

(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2008-538498

(P2008-538498A)

(43) 公表日 平成20年10月30日(2008.10.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	2G045
<b>C07K 14/715 (2006.01)</b>	C07K 14/715	4B024
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28	4B063
<b>C07K 17/02 (2006.01)</b>	C07K 17/02	4B064
<b>C07K 17/14 (2006.01)</b>	C07K 17/14	4B065
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-507261 (P2008-507261)  
 (86) (22) 出願日 平成18年4月18日 (2006.4.18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年12月17日 (2007.12.17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IE2006/000037  
 (87) 国際公開番号 WO2006/111946  
 (87) 国際公開日 平成18年10月26日 (2006.10.26)  
 (31) 優先権主張番号 60/672,051  
 (32) 優先日 平成17年4月18日 (2005.4.18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507345000  
 ザ・プロヴォスト、フェローズ・アンド・  
 スカラーズ・オブ・ザ・カレッジ・オブ・  
 ザ・ホーリー・アンド・アンディヴァイデ  
 ッド・トリニティー・オブ・クイーン・エ  
 リザベス、ニア・ダブリン  
 アイルランド国ダブリン 2、カレッジ・  
 グリーン  
 (74) 代理人 100089705  
 弁理士 社本 一夫  
 (74) 代理人 100140109  
 弁理士 小野 新次郎  
 (74) 代理人 100075270  
 弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トール様レセプター14 (TLR14) 及びそれらの使用

## (57) 【要約】

単離されたポリペプチドは、配列番号1又は2のアミノ酸配列又は変異体又はそれらの断片を含む。変異体は、配列番号1又は2のアミノ酸配列と少なくとも70%又は90%同一であるアミノ酸配列を含む。それらの断片は、配列番号1又は2の少なくとも12の連続したアミノ酸を含むペプチドであることができる。該ポリペプチドはトール様レセプター活性を示す。該TLRはTLR14と名付けられた。TLRレセプターはさまざまなリガンドを認識し、免疫及び炎症性遺伝子の誘導を導く一連のシグナル伝達経路を活性化する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 のアミノ酸配列又は変異体又はそれらの断片を含む、単離されたポリペプチド。

## 【請求項 2】

配列番号 2 のアミノ酸配列又は変異体又はそれらの断片を含む、単離されたポリペプチド。

## 【請求項 3】

該変異体が配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列と少なくとも 70% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド。

10

## 【請求項 4】

該変異体が配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

## 【請求項 5】

該変異体が欠失又は挿入修飾を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチド。

## 【請求項 6】

該変異体が翻訳後修飾を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のポリペプチド。

## 【請求項 7】

該断片が配列番号 1 又は 2 の少なくとも 12 の連続するアミノ酸を含むペプチドである、請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド。

20

## 【請求項 8】

トール様レセプター活性を示す、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のポリペプチド。

## 【請求項 9】

該トール様レセプター活性が TLR14 活性である、請求項 8 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 10】

免疫変調活性を示す、請求項 1 から 9 のいずれかに記載のポリペプチド。

## 【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれかに記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 12】

核酸配列配列番号 3 又は変異体又はそれらの断片、又はそれらと相補的な配列を含む、ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

30

## 【請求項 13】

核酸配列配列番号 4 又は変異体又はそれらの断片、又はそれらと相補的な配列を含む、ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 14】

配列番号 3 又は 4 の核酸配列と少なくとも 70% 同一である核酸配列を含む、請求項 12 又は 13 に記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 15】

該断片が、配列番号 3 又は 4 の少なくとも 17 の連続する核酸を含む、請求項 12 又は 13 に記載のポリヌクレオチド。

40

## 【請求項 16】

該ポリヌクレオチドが、前記セグメントをコードする天然 cDNA と少なくとも 80% の同一性を示す、請求項 12 から 15 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 17】

トール様レセプター又はペプチド又はそれらの融合タンパク質をコードする、請求項 12 から 16 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

## 【請求項 18】

配列番号 3 又は配列番号 4 又は変異体又はそれらの断片、又はそれらと相補的な、それらの融合タンパク質をコードする配列、から選択される核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

50

## 【請求項 19】

配列番号 3、配列番号 4 の核酸配列又は変異体又はそれらの断片又はそれらと相補的な配列を含む、組換え核酸。

## 【請求項 20】

配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列又は変異体又はそれらの断片を含む、精製されたタンパク質又はペプチド。

## 【請求項 21】

該断片が配列番号 1 又は 2 の少なくとも 12 の連続するアミノ酸を含む、請求項 20 に記載のタンパク質又はペプチド。

## 【請求項 22】

該タンパク質が哺乳類起源である、請求項 20 又は 21 に記載のタンパク質又はペプチド。

## 【請求項 23】

該タンパク質がヒト起源である、請求項 20 から 22 のいずれかに記載のタンパク質又はペプチド。

## 【請求項 24】

少なくとも 100 kDa の分子量を有する、請求項 20 から 23 のいずれかに記載のタンパク質又はペプチド。

## 【請求項 25】

グリコシル化形態の、請求項 20 から 24 のいずれかに記載のタンパク質又はペプチド。

## 【請求項 26】

配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列を含む、組換えタンパク質又はペプチド。

## 【請求項 27】

トール様レセプター官能性 / 活性を示す、請求項 20 から 26 のいずれかに記載のタンパク質又はペプチド。

## 【請求項 28】

配列番号 1 又は 2 又は変異体又はそれらの断片から選択されるアミノ酸配列を含む、トール様レセプタータンパク質。

## 【請求項 29】

T L R 14 である、請求項 28 に記載のトール様レセプタータンパク質。

## 【請求項 30】

請求項 20 から 29 のいずれかに記載のタンパク質又はペプチドの抗原性断片。

## 【請求項 31】

請求項 11 から 18 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、組換えベクター。

## 【請求項 32】

請求項 31 に記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

## 【請求項 33】

活性成分として請求項 31 に記載の組換えベクターを含む、遺伝子療法剤。

## 【請求項 34】

請求項 1 から 10 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、アジュバント。

## 【請求項 35】

融合化合物であって、

配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列又は変異体又はそれらの断片を含むタンパク質；及び  
検出又は精製タグ；

のいずれかの一つ又はそれより多くを含む融合化合物。

## 【請求項 36】

検出又は精製タグが、F L A G 配列、H i s 6 配列、I g 配列及び別のレセプタータンパク質の異種ポリペプチドのいずれか一つ又はそれより多くから選択される、請求項 34 に記載の融合化合物。

## 【請求項 37】

10

20

30

40

50

配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列及び T L R リガンドを含む、組換え又は合成的に生成されたタンパク質を含む、リガンド/レセプター複合体。

【請求項 38】

T L R リガンドが C p G 核酸である、請求項 36 に記載のリガンド/レセプター複合体。

【請求項 39】

請求項 20 から 30 のいずれかに記載のタンパク質の抗原決定基を含む、免疫原。

【請求項 40】

請求項 1 から 10 のいずれかに記載のポリペプチドのエピトープ、又は請求項 20 から 30 のいずれかのタンパク質又はペプチドに特異的に結合する、モノクローナル又はポリクローナル抗体又はそれらの断片。

【請求項 41】

抗体が固定化された形態で調製される、請求項 40 に記載の抗体。

【請求項 42】

抗体がビーズ、磁性ビーズ、スライド又は容器へのコンジュゲーション又は付着により固定される、請求項 41 に記載の抗体。

【請求項 43】

抗体が、臭化シアン活性化セファロースへ固定化されるか、又はグルタルアルデヒド架橋有り又は無しでポリオレフィン表面へ吸着される、請求項 41 又は 42 に記載の抗体。

【請求項 44】

トール様レセプター活性を変調する化合物を同定する方法であって：

配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列又は変異体又はそれらの断片を含むポリペプチドと試験サンプルを接触させること；

トール様レセプター活性のマーカーについてモニターすること；及び

トール様レセプター活性を変調する化合物を同定すること；

の工程を含む方法。

【請求項 45】

トール様レセプター活性のマーカーが：

( i ) N F カッパ B 活性化

( i i ) N F カッパ B タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド

( i i i ) I R F 3 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド

( i v ) p 3 8 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド

( v ) I K K タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド

( v i ) R A N T E S タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド

( v i i ) T L R 4 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド又は

( v i i i ) いずれかの炎症誘発性又は抑制性サイトカイン

のいずれか一つ以上を含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

請求項 45 に記載の各 ( i ) ~ ( v i i i ) の少なくとも二つの、試験サンプルに対する量の相違を決定する工程を含む、請求項 44 又は 45 に記載の方法。

【請求項 47】

請求項 45 に記載の各 ( i ) ~ ( v i i i ) の少なくとも三つの、試験サンプルに対する量の相違を決定する工程を含む、請求項 44 から 46 のいずれかに記載の方法。

【請求項 48】

タンパク質の試験サンプルに対する量が決定される、請求項 44 から 47 のいずれかに記載の方法。

【請求項 49】

核酸マイクロアレイを使用して、m R N A の試験サンプルに対する量が決定される、請求項 44 から 48 のいずれかに記載の方法。

【請求項 50】

トール様レセプター活性が T L R 1 4 活性である、請求項 44 から 49 のいずれかに記載

10

20

30

40

50

の方法。

【請求項 5 1】

T L R 活性を活性化する又は阻害する化合物が：

( i ) N F カ ッ パ B 活 性 化

( i i ) N F カ ッ パ B タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヌ ク レ オ チ ド

( i i i ) I R F 3 タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヌ ク レ オ チ ド

( i v ) p 3 8 タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヌ ク レ オ チ ド

( v ) I K K タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヌ ク レ オ チ ド

( v i ) R A N T E S タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヌ ク レ オ チ ド

( v i i ) T L R 4 タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヌ ク レ オ チ ド 又 は

( v i i i ) い ず れ か の 炎 症 誘 発 性 又 は 抑 制 性 サ イ ト カ イ ン

の少なくとも一つ以上の、試験サンプルと比較した量、発現、活性又はリン酸化を決定することにより同定される、請求項 4 4 に記載の方法。

10

【請求項 5 2】

請求項 4 4 から 5 1 のいずれかに記載の方法により同定された、T L R 活性を変調することが可能な化合物。

【請求項 5 3】

請求項 5 2 に記載の化合物及び薬学的に許容できる坦体を含む医薬組成物。

【請求項 5 4】

医薬組成物であって：

配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列を有する試薬又は化合物、又は配列番号 3 又は 4 の核酸を含むポリヌクレオチド；及び

薬学的に許容できる坦体；

を含む組成物。

20

【請求項 5 5】

医薬組成物であって：

配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列を含む T L R 1 4 ポリペプチド又は配列番号 3 又は 4 の核酸を含むポリヌクレオチドの活性を変調する試薬又は化合物；及び

薬学的に許容できる坦体；

を含む組成物。

30

【請求項 5 6】

試薬が T L R 1 4 アゴニスト又はアンタゴニストである、請求項 5 4 又は 5 5 に記載の組成物。

【請求項 5 7】

坦体化合物が、水、塩水及び緩衝液のいずれか一つ以上から選択される水性化合物である、請求項 5 4 から 5 6 に記載の組成物。

【請求項 5 8】

経口、経直腸、経鼻、局所又は非経口投与の形態である、請求項 5 4 から 5 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5 9】

アレルギー性疾患、自己免疫性疾患、炎症性疾患、心血管疾患、C N S 疾患、腫瘍性疾患及び感染性疾患のいずれか一つ以上の治療のための医薬の製造における、請求項 5 2 に記載の化合物、又は請求項 5 3 から 5 8 のいずれかに記載の組成物。

40

【請求項 6 0】

配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列を有する T L R 1 4 ポリペプチド又は変異体に対するアゴニスト又はアンタゴニスト化合物。

【請求項 6 1】

細胞又は組織培養細胞の生理機能又は発育を変調する方法であって、該細胞と哺乳類 T L R 1 4 のアゴニスト又はアンタゴニストを接触させることを含む方法。

【請求項 6 2】

50

N F - B 活性化を阻害する又は促進することが可能な化合物をスクリーニングする方法であって、

請求項 20 から 29 のいずれかに記載のタンパク質をコードする遺伝子、及び N F - B の活性化に付随する検出可能なシグナルを提供する成分を有する細胞を提供すること；  
形質転換細胞中の遺伝子の発現を提供する条件下で形質転換細胞を培養すること；  
形質転換細胞とスクリーニングのための一つ又はそれより多くの化合物を接触させること；

検出可能なシグナルを測定すること；及び

検出可能なシグナルを測定することにより活性化剤化合物又は阻害剤化合物を単離すること又は同定すること；

10

の工程を含む方法。

【請求項 63】

請求項 62 に記載の工程を含む、医薬組成物を調製する方法であって、

医薬化合物として単離された又は同定された化合物を最適化すること；

の工程を含んでいる方法。

【請求項 64】

トール様レセプター活性を変調することが可能な化合物をスクリーニングするためのキットであって、

請求項 20 から 30 のいずれかに記載のタンパク質をコードする遺伝子、及び N F - B の活性化により検出可能なシグナルを提供する成分を含む細胞；及び

20

検出可能なシグナルを測定するための試薬；

を含むキット。

【請求項 65】

該遺伝子がトール様レセプター T L R 14 をコードする、請求項 64 に記載のキット。

【請求項 66】

免疫性又は炎症性障害の治療のための医薬の製造における、配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列の断片又は変異体を含むポリペプチドの使用。

【請求項 67】

ポリペプチドが T L R 14 の活性を阻害することが可能である、請求項 66 に記載のポリペプチドの使用。

30

【請求項 68】

アジュバント又はワクチン製剤の製造における、請求項 1 から 10 のいずれかに記載のポリペプチド、請求項 10 から 19 のいずれかに記載のポリヌクレオチド、又は請求項 52 に記載の化合物の使用。

【請求項 69】

免疫変調機能を有する療法剤の製造における、配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列の断片又は変異体を含むポリペプチドによりコードされたタンパク質の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

40

## 序論

トール様レセプター/インターロイキン - 1 レセプター ( T L R ) スーパーファミリーは、炎症及び細菌感染への宿主応答に中心的役割を果たしている。 T L R ファミリーのメンバーは、トール - I L - I R ( T I R ) ドメインと呼ばれる細胞質ドメイン及び一連のロイシンリッチリピートから成る細胞外領域により特徴付けられる。多様な微生物成分によるトール様レセプターの占拠は、誘導可能シクロオキシゲナーゼ、接着分子及びケモカインのような多数の炎症誘発性タンパク質の発現を導く。ヒト T L R は現在同定されている。最初に発見された T L R、 T L R 4 は細菌リポ多糖類 ( L P S ) への応答のためには必須である ( 1、2 )。 T L R 2 は T L R 1 及び 6 とカップルして、各々ジアシル - 及びトリアシル - リポペプチドを認識する。 T L R 5 は細菌フラゲリンを認識し及び応答し (

50

3)、そしてTLR9は、細菌DNA中に存在するメチル化されていないCpGモチーフの認識に必要とされる(4)。TLR11、12及び13は最近マウスにおいて記述されてきたが、ヒトオルソログは見いだされていない(5、6)。適切なりガンドによるTLRの刺激は、転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化、及びマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)p38、c-jun N末端キナーゼ(JNK)及びp42/p44の活性化も導く。

#### 【0002】

NF- $\kappa$ Bの活性化は、細胞質TIRドメイン含有アダプタータンパク質、MyD88に依存する(7、8、9)。MyD88は、アダプタータンパク質TRIFを動員するTLR3を除く全TLRファミリーに対してアダプタータンパク質として働く(10)。NF- $\kappa$ Bを活性化することに加えて、TRIFは転写因子インターフェロン制御因子3(IRF3)に依存する遺伝子の誘導にも必要とされる(11)。この経路は、MyD88依存経路と称され、ウイルス起源の病原体を避けるために重要であることが示されている(12)。別のTIRアダプタータンパク質、MyD88アダプター様(MaI、TIRAPとしても知られている)は、MyD88依存経路に含まれており(13、14)、そしてTLR2及びTLR4仲介シグナル伝達に特異的に必要とされている(15、16)。

10

#### 【0003】

感染の間、多様なリガンドによるTLRの占拠は、サイトカイン及びケモカインのような炎症性メディエーターの産生及び免疫エフェクター細胞の活性化を導く。この協調化された応答は侵入している病原体を取り除くために計画されているが、多くの例において、細菌産物は宿主由来のメディエーターの制御されていないネットワークを活性化し、それは多器官不全、心血管虚脱及び最終的に死を導くことができる。敗血症と称されるこの状態は、病院の集中治療室における死亡の主原因であり、世界中で増加し続けている。それ故、TLRタンパク質に対するアンタゴニストは、過敏性免疫応答の有害な効果を相殺するために有用な手段であろう。TLR4シグナル伝達の妨害は、LPSの毒性効果を相殺する手段として綿密に試験されている。現在の療法には、TLR4及びその共働レセプターCD14に対する抗体、及び該レセプターへの結合についてLPSと競合する合成リピドA類似体を中和することが含まれる(17、18)。

20

#### 【0004】

敗血症に加え、療法は、ウイルス感染と戦う手段として他のTLRも目標にしている。例えば、TLR7アゴニスト、イミキモドがヒトパピローマウイルスにより引き起こされる性器ヘルペスの治療に成功裡に使用されてきた(19)。自己免疫疾患の場合において、TLRアゴニストは、適応Th2応答を、アレルギーの発生を防止するであろうTh1免疫応答にシフトさせる手段と考えられている。より長期の目標には、TLRシグナル伝達経路の下流構成要素での薬物療法学の開発が含まれるであろう。それ故、TLRシグナル伝達のすべての側面を完全に理解することが重要である。

30

#### 【0005】

TLRファミリーのさらなるメンバー、及びTLRシグナル伝達経路の側面の同定は、有益な薬学的可能性を有している。

40

#### 【発明の開示】

#### 【0006】

本発明に従うと、配列番号1のアミノ酸配列又は変異体又はそれらの断片を含む単離されたポリペプチドが提供される。

本発明は、配列番号2のアミノ酸配列又は変異体又はそれらの断片を含む単離されたポリペプチドも提供する。

#### 【0007】

本発明の一つの態様において、変異体は、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を含む。本発明の別の態様において、変異体は、配列番号1又は2のアミノ酸配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なく

50

とも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0008】

本発明の一つの態様において、変異体は欠失又は挿入修飾を含む。該変異体は、翻訳後修飾も含むことができる。

本発明の一つの態様において、該断片は、配列番号1又は2の少なくとも12の連続したアミノ酸を含むペプチドである。

【0009】

本発明の一つの態様において、本明細書で前に記載したポリペプチドは、トール様レセプター活性を示す。該トール様レセプターはTLR14活性であることができる。

10

本発明の一つの態様において、該ポリペプチドは免疫調節活性を示す。

【0010】

本発明は、本明細書で前に記載したポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。

本発明はさらに、配列番号3の核酸配列又はその変異体又は断片、又はそれらと相補的な配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0011】

本発明はさらに、配列番号4の核酸配列又はその変異体又は断片、又はそれらと相補的な配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

本発明の一つの態様において、該ポリヌクレオチドは、配列番号3又は4の核酸配列と少なくとも70%同一である核酸配列を含む。

20

【0012】

本発明の別の態様において、該断片は配列番号3又は4の少なくとも17の連続した核酸を含む。

本発明の一つの態様において、該ポリヌクレオチドは、前記セグメントをコードする天然cDNAと少なくとも80%の同一性を示す。

【0013】

本発明の一つの態様において、該ポリヌクレオチドは、トール様レセプター又はペプチド又はそれらの融合タンパク質をコードする。

本発明は、配列番号3、配列番号4の核酸配列又は変異体又はそれらの断片、又はそれらと相補的な配列を含む組換え核酸も提供する。

30

【0014】

本発明はさらに、配列番号1又は2のアミノ酸配列又は変異体又はそれらの断片を含む精製されたタンパク質又はペプチドを提供する。好ましくは、該タンパク質又はペプチドの断片は、配列番号1又は2の少なくとも12の連続するアミノ酸を含む。

【0015】

本発明の一つの態様において、該タンパク質又はペプチドは哺乳類起源である。該タンパク質はヒト起源であることができる。

本発明の一つの態様において、該タンパク質又はペプチドは、少なくとも100kDaの分子量を有する。該タンパク質又はペプチドはグリコシル化形態であることができる。

40

【0016】

本発明の一つの態様は、配列番号1又は2のアミノ酸配列を含む組換えタンパク質又はペプチドを提供する。

本発明のタンパク質又はペプチドは、トール様レセプター官能性/活性を示すことができる。

【0017】

本発明は、配列番号1又は2又は変異体又はそれらの断片から選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質も提供する。該タンパク質はトール様レセプタータンパク質、特にTLR14であることができる。

【0018】

50

本発明は、本発明のタンパク質又はペプチドの抗原性断片も提供する。

本発明は、本明細書において前に記載したポリヌクレオチドを含む組換えベクターも提供する。本発明は、該組換えベクターを含む宿主細胞も提供する。本発明はさらに、活性成分として該組換えベクターを含む遺伝子療法剤を提供する。

【0019】

本発明の一つの側面は、本明細書において前に記載したポリヌクレオチドを含むアジュバントを提供する。

本発明は：

配列番号1又は2のアミノ酸配列又はそれらの断片又は変異体を含むタンパク質；及び  
検出又は精製タグ；

のいずれか一つ又はそれより多くを含む融合化合物又はキメラ分子も提供する。

【0020】

本発明の一つの態様において、該検出又は精製タグは、FLAG配列、His6配列、Ig配列及び別のレセプタータンパク質の異種ポリペプチドのいずれか一つ又はそれより多くから選択される。

【0021】

本発明は、配列番号1又は2のアミノ酸配列及びTLRリガンドを含む、組換え又は合成的に生成されたタンパク質を含むリガンド/レセプターも提供する。好ましくは、TLRリガンドはCpG核酸である。

【0022】

本発明は、本明細書において前に記載したタンパク質の抗原決定基を含む免疫原も提供する。

本発明はさらに、本明細書において前に記載したポリペプチド又はタンパク質又はペプチドのエピトープに特異的に結合する、モノクローナル又はポリクローナル抗体又はそれらの断片を提供する。該抗体は、固定化された形態で調製することができる。該抗体は、ビーズ、磁性ビーズ、スライド又は容器へのコンジュゲーション又は付着により固定することができる。該抗体は、臭化シアン活性化セファロスへ固定化させる、又はグルタルアルデヒド架橋有り又は無しでポリオレフィン表面へ吸着させることができる。

【0023】

本発明は、トール様レセプター活性を変調する化合物を同定するための方法も提供し、それは：

配列番号1又は2のアミノ酸配列又は変異体又はそれらの断片を含むポリペプチドと試験サンプルを接触させること；

トール様レセプター活性のマーカについてモニターすること；及び

トール様レセプター活性を変調する化合物を同定すること；

の工程を含む。

【0024】

本発明の一つの態様において、該トール様レセプター活性のマーカは：

(i) NFカッパB活性化

(ii) NFカッパBタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド

(iii) IRF3タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド

(iv) p38タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド

(v) IKKタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド

(vi) RANTESタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド

(vii) TLR4タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド又は

(viii) いずれかの炎症誘発性又は抑制性サイトカイン

のいずれか一つ以上を含む。

【0025】

一つの態様において、該方法は、各(i)から(viii)の少なくとも2つの、試験サンプルと比べた量の相違を決定する工程を含む。

10

20

30

40

50

別の態様において、該方法は、各 ( i ) から ( v i i i ) の少なくとも3つの、試験サンプルと比べた量の相違を決定する工程を含む。

【 0 0 2 6 】

一つの場合において、試験サンプルのタンパク質と比べた量が決定される。もしくは、核酸マイクロアレイを使用して試験サンプルの mRNA と比べた量が決定される。トール様レセプター活性は T L R 1 4 活性であることができる。

【 0 0 2 7 】

本発明の一つの態様において、T L R 活性を活性化する、又は阻害する化合物は：

( i ) N F カ ヲ ヲ B 活 性 化

( i i ) N F カ ヲ ヲ B タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヲ ク レ オ チ ド

( i i i ) I R F 3 タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヲ ク レ オ チ ド

( i v ) p 3 8 タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヲ ク レ オ チ ド

( v ) I K K タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヲ ク レ オ チ ド

( v i ) R A N T E S タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヲ ク レ オ チ ド

( v i i ) T L R 4 タ ン パ ク 質 又 は そ れ を コ ー ド す る ポ リ ヲ ク レ オ チ ド 又 は

( v i i i ) い ず れ か の 炎 症 誘 発 性 又 は 抑 制 性 サ イ ト カ イ ン

の少なくとも一つ以上の、試験サンプルと比較した量、発現、活性又はリン酸化を決定することにより同定される。

【 0 0 2 8 】

別の態様において、T L R 活性を変調することが可能な化合物は、本明細書において前に記載した方法により同定される。

本発明は、本発明の化合物及び薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物も提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明は：配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列を含む T L R 1 4 ポリペプチド又は配列番号 3 又は 4 の核酸を含むポリヌクレオチドの活性を変調する試薬又は化合物；及び

薬学的に許容できる担体；

を含む医薬組成物も提供する。

【 0 0 3 0 】

本発明の一つの態様において、試薬は T L R 1 4 アゴニスト又はアンタゴニストである。

好ましくは、担体化合物は、水、塩水及び緩衝液のいずれか一つ以上から選択される水性化合物である。該組成物は経口、経直腸、経鼻、局所又は非経口投与の形態であることができる。

【 0 0 3 1 】

本発明の一つの態様において、該化合物又は組成物は、アレルギー性疾患、自己免疫性疾患、炎症性疾患、心血管疾患、C N S 疾患、腫瘍性疾患及び感染性疾患及び / 又は免疫仲介障害のいずれか一つ以上の治療のための医薬の製造において使用される。

【 0 0 3 2 】

本発明の一つの態様において、障害は、感染、外傷又は損傷、慢性炎症性疾患、移植片拒絶又は移植片対宿主疾患、クローン病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、タイプ 1 糖尿病又は関節リウマチ、喘息又はアトピー疾患及びアレルギー性脳脊髄炎により誘発された敗血症又は急性炎症のいずれか一つ以上から選択される。

【 0 0 3 3 】

他の免疫仲介障害には、糖尿病、関節炎（関節リウマチ、若年性関節リウマチ、骨関節炎、乾癬性関節炎を含む）、アテローム性動脈硬化症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎、皮膚炎（アトピー性皮膚炎及び湿疹性皮膚炎を含む）、シェーグレン症候群に二次的な乾性角結膜炎を含むシェーグレン症候群、円形脱毛症、節足動物咬合反応によるアレルギー応答、アフタ性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、潰瘍性大腸炎、喘息、アレルギー喘息、皮膚紅斑性狼瘡、硬皮症、鞘膜炎、直腸炎、薬疹、ハンセン病逆転反応、らい性結節性紅斑、自己免疫性ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急

10

20

30

40

50

性壊死性出血性脳症、突発性両側性進行性感音性難聴、再生不良性貧血、赤芽球癆、突発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ヴェグナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スチーブンス・ジョンソン症候群、突発性スプルー、扁平苔癬、グレーブス眼症、サルコイド症、原発性胆汁性肝硬変、後部葡萄膜炎、間質性肺線維症、アルツハイマー病又は小児脂肪便症のいずれか一つ以上が含まれる。

【0034】

本発明はさらに、配列番号1又は2のアミノ酸配列を有するTLR14ポリペプチド又は変異体に対するアゴニスト又はアンタゴニストを提供する。

本発明は、細胞と哺乳類TLR14のアゴニスト又はアンタゴニストを接触させることを含む、細胞又は組織培養細胞の生理機能又は発育を変調する方法も提供する。

10

【0035】

本発明はさらに、NF- $\kappa$ B活性化を阻害する又は促進することが可能な化合物をスクリーニングする方法を提供し：

本明細書において前に記載したタンパク質をコードする遺伝子、及びNF- $\kappa$ Bの活性化に付随する検出可能なシグナルを提供する成分を有する細胞を提供すること；

形質転換細胞中の遺伝子の発現を提供する条件下で形質転換細胞を培養すること；

形質転換細胞とスクリーニングのための一つ又はそれより多くの化合物を接触させること；

検出可能なシグナルを測定すること；及び

検出可能なシグナルを測定することにより活性化剤化合物又は阻害剤化合物を単離すること又は同定すること；

20

の工程を含む。

【0036】

一つの態様において、本発明は、医薬化合物として単離された又は同定された化合物を最適化することの工程を含む。

本発明は、トール様レセプター活性を変調することが可能な化合物をスクリーニングするためのキットも提供し：

本発明のタンパク質をコードする遺伝子、及びNF- $\kappa$ Bの活性化により検出可能なシグナルを提供する成分を有する細胞；

検出可能なシグナルを測定するための試薬；

30

を含む。

【0037】

本発明の一つの態様において、遺伝子はトール様レセプターTLR14をコードする。

本発明は、免疫性又は炎症性障害の治療のための医薬の製造における、配列番号1又は2のアミノ酸配列を有するTLR14の活性を阻害することができる配列番号1又は2のアミノ酸配列の断片又は変異体を含むポリペプチドの使用を提供する。

【0038】

本発明は、アジュバント又はワクチン製剤の製造における、本明細書において前に記載したポリペプチド、ポリヌクレオチド又は化合物の使用も提供する。

本発明は哺乳類レセプター、トール様レセプター14(TLR14)及びその生物学的活性に関する。それは該ポリペプチドをコードする核酸、及びその生産及び使用のための方法を含む。本発明の核酸は、本明細書に含まれているクローン化相補DNA(cDNA)配列とのそれらの類似性により一部特徴付けられる。

40

【0039】

特定の態様において、本発明は、配列番号1又は2と少なくとも12アミノ酸にわたって同一性を示す実質的に純粋な又は組換えTLR14タンパク質又はペプチド、配列番号1又は2のTLR14の天然配列、TLR14配列組成物を含む融合タンパク質：新規TLR(TLR14)の群より選択される組成物を含む。具体的態様において、組成物は、配列番号1又は2の成熟配列を含むか、又は翻訳後修飾を欠いており、又は組成物は、ヒトのような霊長類を含む哺乳類から選択される温血動物からのものであり、配列番号1又

50

は2の少なくとも一つのポリペプチドを含んでなり；グリコシル化されており、天然のグリコシル化で少なくとも100kDaの分子量を有し、合成ポリペプチドであり；別の化学部分にコンジュゲートされており；天然配列よりも5分の1の置換しかなく又は天然配列からの欠失又は挿入変異体である、タンパク質又はペプチドであることができる。具体的態様において、TLR、TLRの抗原性断片、TLRに対する抗体、TLRに対する抗体断片、TLRリガンドに対する抗体が固定化された形態を含む。固定化は、ビーズ、磁性ビーズ、スライド又は容器へのコンジュゲーション又は付着によるものであることができる。固定化は、当該技術分野では公知の方法による臭化シアン活性化セファロースへの固定化、又はグルタルアルデヒド架橋有り又は無しでのポリオレフィン表面への吸着であることができる。

10

**【0040】**

他の態様は、滅菌TLR14タンパク質又はペプチド又はTLR14タンパク質又はペプチド及び担体を含んでなり、担体は水、塩水及び/又は緩衝液を含む水性化合物であり、及び/又は経口、経直腸、経鼻、局所又は非経口投与のために製剤されている。

**【0041】**

特定の融合タンパク質態様において、本発明は、配列番号1又は2の成熟タンパク質配列、FLAG又はHis6又はIg配列を含む検出又は精製タグ；又は別のレセプタータンパク質配列を含む融合タンパク質を提供する。

**【0042】**

多様なキット態様は、TLR14タンパク質又はポリペプチド、及び：タンパク質又はポリペプチドを含むコンパートメント (compartment)；及び/又はキット中の試薬の使用又は廃棄のための説明書、を含むキットを含む。

20

**【0043】**

結合化合物態様は、TLR14タンパク質に特異的に結合する抗体からの抗原結合部位を含むものを含み、該タンパク質は霊長類タンパク質であり；結合化合物はFv、Fab又はFab2断片であり；結合化合物は別の化学部分又は抗体にコンジュゲートされており；配列番号1又は2の成熟ポリペプチドのペプチド配列に対して産生され；成熟TLR14に対して産生され；精製ヒトTLR14に対して産生され；免疫選択されており；ポリクローナル抗体であり；変性TLR14に結合し；少なくとも30µMの抗原に対するKdを示し；ビーズ又はプラスチック膜を含む固体基質に結合されており；滅菌組成物中にあるか又は放射性又は蛍光ラベルを含む検出可能なようにラベルされている。結合組成物キットは多くの場合、結合化合物及び前記結合化合物を含むコンパートメント；及び/又は試薬の使用又は廃棄のための説明書をキット中に含む。多くの場合、キットは定性的又は定量的分析を行うことが可能である。

30

**【0044】**

例えば、免疫原性量の霊長類TLR14で免疫系を免疫化することを含む抗体を作製する方法、又はこうした抗体と哺乳類TLR14タンパク質又はペプチドを接触させ、それにより抗原/抗体複合体を形成させることを含む抗原/抗体複合体を産生する方法が提供される。

**【0045】**

当該技術分野で普通に実践される免疫化法を使用することができ、それは文献に詳しく記載されている。

40

他の組成物には、滅菌結合化合物又は結合化合物及び担体を含む組成物が含まれ、該担体は水、塩水及び/又は緩衝液を含んでいる水性であり、及び/又は経口、経直腸、経鼻、局所又は非経口投与のために製剤されている。

**【0046】**

核酸態様には、TLR14又はペプチド又は融合タンパク質をコードする、単離された又は組換え核酸が含まれ、該TLRは哺乳類からのものであり；又は配列番号3又は4の抗原性ペプチド配列をコードし；複数の配列番号3又は4の抗原性ペプチド配列をコードし；配列番号3又は4からの少なくとも17連続するヌクレオチドを含んでなり、前記セ

50

グメントをコードする天然 cDNA と少なくとも 80% の同一性を示し；発現ベクターであり；さらに複製の起点を含んでなり；天然起源であり；放射性ラベル、蛍光ラベル又は免疫原性ラベルのような検出可能なラベルを含んでなり；合成ヌクレオチド配列を含んでなり；6 k B 未満、好ましくは 3 k B 未満であり；霊長類を含む哺乳類からであり；天然完全長コード配列を含んでなり；前記 TLR をコードする遺伝子のためのハイブリダイゼーションプローブであり；又は PCR プライマー、PCR 生成物又は変異誘発性プライマーである。こうした組換え核酸を含む細胞、組織又は器官も提供される。好ましくは、細胞は原核細胞；真核細胞；細菌細胞；酵母細胞；昆虫細胞；マウス細胞；哺乳類細胞；霊長類細胞又はヒト細胞である。こうした核酸、及び前記核酸を含むコンパートメント；さらに霊長類 TLR 14 タンパク質又はポリペプチドを含むコンパートメント；及び/又はキットの試薬の使用又は廃棄についての説明書；を含むキットが提供される。多くの場合、キットは定性的又は定量的分析を行うことが可能である。

10

## 【0047】

リガンド/レセプター複合体を生成させる方法も提供され、組換え又は合成的に生成されたタンパク質を含む実質的に純粋な TLR 14 と候補 TLR リガンドを接触させることを含んでなり、それにより前記複合体が形成されることを可能にする。

## 【0048】

TLR リガンドとは、TLR ポリペプチド、この場合 TLR 14 ポリペプチドに特異的に結合する分子を指している。ほとんどの場合、TLR リガンドは、適した条件下で TLR と接触させた場合、TLR シグナル伝達も誘導するであろう。

20

## 【0049】

本発明は、細胞又は組織培養細胞の生理学的機能又は発育を変調する方法も提供し、該細胞と哺乳類 TLR 14 のアゴニスト又はアンタゴニスト接触させることを含む。

本発明はマーカーとして以下のマーカーの少なくとも一つを使用し、TLR 14 の活性を変調する試薬を同定する又は評価する方法に関する：(i) NF カッパ B 活性化 (ii) NF カッパ B タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (iii) IRF 3 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (iv) p 38 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (v) IKK タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (vi) RANTES タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (vii) TLR 4 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド又は (viii) いずれかの炎症誘発性又は抑制性サイトカイン。

30

## 【0050】

本発明は、(i) NF カッパ B 活性化 (ii) NF カッパ B タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (iii) IRF 3 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (iv) p 38 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (v) IKK タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (vi) RANTES タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (vii) TLR 4 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド又は (viii) いずれかの炎症誘発性又は抑制性サイトカインの細胞又は組織における発現、量、活性又はリン酸化を改変する試薬の使用にも関する。

40

## 【0051】

本発明は新規 TLR 14 タンパク質の発見、及び TLR 14 の阻害及び活性化が (i) NF カッパ B 活性化 (ii) NF カッパ B タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (iii) IRF 3 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (iv) p 38 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (v) IKK タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (vi) RANTES タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド (vii) TLR 4 タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド又は (viii) いずれかの炎症誘発性又は抑制性サイトカインの活性化を導くことが可能なシグナル分子の量、発現、活性又はリン酸化を決定することにより検出することが可能であることに基づいている。

## 【0052】

50

本発明の一つの態様は、(i) NFカッパB活性化(ii) NFカッパBタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(iii) IRF3タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(iv) p38タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(v) IKKタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(vi) RANTESタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(vii) TLR4タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド又は(viii) いずれかの炎症誘発性又は抑制性サイトカインの、試験サンプルに対するレベルの相違を決定することにより、TLR14活性化又は阻害の効果をモニタリングするための方法を提供する。

#### 【0053】

本明細書で使用される「レベル」には、限定されるわけではないが、タンパク質の量、mRNAの発現量、遺伝子活性、タンパク質活性及びリン酸化の量が含まれる。

試験サンプルは、限定されるわけではないが、ペプチド核酸(PNA)、抗体、ポリペプチド、炭水化物、脂質、ホルモン及び小分子を含むことができる。試験化合物は、基準免疫賦活性核酸の変異体も含むことができる。これらは天然核酸源、ゲノム核又はミトコンドリアDNA又はcDNAから得られても、又は合成物(例えば、オリゴヌクレオチド合成により生成される)であってもよい。

#### 【0054】

それ故、一つの側面において、本発明はTLR14活性を活性化する又は阻害する試薬を同定する又は評価するための方法に関し、以下のマーカー：(i) NFカッパB活性化(ii) NFカッパBタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(iii) IRF3タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(iv) p38タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(v) IKKタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(vi) RANTESタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(vii) TLR4タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド又は(viii) いずれかの炎症誘発性又は抑制性サイトカイン；の少なくとも一つの、試験サンプルに対する量、発現、活性又はリン酸化の相違を決定することを含む。

#### 【0055】

別の態様において、こうした方法は、上に定義した(i)~(viii)の各々の少なくとも二つ、少なくとも三つの、試験サンプルに対する量の相違を決定することを含む。

本発明の一つの態様において、mRNAの試験サンプルに対する量の相違が決定され、及び、例えば、核酸マイクロアレイの使用により決定することが可能である。

#### 【0056】

本発明の一つの態様において、タンパク質の試験サンプルに対する量の相違が決定される。

本発明の別の側面は、TLR14の活性を変調する試薬を同定する又は評価するための方法に関し、前記方法は：(i) NFカッパB活性化(ii) NFカッパBタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(iii) IRF3タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(iv) p38タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(v) IKKタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(vi) RANTESタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(vii) TLR4タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド又は(viii) いずれかの炎症誘発性又は抑制性サイトカイン、を含む。別の態様において、こうした方法は、上に定義した(i)~(viii)の各々の少なくとも二つ、少なくとも三つの、試験サンプルに対する量の相違を決定することを含む。

#### 【0057】

TLR14の活性を変調する試薬を同定する又は評価するための方法の好ましい態様において、前記方法は：(i) NFカッパB活性化(ii) NFカッパBタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(iii) IRF3タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(iv) p38タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(v) IKKタンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド(vi) RANTESタンパク

10

20

30

40

50

質又はそれをコードするポリヌクレオチド(v i i) T L R 4タンパク質又はそれをコードするポリヌクレオチド又は(v i i i)いずれかの炎症誘発性又は抑制性サイトカイン、を含む。別の態様において、こうした方法は、上に定義した(i) ~ (v i i i)の各々の少なくとも二つ、少なくとも三つの、試験サンプルに対する量の相違を決定することを含む。

#### 【0058】

##### 配列相同性

本発明の特に好ましいヌクレオチド配列は、配列番号1又は配列番号2に示したヒト配列である。配列番号3のDNAによりコードされているアミノ酸の配列は配列番号1に示されている。配列番号4のDNAによりコードされているアミノ酸の配列は配列番号2に示されている。

10

#### 【0059】

一つより多くのコドンが同一のアミノ酸をコードすることが可能である遺伝子コードの既知の縮重のため、DNA配列は配列番号3に示されたものから変化することが可能であり、そしてそれでもなお配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている。こうした変異体DNA配列はサイレント変異を生じることができるか(PCR増幅の間に生じる)、又は天然配列の計画的な変異誘発の生成物であることが可能である。

#### 【0060】

本発明はそれ故、(a)配列番号1のヌクレオチド配列を含むDNA(b)配列番号3のポリペプチドをコードするDNA(c)中ストリンジエンシー条件下で(a)又は(b)のDNAにハイブリダイゼーション可能な、及び本発明のポリペプチドをコードするDNA;(d)高ストリンジエンシー条件下で(a)又は(b)のDNAにハイブリダイゼーション可能な、及び本発明のポリペプチドをコードするDNA、及び(e)(a)、(b)、(c)又は(d)に定義したDNAに対する遺伝子コードの結果として縮重している及び本発明のポリペプチドをコードするDNA、から選択される、本発明のポリペプチドをコードする単離されたDNA配列を提供する。もちろん、こうしたDNA配列によりコードされているポリペプチドは本発明に包含される。

20

#### 【0061】

本発明はそれ故、(a)天然哺乳類インターフェロンアルファ14アレルc遺伝子のコード領域から誘導されたDNA;(b)配列番号3のDNA;(c)中ストリンジエンシー条件下で(a)又は(b)のDNAにハイブリダイゼーション可能な、及び生物学的に活性なインターフェロンアルファ14ポリペプチドをコードするDNA;及び(d)(a)、(b)又は(c)に定義したDNAに対する遺伝子コードの結果として縮重している及び生物学的に活性なインターフェロンアルファ14ポリペプチドをコードするDNA;から選択される、生物学的に活性なヒトインターフェロンアルファ14ポリペプチドをコードする均等で単離されたDNAを提供する。

30

#### 【0062】

本明細書で使用される中ストリンジエントの条件は、例えば、DNAの長さに基づいて当業者は容易に決定することが可能である。基本的条件は、Sambrook et al. Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2 ed. Vol.1, pp.1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)に示されている。高ストリンジエントの条件も、例えば、DNAの長さに基づいて当業者は容易に決定することが可能である。

40

#### 【0063】

本発明の態様としてまた含まれるものは、不活性化N-グリコシル化部位(単数又は複数)、不活性化プロテアーゼプロセッシング部位(単数又は複数)又は保存的アミノ酸置換(単数又は複数)を含むポリペプチド断片及びポリペプチドをコードするDNAである。

#### 【0064】

別の態様において、本発明の核酸分子は、天然の配列と少なくとも80%同一であるヌクレオチド配列も含む。核酸分子が、天然の配列と少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも98%同一、少なくとも99%同一、又は少なくとも99.9%同

50

一である配列を含む態様も企図される。

【0065】

パーセント同一性は、目視検査及び数学的計算により決定することができる。もしくは、二つの核酸配列のパーセント同一性は、Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) により記載され、及びUniversity of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG) から入手可能なGAPコンピュータープログラム、バージョン6.0を使用して配列情報を比較することにより決定することが可能である。GAPプログラムのための好ましいデフォルトパラメーターには：(1)ヌクレオチドについての単項比較マトリックス(同一性に対して1及び非同源性に対して0の値を含んでいる)、及びSchwartz and Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979に記載されているGribskov及びBurgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986、の加重比較マトリックス；(2)各ギャップについて3.0のペナルティー及び各ギャップ中の各シンボルについての追加の0.01ペナルティー；及び(3)末端ギャップについてはペナルティー無し、が含まれる。配列比較の技術分野で当業者により使用されている他のプログラムも使用することができる。

10

20

30

40

50

【0066】

本発明は、ポリペプチドの生成において有用な単離された核酸も提供する。こうしたポリペプチドは多数の慣用技術のいずれかにより調製することができる。インターフェロナルファ14ポリペプチド又はそれらの望まれる断片をコードするDNA配列を、ポリペプチド又は断片の生成のための発現ベクター内にサブクローン化することができる。DNA配列を、適したリーダー又はシグナルペプチドをコードする配列内に都合よく融合する。もしくは、所望の断片を既知の技術を使用して化学的に合成することができる。DNA断片は、完全長クローン化DNA配列の制限エンドヌクレアーゼ消化によっても生成することができる。アガロースゲル上での電気泳動により単離される。必要なら、所望のポイントに5'又は3'末端を再構築するオリゴヌクレオチドを、制限酵素消化により発生したDNA断片に結合させることができる。こうしたオリゴヌクレオチドは、所望のコード配列の上流に制限エンドヌクレアーゼ切断部位をさらに含有し、及びコード配列のN末端に開始コドン(ATG)を位置させることができる。

【0067】

公知のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法も、所望のタンパク質断片をコードするDNA配列を単離する、又は増幅するために使用することができる。該DNA断片の所望の末端を規定するオリゴヌクレオチドを5'及び3'プライマーとして使用する。オリゴヌクレオチドは、発現ベクター内への増幅されたDNA断片の挿入を容易にするため、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を追加的に含有することができる。PCR技術は、Saiki et al., Science 239:487 (1988); Recombinant DNA Methodology, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; 及びPCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, Inc. (1990)、に記載されている。

【0068】

本発明は、天然に存在する又は組換えDNA技術を含む方法のような多様な技術を介して生成されるものを含む多様な形態のポリペプチド及びそれらの断片を包含する。例えば、インターフェロナルファ14ポリペプチドをコードするDNAは、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発を含むインビトロ変異誘発及びインビトロ核酸合成により配列番号3から誘導することが可能である。こうした形態には、限定されるわけではないが、誘導体、変異体及びオリゴマー、ならびに融合タンパク質又はそれらの断片が含まれる。

【0069】

本発明のポリペプチドは、配列番号1の核酸配列によりコードされる完全長タンパク質を含む。特に好ましいポリペプチドは、配列番号3のアミノ酸配列を含む。

本発明のポリペプチドは膜に結合されていてもよいし、又は分泌されていても、それ故可溶性であってもよい。可溶性ポリペプチドは、それらが発現される細胞から分泌されて

いることができる。一般に、可溶性ポリペプチドは、培養培地から所望のポリペプチドを発現する無傷の細胞を分離すること（例えば、遠心分離により）、及び所望のポリペプチドの存在について培地（上清）をアッセイすることにより同定すること（及び非可溶性膜結合対応物と区別すること）ができる。培地中のポリペプチドの存在は、該ポリペプチドが細胞から分泌され、及びそれ故タンパク質の可溶性形であることを示している。

#### 【0070】

異なる長さのポリペプチド断片も本明細書において提供される。天然に存在する変異体ならびにポリペプチド及び断片の誘導された変異体も本明細書において提供される。

本発明はさらに医薬組成物に関する。該組成物は：（a）TLR14ポリペプチド又はポリヌクレオチドの活性を変調する試薬及び（b）薬学的に許容できる担体を含む。該試薬はTLR14アゴニスト又はアンタゴニストであることができる。該組成物は、アレルギー性疾患、自己免疫性疾患、炎症性疾患、心血管疾患、中枢神経系疾患、腫瘍性疾患及び感染性疾患のような疾患を治療するために使用することができる。

10

#### 【0071】

当業者は、医薬担体の選択には生理学的に適した化合物が含まれること、及び化合物の選択が投与経路及び意図された投与計画に依存することを理解するであろう。

#### 治療/療法

本明細書において使用される用語「治療」とは、ヒト又は非ヒト動物に利益となることが可能であるいずれかの治療法を指す。該治療は、存在している状態に関していてもよいし、又は予防的であってもよい（予防的治療）。治療は、治療的、軽減的又は予防的効果を含むことができる。

20

#### 【0072】

より具体的には、「療法的」及び「予防的」治療への本明細書での言及は、その最も広い前後関係で考えられるべきである。用語「療法的」は、対象が完全に回復するまで治療されることを必ずしも意味するわけではない。同様に、「予防的」は、対象が最終的に疾患状態にはならないであろうことを必ずしも意味するわけではない。

#### 【0073】

従って、療法的及び予防的治療には、特定状態の徴候の寛解、又は特定状態を発生する危険性を防止する又はさもなくば軽減することが含まれる。用語「予防的」は、特定状態の重度又は発症を軽減することと考えることができる。「療法的」は、存在している状態の重度を軽減することもできる。

30

#### 【0074】

本発明は、特に示さない限り、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子組換え生物学、微生物学、組換えDNA技術及び免疫学の一般に使用される技術を含む方法を記載しており、それらのすべては当該分野で十分に記述されている。

#### 【0075】

本発明はさらに、哺乳類細胞から調製された細胞及び組織抽出物で同定された又は精製された、TLR14の内在性リガンド（単数又は複数）に関する。

本発明はさらに、TLR4シグナル伝達の変調に関し、TLR14はTLR4シグナル伝達を促進する又は阻害する。

40

#### 【0076】

本発明に従ったペプチドは、該ペプチドの活性又は機能に影響する又は変調する分子のスクリーニングに使用することができる。こうした分子とペプチドの相互作用は、療法的及び予防的状況で有用であることができる。

#### 【0077】

新規薬剤の同定を導く医薬品研究は、先導化合物が発見される前又はさらには後の両方で、非常に多数の候補物質のスクリーニングを含むことがよく知られている。こうした手段は、癌を治療すること及び予防することに有用な可能性を有する物質のスクリーニングに有用である。ポリペプチドの変調剤として同定された物質は、インビボ使用のための療法剤の設計及び研究のための基礎を提供するので、これらの領域の療法における進歩を意

50

味する。

【0078】

多様なさらなる側面において、本発明はスクリーニング及びアッセイ方法、及びそれらにより同定された物質に関する。

それ故、本発明のさらなる側面は、本発明のペプチドと相互作用する又は結合する、及び/又はその生物学的機能又は活性又は別の物質のそれらを妨害するペプチド又は化学化合物のような物質を、スクリーニングする又は探索する及び/又は入手する又は同定することにおける、本発明のペプチド(それらの断片及び誘導体を含む)の使用を提供する。例えば、本発明の一つの側面に従った方法は、本発明のペプチドを提供し、それと物質を接触させると、その接触は該ペプチドと該物質間の結合を生じることができる。結合は、定性的及び定量的の両方で、当業者には公知であろうさまざまな技術により決定することができる。

10

【0079】

ペプチド機能の変調剤として同定された物質は、天然のペプチド又は非ペプチドであることができる。非ペプチド「小分子」がしばしば多くのインビボ医薬使用に好ましい。従って、物質のミメティック(mimetic)又は模倣体(mimic)を医薬使用のために設計することができる。既知の医薬として活性な化合物について模倣体を設計することは、「先導」化合物に基づいた医薬の開発への既知のアプローチである。このことは、活性化合物を合成するのが困難である又は費用がかかる場合、又は投与の特定の方法に対して適切ではない場合(例えば、ペプチドは消化管中でプロテアーゼにより迅速に分解される傾向があるので、経口組成物の活性剤として適切ではない)に望ましい。模倣剤設計、合成及び試験は、目標とする特性について多数の分子をランダムにスクリーニングすることを避けるために使用することができる。

20

【0080】

所与の目標特性を有する化合物からの模倣体の設計においては、一般にいくつかの工程がとられる。第一に、目標特性の決定において決定的及び/又は重要である化合物の特定の部分を決定する。ペプチドの場合、このことはペプチド中のアミノ酸残基を系統的に変化させることにより、例えば、各残基を順に置換することにより行うことが可能である。化合物の活性領域を構成するこれらの部分又は残基はその「ファルマコフォア」として知られている。

30

【0081】

ファルマコフォアが決定されたら、起源範囲からのデータ、例えば、分光学的技術、X線回析データ及びNMRを使用して、その物理学的特性、例えば、立体化学、結合、サイズ及び/又は電荷に従ってその構造をモデル化する。コンピューター分析、類似性マッピング(原子間の結合よりもむしろファルマコフォアの電荷及び/又は容量をモデル化する)及び他の技術も、このモデル化プロセスに使用することが可能である。

【0082】

このアプローチの変法においては、リガンドの三次元構造及びその結合パラメーターをモデル化する。このことは、リガンド及び/又は結合相手が結合によりコンホメーションを変化させる場合に特に有用であり、モデルが模倣体の設計を考慮することを可能にしている。

40

【0083】

次に鑄型分子が選択され、その上にファルマコフォアを模倣する化学基を接ぎ合わせることが可能である。該鑄型分子及び接ぎ合わされた該化学基は、模倣体を合成するのが容易であるように、薬学的に許容できそうであるように、及びインビボで分解されないように、一方、先導化合物の生物学的活性が残るように都合よく選択することが可能である。このアプローチで見出されたミメティック及び模倣体は、それらが目標特性を有しているか、又それらがどの程度それを示すかどうかを見るためにスクリーニングすることが可能である。インビボ又は臨床試験のための一つ又はそれより多くの最終模倣体に達するため、さらなる最適化又は修飾を実施することが可能である。

50

## 【0084】

それ故、本発明のさらなる側面は、本発明の少なくとも一つのペプチドと推定結合分子又は他の試験物質間の結合活性を評価するためのアッセイを提供し、それは、少なくとも一つのペプチドと推定結合分子又は他の試験物質を接触させること、及び少なくとも一つのペプチドと結合分子又は試験物質間の相互作用又は結合を決定すること、の工程を含み、少なくとも一つのペプチドと結合分子間の結合は、少なくとも一つのペプチドの有用性の指標である。

## 【0085】

本発明のペプチドと相互作用する物質は、その活性を変調させるために、単離する及び/又は精製する、製造する及び/又は使用することができる。

二つの分子間の結合について試験する本発明のアッセイのため、本発明の全ペプチドを使用する必要はない。当業者には既知のいずれか適した方法で、断片を発生させ及び使用することができる。

## 【0086】

さらに、本発明のアッセイの詳細なフォーマットは、日常の技術及び知識を使用し、当業者が変更することもできる。

詳細な説明

我々は、トール様レセプター/インターロイキン-1レセプター(TLR)ファミリーのメンバーと顕著な相同性を示す新規遺伝子を同定した。細胞に基づいたアッセイにおいて、この新規レセプターは転写因子NF- $\kappa$ B及びIRF3を活性化し、抗ウイルスサイトカイン、RANTESの産生を駆動する。該タンパク質はTLR2、TLR4及び普遍的TLRアダプター、MyD88と相互作用する。我々はレセプターTLR14と名付けた。

## 【0087】

この推定レセプターの発現は、微生物産物、例えば、LPSにより増強され、それが免疫変調剤として機能することができることを示唆している。このことの裏付けとして、細胞がTLR14を発現するベクターでトランスフェクトされた場合、転写因子NF- $\kappa$ B及びIRF3が活性化された。NF- $\kappa$ B及びIRF3の両方が、細菌及びウイルス病原体の除去における中核であるので、TLR14を阻害する又は活性化することは、炎症性疾患の治療について見込みのある新規アプローチである。加えて、高レベルのTLR14を血清中に見出した。主としてこのレセプターの外部ドメインを含むTLR2の可溶型も、血清及び母乳中に見出された。TLR2のこの形態は、TLR2リガンドに対する活性免疫応答を抑えることにおいて保護的である。完全長TLR14ポリペプチド又はそれ自身の外部ドメインは類似の生物学的特性を有することができ、それ故、潜在的生物療法剤と考えることができる。

## 【0088】

LPS及びTLR4シグナル伝達経路の構成要素により調節される遺伝子を同定するため、マイクロアレイアプローチを使用した。上記のように、レセプター刺激後、TLR2及びTLR4からシグナルを伝達するためにはアダプター分子、Malが必要とされる。胚性幹細胞中のMalをコードする遺伝子を破壊するため、遺伝子標的化ベクターを使用した。これらの細胞を次ぎにLPSで処理し、ノックアウト及び野生型細胞間の遺伝子発現の相違を測定した。この方法において、トール様レセプター/インターロイキン-1レセプター(TLR)ファミリーのメンバーと顕著な相同性を示す遺伝子を同定した。

## 【実施例】

## 【0089】

示された実施例は例示のためのみであり、本発明の範囲内の多様な変更及び修飾が当業者には明らかになるであろう。

材料及び方法細胞培養

HEK293及びU373細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)を含み、100単位

10

20

30

40

50

/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン及び 2 mM L-グルタミンを補給したダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) 中で培養した。

#### 【0090】

##### 発現プラスミド

キメラ TLR レセプター CD4 - TLR4 は R. Medzhitov (Yale University, New Haven, CT) から贈与された。TLR14 cDNA (KIAA0644) を含有するベクターは Kazusa DNA Research Institute から供給され、続いての PCR クローニングの標的として使用された。使用されたプライマーは HindIII 及び EcoRV のための制限部位を含んでおり、以下のものであった：5'-GCAAGCTTATGGAGGCTGCCCGCCCTTG (センス) (配列番号 5)；及び 5'-GCGATATCGGCCTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGTCGGCAAATCGC (アンチセンス) (配列番号 6)。アンチセンスプライマーはトランスフェクト細胞中の翻訳されたタンパク質産物の発現を検出するため、9 アミノ酸ヘマグルチニンエピトープタグをコードする配列を含んでいる。生じた EcoRI - HindIII 断片を哺乳類発現ベクター pCDNA3.1 (Invitrogen) の多クローニング部位内にライゲートした。

10

#### 【0091】

##### Mal 欠損胚性幹細胞の発生及びマイクロアレイ解析

Mal をコードする遺伝子を欠く胚性幹細胞は相同的組換えにより発生させた。簡単には、マウス胚性幹細胞に、ネオマイシン耐性カセットで Mal 遺伝子が置き換えられたコード配列のほとんどを 700 bp エクソンがコードする標的化ベクターを電気穿孔した。標的化細胞をサザンブロッティングにより同定した後、Mal 欠失についてホモ接合性クローンを発生させるために 2 回目の標的化にかける。変異体及び野生型細胞を種々の時間、LPS で刺激し、マイクロアレイ解析のために RNA を抽出した。

20

#### 【0092】

##### プロモーター分析

ヒト Riken クローン KIAA0644 及び隣接領域の完全ヌクレオチド配列は、www.ncbi.nlm.nih.gov の National Center for Biotechnology Information (NCBI) ウェブサイトから得られた。転写されたヌクレオチド配列及びゲノム配列中のリピート配列の同定は、NIX アプリケーション (<http://menu.hgmp.mrc.ac.uk>) 及びプログラム Repeat-masker (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>) を使用して実施した (20)。転写因子結合部位予想は MatInspector Release Professional ([www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl](http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl)) を使用して実施した (21)。

30

#### 【0093】

##### 培養細胞からの mRNA 単離

mRNA は、LPS (1 µg/ml) で種々の時間処理した後、細胞から抽出した。簡単には、処理した細胞をペレット化し、1 ml の TRI 試薬 (Sigma) で溶解した。クロホルム (0.2 ml) をサンプルに加え、混合物を 12,000 g で 15 分遠心分離した。RNA を含有する水相を除き、等量のイソプロパノールの添加により、混合物から全 RNA を沈澱させた。12,000 g で 10 分遠心分離した後、RNA 含有ペレットを 500 µl の 75% エタノールで洗浄した。エタノールのいずれの痕跡も除去し、ペレットを室温で 10 分放置して乾燥させた。ペレットを 30 µl の RNase を含まない水に再懸濁し、-80 °C で保存した。

40

#### 【0094】

##### 逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

RT-PCR を Promega Imprompt II RT-PCR キットを使用して実施した。逆転写反応は 2 工程で実施し、次に PCR 反応を合成された cDNA に対して実施した。

#### 【0095】

工程 1：薄壁 500 µl PCR マイクロ遠心チューブ中で、1 µl のランダムプライマーを 4 µl の RNA に加えた。遠心チューブを 70 °C で 5 分及び 4 °C で 5 分のサーマルサ

50

イクラーに置いた。

【0096】

工程2：成分の第二の組を加えた；1  $\mu$ l のデオキシヌクレオチド混合物（dNTP 混合）（各 dNTP を 500  $\mu$ M）、5.5  $\mu$ l の PCR 試薬用水、4.0  $\mu$ l の 10X 緩衝液、3.0  $\mu$ l の塩化マグネシウム、1  $\mu$ l の RNase 阻害剤（1 単位 /  $\mu$ l）、1  $\mu$ l の RT（1 単位 /  $\mu$ l）。これで PCR チューブの総容量が 20  $\mu$ l となる。チューブを以下の時間及び温度、25 で 5 分、42 で 60 分、70 で 15 分、のサーマルサイクラーに置いた。

【0097】

以下のものを薄壁 500  $\mu$ l PCR マイクロ遠心チューブに加えた：5  $\mu$ l の 10X 緩衝液、1  $\mu$ l の dNTP（各 dNTP を 200  $\mu$ M）、1  $\mu$ l の PCR プライマー（各々 0.4  $\mu$ l）、2~5  $\mu$ l の鋳型 DNA（cDNA）、1  $\mu$ l の Taq DNA ポリメラーゼ混合物（0.05 単位 /  $\mu$ l）及び PCR チューブ中の総容量を 50  $\mu$ l とすのに十分な量の PCR 試薬用水。増幅温度は以下の通りであった、変性 / RT 不活性化（工程 1）94 で 2 分、変性（工程 2）94 で 15 秒、アニーリング（工程 3）55 で 30 秒、伸長 68 で 1 分（工程 2、3 及び 4 を 35 回繰り返した）、最終伸長（工程 5）68 で 5 分。PCR 産物を次ぎに 1% アガロースゲルで電気泳動し、UV トランスルミネーターで可視化した。

【0098】

タンパク質発現の検出

推定タンパク質の C 末端に方向付けられたペプチド抗体は、Eurogentec, Liege Science Park, Belgium で合成された。免疫化に使用されたペプチドは以下のアミノ酸から構成されていた - CGSLRREDRLQLRFAD（配列番号 7）。細胞株を、示されたように種々の時間、TLR リガンドで処理した。冷 PBS の添加により刺激を停止し、細胞を SDS - PAGE サンプル緩衝液中で溶解した。ウエスタンブロッティングのため、TLR 14 抗体を、0.5% Tween 20 を含有するトリス緩衝化塩水中で 1 : 1000 に希釈した。

【0099】

ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ

HEK 293 細胞又は U 373 細胞を 96 ウェルプレートに蒔き（ウェル当たり  $2 \times 10^4$  細胞）、次の日、発現ベクター及びレポータープラスミドでトランスフェクトした。「Gene Juice（商標）」（Novagen）を、製造元の説明書に従って一過性トランスフェクションに使用した。NF- $\kappa$ B 又は IRF 3 を含んでいる実験については、80 ng の NF- $\kappa$ B - 又は ISR 3 - ルシフェラーゼレポーター遺伝子（Stratagene）を、40 ng の Renilla ルシフェラーゼ内部対照プラスミド（Promega）と共に細胞内にトランスフェクトした。24 時間後、細胞を受動溶解緩衝液（Promega）に採取し、レポーター遺伝子活性をルミノメーターで測定した。細胞が刺激される場合、LPS（Sigma）を採取に先立った 6 時間前に、1  $\mu$ g / ml の最終濃度で細胞に加えた。データは対照レベルに対して平均誘導倍数  $\pm$  s.d. で表現されている（代表的実験については 3 回の別々の実験から、各々 3 重に実施した）。

【0100】

酵素結合免疫吸着アッセイ

U 373 細胞を、TLRH 発現プラスミドの増加させた用量（1、10 及び 100 ng）でトランスフェクトした。細胞は 37 で 24 時間インキュベートした。96 ウェルマイクロタイタープレートを、40 ng / ml の最終濃度の捕獲抗体（マウス抗ヒト RANTES）で被覆した。24 時間後、プレートを 0.05% Tween 20 含有 PBS で洗浄した。プレートを次ぎに 1% BSA 及び 5% スクロース含有 PBS 中、室温で 1 時間ブロックした。細胞上清（100  $\mu$ l）を各ウェルに加え、室温で 2 時間インキュベートした。次ぎに検出抗体（ビオチン化ヤギ抗ヒト RANTES）を 10 ng / ml の最終濃度でウェルに加えた。プレートを再び室温で 2 時間インキュベートした。洗浄後、100  $\mu$ l のストレプトアビジン - HRP を各ウェルに加え、プレートを覆い、室温で 20 分イン

10

20

30

40

50

キュベートした。最後に、 $100\ \mu\text{l}$ の基質溶液 (R&D Systems、カタログ番号DY999) を加え、続いて $50\ \mu\text{l}$ の停止溶液 ( $2\ \text{N}\ \text{H}_2\text{SO}_4$ ) をウェルに加えた。各ウェルの光学密度を、 $450\ \text{nm}$ に設定されたマイクロプレートリーダーで測定した。

#### 【0101】

##### 共免疫沈降アッセイ

HEK293細胞を $10\ \text{cm}$ のプレートに、 $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{ml}$ で蒔いた。次の日、細胞を $3\ \mu\text{g}$ のflagタグ付けTLR2、TLR4又はMyc-タグ付けMyD88でトランスフェクトした。24時間後、 $1\%$ NP40を含有するヘプス緩衝液中で細胞を溶解した。細胞溶解物は次にM2抗flagアガロースビーズ (Sigma) とインキュベートした。3時間後、ビーズをヘプス緩衝液で3回洗浄し、 $20\ \mu\text{l}$ のSDS-PAGEサンプル緩衝液に再懸濁した。タンパク質サンプルを $10\%$ SDS-PAGEゲル上で流し、ウエスタンブロッティングのためにニトロセルロースに移した。生じたプロットを抗TLR14及び抗flag抗体で探索した。

10

#### 【0102】

##### 局在化研究

LPSでの刺激に先立った24時間前、細胞を $10\ \text{cm}$ ディッシュに $1 \times 10^5$ 細胞/ $\text{ml}$ で蒔いた。膜及び細胞質分画を超遠心により調製し、TLR14の局在化を決定するためSDS-PAGE及びウエスタンブロッティングを行った。 $10\%$ FCSを含有する培地 (DMEM) を、SDS-PAGEに続いてTLR14の存在についてプロットした。

20

#### 【0103】

##### TLR14をコードする遺伝子の特徴付け

予備的マイクロアレイ解析は、MaeIノックアウト細胞において低発現レベルを示す6つの遺伝子を同定した。該遺伝子の5つはある程度特徴付けられていたが、残りの遺伝子は新規であり、そして本明細書において特徴付けられた。この遺伝子の配列は、Kazusa DNA Research Institute ([www.Kazusa.or.jp](http://www.Kazusa.or.jp)) でのヒトcDNAプロジェクトの一部として、HUG (Human Unidentified Gene-Encoded Large Proteins) タンパク質データベースから入手可能である。以下に概説する理由から、この新規遺伝子をTLR14と名付けた。

#### 【0104】

我々は、NCBIから入手可能なMap Viewerツールを使用して、該遺伝子をヒト7番染色体に位置付けした (図1A)。該遺伝子は $4.7\ \text{kb}$ の長さであり、CREB5及びCPVLカルボキシペプチダーゼが隣接していた。ヒト及びマウスTLR14についてのヌクレオチド配列は、それぞれ図1B及び1Cに示されている。予測されたタンパク質は $811$ アミノ酸長であり (図1D)、すべての膜局在化タンパク質に共通する特色である、N末端シグナル配列を含有する。推定タンパク質のN末端も少なくとも6つのロイシンリッチリピートを含み、いくつかのTLRの細胞外領域と高度に相通的である (TLR4が例として図1Eに与えられている)。

30

#### 【0105】

発現プロファイルは、図2Aに示されているように、脳、腎臓及び卵巣における遺伝子産物の高い存在量を明らかにした (情報はKazusa DNA Research Institute から得られた)。TLR14のC末端に対するポリクローナル抗体を発生させた。免疫化に使用したペプチドはアミノ酸CGSLRREDDRLLRQFAD (配列番号7) を含む。抗体は、ヒト脳及び肺組織においておよそ $81\ \text{kDa}$ のタンパク質を検出した (図2B)。

40

#### 【0106】

上記のように、TLRファミリーのメンバーのすべてが細胞質TIRドメインを含有する。このドメインは約 $200$ アミノ酸に広がり、ファミリーメンバー間で、さまざまな程度の配列類似性を有している。3つの特定のboxを同定することが可能であり、それはファミリーメンバー間で高度に保存的である。box1はファミリーのシグナチャー (signature) 配列と考えられ、一方、box2及び3はシグナル伝達について決定

50

的なアミノ酸を含有する。TLR1及びTLR2のTIRドメインの結晶構造は、box 2の周囲を中心とするコア構造要素を明らかにした(22)。BBループと名付けられたこの領域は、暴露された表面パッチ(patch)を形成し、中心的なプロリン又はアルギニン残基を含有する。これらのアミノ酸はループの先端に位置し、下流シグナル伝達成分との接触点を形成する。TLR14の詳細な検査は、それが高度に保存されたbox 2及び同一視することができるbox 1及び3(図3)を含有することも明らかにし、この新規タンパク質がTLRスーパーファミリーに属することを示唆している。

#### 【0107】

TLR14の発現は、細胞をTLR2及びTLR4リガンドで処理した後に誘導される  
 上記のように、LPSへの暴露後、Malを欠く細胞においてはTLR14発現が無効にされる。このことは、問題とする遺伝子がLSP及びおそらく他のTLRリガンドにより調節されていることを示している。この問題をさらに追求するため、我々はNIXアプリケーション(<http://menu.hgmp.mrc.ac.uk>)及びMatInspector Relevance Professional([www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl](http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl))を使用して、TLR14のプロモーター領域及び可能な転写因子結合部位を同定した。機能性TLR14プロモーターはエクソン1近位の4kb領域内に含まれているようである。この領域のさらなる分析は、NF- $\kappa$ B、IRF7及びEts-1のようなくつかの転写因子のための推定結合部位を明らかにした(図4)。TLR14 mRNA発現の誘導は、炎症性刺激による細胞の処理に続いてのRT-PCRにより分析した。図5Aに示されたように、TLR14 mRNAの発現は、LPSへの暴露後の時間と共に、脳星状細胞腫細胞(U373)及び初代マウス胎児線維芽細胞(MEF)で誘導された。著しい増加もLPSで処理したマウスの脳から調製されたTLR14 mRNAのレベルで検出された(図5B)。発現の誘導は、図6Aに示されたように、TLR2リガンド Pam<sub>3</sub>Cysでの処理後、ヒトグリオーマ細胞株、A172中のタンパク質レベルでも検出された。類似の効果が、TLR4で安定的にトランスフェクトされたHEK-293細胞で、LPSでの処理後に見られた(図6B)。加えて、図6Cに示されたように、TLR14タンパク質発現の増加が、LPSを注射したマウスの脳で観察された。

#### 【0108】

##### TLR14は転写因子NF- $\kappa$ B及びIRF3を活性化する

上記のように、NF- $\kappa$ BはTLRスーパーファミリーのほとんどのメンバーにより活性化されるが、一方、IRF3活性化はTLR3及びTLR4に限定されている。TLR14がこれらの因子も活性化し、及び免疫応答を変調することができるかどうかを追求するため、該タンパク質をコードするcDNAを哺乳類発現ベクターpcDNA3.1内にクローン化し、NF- $\kappa$ B及びIRF3が結合するDNAの要素を含有するルシフェラーゼレポーター構築物を使用して機能性アッセイを実施した。該タンパク質はヘマグルチニン(HA)をコードするタグを含有し、発現は抗HA抗体を使用して多様な細胞株で発現を検出した(データは示されていない)。TLR14発現プラスミドがB及びISREレポーター構築物とともに細胞内にトランスフェクトされた場合、ルシフェラーゼ活性が増強され(図7)、TLR4同様、TLR14がNF- $\kappa$ B及びIRF3の両方を活性化することを示唆している。予備的ELISAも、TLR14でトランスフェクトした細胞においてRANTES産生(IRF3誘導可能サイトカイン)の増加を示した(図8)。

#### 【0109】

##### TLR14はTLRファミリーの他のメンバーと相互作用する

TIRドメイン含有タンパク質の共通の特色は、他のTIRドメイン含有タンパク質とホモ又はヘテロ二量体形成するそれらの能力である。TLR14が一方又は両方のレセプターと相互作用できるかどうかを決定するため、TLR14及びTIRドメイン含有レセプターTLR2及びTLR4で共免疫沈降実験を実施した。図9Aに示したように、TLR14は過剰発現されたTLR2及びTLR4と強く相互作用することを見出した。TLRのTIRドメイン中の保存的プロリン残基のヒスチジンへの変異はTIR-TIR相互作用を消滅させることが知られている(22)。従って、レセプターの変異体(P/H)

形が TLR14 と同時発現されると、TLR14 と TLR2 が又は TLR4 との相互作用が著しく減少した。図 9 B に示したように、TLR14 は普遍的 TIRドメイン含有アダプター MyD88 とも相互作用することが見出された。このことは、TLR14 が TIRドメイン含有タンパク質であるという考えを支持している。最後に、図 10 に示したように、TLR2 及び内在性 TLR14 間の相互作用を検出することができた。このことを試験するため、HEK293 細胞を flag タグ付け TLR2 でトランスフェクトした。細胞を次ぎに溶解し、TLR2 及びいずれかの相互作用するタンパク質と免疫沈降させるため、抗 flag ピーズとインキュベートした。ウエスタンブロッティング後、抗 TLR14 抗体を使用して、TLR14 に相当するバンドを検出することができた。

【0110】

TLR14 は血清中に高レベルで見出され、可溶性タンパク質として産生することができる

TLR14 が原形質膜に局在化されているかどうかを決定するため、細胞分画を調製した。驚いたことに、TLR14 は細胞の細胞質分画に見出された(図 11 A)。加えて、高レベルの該タンパク質がウシ胎児血清中に見出され(図 11 B)、該タンパク質は可溶性分泌タンパク質であることができることを示唆している。質量分光法的分析は、FCS 中に存在するバンドは、ヒト TLR14 のウシ相同体であったことを明らかにした(データは示されていない)。予備的実験も、LPS での刺激後、該タンパク質が U373 細胞から分泌されることを示した。分子量が完全長タンパク質の分子量に相当するので、該タンパク質は切断されていないようである。最大分泌は 6 時間で生じる。

【0111】

本発明は、細部にわたって変更することができる、本明細書で上に記載された態様に制限されない。

参考文献：

1. Poltorak, A. et al. Science 282, 2085-2088 (1998).
2. Qureshi, S.T. et al. J.Exp.Med. 189, 615-625 (1999).
3. Hayashi, F. et al. Nature 410, 1099-1103(2001).
4. Hemmi, H. et al. Nature 408, 740-745 (2000).
5. Zhang, D. et al. Science 303, 1522-1526 (2004).
6. Tabeta, K. et al. PNAS 101, 3516-3521 (2004)
7. Hemmi, H. et al. Nature Immunol. 3, 196-200 (2002).
8. Adachi, O. et al. Immunity 9, 143-150 (1998).
9. Takeuchi, O. et al, J.Immunol. 164, 554-557 (2000).
10. Yamamoto, M. et al. J Immunol. 169, 6668-72 (2002).
11. Kaisho, T. et al. J.Immunol. 166, 5688-5694 (2001).
12. Servant, MJ. et al. J. Biochem. Pharmacol. 64, 985-992 (2002).
13. Fitzgerald, K.A. et al. Nature 413, 78-83(2001).
14. Horng, T. et al. Nature Immunol. 2, 835-841 (2001).
15. Yamamoto, M. et al. Nature 420, 324-329 (2002).
16. Horng, T. et al. Nature 420, 329-33(2002).
17. Axtelle, T. & Pribble, J. J. Endotoxin Res. 7, 310-314 (2001).
18. Lynn, M. et al. J Infect Dis. 187, 631-639 (2003).
19. Berman, B. Int. J. Dermatol. 29, 7-11 (2002).
20. Smith, R. et al. Genome Res. 6, 454-462 (1996).
21. Quandt, K. et al. Nucleic Acids Res. 23, 4878-4884 (1995).
22. Xu, Y. et al. Nature 408, 111-5 (2000).

【図面の簡単な説明】

【0112】

本発明は、付随する図面に関連して、ほんの一例として与えられたそれらの以下の説明からより明瞭に理解されるであろう。

10

20

30

40

50

【図1A】図1Aは、ヒトTLR14の染色体位置の略図である。TLR14は線により示されている染色体7上の7p15に位置している。それは4.7kbの長さであり、遺伝子CREB5及びCPVLが隣接している。転写の方向は矢印により示されている。TLR14は逆平行方向に転写される。この情報はwww.ncbi.nlm.nih.govのNCBIウェブサイトで入手可能なヒトゲノムマップビューアツールを使用して得られた；

【図1B】図1Bは、ヒトTLR14（配列番号1）についてのヌクレオチド配列を示している；

【図1C】図1Cは、マウスTLR14（配列番号2）についてのヌクレオチド配列を示している；

【図1D】図1Dは、ヒト（配列番号3）及びマウス（配列番号4）TLR14の予測タンパク質配列を示している。ヒトTLR14遺伝子の推定ORFは、811アミノ酸タンパク質をコードし、一方、マウスタンパク質は809アミノ酸の長さである。予測N末端シグナル配列及び膜貫通ドメインには下線が付されている。

【図1E】図1Eは、TLR4及びTLR14外側ドメインのアラインメントが示されている。推定TLRとヒトTLR4のアラインメントは、二つのレセプター間の高度な配列類似性を明らかにした。少なくとも六つのロイシンリッチリピートを同定することができ、boxにより強調されている。

【図2A】図2Aは、いくつかの組織において発現されたヒトTLR14のmRNA発現プロフィールである。新規TLRのヒト及びマウス形についての発現プロフィールはHUGETANパク質データベースから入手可能である。該タンパク質をコードするmRNAの3'非翻訳領域を標的とするプライマーでRT-PCR反応を実行した。発現は試験されたすべての組織で検出され、腎臓；脳及び卵巣において最も高いレベルが生じた。

【図2B】図2Bは、ヒト組織サンプルにおけるTLR14のタンパク質発現プロフィールである。高い発現レベルが脳及び肺で検出された。

【図3】図3は、TLR14とTLRファミリーの他のメンバーの細胞質領域のアラインメントを示している。TLR14と他のTLRファミリーメンバーの細胞質領域のアラインメントは、推定レセプターがTLRに特徴的である類似の領域を共有していることを明らかにしている。特に二つの領域は相同的であり（Box1及び2）、タンパク質を含有するすべてのTLRドメインのシグナチャー配列と考えられる。TLR14のBox2はTLR3のものと同様である。

【図4】図4は、ヒトTLR14の推定プロモーター領域の略図である。TLR14の推定プロモーター領域は、Promoter Inspector及びMatInspectorを使用して同定した。上記のすべての転写因子は0.8より大きなマトリックススコア\*を有している。\*マトリックススコアは、転写因子マトリックス内の保存ヌクレオチドに相当するプロモーター内の配列がどれほど近いかを測定している。有意な一致は>0.8である。

【図5】図5は、U373及び初代マウス胚性線維芽細胞においてLPSにより、及びまたLPSで処理したマウスにおいて誘導されたTLR14の発現を示している。（A）U373及びMEFは1µg/ml LPSで示された時間処理した。mRNAを単離し、RT-PCRを本文中に記載したように実施した。（B）マウスにLPSを腹腔内注射し、3時間放置した後に屠殺した。RT-PCRは対照未処理及びLPS処理マウスに対して行った。

【図6】図6は、TLRリガンドでの処理後の細胞におけるTLR14タンパク質の発現を示している。（A）ヒトグリオーマ細胞株、A172を種々の時間、Pam<sub>3</sub>Cys（1µg/ml）で処理し、TLR14の発現について探索した。（B）TLR4で安定的にトランスフェクトしたヒトHEK-293細胞を種々の時間LPS（1µg/ml）で処理し、TLR14の発現について探索した。（C）タンパク質抽出物を、対照未処理マウス及びLPSを注射してあるマウスの脳から調製した。抽出物はTLR14の発現について探索した。

【図7】図7は、TLR14活性が、HEK293及びU373星状細胞腫細胞において

10

20

30

40

50

NF- $\kappa$ B及びISREレセプター遺伝子発現を誘導することを示しているグラフである。TLR14活性はHEK293及びU373星状細胞腫細胞においてNF- $\kappa$ B及びISREルシフェラーゼ活性を駆動する。HEK293細胞をNF- $\kappa$ Bレセプター構築物ならびに1、5及び10ngのTLR14でトランスフェクトした(A)。HEK293S(B)及びU373S(C)は、ISREレセプター構築物及び用量を増加させたTLR14(1、10及び100ng)でトランスフェクトした。24時間後、細胞を採取し、相対ルシフェラーゼ活性を決定した。

【図8】図8は、TLR14がU373星状細胞腫細胞においてRantes産生を駆動することを示しているグラフである。RANTES産生は、増加させた用量のTLR14で24時間トランスフェクトされたU373細胞において、酵素結合免疫吸着アッセイにより測定した。データは空ベクターでトランスフェクトした細胞に対しての誘導倍数で表現されている。

10

【図9】図9は、TLR14とTIR-ドメイン含有タンパク質TLR2、TLR4及びMyD88との相互作用を示している。(A)TLR14をFlag-タグ付けTLR4、TLR2又はレセプターの突然変異形とHEK-293細胞内に同時トランスフェクトした。複合体を抗flagビーズで免疫沈降し、抗TLR14抗体で探索した。(B)TLR14をMyc-タグ付けMyD88とHEK-293細胞内に同時トランスフェクトした。複合体をプロテインAセファロースビーズに結合させた抗myc抗体で免疫沈降し、抗TLR14抗体で探索した。

【図10】図10は、TLR2と内因性TLR14との相互作用を示している。Flag-タグ付けTLR2をHEK-293細胞から免疫沈降し、ウエスタンブロットを抗TLR14抗体で探索して、TLR2と複合体形成した該内因性タンパク質の存在を検出した。

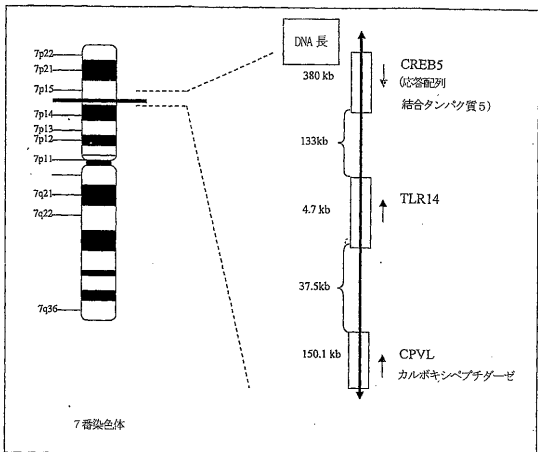
20

【図11】図11は、TLR14が細胞質中に存在し、血清中にも高レベルで見いだされることを示している。(A)細胞をLPSで刺激した後、細胞質及び膜分画に分離した。分画をTLR14の存在について探索した。(B)10%ウシ胎児血清を含有する細胞培養培地をウエスタンブロットティングにかけ、TLR14の存在について探索した。

【図12】図12は、示された時点についてLPSの(1 $\mu$ g/ml)での細胞刺激に続く、U373培養培地内へのTLR14の分泌を示している。分泌されたタンパク質はTLR14の完全長形態であるようであり、最大分泌は6時間で生じている。

30

【図1A】



【図1B】

ヒト KIAA0644 (CDS)

```

atggaggctg ccgcgccttg ggcgctctg ctcgtggtg gcggtgctt cgcgctccg
ccgctggcgc agccctgtg ccggagcgc tgcgactgc agatcccca gcatctctg
tgcaccaaca ggggctccg cgtagtccc aaagcaact cgtgcccag cccccaagc
gtgctcaact acagctcgg cggcaactc ataaccaaca tcaagcctt cagctccac
cgctcggggc agtcaagag gctggacctg cagtcaacc agatccgct cctgcaccc
aaagactcgg agaactctc gggcgtgaa gactgtact tggggaaca cctctgca
gcgctgcgcc cgggcaact gcccgcctg cgaagctgc gcatctcta cgcacaagg
aacgagatca gccgcttaag ccgcgctcc ttcgaggcc tggagatct agtcaagtc
cggctggcgc ggaagcgcct gggggcctg ccggagcgg tcttgcctc cttgggacg
ctgctaccac tacatctgga gtcacacgg atccgcttc tgggcaaga cgcctctgc
cagataggca agctgctct cctcaacct tctgcaaac agtacaagc ctccctgpc
cagcggccca ccttcgacc gctgctccc ctctctccc tcatctctc ggccaacgc
ctgcagcacc tggggcggc catctccag caactgcaa gctctgctt gctctgctc
aggggcaacc agctcagca cctgcgctt gaggctttt ggggcttga ggccctgpc
gagctgcgc tggaggtaa tggctgag cagctgcaa ctgcctgct ggagctctg
cacagcctg aggcctgga cctgagcgc aatgagctt ccgctctga cccggcacc
tctggcacc tggcgctg ggggctg agcttgctc acagcctc cagcctga
tccgggaca tctcgcgc cagccacc ctttatcgc tggatcaga cggcaagcg
tgcactcgc actcgcctg cagagcctg aagcctgga tggcgactg cactcgcag
ggccgctcc tcaactctt cgtcagctg cgcaccccc cggcctcgc aggcaatac
ctgattacc tggatgaca cagctgcaa aatgactct cgcggatcc ctcgacctc
gcttccctg ccgctgacg cagcggcag ccccaacca cggccgag ggagagatg
acgcacact cagctctgc ggaggcctg ccgcgcag ccagctcca cagcagggg
cgattctag ctgggtgga ctggatgga gcgcgcaagg agctgtag caaccgagc
gctctagc tgcctgggc gggcggcgt ctcgcaaga agcccaagc ggcctgctg
tccggggcgc cggctcca cgtccctgac ctttatcgc tggatcaga cggcaagcg
actcggcag atccgcct cgcgagccc accccaagc cctctcctg cctgcacca
tgcggcgc gcgacccc gacgcgcgc agcaagatc gctcggcac ggagcagag
gagctgccc ccaagtcca cgtgggggc gggctgccc cgtctgctc gcacctgc
gactcaaca agttctat gtcaacctg agctggagc cgtggggc agacagccc
tcggtgctt gggcgtgc cagcaaccg agtccccgc cgtgggcy cgcgcttc
cgcctgct tgaacgctt tggcagcag cccaagtcc accgctct cctactgct
gagagagcg actcgcgca gctcgcggc ctccgctgc acaccccct cgtgctgc
gtggagggc cggctcca gctccctgac cctggctgc cccgggaca cctcggggg
ctgtcaacc tacggcgc cgggagccc ggcggctgc actaacagt gctgacctg
gcctctga cgtcaacgc gctcggct ctctggct tggcgctc ggcctctgc
tggctgct gaaactcgc gctcggcgg aagggcggg ccccgctca cgttcgca
atgactcca ccgacggcc cctgcctcc atgggcaag gctctcgc cactctc
ggattccag tcaacggcc acgcaacc gctcgcgc tcaatgagg cagctctc
gaattccct cgaacgctt catggacgt cggggcgc cgcgggcy cagctgga
cgggagacc gctctgca gcatctgc gactg

```

【図1C】

マウス KIAA0644 (CDS)

```

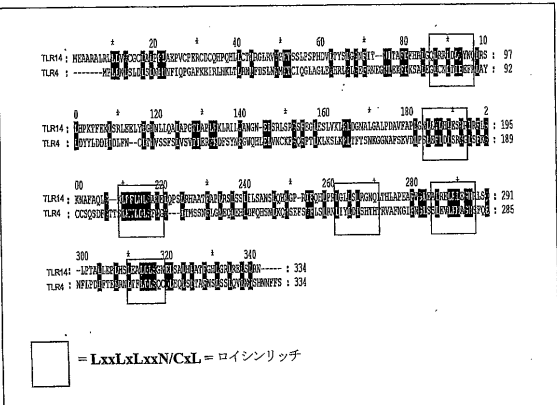
atggaggctg tgggtgcgt ggcgctctg ctcgtggtg ggcgctcct ggcgctccg
ccgcggggc agtccgtgtg ccggagcgc tgcgactgc agcaacccca acatctcta
tgcaccaaca ggggacttg ccgctgacc aagacagct cgcctgctag tcccaagac
gtgctcaact aagcctgag cggcaactc atcaaccaaca tcaacgctt cgaattcac
cgtcggggc agtcaagag gctggactg cagtaacca agactcgttc tctcaaccc
aaagactcgg agaactctc agcactagag gactgtacc tggggaaca cctctgca
gcgctgctc ctcgcaact gctcgcctg cgaagctgc gactcttta cgcacaagg
aacagattg gacgctgag tgcgggtcc tbcagggcc tggagattt ggtcaagct
cggctggag gaaactgag tggagcctg ccgagcggc tcttcgctc cctggcaac
ctgctctacc tacactgga atctaacgg atccgtttt tgggcaaga cgcctcagc
cagctggta agcttcgatt cctcaatcc tggcgaacg agctgcaacc ctctctg
caagggcca ccttgcctc tctcgtccc ctctctctc tcatctctc agcaacagc
ctacggccc tggcccccg cgtctcaag caactgcaa gctcagcct gctctctc
agtggaaacc agtcaagca cctgcacca gaggctctt ggggactga ggcctactg
gagctgccc tggaggtaa ccgctgaa cagctcccc tgaactgct ggaactctg
caagcttgg aggcaacta cctgagctg aatgagctt ctgctgca cctgcacc
tttggccacc agggcggct cgtgagctc agctcgcgc acaacgct cagcgcctt
tctgggaca tcttgcgc cagctcggct ctctacggc tggatcaga cggcaatgt
tggactgag actcgcgctt cggggctg aaacctgga tgggcaactg gaattctcag
gctcctcc ttaagctct cggagctg cgcacaacc cggcctgag gggcaatag
ctggtacc tggatgaca actgctgag aatgggtt gctggatcc ctcaactcc
cctaacgag cagtaggca gggcctgca cccactcgt cagaagagg gatgacccc
cctgcagcc tctgcagga gctcaactc cagcgcagc cgcagcccca gcaagcggga
agactctac caggagtg cctgggtgg gctcgaag aactggtg caaccgagc
gcatatagt tgagccggc gggaccaggt cccactcag gccctctgc tggcgtccg
ggctcgc ccaactctt ggaactgaa gagaagcgg ggagaggag tcaacocga
gcaactct cccagagga gcccaaccg agctctgag cgcgctctg gaaccatct
gcaagaga gctgcaag cgcagaaag cagcctcag cgtcagaga gcaagagagc
cagctcag cgttagtg gttggttg ccaactcgt tgtctgacc cttgacttc
aacaattca tctgtgca cctgcaact gaggcgtga ggcacaacg cgcctcgtg
cgtggcgg tctgcgaa cgcagctcc cggcgcag gggcgcagc ctctcgcct
ctttgacc gcttggcca cgcagcaga tccagcct tctctacc cgcggagc
agcactcgg ccaactgca cagactcgc ggagacacc cctactagt atcgtggag
ggctgctg ggggtcgt tgcggctg gcccgcag accactgag aggttagta
acctcag agcagagag tgaagctg cgcagatcc agctcctg cctgctctg
ctgctgca acgctctc gctcgtcgc gactgagc cctgggagc gctgagctg
cgggaaagc tgcctgca ggggagga gggcccccg tccactgct ccaactgtc
tcaaccagc ggcaactg cctcactgc actggtgt agcgactt ctaagcttc
cagtcacc gtcaccgca caccgtggc gctgacag aggcagctt cactgagtc
cctgcagc gcttcaaga cagaccgca gctggtgca gggcagctt gaggcggag
gatcaact tgaagatt cgtgactag

```

【図1D】

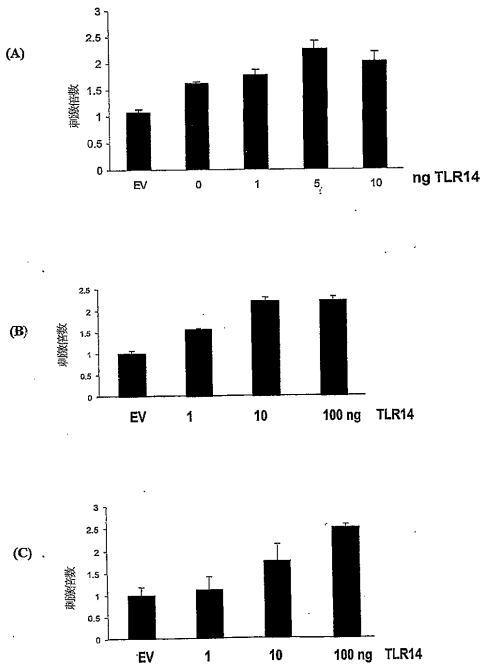
Fig. 1D. Comparison of amino acid sequences between human and mouse KIAA0644. The sequences are aligned, and conserved residues are indicated by asterisks (\*). The human sequence is shown in the top row, and the mouse sequence is shown in the bottom row. The alignment is shown in blocks of 20 amino acids, with positions 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 420, 440, 460, 480, 500, 520, 540, 560, 580, 600, 620, 640, 660, 680, 700, 720, 740, 760, 780, 800, 820, 840, 860, 880, 900, 920, 940, 960, 980, 1000, 1020, 1040, 1060, 1080, 1100, 1120, 1140, 1160, 1180, 1200, 1220, 1240, 1260, 1280, 1300, 1320, 1340, 1360, 1380, 1400, 1420, 1440, 1460, 1480, 1500, 1520, 1540, 1560, 1580, 1600, 1620, 1640, 1660, 1680, 1700, 1720, 1740, 1760, 1780, 1800, 1820, 1840, 1860, 1880, 1900, 1920, 1940, 1960, 1980, 2000, 2020, 2040, 2060, 2080, 2100, 2120, 2140, 2160, 2180, 2200, 2220, 2240, 2260, 2280, 2300, 2320, 2340, 2360, 2380, 2400, 2420, 2440, 2460, 2480, 2500, 2520, 2540, 2560, 2580, 2600, 2620, 2640, 2660, 2680, 2700, 2720, 2740, 2760, 2780, 2800, 2820, 2840, 2860, 2880, 2900, 2920, 2940, 2960, 2980, 3000, 3020, 3040, 3060, 3080, 3100, 3120, 3140, 3160, 3180, 3200, 3220, 3240, 3260, 3280, 3300, 3320, 3340, 3360, 3380, 3400, 3420, 3440, 3460, 3480, 3500, 3520, 3540, 3560, 3580, 3600, 3620, 3640, 3660, 3680, 3700, 3720, 3740, 3760, 3780, 3800, 3820, 3840, 3860, 3880, 3900, 3920, 3940, 3960, 3980, 4000, 4020, 4040, 4060, 4080, 4100, 4120, 4140, 4160, 4180, 4200, 4220, 4240, 4260, 4280, 4300, 4320, 4340, 4360, 4380, 4400, 4420, 4440, 4460, 4480, 4500, 4520, 4540, 4560, 4580, 4600, 4620, 4640, 4660, 4680, 4700, 4720, 4740, 4760, 4780, 4800, 4820, 4840, 4860, 4880, 4900, 4920, 4940, 4960, 4980, 5000, 5020, 5040, 5060, 5080, 5100, 5120, 5140, 5160, 5180, 5200, 5220, 5240, 5260, 5280, 5300, 5320, 5340, 5360, 5380, 5400, 5420, 5440, 5460, 5480, 5500, 5520, 5540, 5560, 5580, 5600, 5620, 5640, 5660, 5680, 5700, 5720, 5740, 5760, 5780, 5800, 5820, 5840, 5860, 5880, 5900, 5920, 5940, 5960, 5980, 6000, 6020, 6040, 6060, 6080, 6100, 6120, 6140, 6160, 6180, 6200, 6220, 6240, 6260, 6280, 6300, 6320, 6340, 6360, 6380, 6400, 6420, 6440, 6460, 6480, 6500, 6520, 6540, 6560, 6580, 6600, 6620, 6640, 6660, 6680, 6700, 6720, 6740, 6760, 6780, 6800, 6820, 6840, 6860, 6880, 6900, 6920, 6940, 6960, 6980, 7000, 7020, 7040, 7060, 7080, 7100, 7120, 7140, 7160, 7180, 7200, 7220, 7240, 7260, 7280, 7300, 7320, 7340, 7360, 7380, 7400, 7420, 7440, 7460, 7480, 7500, 7520, 7540, 7560, 7580, 7600, 7620, 7640, 7660, 7680, 7700, 7720, 7740, 7760, 7780, 7800, 7820, 7840, 7860, 7880, 7900, 7920, 7940, 7960, 7980, 8000, 8020, 8040, 8060, 8080, 8100, 8120, 8140, 8160, 8180, 8200, 8220, 8240, 8260, 8280, 8300, 8320, 8340, 8360, 8380, 8400, 8420, 8440, 8460, 8480, 8500, 8520, 8540, 8560, 8580, 8600, 8620, 8640, 8660, 8680, 8700, 8720, 8740, 8760, 8780, 8800, 8820, 8840, 8860, 8880, 8900, 8920, 8940, 8960, 8980, 9000, 9020, 9040, 9060, 9080, 9100, 9120, 9140, 9160, 9180, 9200, 9220, 9240, 9260, 9280, 9300, 9320, 9340, 9360, 9380, 9400, 9420, 9440, 9460, 9480, 9500, 9520, 9540, 9560, 9580, 9600, 9620, 9640, 9660, 9680, 9700, 9720, 9740, 9760, 9780, 9800, 9820, 9840, 9860, 9880, 9900, 9920, 9940, 9960, 9980, 10000.

【図1E】

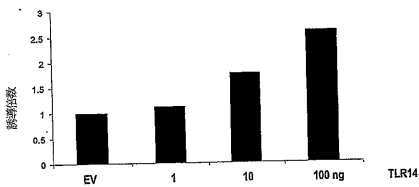




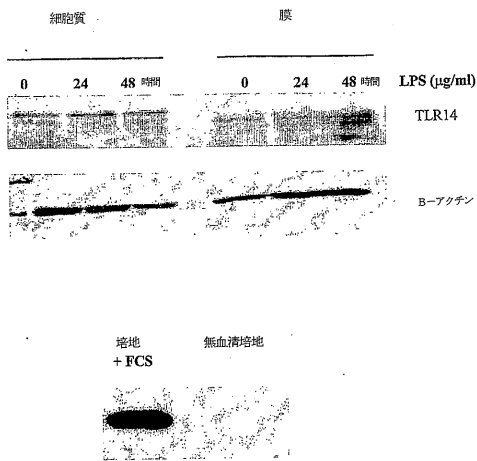
【 図 7 】



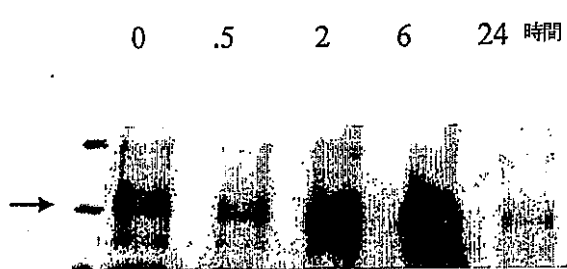
【 図 8 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 9 】

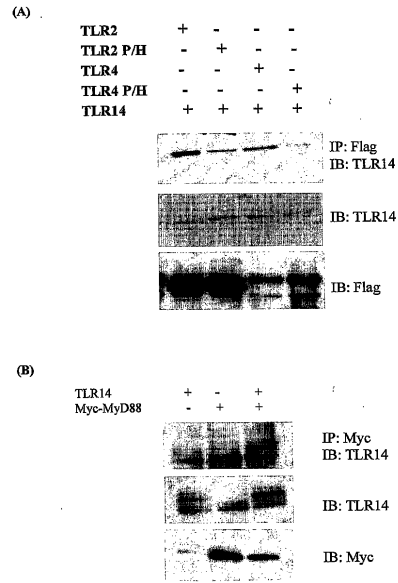
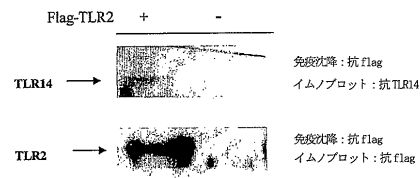


Fig.9

【 図 1 0 】



【配列表】

2008538498000001.xml

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IE2006/000037

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 A61K38/00		
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) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 15 July 1998 (1998-07-15), "Homo sapiens mRNA for KIAA0644 protein, partial cds." XP002397960 retrieved from EBI accession no. EM_HUM:AB014544 Database accession no. AB014544 the whole document	1, 3-12, 14-43, 54, 66-69
X	WO 03/025138 A (EOS BIOTECHNOLOGY, INC; AFAR, DANIEL; AZIZ, NATASHA; GISH, KURT, C; HE) 27 March 2003 (2003-03-27) "METHODS OF DIAGNOSIS OF CANCER COMPOSITIONS AND METHODS OF SCREENING FOR MODULATORS OF CANCER" page 752; sequence 299 claim 12	1, 3-12, 14-43, 54, 66-69
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search  7 September 2006		Date of mailing of the international search report  06/10/2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  NIEBUHR-EBEL, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/IE2006/000037

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/035833 A (EXELIXIS, INC; BELVIN, MARCIA; FRANCIS-LANG, HELEN; FLOWMAN, GREGORY,) 1 May 2003 (2003-05-01) "MODIFIER OF THE P53 PATHWAY AND METHODS OF USE" page 191 - page 195; sequence 24 example 2	1,3-12, 14-43, 54,66-69
X	DATABASE EMBL [Online] 8 February 2001 (2001-02-08), "Mus musculus adult male lung cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1200009022 product:WUGSC:H_GS165L15.2 PROTEIN (FRAGMENT) homolog [Homo sapiens], full insert sequence." XP002397961 retrieved from EBI accession no. EM_HTG:AK004681 Database accession no. AK004681 the whole document	2-11, 13-43, 54,66-69
X	OKAZAKI NORIKO ET AL: "Prediction of the coding sequences of mouse homologues of KIAA gene: II. The complete nucleotide sequences of 400 mouse KIAA-homologous cDNAs identified by screening of terminal sequences of cDNA clones randomly sampled from size-fractionated libraries." DNA RESEARCH : AN INTERNATIONAL JOURNAL FOR RAPID PUBLICATION OF REPORTS ON GENES AND GENOMES. 28 FEB 2003, vol. 10, no. 1, 28 February 2003 (2003-02-28), pages 35-48, XP002397957 ISSN: 1340-2838 abstract page 38; table 1 page 40, right-hand column; figure 1 & DATABASE UniProt	2-11, 13-43, 54,66-69
X	1 June 2003 (2003-06-01), OKAZAKI,N. ET AL.: "MKIAA0644 protein (Fragment)" Database accession no. Q80TVQ_MOUSE the whole document	2-11, 13-43, 54,66-69

International Application No. PCT/IE2006 /000037

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 52, 53, 55-61

Claims 52, 53 and 55-60 refer to agonists and antagonists to the polypeptides of claims 1 and 2, and claim 61 refers to a method comprising the administration of such agonists or antagonists. These agents are of unspecified constitution or structure, i.e. no true technical characterization of these compounds is given. Moreover, no such compounds are defined in the application and no working example is provided. In consequence, the scopes of said claims are ambiguous and vague, and their subject matter is not sufficiently disclosed and supported (Art. 6 PCT).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IE2006/000037**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 52, 53, 55-61  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

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

**Remark on Protest**

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/IE2006/000037

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03025138	A	27-03-2003	CA 2459219 A1 27-03-2003 EP 1434881 A2 07-07-2004 JP 2005518782 T 30-06-2005
WO 03035833	A	01-05-2003	NONE

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00 1 0 1	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
	G 0 1 N 37/00 1 0 2	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, 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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100080137  
弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行

(72)発明者 オニール, ルーク・アンソニー・ジョン  
アイルランド国カウンティ・ダブリン, サンディコーヴ, バーデット・アベニュー 4 エイ

(72)発明者 ダン, アイスリング  
アイルランド国ダブリン 6, ラスマインズ, チャールヴィル・クロース 1 8

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 DA13 DA36 FB02 FB03  
4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 CA20 DA02 EA04 GA14 HA11  
4B063 QA01 QA05 QA18 QQ43 QQ53 QR32 QR55 QR80 QR82 QS34  
QS36 QX02

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA91X AA93X AB01 AC14 BA02 BB12  
BB25 BB37 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA17  
MA01 NA14 ZA022 ZA402 ZB072 ZB112 ZB132 ZB212 ZB262 ZB322  
ZC412  
4C085 AA13 AA14 CC32 DD88 EE01 GG01  
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA40  
ZB07 ZB11 ZB13 ZB21 ZB26 ZB32 ZC41  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 BA62 BA63 CA40 DA50 EA20  
EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008538498A5</a>	公开(公告)日	2009-07-02
申请号	JP2008507261	申请日	2006-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	都柏林伊丽莎白女皇神学院		
申请(专利权)人(译)	教务长，研究员，和学者学院的伊丽莎白女王的神圣和安迪·瓦伊死三位一体，都柏林附近		
[标]发明人	オニールルークアンソニージョン ダンアイスリング		
发明人	オニール,ルーク・アンソニー・ジョン ダン,アイスリング		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/715 C07K16/28 C07K17/02 C07K17/14 C07K19/00 C12Q1/02 C12Q1/68 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61K45/00 A61K31/7105 A61P37/08 A61P37/02 A61P29/00 A61P9/10 A61P25/00 A61P35/00 A61P31/00 A61P43/00 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N37/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/14 A61P19/02 A61P19/08 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/2896 C07K2317/34 G01N33/6872		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/715 C07K16/28 C07K17/02 C07K17/14 C07K19/00 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61K45/00 A61K31/7105 A61P37/08 A61P37/02 A61P29/00 A61P9/10 A61P25/00.101 A61P35/00 A61P31/00 A61P43/00.111 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA14 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB12 4B065/BB25 4B065/BB37 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA17 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZZA022 4C084/ZZA02 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB322 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC32 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA40 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB32 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA62 4H045/BA63 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/672051 2005-04-18 US		
其他公开文献	JP2008538498A		

#### 摘要(译)

分离的多肽包含SEQ ID NO : 1或2的氨基酸序列或其变体或片段。变体包含与SEQ ID NO : 1或2的氨基酸序列至少70%或90%相同的氨基酸序列。片段可以是包含SEQ ID NO : 1或2的至少12个连续氨基酸的肽。该多肽表现出Toll样受体活性。TLR被命名为

TLR14。TLR受体识别各种配体并激活一系列信号转导途径，导致免疫和炎症基因的诱导。