA10 BA10 CA40

专利名称(译)	分子优先与效应T细胞及其用途相关		
公开(公告)号	JP2006508191A	公开(公告)日	2006-03-09
申请号	JP2005507126	申请日	2003-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	托勒克斯股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	托拉雷克斯, 油墨.		
[标]发明人	ラオパトリシア		
发明人	ラオ, パトリシア		
IPC分类号	A61K45/00 A61K31/7088 A61K48/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C12Q1/02 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/50 C12N5/06 A61K38/00 C07K14/47 C12N15/09 A61K C07K1/00 C07K17/00 C12N5/00 C12N15/00 C12Q1/70 G01N33/53		
CPC分类号	C12N9/1205 C07K2319/10 G01N2333/9121 G01N2500/02		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A61K31/7088 A61K48/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00.105 C12Q1/02 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N5/00.E A61K37/02 C07K14/47 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA20 2G045/CB01 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/DA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR77 4B065/AA93X 4B065/BA30 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZB02 4C084/ZB05 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZB13 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZB37 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB02 4C086/ZB05 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB13 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/CA40		
代理人(译)	远藤顺治		
优先权	60/424777 2002-11-08 US 60/467477 2003-05-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是基于, 至少部分, 如蛋白激酶C THETA (PKC- θ), 不存在于T调节细胞, 基于特定基因的发现存在于顶效应细胞 (Th1和Th2) 。此外, 调节性T细胞尚未使用用于产生炎性细胞因子和炎性效应T细胞的细胞增殖的重要途径。因此, 在一个方面, 本发明提供了一种用于识别的方法 本发明提供了一种促进调节性T细胞功能以实现T细胞功能的方法, 包括使免疫细胞与抑制免疫细胞中蛋白激酶C θ 途径的试剂接触的步骤。包括。在另一个方面, 本发明提供了治疗患有在受试者中的细胞在受试者中促进相对于效应T细胞功能的调节性T细胞的功能, 该方法中, 免疫将受益的状态的受试者的方法包括施用抑制细胞中蛋白激酶C θ 途径的试剂的步骤。在另一个方面, 本发明提供了用于筛选特异性调节效应T细胞功能而不调节调节性T细胞功能的化合物的测定法, 该测定法基于, 将蛋白激酶C θ 途径分子与测试化合物接触, 并测定测试化合物调节蛋白激酶C θ 途径分子活性的能力

【 図 5 】

