(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2002－542814
(P2002－542814A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	ZNA	Ａ６１Ｋ 31/56		４Ｂ０２４
Ａ６１Ｋ 31/56		31/7088		４Ｂ０６３
31/7088		39/395	Ｄ	４Ｂ０６４
39/395			Ｎ	４Ｂ０６５
		45/00		４Ｃ０８４

審査請求　未請求　予備審査請求（全107数）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000－615733(P2000－615733)

(86)(22)出願日　平成12年5月1日(2000.5.1)
(85)翻訳文提出日　平成13年10月31日(2001.10.31)
(86)国際出願番号　PCT/US00/11712
(87)国際公開番号　WO00/66708
(87)国際公開日　平成12年11月9日(2000.11.9)
(31)優先権主張番号　60/132,138
(32)優先日　平成11年5月1日(1999.5.1)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　ジェネーラ　コーポレーション
アメリカ合衆国　ペンシルベニア　19462，プライマウス　ミーティング，キャンパス　ドライブ　5110
(72)発明者　ロウアヘド，ジャミラ
ベルギー国　ベー－1040　エッタービーク，リュ　ドゥ　グランド　ドュック，45－47
(72)発明者　ドン，チャールズ　ク
アメリカ合衆国　ペンシルベニア　19025，ドレシャー，ニコル　ドライブ　1908
(74)代理人　弁理士　山本　秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　喘息および関連する障害を含むアトピー性のアレルギーを処置するための標的としての喘息に関連する因子

(57)【要約】
ＩＬ－９によって誘導される新規のＴＨ２関連遺伝子が同定されそして単離され、それによって、アトピー性のアレルギーおよび喘息関連障害のようなＩＬ－９によって媒介される疾患の治療上の標的が提供される。本発明はまた、この遺伝子の同定のための方法、ならびにこれらの障害を処置するためのこの遺伝子およびその産物の低分子インヒビターの使用、このタンパク質に特異的な抗体を使用して生物学的サンプル中での遺伝子発現のレベルを測定することによる、アトピー性のアレルギーまたは喘息関連障害に対する感受性を診断するための方法およびその処置を評価するための方法を、含む。自己免疫疾患の処置のための治療薬としてのこのタンパク質の使用もまた、含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項１】　以下からなる群より選択される、単離された核酸分子：

（ａ）配列番号２、４、６、８、１０、または１２のアミノ酸配列をコードする、単離された核酸分子；

（ｂ）配列番号２、４、６、８、１０、または１２の少なくとも６アミノ酸のフラグメントをコードする、単離された核酸分子；

（ｃ）明らかなシグナルを生じるために十分なストリンジェンシーの条件下で、配列番号１、３、５、７、９、または１１の相補体を含有している核酸分子に対してハイブリダイズする、単離された核酸分子；

（ｄ）明らかなシグナルを生じるために十分なストリンジェンシーの条件下で、配列番号２、４、６、８、１０、または１２のアミノ酸配列をコードする核酸分子の相補体に対してハイブリダイズする、単離された核酸分子；および

（ｅ）配列番号１、３、５、７、９、または１１に対して約７２パーセントの配列相同性を有する、単離された核酸分子。

【請求項２】　前記核酸分子が、配列番号１、３、５、７、９、または１１の配列を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。

【請求項３】　前記核酸分子が、配列番号１、３、５、７、９、または１１の配列からなる、請求項２に記載の単離された核酸分子。

【請求項４】　前記核酸分子が、配列番号１、３、５、７、もしくは９のヌクレオチド６７～１００５を含むかまたは配列番号１１のヌクレオチド１０４～１０４２を含む、請求項１に記載の単離された核酸分子。

【請求項５】　前記核酸分子が、１つ以上の発現制御エレメントに作動可能に連結されている、請求項１～４のいずれか１項に記載の単離された核酸分子。

【請求項６】　請求項１～４のいずれか１項に記載の単離された核酸分子を含有している、ベクター。

【請求項７】　請求項６に記載の核酸分子を含むように形質転換された、宿主細胞。

【請求項８】　請求項７に記載のベクターを含有している、宿主細胞。

【請求項９】　前記宿主が、原核生物宿主および真核生物宿主からなる群よ

り選択される、請求項８に記載の宿主細胞。

【請求項１０】　請求項１～４のいずれか１項に記載の核酸分子で形質転換された宿主細胞を、該核酸分子によってコードされるタンパク質が発現される条件下で培養する工程を包含する、ポリペプチドを産生するための方法。

【請求項１１】　前記宿主細胞が、原核生物宿主および真核生物宿主からなる群より選択される、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】　請求項１１に記載の方法によって産生された、単離されたポリペプチド。

【請求項１３】　以下からなる群より選択される、単離されたポリペプチド：

配列番号２、４、６、８、１０、または１２のアミノ酸配列を含む、単離されたタンパク質；

配列番号２、４、６、８、１０、または１２の少なくとも６アミノ酸のフラグメントを含有している、単離されたポリペプチド；

配列番号２、４、６、８、１０、または１２の保存的アミノ酸置換体を含有している、単離されたポリペプチド；および

配列番号２、４、６、８、１０、または１２の天然に存在しているアミノ酸配列改変体またはイソ型。

【請求項１４】　請求項１２または１３のいずれかに記載のポリペプチドに結合する、単離された抗体。

【請求項１５】　配列番号１２のリガンド結合配列を含むペプチドから産生される、請求項１４に記載の方法。

【請求項１６】　モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項１４に記載の抗体。

【請求項１７】　配列番号１２の配列を含有しているタンパク質をコードする核酸の発現を調節する作用物質の有効量を含む、哺乳動物における喘息および喘息関連障害を処置するための組成物。

【請求項１８】　配列番号１２の配列を含有しているタンパク質の少なくとも１つの活性を調節する作用物質の有効量を含む、哺乳動物における喘息および

喘息関連障害を処置するための組成物。

【請求項１９】　前記発現がダウンレギュレートされる、請求項１７に記載の組成物。

【請求項２０】　前記活性が低下させられる、請求項１８に記載の組成物。

【請求項２１】　前記作用物質がアミノステロールである、請求項１７または１８に記載の組成物。

【請求項２２】　前記作用物質が、配列番号１２の配列を含有しているタンパク質に結合する抗体である、請求項１７または１８に記載の組成物。

【請求項２３】　前記抗体がモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項２２に記載の組成物。

【請求項２４】　以下の工程を包含する、サンプル中の配列番号１２の配列を含有しているタンパク質を定量する方法：

（ａ）該タンパク質を含有していると疑われるサンプルを、該タンパク質に特異的に結合する請求項１４または１５に記載の抗体と、該抗体と該タンパク質とを含有する反応複合体の形成を可能にする条件下で接触させる工程；および

（ｂ）該サンプル中の該反応複合体の形成を検出する工程であって、ここで該反応複合体の定量が該サンプル中のタンパク質のレベルを示す、工程。

【請求項２５】　被検体に由来するサンプル中の配列番号１２の配列を含有しているタンパク質のレベルを検出する工程を包含する、ヒト被検体中の喘息または喘息関連障害に対する感受性を検出するためのデータを収集するための方法。

【請求項２６】　被検体に由来するサンプル中の配列番号１２の配列を含有しているタンパク質のレベルを検出する工程を包含する、ヒト被検体におけるアレルギー性炎症関連性の、喘息または喘息関連障害を検出するためのデータを収集するための方法。

【請求項２７】　前記処置の後で、被検体に由来するサンプル中の配列番号１２の配列を含有しているタンパク質のレベルにおける変化を検出する工程を包含する、ヒトの被検体中の喘息または喘息関連障害の処置をモニターするための、方法。

【請求項２８】　以下の工程を包含する、配列番号２、４、６、８、１０、または１２の配列を有しているタンパク質をコードする核酸の発現を調節する作用物質を同定する、方法：

（ａ）該作用物質に対して、該核酸を発現する細胞を暴露する工程；および

（ｂ）該作用物質が該核酸の発現を調節するか否かを決定し、それによって配列番号２、４、６、８、１０、または１２の配列を有しているタンパク質をコードする核酸の発現を調節する作用物質を同定する、工程。

【請求項２９】　以下の工程を包含する、配列番号２、４、６、８、１０、または１２の配列を含有しているタンパク質の少なくとも１つの活性を調節する作用物質を同定する、方法：

（ａ）該作用物質に対して、該タンパク質を発現する細胞を暴露する工程；および

（ｂ）該作用物質が該タンパク質の少なくとも１つの活性を調節するか否かを決定し、それによって配列番号２、４、６、８、１０、または１２の配列を含有しているタンパク質の少なくとも１つの活性を調節する作用物質を同定する、工程。

【請求項３０】　前記細胞をＩＬ－９に対して暴露し、続いて前記作用物質に対して暴露する工程をさらに包含する、請求項２８または２９に記載の方法であって；ここで、該作用物質の存在下でのＩＬ－９に対する応答における減少により、前記タンパク質の活性を調節し得る作用物質が同定される、方法。

【請求項３１】　前記細胞が、ヒトのＩＬ－９レセプターでトランスフェクトしたマウスの肺上皮細胞、初代ヒト肺細胞、およびヒト上皮細胞からなる群より選択される、請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】　以下の工程を包含する、配列番号２、４、６、８、１０、または１２の配列を含有しているタンパク質の少なくとも１つの活性を調節する作用物質を同定するための、方法：

（ａ）非ヒト動物に対して気道の反応性亢進を誘導し得る少なくとも１つの抗原を投与する工程；および

（ｂ）該作用物質で予め処理した非ヒト動物における気道の反応性亢進における

変化を検出する工程。

【請求項３３】　配列番号１２の配列またはそのフラグメントを含有している核酸のアンチセンス配列を含有している、アンチセンス核酸。

【請求項３４】　前記作用物質が請求項３３に記載のアンチセンス核酸である、請求項１８に記載の組成物。

【請求項３５】　配列番号１２の配列を含有しているタンパク質の少なくとも１つの活性を調節する作用物質の有効量を含む、哺乳動物における自己免疫疾患を処置するための組成物。

【請求項３６】　前記作用物質が、配列番号１２の配列を含有しているタンパク質から誘導されたペプチド模倣物のペプチドである、請求項３５に記載の組成物。

【請求項３７】　前記疾患が炎症性腸疾患である、請求項３５に記載の組成物。

【請求項３８】　哺乳動物における喘息および喘息関連障害を処置するための医薬の製造のための作用物質の使用であって、該作用物質が、配列番号１２の配列を含有しているタンパク質をコードする核酸の発現を調節する、使用。

【請求項３９】　哺乳動物における喘息および喘息関連障害を処置するための医薬の製造のための作用物質の使用であって、該作用物質が、配列番号１２の配列を含有しているタンパク質の少なくとも１つの活性を調節する、使用。

【請求項４０】　前記発現がダウンレギュレートされる、請求項３８に記載の使用。

【請求項４１】　前記活性が低下させられる、請求項３９に記載の使用。

【請求項４２】　前記作用物質がアミノステロールである、請求項３８または３９に記載の使用。

【請求項４３】　前記作用物質が、配列番号１２の配列を含有しているタンパク質に結合する抗体である、請求項３８または３９に記載の使用。

【請求項４４】　前記抗体がモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項４３に記載の使用。

【請求項４５】　前記作用物質が請求項３３に記載のアンチセンス核酸であ

る、請求項３９に記載の使用。

【請求項４６】　哺乳動物における自己免疫疾患を処置するための医薬の製造のための作用物質の使用であって、該作用物質が、配列番号１２の配列を含有しているタンパク質の少なくとも１つの活性を調節する、使用。

【請求項４７】　前記作用物質が、配列番号１２の配列を含有しているタンパク質から誘導されたペプチド模倣物のペプチドである、請求項４６に記載の使用。

【請求項４８】　前記疾患が炎症性腸疾患である、請求項４６に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

（発明者）

Ｑｕ　Ｄｏｎｇ，Ｒｏｙ　Ｃ．Ｌｅｖｉｔｔ，Ｎｉｃｈｏｌａｓ　Ｃ．Ｎｉｃｏｌａｉｄｅｓ，Ｙｕｈｏｎｇ　Ｚｈｏｕ，Ｊａｍｉｌａ　Ｌｏｕａｈｅｄおよび Ｗ．Ｌｅｅ　Ｍａｌｏｙ。

【０００２】

（関連出願に対する相互参照）

本出願は、１９９９年５月１日に出願された米国特許仮出願番号第６０／１３２，１３８号に対して優先権を主張する。これは、その全体において本明細書中で参考として援用されている。本発明は、１９９９年６月６日に出願された、米国特許出願番号第０９／３２５，５７１号の内容に関連する。これは、本明細書中で参考として援用されている。

【０００３】

本出願はまた、１９９７年１２月１日に出願された米国特許出願番号第０８／９８０，８７２号、および１９９８年３月３日に出願された米国仮特許出願番号第６０／０７６，８１５号に関連する。これらの両方が、本明細書中で参考として援用されている。

【０００４】

（発明の分野）

本発明は、アトピー性のアレルギーおよび関連する喘息様の障害の処置のためのＩＬ－９経路に関連する活性を調節することに関する。本発明はまた、自己免疫疾患の処置のための新規のポリペプチドの使用に関する。

【０００５】

（発明の背景）

炎症は、身体の防御系が外来の実体と闘う複雑なプロセスである。外来の実体に対する闘いは、身体の生存のために必要であり得るが、いくつかの防御系は、たとえ無害な実体でも、危険なものとして、外来の実体に対して応答し、それによって闘いに続いて周辺組織に損傷を与える。

【０００６】

アトピー性のアレルギーは、遺伝的な背景が環境による刺激に応答するように指示する、環境遺伝的な障害である。この障害は、一般的には、ユビキチン様抗原に応答するＩｇＥ抗体を産生する、リンパ球の増大した能力によって特徴付けられる。これらの抗原による免疫系の活性化は、アレルギー性の炎症を導き、そして摂取、皮膚を通じる浸潤の後、または吸入後に生じ得る。この免疫活性化が生じ、そして肺の炎症および気管支の反応性亢進（ｈｙｐｅｒｒｅｓｐｏｎｓｉｖｅｎｅｓｓ）によって達成される場合は、この障害は、喘息として広範に特徴付けられる。特定の細胞が、この炎症反応において重要であり、そしてこれらには、Ｔ細胞および抗原提示細胞、ＩｇＥを産生するＢ細胞、ＩｇＥに結合する好塩基球、ならびに好酸球が含まれる。これらの炎症性の細胞は、アレルギー性の炎症の部位に蓄積し、そしてこれらが放出する毒性の生成物は、これらの障害に関連する組織の分解に寄与する。

【０００７】

喘息は、一般的には、断続的な気道の閉塞によって生じる臨床的な症状である、気道の炎症性の障害として定義される。これは、慢性の、機能を一時的に停止する障害である。これは、罹患率および重篤度を増大させるようである（Ｇｅｒｇｅｎら、（１９９２）Am. Ｒｅｖ. Ｒｅｓｐｉｒ. Ｄｉｓ. １４６, ８２３－８２４）。集団のうちの３０～４０％がアトピー性のアレルギーを罹患しており、そしてその集団のうちの１５％の子供および５％の成人が重篤な喘息を罹患していると推定される（Ｇｅｒｇｅｎら、（１９９２）Am. Ｒｅｖ. Ｒｅｓｐｉｒ. Ｄｉｓ. １４６, ８２３－８２４）。このように、多くの人々が健康管理の問題に悩まされている。

【０００８】

ほとんどの個体は、同様の環境に対する暴露を経験しているが、特定の個体のみが、アトピー性のアレルギーおよび喘息を発症する。「アトピー」として公知のこの環境によるアレルギーに対する過敏性は、しばしば、ナノトピックスと比較してアトピー性の個体における、上昇した血清ＩｇＥレベル、またはアレルゲンに対する異常に激しい皮膚の試験応答によって示される（Ｍａｒｓｈら、（１

９８２）New Eng. J. Med. ３０５, １５５１－１５５９）。アトピー性のアレルギーと喘息との間の密接な関係についての強い証拠は、ほとんどの喘息患者がアトピーの臨床的なそして血清学的な証拠を有するという事実によって導かれる（Cliffordら、（１９８７）Arch. Dis. Childhood ６２, ６６－７３；Gergen, （１９９１）Arch. Intern. Med. １５１. ４８７－４９２；Burrowsら、（１９９２）J. Allergy Clin. Immunol. ９０、３７６－３８５；Johannsonら、（１９７２）Prog. Clin. Immunol. １, １－２５；Searsら（１９９１）New Engl. J. Med. ３２５, １０６７－１０７１；Halonenら、（１９９２）Am. Rev. Respir. Dis. １６, ６６６－６７０）。詳細には、より若い喘息患者は、高い発病率のアトピーを有する（Marshら（１９８２）New Eng. J. Med. ３０５, １５５１－１５５９）。さらに、全血清ＩｇＥレベルにおける増大に関連する免疫学的因子は、損傷した肺機能に非常に密接に関連する（Burrowsら、（１９８９）New Eng. J. Med. ３２０, ２７１－２７７）。これらの障害の診断および処置の両方が、問題である（Gergenら、（１９９２）Am. Rev. Respir. Dis. １４６, ８２３－８２４）。炎症を起こした肺組織の評価は、しばしば困難であり、そして頻繁に炎症の源が決定され得ない。現在、肺の炎症をコントロールできないことが経時的な肺機能の有意な損失を導くことが、一般的に受け容れられている。

【０００９】

現在の処置は、それら自体に欠点に苦しむ。主な治療薬であるβ－アゴニストは症状を軽減し、それによって一時的に肺機能を改善するが、根底にある炎症には影響を与えない。その結果、その肺組織は、危険にさらされたままである。さらに、アゴニストの定常的な使用は、それらの効率および安全性を減少させる脱感作を生じる（Molinoffら、（１９９５）Goodman and Gilman’s The Pharmacologic Basis of Theraoeutics, MacMillan Publishing）。根底にある炎症を減少させ得る作用物質である、抗炎症性のステロイドは、免疫抑制

から骨の損失までの範囲にわたるそれら自体に欠点を有する（Ｍｏｌｉｎｏｆｆら、（１９９５）Ｇｏｏｄｍａｎ ａｎｄ Ｇｉｌｍａｎ’ｓ Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ, Ｍａｃ Ｍｉｌｌａｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ）。

【００１０】

従来の治療に関連する問題に起因して、別の処置ストラテジーが評価されている。Ｇｌｙｃｏｐｈｏｒｉｎ Ａ（Ｃｈｕら、（１９９２）Ｃｅｌｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４５，２２３－２２３）、シクロスポリン（Ａｌｅｘａｎｄｅｒら、（１９９２）Ｌａｎｃｅｔ ３３９、３２４－３２８；Ｍｏｒｅｌｙ，（１９９２）Ａｕｔｏｉｍｍｕｎ．５、Ｓｕｐｐｌ－Ａ、２６５－２６９）、およびインターロイキン２（ＩＬ－２）のナノペプチドフラグメント（Ｚａｖｙａｌｏｖら（１９９２）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．３１，２８５－２８８）は全て、恒常性に関連する潜在的に重要な免疫機能を阻害する。根底にある病因について喘息を処置することが、当該分野で必要とされている。さらに、これらの治療は、障害の一時的な性質、および重要な免疫機能の下流でのアレルギーおよび介入との密接な関係に取り組まなければならない。

【００１１】

上記の関連する特許出願において、本出願人らは、インターロイキン９（ＩＬ－９）、そのレセプター、およびＩＬ－９による影響を受ける活性が、アトピー性のアレルギー、喘息、および関連する障害における治療介入のための適切な標的であることを実証する。

【００１２】

アレルゲンによる肥満細胞からの媒介因子の放出は、アレルギーにおいて重要な開始事象であると考えられている。ＩＬ－９は最初に、肥満細胞増殖因子として同定され、そしてＩＬ－９が肥満細胞のプロテアーゼ（ＭＣＰ－１、ＭＣＰ－２、ＭＣＰ－４（Ｅｋｌｕｎｄら（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１、４２６６－４２７３）およびＧｒａｎｚｙｍｅ Ｂ（Ｌｏｕａｈｅｄら、（１９９５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５４、５０６１－５０７０）を含む）の発現をアップレギュレートすることが実証されている。このように、ＩＬ－９は、肥満細胞

の増殖および分化において役割を果たすようである。さらに、ＩＬ－９は、高親和性のＩｇＥレセプターのα鎖の発現をアップレギュレートする（Ｄｕｇａｓら（１９９３）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２３，１６８７－１６９２）。上昇したＩｇＥレベルは、アトピー性のアレルギーおよび喘息の危険因子の特徴であると考えられる。さらに、インビトロおよびインビボの両方での研究は、ＩＬ－９が感作されたＢ細胞からのＩｇＥの放出を強化することを示した（Ｐｅｔｉｔ－Ｆｒｅｒｅら、（１９９３）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　７９，１４６－１５１）。

【００１３】

上記に列挙した関連する特許に示されているデータに基づくと、喘息におけるＩＬ－９遺伝子の候補についての実質的な支持が存在する。第１に、本出願人らは、ヒトとマウスの間での連関、相同性を実証し、このことは、同じ遺伝子が両方の種中の抗原に応答して生物学的な多様性を生じることについて応答性であることを示唆する。第２に、マウスのＩＬ－９候補遺伝子の発現における差異は、気管支の応答性における生物学的な多様性に関連する。特に、ＩＬ－９の低下した発現は、Ｂ６マウスにおけるより低い基礎気管支の応答に関連する。第３に、ヒトからのデータにおける連関の不均衡についての最近の証拠は、ＩＬ－９がアトピーに関連し得、そして気管支の反応性亢進が両方の種におけるこの遺伝子の役割と一致することを示唆する（Ｄｏｕｌｌら（１９９６）Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ　Ｍｅｄ．１５３，１２８０－１２８４）。さらに、本出願人らは、ヒトの遺伝子中での遺伝子の変更が、サイトカイン機能の欠失およびより低いＩｇＥレベルに関連するようであることを実証した。第４に、アレルギー性の免疫応答におけるこのサイトカインおよびそのレセプターの肺機能は、喘息の複雑な病因におけるＩＬ－９経路の役割を強力に指示する。第５に、ヒトにおいては、ＩＬ－９レセプターの生物学的な多様性もまた、アトピー性のアレルギーおよび喘息に関連するようである。最後に、ＩＬ－９レセプター機能の遺伝した欠損にもかかわらず、これらの個体は、その他の点では健康であるようである。このように、ＩＬ－９およびＩＬ－９レセプター遺伝子、またはＩＬ－９によって活性化される遺伝子、ならびにそのレセプターの治療によるダウンレ

ギュレーションが安全であるようであるという性質が、アトピー性の個体において実証される。

【００１４】

このように、当該分野では、現在、ＩＬ－９遺伝子、そのレセプター、およびそれらの機能が、アトピー性のアレルギー、喘息、および関連する障害にどのように関連するかを理解する。従って、当該分野では、これらの障害の病因においてＩＬ－９によって調節される遺伝子の役割の解明が、特に必要とされている。さらに、最も有意には、この知見に基づいて、これらの障害を処置するためのこれらの遺伝子またはそれらの遺伝子産物の活性を調節し得る作用物質の同定が必要とされている。

【００１５】

（発明の要旨）

本出願人らは、２型ヘルパーＴ細胞（ＴＨ）によって媒介される気道における炎症性応答に関連して密接に発現される新規の遺伝子を同定した。これらの遺伝子は、ＴＨ２ＡＦ１と命名されている。５匹のマウスのイソ型が、種々の株および組織において同定され（配列番号（ＳＥＱ　ＩＤＮＯ：）１、３、５、７、９）、そして一方で、１つのヒトのイソ型（配列番号１１）が同定されている。これらは、ＩＬ－９によって選択的にアップレギュレートされ、従って、ＩＬ－９シグナル伝達経路の一部である。本出願人らはまた、マウス中のこれらの遺伝子のポリペプチド産物（配列番号２、４、６、８、１０）およびヒト中のこのポリペプチド産物（配列番号１２）を請求する。本出願人らは、アトピー性のアレルギー、喘息、および関連する障害の診断および処置についての必要性を、これらの障害の病因におけるＴＨ２ＡＦ１の役割を実証することによって満たす。これらの障害の治療は、ＩＬ－９経路のメンバーとしてのＴＨ２ＡＦ１のダウンレギュレーションによって誘導される。

【００１６】

ＴＨ２ＡＦ１の同定は、その活性をダウンレギュレートし得る作用物質の発見を導く。従って、ＴＨ２ＡＦ１をダウンレギュレートする分子が、本発明において特許請求される。ダウンレギュレーションは、ＴＨ２ＡＦ１、そのレセプター

（単数または複数）、またはその活性化因子の活性化、機能、または合成の減少として本明細書中で定義される。これはさらに、ＴＨ２ＡＦ１遺伝子、そのポリペプチド産物、レセプター（単数または複数）、または活性化因子の分解を増大させることをも含むとして定義される。従って、ダウンレギュレーションは、多数の方法において達成される。例えば、そのレセプター（単数または複数）とのＴＨ２ＡＦ１の結合を不安定化させ得る分子の投与である。このような分子には、ＴＨ２ＡＦ１遺伝子のＤＮＡ配列または種々の変異を含有しているＤＮＡ配列によってコードされるものを含む、ポリペプチド産物が含まれる。これらの変異体は、ＴＨ２ＡＦ１遺伝子の点変異体、挿入変異体、欠失変異体、またはスプライシング変異体であり得る。本発明はまた、上記のＤＮＡ分子によってコードされる短縮型のポリペプチドをも含む。これらのポリペプチドは、ＴＨ２ＡＦ１とそのレセプターおよび他のポリペプチドとの相互作用を妨害し得る。

【００１７】

本発明のさらなる実施形態として、ＴＨ２ＡＦ１遺伝子の発現を変更することによるＴＨ２ＡＦ１機能のダウンレギュレーションが挙げられる（アンチセンス遺伝子治療の使用が一つの例である）。ＴＨ２ＡＦ１の発現のダウンレギュレーションは、有効量のアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することによって達成される。これらのアンチセンス分子は、ＴＨ２ＡＦ１遺伝子のＤＮＡ配列、または種々の変異、欠失、挿入、もしくはスプライシングされた改変体を含有している配列から作られ得る。本発明の別の実施形態は、ＴＨ２ＡＦ１遺伝子に由来する単離されたＲＮＡまたはＤＮＡ配列の使用に関する。これらの配列は種々の変異（例えば、ＴＨ２ＡＦ１遺伝子の点変異、挿入、欠失、またはスプライシング改変体変異）を含み、そして遺伝子治療において有用であり得る。

【００１８】

ＴＨ２ＡＦ１ポリペプチドの分解を増大させる分子もまた、その機能をダウンレギュレートするために使用され得、そして本発明の範囲内である。ＴＨ２ＡＦ１のリン酸化は、タンパク質の安定性を変更し得、従って、キナーゼインヒビターがその機能をダウンレギュレートするために使用され得る。ＴＨ２ＡＦ１のグリコシル化は、タンパク質の安定性を変更し得、従って、グリコシラーゼインヒ

ビターは、その機能をダウンレギュレートするために使用され得る。ＴＨ２ＡＦ１のダウンレギュレーションもまた、ＴＨ２ＡＦ１ポリペプチドに対して指向されたポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、またはそれらのフラグメントの使用によって達成され得る。このような分子は、本発明の特許請求の範囲内である。本発明はさらに、そのレセプター（単数または複数）とのＴＨ２ＡＦ１の相互作用をブロックするために十分な親和性を有して結合することを必要とする、３次元構造を有する低分子を含む。さらなる実施形態においては、アミノステロール作用物質は、アトピー性のアレルギーおよび関連する障害を処置することにおけるそれらの有用性を決定するための手段として、ＩＬ－９または抗原によるＴＨ２ＡＦ１の誘導をブロックするそれらの能力について評価される。

【００１９】

上記に議論する生成物は、アトピー性のアレルギー、喘息、および他の関連する障害を処置することにおいて種々の有効な治療薬を提示する。このように、本出願人らは、ＴＨ２ＡＦ１をダウンレギュレートし得るアンタゴニストを提供し、そしてアンタゴニストを同定する方法を提供する。本出願人らはまた、短縮型のポリペプチド生成物、アミノステロールなどを投与することによる、ＴＨ２ＡＦ１の活性をダウンレギュレートするための方法を提供する。

【００２０】

本出願人らはまた、アトピー性のアレルギー、喘息、および関連する障害に対する感受性の診断のための方法を、ＴＨ２ＡＦ１の誘導、その機能、または下流の活性をアッセイするための方法を記載することによって提供する。さらなる実施形態においては、本出願人らは、アトピー性のアレルギーおよび喘息の処置に続く手段としての、ＴＨ２ＡＦ１のダウンレギュレーションの影響をモニターするための方法を提供する。

【００２１】

本出願人らはまた、ＴＨ２型ポリペプチドの使用を用いて処置が可能であることが以前に示されている炎症性腸管疾患（ＩＢＤ）のような自己免疫疾患の処置のための方法を提供する（Ｄｅｌ　Ｐｒｅｔｅ、（１９９８）Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６，４２７－４５５）。ＴＨ２ＡＦ１の自己免疫疾患の処

置のための薬理学的作用物質としての適用は、そのＴＨ２に関連する発現プロフィール、およびＩＢＤモデルにおいて抑制性の活性を有することが以前に示されているＴＨ２型のタンパク質であるサイトカインインターロイキン－１０によるその誘導によって一部示唆される（Ｏｐａｌら、Ｃｌｉｎ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．，２７，１４９７－５０７）。

【００２２】

添付の図面（これらは、本明細書中で参考として援用され、そしてその一部を構成する）は、本発明のいくつかの実施形態を説明し、そして本明細書とともに本発明の原理を説明するために提供される。

【００２３】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

（ＴＨ２ＡＦ１タンパク質）

本発明は、単離されたタンパク質、タンパク質の対立遺伝子変異体、およびタンパク質のＴＨ２ＡＦ１ファミリーの保存的アミノ酸置換体を提供する。本明細書中で使用される場合は、タンパク質またはポリペプチドは、配列番号２、４、６、８、１０、または１２に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をいう。本発明はまた、上記に特に列挙されているアミノ酸配列とは、わずかに異なるアミノ酸配列を有する、天然に存在する対立遺伝子改変体およびタンパク質を含む。対立遺伝子改変体は、上記に列挙されているアミノ酸配列とは、わずかに異なるアミノ酸配列を有するが、ＴＨ２ＡＦ１タンパク質と関連する同じ生物学的機能または同様の生物学的機能をなお有する。

【００２４】

本明細書中で使用される場合は、ＴＨ２ＡＦ１タンパク質に関連するタンパク質のファミリーは、ヒトまたはマウスに加えて、複数の生物から単離されているタンパク質をいう。ＴＨ２ＡＦ１タンパク質に関連するタンパク質のファミリーの他のメンバーを同定しそして単離するために使用される方法は、以下に記載される。

【００２５】

本発明のタンパク質は、好ましくは単離された形態である。本明細書中で使用

される場合は、タンパク質は、通常タンパク質と会合している細胞性の成分からタンパク質を取り出すために、物理的、機械的、または化学的な方法が使用される場合に、単離されるといわれる。当業者は、単離されたタンパク質を得るための標準的な精製方法を容易に使用し得る。

【００２６】

本発明のタンパク質はさらに、本明細書中に記載されるタンパク質の保存的な改変体を含む。本明細書中で使用される場合は、保存的な改変体とは、タンパク質の生物学的機能に対して有害な影響を与えないアミノ酸配列中の変更をいう。置換、挿入、または欠失が、変更された配列がタンパク質に関連する生物学的な機能を妨げるかまたは破壊する場合は、タンパク質に有害な影響を与えると言われる。例えば、タンパク質の全体的な電荷、構造、または疎水性および親水性特性は、生物学的な活性に有害な影響を与えることなく変更され得る。従って、アミノ酸配列は、例えば、タンパク質の生物学的な活性に有害な影響を与えることなく、ペプチドをより疎水性または親水性にするように変更され得る。

【００２７】

通常は、対立遺伝子改変体、保存的な置換改変体、およびタンパク質のファミリーのメンバーは、配列番号２、４、６、８、１０、または１２に示される配列と少なくとも７２％または７５％、より好ましくは、少なくとも８０％、なおより好ましくは少なくとも９０％、そして最も好ましくは少なくとも９５％のアミノ酸配列同一性を有しているアミノ酸配列を有する。このような配列に関する同一性または相同性は、本明細書中では、配列をアラインメントして、そして必要である場合には、ギャップを導入して、最大のパーセントの相同性を達成した後、かつ配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮しないで、既知のペプチドと同一である候補の配列中のアミノ酸残基の割合として定義される。ペプチド配列へのＮ末端、Ｃ末端、または内部伸長、欠失、または挿入は、相同性に影響を与えるとは解釈されないはずである。

【００２８】

このように、本発明のタンパク質は、配列番号２、４、６、８、１０、または１２に開示されているアミノ酸配列；ＴＨ１ＡＦ１タンパク質のうちの少なくと

も約3、４、５、６、１０、１５、２０、２５、３０、３５アミノ酸残基以上の連続している配列を有しているそれらのフラグメント；開示されている配列のN末端、またはC末端、またはその内部に、少なくとも１つのアミノ酸残基が導入されている、このような配列のアミノ酸配列改変体；別の残基によって置換されている、開示されている配列のアミノ酸配列改変体または上記に定義されているようなそれらのフラグメントを含む。意図される改変体には、さらに、例えば、相同組換え、部位特異的変異誘発またはＰＣＲ変異誘発によって予め決定された変異を含む改変体、他の動物種（ウサギ、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウマ、およびヒト以外の霊長類種を含むが、これらに限定されない）の対応するタンパク質、タンパク質のファミリーの対立遺伝子改変体または他の天然に存在している改変体；ならびに誘導体（ここで、タンパク質は、天然に存在しているアミノ酸以外の部分（例えば、酵素または放射性同位体のような検出可能な部分）と、置換、化学的な、酵素的な、または他の適切な手段によって共有的に改変されている）が、含まれる。

【００２９】

以下に記載するように、タンパク質のファミリーのメンバーは、（１）タンパク質の少なくとも１つの活性を調節する作用物質を同定するために、（２）タンパク質についての結合パートナーを同定する方法において、（３）ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を惹起するための抗原として、そして（４）喘息および喘息関連障害の処置における治療薬として、使用され得る。

【００３０】

（ＴＨ２ＡＦ１核酸）

本発明はさらに、配列番号２、４、６、８、１０、または１２を有しているタンパク質をコードする核酸分子、および本明細書中に記載されている関連するタンパク質を、好ましくは単離された形態で提供する。本明細書中で使用される場合は、「核酸」は、上記に定義されているようなタンパク質またはペプチドをコードするか、あるいはそのようなペプチドをコードする核酸配列に対して相補的であるか、あるいは適切なストリンジェンシーの条件下でこのような核酸に対してハイブリダイズしかつこのような核酸に対して安定に結合したままであるか、

あるいはペプチド配列と少なくとも７２％もしくは７５％の配列同一性、好ましくは少なくとも８０％、そしてより好ましくは少なくとも８５％の配列同一性を共有しているポリペプチドをコードする、ＲＮＡまたはＤＮＡとして定義される。ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ、およびアンチセンス分子、ならびに別の骨格に基づく核酸か、または天然の供給源に由来するかもしくは合成されたかにはかかわらず別の塩基を含んでいる核酸が、特に意図される。しかし、このようなハイブリダイズする核酸または相補的な核酸はさらに、本発明に従うタンパク質をコードする核酸をコードしするもの、その核酸に対して適切なストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするものか、またはその核酸に対して相補的であるものを含む、いかなる先行技術の核酸からも新規でありかつ自明ではないとして、定義される。

【００３１】

相同性または同一性は、ＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ Ｌｏｃａｌ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｓｅａｒｃｈ Ｔｏｏｌ）分析によって、プログラムｂｌａｓｔｐ、ｂｌａｓｔｎ、ｂｌａｓｔｘ、ｔｂｌａｓｔｎ、およびｔｂｌａｓｔｘ（Ｋａｒｌｉｎら（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７，２２６４－２２６８；Ａｌｔｓｃｈｕｌ、（１９９３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｖｏｌ．３６，２９０－３００、全体が参考として援用されている）によって使用されるアルゴリズムを使用して決定される。これらのプログラムは、配列類似性の検索に適切である。ＢＬＡＳＴプログラムによって使用されるアプローチは、最初に問い合わせ配列とデータベース配列との間での類似のセグメントを考慮すること、次いで、同定された全ての適合の統計学的な有意性を評価すること、そして最後に、有意性の予め選択された限界を満たすこれらの適合のみをまとめることである。配列のデータベースの類似性の検索における基本的な事項の考察については、Ａｌｔｓｃｈｕｌら（Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ（１９９４）６，１１９－１２９）を参照のこと。これは、全体が参考として援用されている。ヒストグラム、説明、アラインメント、予想値（すなわち、データベース配列に対する適合性を報告するための統計学的に有意な限界）、カットオフ、マトリックス、およびフィルターについての検索のパラメーターが、デフォルト設定である。Ｂ

ＬＡＳＴｐ、ＢＬＡＳＴｘ、ｔＢＬＡＳＴｎ、およびｔＢＬＡＳＴｘによって使用されるデフォルトスコアリングマトリックスは、ＢＬＯＳＵＭ６２マトリックス（Ｈｅｎｉｋｏｆｆら（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９，１０９１５－１０９１９、全体が参考として援用されている）である。４つのＢＬＡＳＴｎパラメーターは、以下のように調整される：Ｑ＝１０（ギャップ作成ペナルティー）；Ｒ＝１０（ギャップ伸長ペナルティー）；ｗｉｎｋ＝１（問い合わせ配列に沿ったそれぞれのｗｉｎｋth位置で、ワードヒットを生じる）；およびｇａｐｗ＝１６（ギャップをいれられたアラインメントが作成されるウィンドウの幅を設定する）。同等のＢＬＡＳＴｐパラメーターセッティングは、Ｑ＝９；Ｒ＝２；ｗｉｎｋ＝１；およびｇａｐｗ＝３２であった。ＧＣＧパッケージバージョン１０．０で利用可能な配列間のＢｅｓｔｆｉｔ比較は、ＤＮＡパラメーターＧＡＰ＝５０（ギャップ作成ペナルティー）およびＬＥＮ＝３（ギャップ伸長ペナルティー）を使用し、そしてタンパク質の比較における同等のセッティングが、ＧＡＰ＝８およびＬＥＮ＝２である。

【００３２】

「ストリンジェントな条件」は、以下の条件である：（１）洗浄のために低イオン強度および高温を使用する条件（例えば、０．０１５ＭのＮａＣｌ／０．００１５Ｍのクエン酸ナトリウム／０．１％のＳＤＳで、５０℃）または（２）ホルムアミドのような変性剤（例えば、０．１％のウシ血清アルブミン／０．１％のＦｉｃｏｌｌ／０．１％のポリビニルピロリドン／７５０ｍＭのＮａＣｌ、７５ｍＭのクエン酸ナトリウムを含む５０ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ６．５）５０％のホルムアミド）をハイブリダイゼーションの間に使用する、４２℃での条件。別の例は、４２℃で５０％のホルムアミド、５×ＳＳＣ、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ６．８）、０．１％のピロリン酸ナトリウム、５×デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子ＤＮＡ（５０μｇ／ｍｌ）、０．１％のＳＤＳ、および１０％のデキストラン硫酸の使用、それに伴う、４２℃での０．２×ＳＳＣおよび０．１％のＳＤＳ中での洗浄である。当業者は、明らかでありそして検出可能なハイブリダイゼーションシグナルを得るために適切にストリンジェンシーの条件を容易に決定し、そして変更し得る。

【００３３】

本明細書中で使用される場合は、核酸分子は、核酸分子が核酸の供給源に由来する他のポリペプチドをコードする混入している核酸から実質的に分離されている場合に、「単離された」と言われる。

【００３４】

本発明はさらに、コードする核酸分子のフラグメントを提供する。本明細書中で使用される場合は、コードする核酸分子のフラグメントは、全体のタンパク質のコード配列の小さい部分をいう。フラグメントの大きさは、意図される用途によって決定される。例えば、フラグメントが、タンパク質の活性な部分をコードするように選択される場合は、フラグメントは、タンパク質の機能的な領域（単数または複数）をコードするために十分な長さを必要とする。フラグメントが核酸プローブまたはＰＣＲプライマーとして使用される場合は、フラグメントの長さは、プロービングまたはプライミングの間に比較的少数の偽陽性を得るように、選択される。

【００３５】

本発明のコード核酸分子のフラグメント（すなわち、合成のオリゴヌクレオチド）（これは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、または本発明のタンパク質をコードする遺伝子配列を合成するためのプローブまたは特異的なプライマーとして使用される）は、化学的な技術（例えば、Ｍａｔｔｅｕｃｃｉら（１９８１）（Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０３，３１８５－３１９１）のホスホトリエステル法）によって、または自動化された合成方法を使用して容易に合成され得る。さらに、より大きなＤＮＡセグメントが、周知の方法（例えば、遺伝子の種々のモジュラーセグメントを規定するオリゴヌクレオチドのグループの合成、続く完全な改変された遺伝子を構築するためのオリゴヌクレオチドの連結）によって容易に調製され得る。

【００３６】

本発明のコード核酸分子はさらに、診断用およびプローブの目的のための検出可能な標識を含むように改変され得る。種々のこのような標識が当該分野で公知であり、そして本明細書中に記載されているコード分子とともに容易に使用され

得る。適切な標識として、ビオチン、放射標識ヌクレオチドなどが挙げられるが、これらに限定されない。当業者は、標識されたコード核酸分子を得るために任意の当該分野で公知の標識を使用し得る。

【００３７】

翻訳の間にタンパク質配列中に取り込まれるアミノ酸の欠失、付加、または変更によるそれ自体の一次構造に対する改変は、タンパク質の活性を分解させることなく行われ得る。このような置換または他の変更は、本発明の意図される範囲内に入る核酸によってコードされるアミノ酸配列を有しているタンパク質を生じる。

【００３８】

上記のように、マウスにおける配列番号１、３、５、７、または９、そしてヒトにおける配列番号１１を有している核酸分子の同定は、当業者が、本明細書中に記載されているマウスおよびヒト配列に加えて、タンパク質ファミリーの他のメンバーをコードする核酸分子を単離することを可能にする。さらに、本明細書中で開示されている核酸分子は、当業者が、配列番号２、４、６、８、１０、または１２を有しているＴＨ２ＡＦ１タンパク質に加えて、タンパク質のファミリーの他のメンバーをコードする核酸分子を単離することを可能にする。

【００３９】

本質的には、当業者は、適切な細胞から調製される発現ライブラリーをスクリーニングするための抗体プローブを作成するために、配列番号２、４、６、８、１０、または１２のアミノ酸配列を容易に使用し得る。代表的には、精製されたタンパク質（以下に記載されるように）またはモノクローナル抗体で免疫されたウサギのような哺乳動物に由来するポリクローナル抗血清が、タンパク質ファミリーの他のメンバーの適切なコード配列を得るために哺乳動物のｃＤＮＡまたはλｇｔ１１ライブラリーのようなゲノム発現ライブラリーをプローブするために使用され得る。クローン化されたｃＤＮＡ配列は、融合タンパク質として発現され得るか、それ自体の制御配列を使用して直接発現され得るか、または酵素の発現のために使用される特定の宿主について適切な制御配列を使用する構築物によって発現され得る。

【００４０】

あるいは、本明細書中に記載されるコード配列の一部が合成され得、そして任意の哺乳動物生物体に由来するタンパク質ファミリーのメンバーをコードするＤＮＡを回収するためのプローブとして使用され得る。約１８～２０ヌクレオチドを含有しているオリゴマー（約６アミノ酸から７アミノ酸のストレッチをコードする）が調製され、そしてストリンジェントな条件下または過度のレベルの偽陽性を排除するために十分なストリンジェンシーの条件下でのハイブリダイゼーションを得るために、ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングするために使用される。

【００４１】

さらに、オリゴヌクレオチドプライマーのペアが、コード核酸分子を選択的にクローン化するためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）における使用のために調製され得る。このようなＰＣＲプライマーを使用するためのＰＣＲ変性／アニーリング／伸長サイクルは、当該分野で周知であり、そして他のコード核酸分子の単離における使用のために容易に適合され得る。

【００４２】

（ベクター）

本発明はさらに、コード配列を含む組換えＤＮＡ分子（ｒＤＮＡ）を提供する。本明細書中で使用される場合は、ｒＤＮＡ分子は、分子操作に供されているＤＮＡ分子である。ｒＤＮＡ分子を作成するための方法は当該分野で周知である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８５）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照のこと。好ましいｒＤＮＡ分子においては、コードＤＮＡ配列は、発現制御配列および／またはベクター配列に作動可能に連結される。

【００４３】

本発明のタンパク質ファミリーのコード配列の１つが作動可能に連結されるベクターおよび発現制御配列の選択は、当該分野で周知であるように、所望される機能的特性（例えば、タンパク質の発現、および形質転換される宿主細胞）に直

接依存する。本発明によって意図されるベクターは、少なくとも宿主の染色体中での複製または挿入を指向し得、そして好ましくは、ｒＤＮＡ分子中に含まれる構造遺伝子の発現もまた指向し得る。

【００４４】

作動可能に連結されたタンパク質のコード配列の発現を調節するために使用される発現制御エレメントは当該分野で公知であり、そして限定的ではないが、誘導性プロモーター、構成性プロモーター、分泌シグナル、および他の調節エレメントを含む。好ましくは、誘導性プロモーターは、例えば、宿主細胞の培地中の栄養に対して応答性であるように、容易に制御される。

【００４５】

１つの実施形態においては、コード核酸分子を含有しているベクターは、原核生物のレプリコン（すなわち、それらとともに形質転換された原核生物宿主細胞（例えば、細菌の宿主細胞）中での染色体外の組換えＤＮＡ分子の自律複製および維持を指向する能力を有しているＤＮＡ配列）を含む。このようなレプリコンは、当該分野で周知である。さらに、原核生物のレプリコンを含むベクターもまた、その発現が薬物耐性のような検出可能なマーカーを付与する遺伝子を含み得る。代表的な細菌の薬物耐性遺伝子は、アンピシリンまたはテトラサイクリンに対する耐性を付与する遺伝子である。

【００４６】

原核生物のレプリコンを含むベクターはさらに、細菌の宿主細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）中でのコード遺伝子配列の発現（転写および翻訳）を指向し得る、原核生物またはバクテリオファージのプロモーターを含み得る。プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼの結合を可能にし、そして転写を生じさせるＤＮＡ配列によって形成される発現制御エレメントである。細菌の宿主と適合性であるプロモーター配列は、代表的には、本発明のＤＮＡセグメントの挿入のための簡便な制限部位を含有しているプラスミドベクター中で提供される。代表的なこのようなベクタープラスミドは、ｐＵＣ８、ｐＵＣ９、ｐＢＲ３２２、およびｐＢＲ３２９（Ｂｉｏｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）、ｐＰＬ、ならびにｐＫＫ２２３（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）である。

【００４７】

真核生物細胞と適合性である発現ベクター（好ましくは、脊椎動物細胞と適合性である発現ベクター）もまた、コード配列を含むｒＤＮＡ分子を形成するために使用され得る。真核生物細胞の発現ベクターは当該分野で周知であり、そしていくつかの商業的な供給源から入手可能である。代表的には、所望されるＤＮＡセグメントの挿入のための簡便な制限部位を含有しているようなベクターが、提供される。代表的なこのようなベクターは、ｐＳＶＬおよびｐＫＳＶ－１０（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）、ｐＢＰＶ－１、ｐＭＬ２ｄ（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ｐＴＤＴ１（ＡＴＣＣ、＃３１２５５）、ならびに同様の真核生物の発現ベクターである。

【００４８】

本発明のｒＤＮＡ分子を構築するために使用される真核生物細胞発現ベクターはさらに、真核生物細胞中で有効である選択マーカー（好ましくは、薬物耐性選択マーカー）を含み得る。好ましい薬物耐性マーカーは、その発現がネオマイシン耐性を生じる遺伝子（すなわち、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（ｎｅｏ）遺伝子）である（Ｓｏｕｔｈｅｒｎら、（１９８２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ａｎａｌ．Ｇｅｎｅｔ．１，３２７－３４１）。あるいは、選択マーカーは、異なるプラスミド上に存在し得、２つのベクターが、宿主細胞の同時トランスフェクションによって導入され得、そして選択マーカーについて適切な薬物中での培養によってトランスフェクタントが選択され得る。

【００４９】

本発明はさらに、本発明のタンパク質をコードする核酸分子で形質転換された宿主細胞を提供する。宿主細胞は、原核生物または真核生物のいずれかであり得る。本発明のタンパク質の発現に有用な真核生物細胞は、細胞株が細胞培養方法と適合性であり、そして発現ベクターの増殖および遺伝子産物の発現と適合性である限りは、限定されない。好ましい真核生物宿主細胞として、酵母細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞（好ましくは、脊椎動物細胞（例えば、マウス、ラット、サル、またはヒトの細胞株に由来する細胞））が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい真核生物宿主細胞として、ＣＣＬ６１としてＡＴＣＣから

入手可能なチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＣＲＬ１６５８としてＡＴＣＣから入手可能なＮＩＨ　Ｓｗｉｓｓマウス胚細胞ＮＩＨ－３Ｔ３、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ）、および同様の真核生物組織培養細胞株が挙げられる。

【００５０】

任意の原核生物宿主が、本発明のタンパク質をコードするｒＤＮＡ分子を発現するために使用され得る。好ましい原核生物宿主として、ＰｉｃｈｉａおよびＳａｃｃｒｏｍｙｃｅｓが挙げられるがこれらに限定されない。

【００５１】

適切な細胞宿主の本発明のｒＤＮＡ分子での形質転換は、代表的には使用されるベクターの型および使用される宿主系に依存する周知の方法によって達成される。原核生物宿主細胞の形質転換に関しては、エレクトロポレーションおよび塩処理方法が、代表的には使用される（例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓら（１９８２）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ－Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ；Ｃｏｈｅｎら（１９７２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　６９，２１１０－２１１４を参照のこと）。ｒＤＮＡを含有するベクターでの脊椎動物細胞の形質転換に関しては、エレクトロポレーション、カチオン性脂質、または塩処理方法が、代表的には使用される（例えば、Ｇｒａｈａｍら（１９７３）、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ　５２，４５６－４６７；Ｗｉｇｌｅｒら（１９７９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７６，１３７３－１３７６を参照のこと）。

【００５２】

首尾良く形質転換された細胞（すなわち、本発明のｒＤＮＡ分子を含む細胞）は、選択マーカーについての選択を含む周知技術によって同定され得る。例えば、本発明のｒＤＮＡの導入によって生じる細胞は、単一のコロニーを生じるようにクローン化され得る。これらのコロニーに由来する細胞が回収され得、溶解され得、そしてそれらのＤＮＡ内容物が、Ｓｏｕｔｈｅｒｎ（１９７５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．９８，５０３－５１７によって記載されている方法のような方法

を使用してｒＤＮＡの存在について試験され得るか、または細胞から産生されたタンパク質が、免疫学的方法を通じてアッセイされ得る。

【００５３】

本発明はさらに、本明細書中に記載されている核酸分子を使用して本発明のタンパク質を産生するための方法を提供する。一般的な用語においては、タンパク質の組換え形態の産生は、代表的には、以下の工程を包含する：第１に、以下のような本発明のタンパク質をコードする核酸分子が得られる工程；配列番号１、３、５、７、９、もしくは１１を含有している核酸分子、あるいは配列番号１、３、５、７、もしくは９のヌクレオチド６７～１００５を含有している核酸分子、あるいは配列番号１１のヌクレオチド１０４－１０４２を含有している核酸分子。コード配列が本明細書中の場合のように、イントロンによって中断されていない場合は、任意の宿主中での発現に直接適切である。

【００５４】

次いで、核酸分子は、好ましくは、タンパク質のオープンリーディングフレームを含有している発現ユニットを形成するように、上記のような適切な制御配列に作動可能に連結して配置される。発現ユニットは、適切な宿主を形質転換するために使用され、そして形質転換された宿主は、組換えタンパク質の産生を可能にする条件下で培養される。必要に応じて、組換えタンパク質は、培地からまたは細胞から単離される；タンパク質の回収および精製は、いくつかの不純物が寛容化され得るいくつかの例においては必須ではないかもしれない。

【００５５】

上記の工程のそれぞれが、種々の方法で行われ得る。例えば、所望されるコード配列は、ゲノムフラグメントから得られ得、そして適切な宿主中で直接使用され得る。種々の宿主中で作動可能な発現ベクターの構築は、上記に示されるような適切なレプリコンおよび制御配列を使用して達成される。制御配列、発現ベクター、および形質転換方法は、遺伝子を発現するために使用される宿主細胞の型に依存し、そして先に詳細に議論された。適切な制限部位が、通常のものが利用可能ではない場合には、これらのベクター中への挿入のための摘出可能な遺伝子を提供するように、コード配列の末端に付加され得る。当業者は、組換えタンパ

ク質を産生するために、本発明の核酸分子を用いる使用のために、当該分野で公知の任意の宿主／発現系を容易に適合し得る。

【００５６】

（アッセイ）

本発明の別の実施形態は、本発明のタンパク質の結合パートナーの単離および同定における使用のための方法を提供する。詳細には、本発明のタンパク質は、可能性のある結合パートナーまたは抽出物または細胞の画分と、本発明のタンパク質と可能性のある結合パートナーとの会合を可能にする条件下で、混合される。混合後、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または本発明のタンパク質と会合した他の分子が、混合物から分離される。本発明のタンパク質に結合した結合パートナーは、次いで、取り出され得、そしてさらに分析され得る。結合パートナー、タンパク質全体を同定および単離するためには、例えば、配列番号２、４、６、８、１０、または１２のＴＨ２ＡＦ１タンパク質全体が使用され得る。あるいは、タンパク質のフラグメントが使用され得る。

【００５７】

本明細書中で使用される場合は、細胞性の抽出物は、溶解された細胞または破壊された細胞から作成される調製物または画分をいう。細胞性の抽出物の好ましい供給源は、ヒトの肺組織（例えば、喘息のヒトの肺組織）に由来する細胞である。あるいは、細胞性の抽出物は、正常なヒトの肺組織または入手可能な細胞株（特に、肺または上皮に由来する細胞株）から調製され得る。細胞性の抽出物として、ヒトおよび実験室動物の両方から気管支の肺胞洗浄（ＢＡＬ）によって単離される細胞が挙げられる。

【００５８】

種々の方法が、細胞の抽出物を得るために使用され得る。細胞は、物理的な破壊方法または化学的な破壊方法のいずれかを使用して破壊され得る。物理的な破壊方法の例として、超音波処理、および機械的な剪断が挙げられるが、これらに限定されない。化学的な溶解方法の例として、界面活性剤による溶解および酵素による溶解が挙げられるが、これらに限定されない。当業者は、本発明の方法における使用のための抽出物を得るために、細胞性の抽出物を調製するための方法

を容易に適合し得る。一旦、細胞の抽出物が調製されると、抽出物は、結合パートナーとのタンパク質の会合が生じ得る条件下で本発明のタンパク質と混合される。種々の条件が使用され得、ヒトの細胞の細胞質中に見出される条件によく似ている条件が最も好ましい。使用される細胞性の抽出物の浸透圧、ｐＨ、温度、および濃度のような特徴は、結合パートナーとのタンパク質の会合を最適化するように変更され得る。

【００５９】

適切な条件下での混合後、結合した複合体が混合物から分離される。種々の技術が、混合物を分離するために利用され得る。例えば、本発明のタンパク質に特異的な抗体が、結合パートナー複合体を免疫沈降させるために使用され得る。あるいは、標準的な化学的な分離技術（例えば、クロマトグラフィーおよび密度沈降遠心分離）が使用され得る。

【００６０】

抽出物中に見出される無関係な細胞性の構成成分の除去後、結合パートナーが、従来の方法を使用して複合体から解離させられ得る。例えば、解離は、混合物の塩濃度またはｐＨを変更することによって達成され得る。

【００６１】

混合された抽出物からの会合した結合パートナーペアの分離を補助するために、本発明のタンパク質は、固体支持体上に固定され得る。例えば、タンパク質は、ニトロセルロースマトリックスまたはアクリルビーズに対して付着させられ得る。固体支持体へのタンパク質の付着は、抽出物中に見出される他の構成成分からペプチド－結合パートナーペアを分離することを補助する。同定された結合パートナーは、単一のタンパク質、または２つ以上のタンパク質から作成された複合体のいずれかであり得る。あるいは、結合パートナーは、Ｔａｋａｙａｍａら（１９９７）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．６９，１７１－１８４、またはＳａｕｄｅｒら、（１９９６）Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．７７、９９１－９９６の手順に従うＦａｒ－Ｗｅｓｔｅｒｎアッセイを使用して同定され得るか、あるいはエピトープ（ｅｐｉｔｏｍｅ）タグ化タンパク質またはＧＳＴ融合タンパク質の使用を通じて同定され得る。

【００６２】

あるいは、本発明の核酸分子は、酵母のツーハイブリッドシステムにおいて使用され得る。酵母のツーハイブリッドシステムは、他のタンパク質パートナーペアを同定するために使用されており、そして本明細書中に記載されている核酸分子を使用するために容易に適合され得る（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ　Ｈｙｂｒｉｚａｐ（登録商標）ツーハイブリッドシステム）。

【００６３】

本発明の別の実施形態は、配列番号２、４、６、８、１０、または１２のアミノ酸配列を有しているタンパク質のような、本発明のタンパク質をコードする核酸の発現を調節する作用物質を同定するための方法を提供する。このようなアッセイは、本発明の核酸の発現レベルにおける変化をモニターする任意の利用可能な手段を利用し得る。本明細書中で使用される場合は、作用物質は、本発明の核酸の発現を調節すると言われ、例えば、それが細胞中の核酸の発現をアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションし得る場合には、配列番号２、４、６、８、１０、または１２の配列を有しているタンパク質をコードする核酸である。１つのアッセイ形式においては、配列番号１、３、５、７、もしくは９のヌクレオチド６７～１００５、または配列番号１１のヌクレオチド１０４～１０４２によって規定されるオープンリーディングフレームと、任意のアッセイ可能な融合パートナーとの間でのレポーター遺伝子融合体を含む細胞株が、調製され得る。多数のアッセイ可能な融合パートナーが公知であり、そして容易に利用可能であり、これらには、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子が含まれる（Ａｌａｍら、（１９９０）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１８８，２４５－２５４）。次いで、レポーター遺伝子融合体を含有している細胞株が、適切な条件および時間の下で、試験されるべき作用物質に暴露される。作用物質に暴露されたサンプルとコントロールサンプルとの間でのレポーター遺伝子の示差的発現は、配列番号２、４、６、８、１０、または１２の配列を有しているタンパク質をコードする核酸の発現を調節する作用物質を同定する。

【００６４】

さらなるアッセイ形式が、配列番号２、４、６、８、１０、または１２を有しているタンパク質のような、本発明のタンパク質をコードする核酸の発現を調節する作用物質の能力をモニターするために使用され得る。例えば、ｍＲＮＡの発現は、本発明の核酸に対するハイブリダイゼーションによって、直接モニターされ得る。細胞株は、適切な条件および時間の下で、試験されるべき作用物質に対して暴露され、そして全ＲＮＡまたはｍＲＮＡが、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８５）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓに開示されている手順のような標準的な手順によって単離される。

【００６５】

作用物質に対して暴露された細胞とコントロール細胞との間でのＲＮＡの発現レベルにおける差異を検出するためのプローブが、本発明の核酸から調製され得る。抗ストリンジェンシーの条件下で標的核酸とのみハイブリダイズするプローブを設計することが好ましいが、必須ではない。高く相補的な核酸のハイブリッドのみが、高ストリンジェンシーの条件下で形成する。従って、アッセイ条件のストリンジェンシーは、ハイブリッドを形成するための２つの核酸の鎖間に存在するべきである相補性の量を決定する。ストリンジェンシーは、プローブ：標的ハイブリッドと潜在的なプローブ：非標的ハイブリッドとの間の安定性における差異を最大にするように選択されるべきである。

【００６６】

プローブは、当該分野で公知の方法を通じて本発明の核酸から設計され得る。例えば、プローブのＧ＋Ｃ含有量、およびプローブの長さは、その標的配列へのプローブの結合に影響を与え得る。プローブの特異性を最適化するための方法は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８５）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、またはＡｕｓｕｂｅｌら（１９９５）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇにおいて一般的に利用可能である。

【００６７】

ハイブリダイゼーション条件は、それぞれのプローブについて必要とされている場合には、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８５）およびＡｕｓｕｂｅｌら（１９９５）に記載されている方法のような公知の方法を使用して、改変される。全細胞性のＲＮＡまたはポリＡ＋ＲＮＡについて富化されたＲＮＡのハイブリダイゼーションは、任意の利用可能な形式で達成され得る。例えば、全細胞性のＲＮＡまたはポリＡ＋ＲＮＡについて富化されたＲＮＡは、固体支持体に対して固定され得、そしてこの固体支持体は、本発明の配列の少なくとも１つまたはその１つの一部を含有している少なくとも１つのプローブに対して、このプローブが特異的にハイブリダイズする条件下で暴露される。あるいは、本発明の配列の少なくとも１つまたはその１つの一部を含有している核酸フラグメントは、シリコンベースのカシェ剤または有孔性のガラスカシェ剤のような固体支持体に対して固定され得る。次いで、このカシェ剤は、サンプルに由来する全細胞性のＲＮＡまたはポリＡ＋ＲＮＡに対して、固定された配列が特異的にハイブリダイズする条件下で暴露され得る。このようなカシェ剤およびハイブリダイゼーション方法は、広範に利用可能であり、例えば、Ｂｅａｔｔｉｅ（WO９５１１７５５）によって開示されている。所定のプローブの、未処理の細胞集団に由来するＲＮＡサンプル、および作用物質に対して暴露された細胞集団に由来するＲＮＡサンプルに対して特異的にハイブリダイズする能力について試験することによって、配列番号２、４、６、８、１０、または１２の配列を有しているタンパク質をコードする核酸の発現をアップレギュレートまたはダウンレギュレートする作用物質が同定される。

【００６８】

ｍＲＮＡの定量的および定性的な分析のためのハイブリダイゼーションもまた、ＲＮａｓｅ　Ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ　Ａｓｓａｙ（すなわち、ＲＰＡ、Maら（１９９６）Ｍｅｔｈｏｄｓ　１０，２７３－２３８を参照のこと）を使用することによって行われ得る。簡潔には、遺伝子産物をコードするｃＤＮＡおよびファージ特異的ＤＮＡ依存性のＲＮＡポリメラーゼプロモーター（例えば、Ｔ７、Ｔ３、またはＳＰ６　ＲＮＡポリメラーゼ）を含有している発現ビヒクルが、ファージプロモーターの下流であるｃＤＮＡ分子の３’末端で直鎖状にされる。こ

こでは、このような直鎖状にされた分子は、続いて、インビトロでの転写によるｃＤＮＡの標識されたアンチセンス転写物の合成のための鋳型として使用される。標識された転写物は、次いで、単離されたＲＮＡの混合物（すなわち、全ｍＲＮＡまたは分画されたｍＲＮＡ）に対して、８０％のホルムアミド、４０ｍＭのＰｉｐｅｓ（ｐＨ６．４）、０．４ＭのＮａＣｌ、および１ｍＭのＥＤＴＡを含有している緩衝液中で４５℃で一晩のインキュベーションによってハイブリダイズされる。得られたハイブリッドは、次いで、４０μｇ／ｍｌのリボヌクレアーゼＡおよび２μｇのリボヌクレアーゼを含有している緩衝液中で消化される。外来のタンパク質の脱活性化および抽出後、このサンプルは、分析のために尿素／ポリアクリルアミドゲル上にロードされる。

【００６９】

別のアッセイ形式においては、目的の遺伝子産物の発現に影響を与える作用物質、細胞または細胞株が、最初に同定される。これは、この遺伝子産物を生理学的に発現する。このように同定された細胞および細胞株は、必須の細胞性の機構を含むと予想される。その結果、転写装置の変調の適合度が、適切な表面の形質導入機構および細胞質性のカスケードを伴う作用物質の外因性の接触に関して、維持される。さらに、このような細胞または細胞株は、目的の遺伝子産物に対して特有である１つ以上の抗原性フラグメントに融合された本発明の遺伝子産物をコードする構造遺伝子の末端を含有している作動可能な非翻訳５’プロモーターを含有している発現ビヒクル（例えば、プラスミドまたはウイルスベクター）構築物で形質導入されるかまたはトランスフェクトされる。ここでは、上記のフラグメントは、上記のプロモーターの転写制御下にあり、そしてその分子量が天然に存在するポリペプチドとは異なり得るか、または免疫学的に異なるタグをさらに含み得るポリペプチドとして発現される。このようなプロセスは、当該分野で周知である（Ｍａｎｉａｔｉｓら（１９８２）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照のこと）。

【００７０】

上記に概説されるように形質導入されるかまたはトランスフェクトされた細胞

または細胞株は、次いで、適切な条件下で作用物質と接触させられる；例えば、作用物質は、薬学的に受容可能な賦形剤を含み、そして生理学的なｐＨのリン酸緩衝化生理食塩水（ＰＢＳ）、生理学的なｐＨのＥａｇｌｅ平衡化塩溶液（ＢＳＳ）、血清を含有しているＰＢＳもしくはＢＳＳ、またはＰＢＳもしくはＢＳＳを含有している馴化培地、および／または３７℃でインキュベートした血清のような水性の生理学的な緩衝液中の細胞と、接触させられる。上記の条件は、当業者によって必要と考えられる場合には調節され得る。細胞と作用物質との接触に続いて、上記の細胞が破壊され、そして破壊物のポリペプチドが分画され、その結果、ポリペプチド画分がプールされ、そして免疫学的アッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡ，免疫沈降、またはウェスタンブロット）によってさらに処理される抗体と接触される。「作用物質と接触された」サンプルから単離されたタンパク質のプールは、賦形剤のみが細胞と接触されるコントロールサンプルと比較され、そしてコントロールと比較して「作用物質と接触された」サンプルによる免疫学的に生成されたシグナルにおける増大または減少が、作用物質の有効性を区別するために使用される。

【００７１】

本発明の別の実施形態は、配列番号２、４、６、８、１０、または１２のアミノ酸配列を有しているタンパク質のような、本発明のタンパク質の少なくとも１つの活性を調節する作用物質を同定するための方法を提供する。このような方法またはアッセイは、所望される活性をモニターするかまたは検出する任意の手段を利用し得る。

【００７２】

１つの形式においては、暴露されていないコントロール細胞の集団と比較される、試験される作用物質に対して暴露されている細胞の集団間での本発明のタンパク質の相対的な量が、アッセイされ得る。この形式においては、特異的な抗体のようなプローブが、異なる細胞集団中でのタンパク質の示差的な発現をモニターするために使用される。細胞株または集団は、適切な条件および時間の下で、試験された作用物質に対して暴露される。細胞性の溶解物は、暴露された細胞株または集団、およびコントロールの暴露されていない細胞株または集団から調製

され得る。細胞性の溶解物は、次いで、プローブを用いて分析される。

【００７３】

抗体プローブは、ペプチドを使用する適切な免疫プロトコールにおいて適切な哺乳動物宿主を免疫化することによって調製される。本発明のポリペプチドまたはタンパク質は、それらが十分な長さである場合、または所望される場合、または必要とされる場合には、免疫原性を増強するために、適切なキャリアに結合される。ＢＳＡ、ＫＬＨ、または他のキャリアタンパク質のようなキャリアとの免疫原性の結合体を調製するための方法は、当該分野で周知である。いくつかの状況においては、例えば、カルボジイミド試薬を使用する直接的な結合が有効であり得る；他の例においては、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏ．によって供給されているような連結試薬が、ハプテンに対する接近性を提供するために所望され得る。ハプテンペプチドは、例えば、キャリアに対する連結を容易にするように、システイン残基を有するアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれかで延長され得るか、またはシステイン残基とともに点在され得る。免疫原の投与は、一般的には、当該分野で一般的に理解されているように、適切な期間にわたって、そして適切なアジュバントの使用とともに、注射によって行われる。免疫化スケジュールの間には、抗体の力価が、利用され、抗体の形成の適否を決定する。

【００７４】

この方法で産生されるポリクローナル抗血清は、いくつかの適用について、薬学的組成物について十分であり得るが、モノクローナル調製物の使用が好ましい。所望されるモノクローナル抗体を分泌する固定された細胞株は、Ｋｏｈｌｅｒ およびＭｉｌｓｔｅｉｎ（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９９２）２４，５２４－５２６）の標準的な方法、または一般的に公知であるようなリンパ球もしくは脾細胞の固定化を達成する改変を使用して調製され得る。所望される抗体を分泌する固定された細胞株は、抗原がペプチドハプテン、ポリペプチド、またはタンパク質であるイムノアッセイによってスクリーニングされる。所望される抗体を分泌する適切な固定された細胞培養物が同定される場合は、この細胞は、インビトロでまたは腹水液中での産生によるかのいずれかによって、培養され得る。

【００７５】

所望されるモノクローナル抗体は、培養上清からまたは腹水の上清から回収され得る。免疫学的に有意な部分を含有しているモノクローナル抗血清またはポリクローナル抗血清のフラグメントが、アンタゴニストおよびインタクトな抗体として使用され得る。免疫学的に反応性のフラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ）$_2$フラグメントのＦａｂ’）の使用がしばしば、特に、これらのフラグメントがイムノグロブリン全体よりも一般的に免疫原性が低い治療の状況において好ましい。抗体またはフラグメントはまた、組換え手段によって現行の技術を使用して産生され得る。タンパク質の所望の領域に対して特異的に結合する抗体領域はまた、複数の種の起源とのキメラの状況で産生され得る。

【００７６】

上記の方法でアッセイされる作用物質は、ランダムに選択され得るか、または合理的に選択もしくは設計され得る。本明細書中で使用される場合は、作用物質は、作用物質が本発明のタンパク質の、単独で、またはその会合した物質、結合パートナーなどとの会合に関連している特異的な配列を考慮することなく、ランダムに選択される場合には、ランダムに選択されると言われる。ランダムに選択された作用物質の一例は、化学的ライブラリーもしくはペプチドの組み合わせライブラリーの使用、または生物体の増殖培地の使用である。

【００７７】

本明細書中で使用される場合は、作用物質がランダムではない基準に基づいて選択される場合には、作用物質は合理的に選択されるかまたは設計されると言われ、このランダムでない基準は、作用物質の作用と組み合わせて標的部位の配列および／またはその立体構造を考慮する。作用物質は、これらの部位が作成されるペプチド配列を利用することによって合理的に選択され得るかまたは合理的に設計され得る。

【００７８】

本発明の作用物質は、例として、ペプチド、低分子、ビタミン誘導体、ならびに糖質であり得る。当業者は、本発明の作用物質の構造的な性質が限定的ではなく存在することを容易に認識し得る。

【００７９】

本発明のペプチド作用物質は、当該分野で公知であるような、標準的な固相（または液相）ペプチド合成方法を使用して調製され得る。さらに、これらのペプチドをコードするＤＮＡは、市販されているオリゴヌクレオチド合成装置を使用して合成され得、そして標準的な組換え産生システムを使用して組換えによって産生され得る。固相ペプチド合成を使用する産生は、アミノ酸をコードしない遺伝子が含まれる場合に、必要とされる。

【００８０】

本発明の作用物質の別のクラスは、本発明のタンパク質の重要な部分と免疫反応性である抗体である。抗体作用物質は、抗原性領域を含有しているペプチドでの適切な哺乳動物被検体の免疫によって得られる。タンパク質のこれらの部分は、この抗体によって標的化されるように意図される。

【００８１】

（アトピー）

出願人らは、ＩＬ－９経路において重要な遺伝子、ならびに喘息および関連する障害を含むアトピー性のアレルギーの診断、予防、または処置に使用され得る経路に影響を与える組成物を明らかにすることによって、当該分野での必要性を解決する。喘息は、可逆的な気道の閉塞を伴う気道の炎症性の障害を含む。アトピー性のアレルギーとは、喘息、気管支の応答性亢進、鼻炎、じんましん、腸のアレルギー性の炎症障害、および種々の形態の湿疹を含む、アトピーおよび関連する障害をいう。アトピーは、コントロールと比較した場合の、血清の全ＩｇＥの上昇またはアレルゲンに対する異常な皮膚の試験応答として発現される環境によるアレルゲンに対する反応性亢進である。気管支の反応性亢進は、種々の刺激に対する高められた気管支収縮応答である。従って、本発明は、ヒトまたはマウスのＴＨ２ＡＦ１をコードするヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメントを含有している精製されそして単離されたＤＮＡ分子を提供する。本発明はまた、ＤＮＡの縮重配列、ならびに実質的に相同である配列を含む。本発明のＴＨ２ＡＦ１の供給源は、ヒトおよびマウスである。あるいは、ＤＮＡまたはそのフラグメントは、当該分野で公知の方法を使用して合成され得る。遺伝子操作技術に

よって、任意の受け容れられている技術を使用してＤＮＡを構築すること、発現ビヒクル中のＤＮＡをクローニングすること、およびこの作用物質を発現する細胞中にビヒクルをトランスフェクトすることによって、この作用物質を産生することもまた可能である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８５に記載されている方法を参照のこと。

【００８２】

（ＴＨ２ＡＦ１のクローニング）

マウスのＴＨ２ＡＦ１遺伝子は、Ｉｌ－９によって特異的に誘導される遺伝子を同定するために行われた差し引きｃＤＮＡクローニング（ｓｕｂｔｒａｃｔｉｖｅ ｃＤＮＡ ｃｌｏｎｉｎｇ）実験によって同定された。差し引きｃＤＮＡクローニング方法の模式図が、図１に提供される。出願人らは、親株（ＦＶＢ）中では発現されない遺伝子に対して、ＩＬ－９に応答して発現される遺伝子を単離するために、マウスのＩＬ－９トランスジーンを過剰発現するトランスジェニックマウス（ＴＧ５）の肺に由来するＲＮＡを使用した。マウスのｃＤＮＡライブラリーのライブラリースクリーニング、および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）によって誘導された組換えクローンの配列分析によって、密接に関連するＴＨ２ＡＦ１イソ型のファミリーを明らかにした。これらは、種々のマウスの株の腸管において主に発現される（図２、および配列番号２、４、６、８、１０）。興味深いことに、これらのタンパク質（これらは＞９８％同一である）は、ＩＬ－９トランスジェニックマウスの肺についてを除いて、ネイティブの動物の肺においては見出されない。このことは、肺のイソ型の発現とアレルギー応答および／またはＴＨ２応答との間での密接な相関関係を実証する。図３は、ＴＧ５マウス（右のレーン）およびＦＶＢマウス（左のレーン）の肺に由来するＲＮＡでのノーザンブロットを示し、これは、これらの知見を実証する。ＴＨ２ＡＦ１の発現はまた、ＤＢＡマウス株の肺中で観察された。これらは、ＤＢＡマウス株の肺において上昇した基礎ＩＬ－９レベルを発現することが示されている（図４）。ＴＨ２ＡＦ１の発現は、Ｃ５７ＢＬ／６株の肺では観察されなかった

。この株では、ＩＬ－９の発現は検出限界未満である（図４）（Ｎｉｃｏｌａｉｄｅｓら、（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４，１３１７５－１３１８０）。ＴＨ２ＡＦ１の発現を含むＩＬ－９の直接的な影響は、ＩＬ－９がＣ５７Ｂ６マウスの気道内に注入された場合に、実証された。この実験の結果は、ＴＨ２ＡＦ１がＩＬ－９を注入されたマウスの肺においては発現されたが、ネイティブのマウスまたはビヒクルで処置されたマウスにおいては発現されなかったことを実証した（図５）。このことは、この遺伝子がＩＬ－９によって誘導されることを示している。さらに、ＴＨ２ＡＦ１は、他のＴＨ２に関連するサイトカイン（例えば、ＩＬ－４およびＩＬ－１０）によって誘導されるが、一方、ＴＨ１に関連するサイトカイン（例えば、インターフェロンγ）は、この遺伝子の発現を誘導しなかったことが見出された（図５）。

【００８３】

マウスのＴＨ２ＡＦ１遺伝子は、Ｘｅｎｏｐｕｓの皮質顆粒のＬｅｃｔｉｎファミリーのメンバーと有意な同一性（６２％）を提示した（Ｑｕｉｌｌら、（１９９６）Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．３３３，３２６－３３２；Ｌｅｅら、（１９９７）Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ．７，３６７－３７２）。全長のマウスのｃＤＮＡは、ｃＤＮＡ ＲＡＣＥキットを使用してクローン化されたが（図２）、一方、ｃＤＮＡは、部分的な配列を同定するためのＮａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＩｎｆｏｒｍａｔｉｏｎのｄｂＥＳＴデータベースのＢＬＡＳＴ分析を使用して同定され、次いでこれは、５’ＲＡＣＥおよび３’ＲＡＣＥ（Ｃｌｏｎｅｔｅｃｈ）を使用して完全にクローン化された。

【００８４】

マウスのＴＨ２ＡＦ１の組織発現は、ネイティブのマウスにおいては小腸を除くいかなる組織においても検出されなかったが、ＴＨ２ＡＦ１の上昇した発現が、ＩＬ－９トランスジェニックマウスの肺、結腸、および小腸で観察された。これは、全ての組織においてこのサイトカインを過剰に発現する（示さない）。興味深いことに、これらの組織は、上皮細胞型からなり、このことは、この遺伝子がＩＬ－９応答性の上皮細胞に対して制限され得ることを示唆する。インサイチ

ュ分析においては、ＴＨ２ＡＦ１の発現がＴＧ５マウスの肺上皮細胞中で見出されたが、一方、ネイティブの類似遺伝子型のバックグラウンドの株（ＦＶＢ）においては発現は観察されなかった（示さない）。

【００８５】

アトピー性のアレルギー、気管支の反応性亢進（ＢＨＲ）、喘息、および関連する障害の病因におけるＴＨ２ＡＦ１の役割を定義するさらなる証拠は、ＩＬ－９がＴＨ２ＡＦ１を選択的に誘導するという出願人らの観察から直接導く。従って、ＩＬ－９の多面発現性の役割（これは、抗原によって誘導される多数の応答について重要である）は、アトピー性のアレルギーについて重要な細胞中でのＴＨ２ＡＦ１のアップレギュレーションに一部依存する。ＩＬ－９の機能が抗原でのエアゾールチャレンジの前の抗体での予備処置によってダウンレギュレートされる場合は、動物は、抗原によって誘導される応答から完全に保護され得る。これらの応答として：ＢＨＲ、気道の好酸球増加症、および気道の洗浄における上昇した細胞数、炎症および上昇した血清の全ＩｇＥレベルに関連する肺における組織学的な変化を含む。従って、ＴＨ２ＡＦ１をダウンレギュレートすることによるこのような応答（これらは、アトピー性のアレルギーの病因の根底にあり、そしてこの障害に関連するアレルギー性の炎症の特徴である）の処置は、本発明の範囲内である。

【００８６】

出願人らはまた、ＴＨ２ＡＦ１のアンタゴニストを投与することによる、ＴＨ２ＡＦ１のダウンレギュレーションを教示する。当業者は、ＴＨ２ＡＦ１の活性化、またはそれに対する可溶性のレセプターおよび／もしくはタンパク質の結合に重要な必要な三次元立体構造を含有している全ての分子が、本発明の範囲内であることを認識する。

【００８７】

喘息様の表現型に関連するＩＬ－９配列および喘息様の表現型の非存在に関連するＩＬ－９配列の実証は、肺での抗原に対する炎症性の応答がＩＬ－９依存性であることを示す。ＴＨ２ＡＦ１のダウンレギュレーション（これは、ＩＬ－９経路の誘導されたダウンレギュレーションである）は、従って、この抗原に誘導

された応答に対して防御する。さらに、出願人らはまた、アトピー性のアレルギーおよび関連する障害に対する感受性を診断する方法を提供し、そしてＩＬ－９、そのレセプター、およびＴＨ２ＡＦ１の間の相関関係に基づいてこれらの障害を処置するための方法を提供する。

【００８８】

１つの診断実施形態は、ＴＨ２ＡＦ１のＤＮＡ配列におけるバリエーションの認識に関する。１つの方法は、当業者によって理解されているような、十分なハイブリダイゼーション条件下での、本発明のＴＨ２ＡＦ１に対して相補的な配列を有している核酸分子（プローブとしてもまた公知である）の導入を含む。１つの実施形態においては、この配列は、ＴＨ２ＡＦ１の１つの対立遺伝子またはそのフラグメントに対して特異的に結合し、そして別の実施形態においては、両方の対立遺伝子に結合する。これらの障害に関連するＤＮＡ配列のバリエーションを認識する別の方法は、当該分野で周知の複数の方法による直接的なＤＮＡ配列の分析である（Ｏｔｔ、（１９９１）、Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｇｅｎｅｔｉｃ ｌｉｎｋａｇｅ，Ｊｏｈｎ Ｈｏｐｋｉｎｓ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ）。別の実施形態は、これらの障害に関連するＴＨ２ＡＦ１遺伝子中のＤＮＡ配列のバリエーションの検出を含む（Ｓｃｈｗｅｎｇｅｌら（１９９３）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ １８、２１２－２１５；Ｓｈｅｆｆｉｅｌｄら（１９９３）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ １６、３２５－３３２；Ｏｒｉｔａら、（１９８９）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ５、８７４－８７９；Ｓａｒｋａｒら、（１９９２）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ １３、４４１－４４３；Ｃｏｔｔｏｎ，（１９８９）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．２６３、１－１０）。これらは、ポリメラーゼ連鎖反応、制限フラグメント長の多形分析、および一本鎖の立体構造の分析を含む。

【００８９】

特異的なアッセイは、ＴＨ２ＡＦ１の細胞性の機能をモニターすることに基づき得る。本発明のアンタゴニストとしては、ＴＨ２ＡＦ１と相互作用するかまたはそれに対して結合する分子、およびこのタンパク質を不活性化する分子が挙げられる。本発明の他のアロステリックな、逆位の、または弱いアンタゴニストを同定するために、当業者は、ＴＨ２ＡＦ１に対する結合を試験し得る。本発明は

、このタンパク質の機能をブロックするＴＨ２ＡＦ１のアンタゴニストを含む。アンタゴニストは、それ自体の薬理学的な活性を欠いているが、アゴニストの作用を妨げることによって影響を生じる作用物質である。本発明のアンタゴニストを同定するために、当業者は、活性のためにＴＨ２ＡＦ１と複合体化する天然のＴＨ２ＡＦ１レセプターまたはタンパク質との競合的な結合について試験し得る。アンタゴニストの結合および活性のアッセイは、本明細書中および引用文献中に記載されているような、ダウンレギュレーションについてＴＨ２ＡＦ１機能をモニターすることによって誘導され得る。アンタゴニストの結合は、イオン作用、水素結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力、および共有結合を含む全ての公知の型の相互作用を含み得る。多くの場合においては、複数の型の結合が、アゴニストまたはアンタゴニストのＴＨ２ＡＦ１様の分子との相互作用において重要である。

【００９０】

さらなる実施形態においては、これらの作用物質は、ＴＨ２ＡＦ１のアナログまたは可溶性のレセプターであり得る。ＴＨ２ＡＦ１アナログは、遺伝子、ヌクレオチド置換、および／または欠失のための単離されたＤＮＡ配列中の点変異によって産生され得る。これらは、当該分野で十分に記載されている方法によって作成され得る（Ｓｉｍｏｎｃｓｉｔｓら（１９９４）Ｃｙｔｏｋｉｎｅ　６，２０６－２１４）。本発明はまた、ＴＨ２ＡＦ１のスプライシングされた改変体を含み、そしてそのエキソン中に１つ以上の欠失を含有しているＴＨ２ＡＦ１の単離された核酸配列を開示する。本明細書中で使用される場合、用語「スプライシングされた改変体」は、精製されそして単離された、少なくとも１つのエキソンを含有しているヒトのＴＨ２ＡＦ１をコードするＤＮＡ分子を示す。当該分野で天然に発現されるスプライシングされた改変体の証拠はない。これらのエキソンが種々の点変異を含み得ることが、理解されなければならない。

【００９１】

構造活性相関は、本発明のアンタゴニストを改変するために使用され得る。例えば、Ｘ線結晶解析およびＮＭＲの技術が、本発明の改変を行うために使用され得る。例えば、当業者は、、分子グラフィックを使用して欠失変異体の構造モデ

ルを構築するための鋳型として使用され得る、ヒトＴＨ２ＡＦ１の三次元構造を作成し得る。これらのモデルは、次いで、その正常な機能を変更するＴＨ２ＡＦ１のポリペプチドまたは化学的な構造を同定しそして構築するために使用され得る。なお別の実施形態においては、これらの作用物質はまた、ＴＨ２ＡＦ１の構造のための動的なプローブとして、そしてＴＨ２ＡＦ１活性をアッセイするための細胞株または他の適切な手段を使用してＴＨ２ＡＦ１アンタゴニストを開発するために使用され得る。

【００９２】

さらに、本発明はまた、ＴＨ２ＡＦ１の合成を妨げるかまたはＴＨ２ＡＦ１の生物学的な安定性を減少させる作用物質を提供する。生物学的な安定性は、分子の合成とその分解との間の時間の程度である。例えば、タンパク質、ペプチド、またはペプチド模倣物（Ｋａｕｖａｒ、（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１４，７０９）の治療薬の安定性は、それを酵素的な分解に対してより敏感にするために、Ｄ－アミノ酸を使用することによって延長させられ得るか、またはその配列を変更することによって短縮され得る。

【００９３】

別の実施形態においては、本発明のアンタゴニストは、ＴＨ２ＡＦ１に対する抗体である（図７を参照のこと）。ＴＨ２ＡＦ１に対する抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかであり得、当該分野で周知の標準的な技術を使用して作成される（ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ、（１９８８）、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓを参照のこと）。これらは、リガンドの結合または活性化に必要とされるタンパク質の細胞外領域に対する結合によって、ＴＨ２ＡＦ１の活性化をブロックするために使用され得る。１つの実施形態においては、抗体はＴＨ２ＡＦ１と相互作用し、別の実施形態においては、これらは、ＴＨ２ＡＦ１のレセプター（単数または複数）と相互作用する。これらの抗体を誘発するために使用されるＴＨ２ＡＦ１は、ＴＨ２ＡＦ１タンパク質、または上記に議論されているＴＨ２ＡＦ１改変体もしくはフラグメントのいずれかであり得る。抗体はまた、ＴＨ２ＡＦ１のペプチド配列から、当該

分野での標準的な技術を使用して産生される（Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，１９９４を参照のこと）。

【００９４】

なお別の実施形態においては、本発明の試薬は、アトピー性のアレルギーおよび喘息における治療上の利点のために、ＴＨ２ＡＦ１の機能または調節を変更するタンパク質を含む、化学的な部分に対してカップリングされ得る（Ｋｒｅｉｔｍａｎら、（１９９４）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３３，１１６３７－１１６４４）。これらのタンパク質は、抗ＩＬ－２、抗ＩＬ－３、抗ＩＬ－４、抗ＩＬ－５、抗ＩＬ－１１、抗ＩＬ－１０、および抗ＩＬ－１３を含むサイトカインおよび増殖因子の他のインヒビターを組合せて含み得る。これらは、アトピー性のアレルギーおよび喘息においてさらなる治療上の利点を付与し得る。さらに、本発明の分子は、当該分野で周知の任意の架橋試薬を使用して、ビオチニレート、チオエート、アセチレート、ヨウ素酸（ｉｏｄｉｎａｔｅ）へのリン酸化を通じて結合体化され得る。

【００９５】

本発明のさらなる実施形態は、アンチセンス治療または遺伝子治療に関する。変更されたＤＮＡ分子が、アンチセンス治療または遺伝子治療として提供される場合には、選択された効果を提供するように調整され得ることが、当該分野で現在公知である。ＴＨ２ＡＦ１をコードする天然のＤＮＡセグメントは２本の鎖を有する；このセンス鎖およびアンチセンス鎖が、水素結合によって互いに結びついている。レセプターをコードするｍＲＮＡは、ウリジンによるチミジンの予想される置換を伴って、センス鎖に対して同一であるヌクレオチド配列を有する。このように、レセプター配列の知見に基づいて、合成オリゴヌクレオチドが合成され得る。これらのオリゴヌクレオチドは、ＴＨ２ＡＦ１をコードするＤＮＡおよびＲＮＡに結合し得る。本発明の活性なフラグメント（これらは、ｍＲＮＡおよびＤＮＡのコード鎖に対して相補的である）は、通常は、少なくとも約１５ヌクレオチド、より通常は、少なくとも２０ヌクレオチド、好ましくは、３０ヌクレオチドであり、そしてより好ましくは少なくとも５０以上のヌクレオチドであ

り得る。センス鎖とアンチセンス鎖との間での結合強度は、全水素結合に依存する。従って、ｍＲＮＡ中の塩基の総数に基づいて、最適な長さのオリゴヌクレオチド配列が、当業者によって容易に計算され得る。

【００９６】

配列は、ｍＲＮＡの配列の任意の部分に対して相補的であり得る。例えば、これは、５’末端もしくはキャッピング部位に対して近位であり得るか、またはキャッピング部位の下流であり得るか、キャッピング部位と開始コドンの間であり得、そして非コード領域またはコード領域の全体または一部のみをカバーし得る。それに対してアンチセンス配列が結合する特定の部位（単数または複数）は、所望される阻害の程度、配列の独自性、アンチセンス配列の安定性などに依存して変化する。

【００９７】

本発明の実施においては、ＴＨ２ＡＦ１の発現は、上記のアンチセンスオリゴヌクレオチド配列の有効量を投与することによってダウンレギュレートされる。本発明のオリゴヌクレオチド作用物質は、ヒトのＴＨ２ＡＦ１をコードするｍＲＮＡに結合し、それによってこれらのタンパク質の発現（翻訳）を阻害する。点変異、挿入、欠失のような種々の変異を含有している単離されたＤＮＡ配列は、ＴＨ２ＡＦ１のスプライシングされた変異体であり、これらは遺伝子治療において同様に十分に有用である。

【００９８】

ＴＨ２ＡＦ１遺伝子の直接的な調節に加えて、本発明はまた、ＴＨ２ＡＦ１による細胞内シグナル伝達の阻害の方法を含む。高度にエネルギーを放出するホスホリル伝達反応はが、キナーゼとして公知の種々の酵素によって触媒されることが、当該分野で公知である。言いかえると、キナーゼは、ＡＴＰと代謝物との間でホスホリル基を伝達する。ＴＨ２ＡＦ１のダウンレギュレーションにおいて有用であるこれらのキナーゼであるプロテインキナーゼの特異的なインヒビターが本発明の範囲内に含まれ、そして従って、アトピー性のアレルギーおよび喘息の処置において有用である。ＴＨ２ＡＦ１は、グリコシル化されることが公知であり、従って、このタンパク質のグリコシル化を抑制する分子が、ＴＨ２ＡＦ１の

機能を変更するために有用であり得る。

【００９９】

本発明のなお別の局面においては、驚くべきことに、アミノステロール作用物質が、ＩＬ－９によるＴＨ２ＡＦ１の誘導の阻害において有用であることが見出された（図８）。本発明において有用であるアミノステロール作用物質は、米国特許出願番号第０８／２９０，８２６号、ならびにその関連出願番号第０８／４１６，８８３号および同第０８／４７８，７６３号、ならびに米国特許出願番号第０８／４８３，０５９号、ならびにその関連出願番号第０８／４８３，０５７号、同第０８／４７９，４５５号、同第０８／４７９，４５７号、同第０８／４７５，５７２号、同第０８／４７６，８５５号、同第８／４７４，７９９号、および同第０８／４８７，４４３号に記載されている。これらは、本明細書中で特に参考として援用されている。これらの関連出願は、抗原の暴露の際に喘息のマウスのモデルにおいて、喘息様の応答におけるアミノステロール作用物質の阻害活性について言及している。これらのデータは再び、応答がダウンレギュレートされる場合に、喘息の応答におけるＴＨ２ＡＦ１とその発現との密接な相関関係が抑制されることをいう。

【０１００】

ＴＨ２ＡＦ１のダウンレギュレーションの治療可能性が同定されているが、出願人らはまた、ＴＨ２ＡＦ１のアップレギュレーションについての治療可能性を十分に認識している。自己免疫疾患は、炎症のＴＨ１型と関連して見出されている。これらの型の疾患（例えば、炎症性腸疾患（ＩＢＤ））は、ＴＨ２型タンパク質の使用を用いて処置可能であることが以前に示されている（Ｄｅｌ　Ｐｒｅｔｅ（１９９８）Ｉｎｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６，４２７－４５５）。この疾患の処置のための薬理学的な作用物質としてのＴＨ２ＡＦ１の適用は、そのＴＨ２に関連する発現プロフィールによって一部示唆され、そしてＴＨ２型タンパク質であるサイトカインＩＬ－１０中でのその誘導が、ＩＢＤモデルにおいて抑制性活性を有することが以前に示されている（Ｏｐａｌら、（１９９８）Ｃｌｉｎ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．２７，１４９７－５０７）。他の自己免疫関連疾患（例えば、糖尿病、関節炎、潰瘍性大腸炎など）もまた、組換えＴＨ２ＡＦ

１またはこのタンパク質に由来するフラグメントによって処置可能である可能性のある疾患である。タンパク質またはフラグメントは、増強された薬理学的な活性を有する改変された構造から構成され得る。

【０１０１】

本発明はまた、薬学的に受容可能なキャリアとともに本発明の作用物質を含有している薬学的組成物を含む。薬学的に受容可能なキャリアは、滅菌液体（例えば、水、および油（石油、動物、植物、または合成の起源のものを含む（例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油など））であり得る。水は、好ましくは、薬学的組成物が静脈内で投与される場合に好ましいキャリアである。生理食塩水および水性のデキストロースおよびグリセロール溶液もまた、液体のキャリア（特に、注射可能な溶液）として使用され得る。適切な薬学的なキャリアは、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ（１９９５）に記載されている。

【０１０２】

本発明の処置方法で使用される作用物質は、処置される条件、部位特異的な処置の必要性、投与される薬物の量、および同様の要件のようなこのような要件に依存して、全身的にまたは局所的に投与され得る。

【０１０３】

局所的な投与が使用され得る。任意の一般的な局所形式（例えば、溶液、懸濁物、ゲル、軟膏、または膏薬（ｓａｌｖｅ）など）が使用され得る。このような局所的な処方物の調製は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓによって例証されているように、薬学的処方物の分野で十分に記載されている。局所適用については、これらの作用物質はまた、粉末またはスプレー、特にエアゾールの形態として投与され得る。有効成分は、全身的な投与に適合させられた薬学的組成物中で投与され得る。公知であるように、薬物が全身的に投与される場合には、粉末、丸剤、錠剤などとして作成され得、経口投与のためにはシロップ剤またはエリキシル剤として作成され得る。静脈、腹腔内、または病変内投与のためには、作用物質は、注射によって投与され得る溶液または懸濁物として調製される。特定の場合においては、これらの作

用物質を坐剤の形態で処方すること、または皮膚もしくは筋肉内注射下での蓄積のための延長された放出処方物として処方することが、有用であり得る。好ましい実施形態においては、本発明の作用物質は、吸入によって投与され得る。吸入治療のためには、薬剤は、メーターで測る用量の吸入装置による投与に有用な溶液であり得るか、または乾燥粉末の吸入に適切な形態であり得る。

【０１０４】

有効量は、ＴＨ２ＡＦ１をダウンレギュレートする量である。所定の有効量は、それぞれの条件によって変化し、そして特定の例においては、処置される状態の重篤度および処置に対する患者の敏感さとともに変化し得る。従って、所定の有効量は、その時点で最良に決定され、そして日常的な実験を通じて決定される。しかし、本発明に従うアトピー性のアレルギーおよび喘息関連障害の処置においては、０．００１～５重量％の間、好ましくは約０．０１～１重量％の間を含有している処方物が、通常は治療有効量を構成することが予想される。全身的に投与される場合には、１日あたり体重１ｋｇあたり０．０１と１００ミリグラムとの間の量、しかし好ましくは、１ｋｇあたり約０．１～１０ミリグラムの間の量が、ほとんどの症例において治療結果をもたらす。

【０１０５】

本発明の実施は、分子生物学、薬理学、免疫学、および生化学の従来の用語および技術を使用する。これらは、当業者の範囲内である。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８５）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ－Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ）を参照のこと。

【０１０６】

本発明のなお別の局面においては、ＴＨ２ＡＦ１遺伝子またはタンパク質の発現は、喘息のような気道の炎症性疾患の検出のための診断マーカーとして作用し得、そして腸管の炎症性疾患についてのマーカーとして作用し得る。ここでは、ＴＨ２ＡＦ１の構成的発現が、ヒトおよびマウスの組織の両方において見出される。

【０１０７】

本発明の他の実施形態は、開示される本発明の明細書および実施を考慮して当業者に明らかである。明細書および実施例が、特許請求の範囲によって示される本発明の真の範囲を伴って、単なる例示であると見なされることが意図される。提供されるこの背景情報を用いて、出願人らはここで、本発明のＴＨ２ＡＦ１の好ましい局面を記載する。

【０１０８】

（実施例１）

（ＩＬ－９発現遺伝子の示差的ｃＤＮＡ分析）

トランスジェニックＩＬ－９マウス（ＴＧ５）から抽出された肺を用いて、ＩＬ－９誘導遺伝子を単離した。ＴＧ５は以前に報告されているように、ＩＬ－９遺伝子を過剰発現するＦＶＭマウスである（Ｒｅｎａｕｌｄら、（１９９４）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　９，１３２７－１３３２）。この株はマウスのほとんどの組織においてＩＬ－９を過剰発現していることが示されている。特異的ＩＬ－９誘導遺伝子を同定するために、市販のＰＣＲ－ｓｅｌｅｃｔ　ｃＤＮＡ　ｓｕｂｔｒａｃｔｉｏｎキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて、ＴＧ５および親のＦＶＢマウスの肺由来のＲＮＡにおいて、抑制性ＰＣＲ　ｃＤＮＡ相違分析を行った。

【０１０９】

ｃＤＮＡ合成。全ＲＮＡを、製造業者（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）によって示された通り、トリゾールを用いて、ＦＶＢマウスおよびＴＧ５マウスの肺から調製した。安楽死させたマウスから肺を取り出し、液体窒素で凍結させた。次いで、凍結した肺をトリゾール中に移し替え、組織研磨機を用いて粉々にした。ポリアデニル化ＲＮＡをオリゴ（ｄＴ）セルロースカラム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）を用いて全ＲＮＡから精製した。製造業者（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）により示された方法に従い、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ逆転写酵素およびオリゴ（ｄＴ）プライマーを用いて二本鎖ｃＤＮＡを合成した。次いで、ｃＤＮＡはフェノール－クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により調製した。生成物をヌクレアーゼフリーの水に再懸濁し、以下に記載するように生成物の質を決定するために、アガロースゲルでの分析を行った。

【０１１０】

ＴＧ５肺およびＦＶＢ肺の示差的ｃＤＮＡ分析は、図１に示されているような、製造業者（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）のプロトコールに従って行った。これらの肺由来のｃＤＮＡ間の差し引きの結果、１２００の組換えクローンを作り出すこととなった。これらのクローンの分析により、幾つかの種の多重性が明らかになり、それぞれ、ライブラリーの２～５％を占めていた。ライブラリーにおいて最も顕著な転写をしていたのは、減算の効率のコントロールとして働いていたＩＬ－９ｃＤＮＡであった。なぜなら、この減算はＩＬ－９を構成的に発現しているマウス（ＴＧ５）とその両親のコントロール（ｐａｒｅｎｔａｌ　ｃｏｎｔｒｏｌ）との間の減算であったからである。

【０１１１】

（実施例２）

（ＩＬ－９トランスジェニックマウスの肺におけるマウスＴＨ２ＡＦ１ｃＤＮＡの同定）

妥当な配列を生じる８３６のクローンの中で新たなｃＤＮＡが１７回回収された。この３２１塩基の断片を用いたＧａｎＢａｎｋのヌクレオチドＢＬＡＳＴデータベース検索（Ａｌｔｓｃｈｕｌら（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５、４０３－４１０）により、この断片はアフリカツメガエルの皮質顆粒レクチンタンパク質に最も良く類似しており、また、幾つかのマウスＥＳＴクローンにも類似していることが明らかとなった。この３２１塩基のｃＤＮＡおよびマウスＥＳＴクローン由来のＴＨ２ＡＦ１プライマーを、製造業者（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）の推奨に従い、肺ｃＤＮＡ　ＲＡＣＥキット（Ｍａｒａｔｈｏｎ－Ｒｅａｄｙ　ｃＤＮＡ、Ｂａｌｂ/ｃ　ｍａｌｅ）を用いてＲＡＣＥを行う際に用いられた。５’ＲＡＣＥのためにアンチセンスプライマーｍＬｅｃｔｉｎ７（配列番号１３）、５’－ＧＧＧＴＴＣＴＴＧＴＡＧＴＣＡＴＣＡＣＴＴＧＴＧＧＣＡＧ－３’、ｍＬｅｃｔｉｎ９（配列番号１４）、５’－ＴＧＣＡＧＡＣＣＣＡＡＡＧＧＴＧＴＴＧＴＡＧＴＴＧＧＣ－３’が用いられた。３’ＲＡＣＥ用には、アンチセンスプライマーｍＬｅｃｔｉｎ１０（配列番号１５）、５’－ＣＴＧＣＣＡＣＡＡＧＴＧＡＴＧＡＣＴＡＣＡＡＧＡＡＣＣＣ－３’、ｍＬｅｃｔｉｎ８（配列番号１６）、５’－ＣＧＴＧＣＡＧＴＧＴＧＧＡＧＡＣＴＴＴＧＣＴＧＣＡ－３

’が用いられた。ＰＣＲフラグメントをＴＡクローニングベクターにクローニングし、部分的に減算したＤＮＡフラグメントおよびマウスＥＳＴクローン由来の配列から同定された内部配列だけでなく、プラスミドベクターに対するプライマーを用いて配列決定した。これらの５’および３’ＲＡＣＥ配列から生成したセンスプライマーｍＬｅｃｔｉｎ２０（配列番号１７）、５’－ＧＡＡＡＧＧＴＴＣＣＴＧＴＣＡＴＴＡＣＴＣＡＧＣ－３’、アンチセンスプライマーｍＬｅｃｔｉｎ（配列番号１８）、５’－ＣＴＧＣＴＴＴＡＴＴＧＣＴＣＡＴＴＡＧＣＡＴＴＣ－３’がＦＶＢおよびＴＧ５（配列番号１）の肺、ＦＶＢの小腸（配列番号３）、ＴＧ５（配列番号１）、ＤＢＡ２（配列番号７）、およびＣ５７ＢＬ/６（配列番号９）マウスから生じたＰＣＲ産物に対して用いられた。ＰＣＲ産物をクローニングおよび配列決定した。その後、これらのクローンのアライメントを取り、全長ＯＲＦを含むｃＤＮＡを作るためのコンティグを作った。明らかに、株のバリエーションの他に、各々のマウスの株は少なくとも高度に相同性のある３種のＴＨ２ＡＦ１を有することが分かった。これはおそらく、昔に染色体の重複が起こったせいである。マウスＴＨ２ＡＦ１アイソフォームのタンパク質アライメントを図２に示す。これらのアイソフォームはアミノ酸レベルで９８％より高い相同性を示す。このことは、これらのタンパク質が保存された機能を持つことを示している。マウスＴＨ２ＡＦ１の一次配列は、ヒトＥＳＴデータベースに対して検索をかけるために用いられ、いくつかのＥＳＴがこの新規ｃＤＮＡに類似していることが見出された。５’ヒトＴＨ２ＡＦ１配列が、ヒト小腸ＲＡＣＥキット（Ｍａｒａｔｈｏｎ－Ｒｅａｄｙ　ｃＤＮＡ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を用いて、製造業者の推薦に従って作り出された（配列番号１１）。アンチセンスプライマーｈＬｅｃｔｉｎ７（配列番号１９）、５’－ＡＧＧＧＴＴＣＴＴＧＴＡＧＴＣＡＴＣＧＣＴＣＧＴＧＧ－３’、ｊＬｅｃｔｉｎ（配列番号２０）、５’－ＡＧＡＴＣＣＡＡＡＧＧＴＧＴＴＧＴＡＧＴＴＧＧＣＣＣ－３’が、５’ＲＡＣＥに用いられた。アンチセンスプライマーｈＬｅｃｔｉｎ２（配列番号２１）、５’－ＧＣＴＣＴＡＧＡＴＣＴＣＡＴＧＧＴＴＧＧＧＡＧＧＡＧＧＧ－３’は、ヒトＥＳＴクローン由来のものであった。ｈＬｅｃｔｉｎ２およびアンチセンスプライマーｈＬｅｃｔｉｎ１６（配列番号２２）、５’－ＧＡＡＡＧＣＴＧＣＡ

ＣＴＣＴＧＴＴＧＡＧＣ－３’は、このヒト小腸ＲＡＣＥキットからＰＣＲ産物を作り出す為に用いられた。

【０１１２】

ＰＣＲ産物をクローニングおよび配列決定した。その後、それらのクローンのアライメントをとり、ヒトＴＨ２ＡＦ１（配列番号１１および１２）の全長ＯＲＦを含むｃＤＮＡ配列を作るためにコンティグを作った。ｈＬｅｃｔｉｎ２（配列番号２１）、プライマーおよびセンスプライマーｈＬｅｃｔｉｎ１８（配列番号２３）、５’－ＧＣＡＧＣＴＧＡＧＡＣＴＣＡＧＡＣＡＡＧ－３’もまた、ＩＬ－４で処理したＡ５４９のＲＴ－ｃＤＮＡサンプルからＰＣＲ産物を生成するために用いた（Ａ５４９は、ヒト肺の上皮細胞系統である）。Ａ５４９由来のヒトＴＨ２ＡＦ１配列は、小腸由来のものと全く同じであった（配列番号１１）。ヒトＴＨ２ＡＦ１ホモログと、マウス（８１％の相同性）のタンパク質およびアフリカツメガエル（６０％の相同性）のタンパク質と、高度に保存されていることが見出された。コードされているタンパク質のモチーフ分析は、分泌シグナルペプチド（コドン１～１８）およびグリコシル化部位などの幾つかの特徴を実証した。

【０１１３】

（実施例３）

（マウス細胞において、ＴＨ２ＡＦ１はＩＬ－９によってインビボで誘導される）

肺において、ＴＨ２ＡＦ１がＩＬ－９によって誘導されることを確かめるために、ＴＧ５およびＦＶＢマウスの肺から、実施例１に示すようにＲＮＡをとり出した。製造業者により示されるように、ランダムヘキサマー（Ｐｈａｒｍａｃｉａ）およびＳｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩ（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）を用いて、ｃＤＮＡを生成した。メッセージを、記載されているように（Ｎｉｃｏｌａｉｄｅｓら（１９９５）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　３０、１９５－２０６）、ＰＣＲ、およびノーザンブロットを介して分析した。マウスＴＨ２ＡＦ１メッセージを生成するのに使用したプライマーは、センスｍＬｅｃｔｉｎ２０（配列番号１７）（ヌクレオチド）およびアンチセンスｍＬｅｃｔｉｎ２３（配列番号１８）であった。

これらによって、１，１０４塩基の遺伝子産物が産生される。以前に記載された（Ｎｉｃｏｌａｉｄｅｓら、（１９９１）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　３０、１９５－２０６）プライマーを用いて、ｃＤＮＡの完全性（ｉｎｔｅｇｒｉｔｙ）を測定するための内部コントロールとして、ＧＡＰＤＨをアッセイした。用いた増幅条件は、９４℃で３０秒間、５８℃で１．５分間、７２℃で１．５分間を３５回サイクルであった。ノーザンブロット分析により、ＴＧ５またはＦＶＢの肺由来の全ＲＮＡが１．５％ホルムアルデヒドゲル上で電気泳動され、ナイロンメンブレンへと転写され、そして、マウスＴＨ２ＡＦ１　ｃＤＮＡを含むＤＮＡフラグメントを用いてプロービングされた。

【０１１４】

発現研究の結果は、ＴＨ２ＡＦ１はＩＬ－９トランスジェニックマウス（ＴＧ５）の肺において特異的に発現されているが、その親の株（ＦＶＢ）においては、その発現はもっと低いか、あるいは全く見られないことを実証した（図３）。ＧＡＰＤＨ（下側のパネル）を、ＲＮＡローディングのための内部コントロールとして評価するために用いた。このデータは、肺に含まれているＩＬ－９応答性細胞がＴＨ２ＡＦ１を発現している肺における、ＩＬ－９のＴＨ２ＡＦ１発現に対する直接的な効果を実証した。

【０１１５】

（実施例４）

（ＴＨ２ＡＦ１発現は、マウス肺においてＩＬ－９により誘導される）

ＴＨ２ＡＦ１遺伝子発現を、検出可能なレベルのＩＬ－９を発現しないＣ５７ＢＬ/６マウスおよび強いレベルのＩＬ－９を発現するＤＢＡマウスを用いて、インビボで評価した（Ｎｉｃｏｌａｉｄｅｓら、（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９４、１３１７５－１３１８０）。これらの肺由来のＴＨ２ＡＦ１のＲＴ－ＰＣＲおよびノーザンブロット分析は、ＴＨ２ＡＦ１が元来、高レベルのＩＬ－９を発現するマウス（ＤＢＡ）の肺においては発現しているが、低レベルのＩＬ－９を有するマウス（Ｃ５７ＢＬ/６）においては、発現しないということを実証した（図４）。ＲＮＡローディングのコントロールとして、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ、下側のパネル）を、エチジウムブロミ

ド（下側のパネル）を用いて染色した。

【０１１６】

ＩＬ－９の発現がＴＨ２ＡＦ１の発現に決定的に関与しており、遺伝的バックグラウンドをコントロールするのに特異的に関与していることを確かめるために、組換えマウスＩＬ－９を、マウス株Ｃ５７ＢＬ/６の肺に導入した。組換えＩＬ－９は、１０日間、毎日、５０μｌの０．１ｍｇ/ｍｌＩＬ－９溶液またはビヒクルのみ（０．１％ウシ血清アルブミン）の添加により、麻酔をかけたマウスの気管に染み込ませた。１０日後、マウスを安楽死させ、肺を、製造業者（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）により記載されたトリゾールを用いたＲＮＡ発現分析、または、染み込ませたＩＬ－９のレベルを決定するためのウエスタンブロット分析のいずれかのために用いられた。ＩＬ－９のウエスタンブロット分析は、肺への直接的なＩＬ－９の添加がビヒクルのみを染み込ませたマウスでは何も見られないのに対し、肺におけるＩＬ－９の全量の増加を引き起こすことを示した（Ｓｈｉｍｂａｒａら、（２０００）Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１０５、１０８－１１５）。

【０１１７】

ＴＨ２ＡＦ１　ＲＮＡの発現を、実施例３に記載されたように測定した。ＴＨ２ＡＦ１の定常状態ｍＲＮＡ分析により、ビヒクルのみで処理されたマウスの肺においては発現が全く見られれないが、Ｃ５７ＢＬ/６マウスの肺に組換えＩＬ－９を投与したときには発現が増加することが示された（図５）。このデータは、肺におけるＴＨ２ＡＦ１発現の誘導に対するＩＬ－９の直接的な役割を実証する。他の組換えサイトカインの付加は、遺伝子導入のパターンを示唆した。Ｃ５７ＢＬ/６マウスの気道に染み込ませた場合、ＴＨ２関連サイトカインであるＩＬ－４、ＩＬ－９およびＩＬ－１０はすべてＴＨ２Ｆ１の発現を誘導した。しかし、インターフェロンγ（ＩＮＦ－γ）のようなＴＨ１関連サイトカインはＴＨ２Ｆ１の発現を誘導しなかった。リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ、下側のパネル）を、ＲＮＡローディングのコントロールのために、エチジウムブロミド（下側のパネル）で染色した。

【０１１８】

（実施例５）

（マウスにおけるＴＨ２ＡＦ１の組織分布）

ＴＨ２ＡＦ１の発現がＩＬ－９の発現の存在下でのみ起こるという可能性について調べるために、様々な器官をＴＧ５マウスから抽出し、そのＲＮＡ発現をノーザンブロットにより分析した。親の株であるＦＶＢマウスをコントロールとして用いた。なぜなら、このマウスは、肺において、ＴＧ５マウスと比べて低いレベルのＩＬ－９を発現するからである。ＴＧ５、ＦＶＢマウス器官の組織ブロットを、器官を取り出し、液体窒素中で凍らせることにより調製した。製造業者（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）により記載されるように、トリゾールを用いて、それぞれの器官から全ＲＮＡを抽出した。ＲＮＡを、ゲル電気泳動に供し、実施例４に示されている方法で分析した。各レーンを、ＧＡＰＤＨを内部コントロールにしてプロービングすることにより標準化した。

【０１１９】

組織ブロットを、ＴＨ２ＡＦ１を含むＤＮＡフラグメントを用いてプロービングした。顕著な定常状態ＴＨ２ＡＦ１発現は、投薬を受けていないマウスの小腸においてのみ見られた（示さず）。ＩＬ－９トランスジェニックマウス由来の器官によるＴＨ２ＡＦ１の発現分析は、この遺伝子は小腸と同様に、肺および結腸における高レベル発現を示した（示さず）。このデータは、ＴＨ２ＡＦ１が、ＩＬ－９を過剰発現しているマウスのいくつかの組織において発現しているが、ＩＬ－９レベルの低いマウスにおいては、小腸においてのみ構成的に発現することを実証した。このデータは、ＴＨ２ＡＦ１は、ＩＬ－９に応答して、これらの器官の生理学において役割を果たし得ることを示唆する。腸へのＴＨ２ＡＦ１の導入は、炎症性腸疾患におけるＴＨ２ＡＦ１の役割を指し示し得る。また、ヒト腸において、ヒトホモログの発現を観察した。ＩＬ９トランスジェニックマウスおよび先天的なバックグラウンド株マウス由来の肺組織を用いたインサイチュ遺伝子発現により、ＴＨ２ＡＦ１の発現は気道の上皮から起こっていることが明らかになった。このことは、通常、上皮細胞が、ＴＨ２サイトカインのサブセットに応答したこれらのファクターの生産を担っていることを示唆する。

【０１２０】

（実施例６）

（喘息様の表現型を示すマウスにおける、抗原誘導性のＴＨ２ＡＦ１発現）

遺伝子発現プロフィールは、ＴＨ２ＡＦ１が天然のＩＬ－９トランスジェニックマウス（ＴＧ５）の肺においては発現しているが、先天的なコントロール株（ＦＶＢ）では発現していないということを示す（図３）。さらに、その発現は反応性亢進ＤＢＡ/２マウスの肺においても観察された（図４）。ＴＨ２ＡＦ１の発現が、抗原にさらされたマウスの喘息様の肺に関連しているかどうかを調べるために、天然の肺、ならびに定常状態ｍＲＮＡ発現レベルを、ＢＨＲの増加、肺への好酸球増加症、および抗原へさらすことによる全血清ＩｇＥレベルの上昇を示す、抗原にさらされたＦＶＢ、ＴＧ５マウスの肺において調べられた（ＭｃＬａｎｅら（１９９８）Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９、７１３－７２０）。これらのマウスは、抗原がＩＬ－９トランスジェニックマウス（Ｔ）にさらされた後に、ＦＶＢ類遺伝子性（ｃｏｎｇｅｎｉｃ）バックグラウンド系統マウス（Ｆ）（３．３×１０^{4}）と比較して、気道における好酸球の増加（３．３×１０^{5}）を示し、そして両方の動物において、気道の反応性亢進の増加を示す（ＭｃＬａｎｅら（１９９８）Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｅｌｌ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９、７１３－７２０）。図６は、ＴＨ２ＡＦ１の定常状態発現レベルが、抗原にさらすことよりＦＶＢコントロールマウス（Ｆレーン）においてもまた増加しているが、その一方で、増強されたＴＧ５マウス（Ｔレーン）における発現は強いままであり、増強された喘息様の応答に関連しているということを示す。このデータは、気管炎症におけるしっかりとしたＴＨ２ＡＦ１発現パターンを示しており、疾患のプロセスの調節におけるこの遺伝子の役割を示唆する。

【０１２１】

（実施例７）

（ＴＨ２ＡＦ１に対する抗体の産生）

ウサギに、マウスタンパク質とヒトタンパク質との間で同一であるＴＨ２ＡＦ１のＣ末端残基３０２～３１３を含むペプチドでワクチン接種した。簡単に書くと、ウサギ１匹あたり３～５ｍｌの血清を事前採血した後、１、７、１４、２８

、５６、および８４日目に、フロイントアジュバント中の抗原をその動物に注入した。血清サンプルを４２、７０および８０日目に採取し、免疫に使われたペプチドおよび総分子に対する抗ＴＨ２ＡＦ１力価について、プレートＥＬＩＳＡにより分析した。簡単に書くと、ＥＬＩＳＡは、３連のウェルにおいて、ＰＢＳ（ｐＨ７．４）中の、ペプチド、組換えＴＨ２ＡＦ１または非特異的抗原を含む、１μｇ/ｍｌの溶液でコートした９６ウェルマイクロタイタープレートを用いて行った。コート試薬を取り除き、ウェルを０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ（ｐＨ７．４）で３回洗い、ＰＢＳ中の５％ＢＳＡ（ＢＳＡ－ＰＢＳ）で、室温で２時間ブロッキングした。その後、プレートを洗浄し、ウサギの免疫前抗血清あるいは活性抗血清をＢＳＡ－ＰＢＳに溶かした系列希釈物（０．１、０．０１、０．００１）とともに、１時間インキュベートした。その後、プレートを三回洗浄し、ＰＢＳ－ＢＳＡで１：３０００希釈した抗ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体とともに３０分間インキュベートした。最終的に、プレートを洗浄し、ＴＭＢペルオキシダーゼ基質（ＢｉｏＲＡＤ）とともに３０分間インキュベートし、Ｄｙｎａｔｅｃｈプレートリーダーで４５０ｎｍにて分析した。２つの抗血清が、ペプチド抗原に対して高い力価を示すことを見出し（６８７３および６８７４）そしてそれらをさらに、Ｃ末端にＦＬＡＧエピトープタグを含む、インビトロで翻訳されたマウスおよびヒトのＴＨ２ＡＦ１をポジティブコントロールとして、この抗血清がＴＨ２ＡＦ１を検出する能力をインビトロでの免疫沈降（ＩＰ）により評価した。このマウスおよびヒトのＴＨ２ＡＦ１－ＦＬＡＧタンパク質は、ヒトおよびマウスのＴＨ２ＡＦ１　ｃＤＮＡのＰＣＲ増幅により得られた転写産物から生成し、このＰＣＲ増幅には、翻訳開始のためのＴ７プロモーターおよびＫｏｚａｋコンセンサス配列を含むセンスプライマー、ならびに成熟ペプチドの一番最後のアミノ酸に融合したＦＬＡＧエピトープ（下線、下記を参照のこと）、続いて終止コドンを含む、アンチセンスプライマーを用いた。このセンスプライマーは、コドン１９～２４を標的とする（コドン１９は成熟ＴＨ２ＡＦ１の最初の残基である）。このＣ末端ＦＬＡＧ融合エピトープは、ポジティブコントロールとして作用し、モノクローナル抗ＦＬＡＧ（ＩＢＩ）もまた、検出に用いる。

【０１２２】

用いたプライマーは、マウスセンス：５’－ｇｇａｔｃｃｔａａｔａｃｇａｃｔｃａｃｔａｔａｇｇｇａｇａｃｃａｃｃａｔｇｇｃａｇｃｔｇａａｇａｃｔｇ－３’（配列番号２４）；マウスアンチセンス：５’－ｇｇｔｃｃｔｔａｔｃａｃｔｔｇｔｃｇｔｃｇｔｃｃｔｃｇｔｃｃｔｃｇｃｇａｔａｇａａｔａｇ－３’（配列番号２５）；ヒトセンス：５’－ｇｇａｔｃｃｔａａｔａｃｇａｃｔｃａｃｔａｔａｇｇｇａｇａｃｃａｃｃａｔｇａｇｔａｃａｇａｔｇａｇｇｃｔａａｔａｃｔｔａｃ－３’（配列番号２６）；ヒトアンチセンス：５’－ｇｇａｔｃｃｔｔａｔｃａｃｇｇｔｃａｔｃｇｔｃｇｔｃｃｔｔａｇｔｃｇａｔａｇａａｔａｇａａｇａｃａｇｃ－３’（配列番号２７）。

【０１２３】

ＰＣＲ増幅は、９４℃で３０秒、５４℃で１分、７２℃で１分、の３０サイクルを、ＤＮＡ複製における忠実性が非常に高くなったＴａｑ－ｐｆｕポリメラーゼを用いて、Ｈｙｂａｉｄ　９６ウェルＴｏｕｃｈｄｏｗｎサーマルサイクラーにて行った。その後、およそ１ｋｂｐの長さのＰＣＲ産物を、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿し、そしてインビトロ転写結合型翻訳（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　ｃｕｐｌｅｄ　ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ）（ＴＮＴ）反応のための鋳型として、ＲＮａｓｅおよびＤＮＡｓｅを含まない水に、１μｇ/ｍｌになるように再懸濁した。ＴＮＴ反応のために、１μｇの鋳型を、５０μｌの放射性標識した^{35}Ｓ－メチオニンを含む網状赤血球溶解物（ｒｅｔｉｃｕｌｏｌｙｓａｔｅ）混合物（Ｐｒｏｍｅｇａ）に添加した。反応は３０℃で１時間行った。ヒトＩＬ－９レセプターｃＤＮＡをＰＣＲ増幅した。そして、ネガティブコントロールとして用いるために、このＰＣＲ産物ならびに鋳型を含まないようにプログラムした網状赤血球溶解物（ｒｅｔｉｃｕｌｏｌｙｓａｔｅ）をインビトロで翻訳させた。インキュベート後、各反応液５μｌを４～２０％のＴｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（Ｎｏｖｅｘ）上で泳動し、５％メタノールおよび５％酢酸で固定した、乾燥させ、オートラジオグラフィーに供した。図７（ＴＮＴパネル）は、インビトロ翻訳反応からの代表的結果を示している。その後、等量の翻訳産物を、ウサギ事前採血由来の抗血清

（ＩｇＧパネル）、ＴＨ２ＡＦ－１抗血清６８７３および６８７４および抗ＦＬＡＧを用いた免疫沈降に用いた。サンプルを３００μｌになるようにＥＢＣ緩衝液（０．１ＭｎＣｌ、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－Ｈｃｌ、ｐＨ７．５、０．５％　ＮＰ４０）に希釈し、そして１０μｌの抗血清または１μｇの抗ＦＬＡＧを加え、そして氷上で１時間インキュベートした。４０μｌのプロテインＡ－セファロース（Ｓｉｇｍａ）をそれぞれのサンプルに加え、４℃で１２時間、サンプルを反転させた。インキュベーションが完了した後、サンプルを１４，０００ｒｐｍで微量遠心分離し、そしてＥＢＣで５回洗浄した。最後の洗浄後、ペレットを２×ＳＤＳ緩衝液（６０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ　６．８５、２％　ＳＤＳ、１０％グリセロール、０．１Ｍ　２－メルカプトエタノール、０．００１％ブロモフェノールブルー）に再懸濁し、５分間煮沸し、４～２０％　Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅ　ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で泳動し、固定し、乾燥させ、そしてオートラジオグラフィーに供した。図７は、ＴＨ２ＡＦ１抗血清（＃６８７３および＃６８７４）は、ヒトおよびマウスのＴＨ２ＡＦ－１を特異的に認識し得たが、ヒトＩＬ－９レセプターは認識し得なかったことを示している。

【０１２４】

（実施例８）

（マウス肺におけるアミノステロールによるＴＨ２ＡＦ１誘導のブロッキング）

ＴＨ２ＡＦ１の発現をブロックする能力について試験するために、ＤＢＡ気管支反応性亢進マウス由来の肺を、アミノステロール剤で処理する。このグループのアミノステロールは、ツノザメ科のサメの肝臓から、抗増殖性であるような分子の種類として同定された。これらの薬剤の例は、米国特許第５，６３７，６９１号およびそれに関連する米国特許第５，７３３，８９９号および同第５，７２１，２２６号、ならびに米国特許第５，８４０，７４０号およびそれに関連する同第５，７９５，８５５号、同第５，９９４，３３６号、同第５，７６３，４３０号、同５，８４０，９３６号、同第５，８７４，５９７号、同第５，７９２，６３５号および同５，８４７，１７２号において、言及されている。この一連のアミノステロールのメンバーを、下記のように、ＤＢＡマウスからのＴＨ２ＡＦ

１発現およびＴＨ２活性を阻害する能力についてアッセイした。

【０１２５】

ＤＢＡ/２マウスに、１５日間にわたり毎日、１０ｍｇ/ｋｇにて種々のアミノステロールを腹腔内注入した。１５日目にマウスの表現型を調べ（実施例９を参照のこと）、安楽死させ、実施例１に記載されるように肺を抽出した。ＲＮＡを単離し、そしてノーザンブロット分析のためにＴＨ２ＡＦ１　ｃＤＮＡプローブを用いて処理した。定常状態のＴＨ２ＡＦ１　ＲＮＡレベルは、コントロールと比較した場合の、アミノステロール処理による阻害の程度を示す。例えば、図８は、特定のアミノステロール（１４３２）ががインビボにおいてＴＨ２ＡＦ１の発現をブロックする能力を示している。図８は、このモデルにおいて抗原に対する喘息様の応答を抑制することに対して最小の効果を有するコルチコステロイドデキタメゾンで処理されたマウス（レーン３）に対し、処理されたマウスの肺において、１４３２（レーン２）がＴＨ２ＡＦ１の発現をダウンレギュレートし得ることを示している。前述の実験（図４）で示されているように、生まれつき気道反応性亢進であるＤＢＡ/２マウス（Ｎｉｃｏｌａｉｄｅｓら（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９４、１３１７５～１３１８０）は、抗原への曝露の際に増強される基礎ＴＨ２ＡＦ１発現を示す（レーン４）。このデータは、ＴＨ２ＡＦ１発現と喘息様の肺の緊密な相関を示している。ＲＮＡローディングについてのコントロールのために、ＧＡＤＰＨを測定した（下側のパネル）。

【０１２６】

（実施例９）

（喘息のマウスモデルにおけるＴＨ２ＡＦ１の役割－感作されていないマウスの気管応答）

系統ＤＢＡ、Ｃ５７１３６、Ｂ６Ｄ２Ｆ１の保証されたウイルスフリーの雄性および雌性のマウスを、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅまたは Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｂａｒ　Ｈａｒｂｏｒ、Ｍａｉｎｅ）から購入する。ＩＬ－９トランスジェニックマウス（ＴＧ５）およびその親株（ＦＶＢ）は、Ｌｕｄｗｉｇ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（Ｂｒｕｓｓｅｌｓ

、Ｂｅｌｇｉｕｍ）から手に入れる。ウイルスおよび抗原フリーな設備において、高い効率で微粒子濾過した層流空気流のフードにて、実験操作前の３～７日間、動物を飼育し、エサおよび水を自由に摂ることができるようにしておく。この動物施設を、２２℃で維持し、明：暗のサイクルを自動で調節する（明：暗＝１０時間：１４時間）。

【０１２７】

気管支収縮応答を決定するために、薬物へさらす前および間に、気管にて呼吸器系圧を測定し、そして記録する。マウスを、以前に記載されたように、麻酔しそして準備（ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔ）した（Ｌｅｖｉｔｔら、（１９８８）ＦＡＳＥＢ Ｊ． ２，２６０５－２６０８；Ｌｅｖｉｔｔら、（１９９１）Ｐｈａｒｍａｃｏｇｅｎｅｔｉｃｓ １、９４－９７；Ｋｌｅｅｂｅｒｇｅｒら、（１９９０）Ａｍ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．２５８、３１３－３２０；Ｌｅｖｉｔｔら、（１９９５）Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ．Ｍｅｄ．１５１，１５３７－１５４２；Ｅｗａｒｔら、（１９９５）Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｐｈｙｓ．７９、５６０－５６６）。気管応答性を、以下のうちの１つ以上に対して測定する：５－ヒドロキシトリプタミン、アセチルコリン、アトラクリウム、または物質－Ｐアナログ。気管支収縮チャレンジの後のピーク吸息性圧力における変化の、簡単かつ繰り返し可能な測定が用い、この測定は気道圧力時間指数（ａｉｒｗａｙ ｐｒｅｓｓｕｒｅ ｔｉｍｅ ｉｎｄｅｘ）（（ＡＰＴＩ）と呼ばれている（Ｌｅｖｉｔｔら、（１９８８）ＦＡＳＥＢ Ｊ．２，２６０５－２６０８；Ｌｅｖｉｔｔら、（１９８９）Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．６７、１１２５－１１３２）。このＡＰＴＩは、注入の時間からピーク圧力がベースラインあるいはプラトーに達するまでを積分した生じたピーク呼吸圧変化により評価する。このＡＰＴＩは気管抵抗に匹敵するが、このＡＰＴＩは気管支収縮の回復に関するさらなる要素を含んでいる。

【０１２８】

屠殺の前に、麻酔した動物における下大静脈の針穿刺によって、血清ＩｇＥの測定のために、全血を採取する。細胞を分離するためにサンプルを遠心分離し、血清を集め、総ＩｇＥレベルを測定するために用いる。すぐに測定しないサンプ

ルは、－２０℃で冷凍保存する。

【０１２９】

全てのＩｇＥ血清サンプルを、ＥＬＩＳＡ抗体サンドイッチアッセイを用いて測定する。マイクロタイタープレートを、アジ化ナトリウムを含む炭酸ナトリウム－重炭酸ナトリウム溶液のコーティング緩衝液中２．５μｇ/ｍｌの濃度の抗マウスＩｇＥ抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）で、1ウェルあたり５０μｌでコートする。プレートを、プラスチックラップでカバーし、４０℃で１６時間インキュベートする。プレートを、リン酸緩衝化生理食塩水中０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０で3回洗浄し、各洗浄につき5分間インキュベートする。非特異的な結合部位のブロッキングを、リン酸緩衝化生理食塩水中５％のウシ血清アルブミンを１ウェルあたり２００μｌ添加し、プラスチックラップで覆い、３７℃で2時間インキュベートすることによって、非特異的結合部位のブロッキングを達成する。洗浄緩衝液で3回洗浄した後、それぞれのウェルに２連の５０μｌ試験サンプルを添加する。洗浄緩衝液中５％のウシ血清アルブミンで１：１０、１：５０、１：１００に希釈した後、試験サンプルのアッセイする。この試験サンプルに加え、洗浄緩衝液中５％のウシ血清アルブミン中０．８ｎｇ/ｍｌ～２００ｎｇ/ｍｌの濃度の一連のＩｇＥスタンダード（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を、標準曲線を作るためにアッセイする。サンプルなしのブランクまたはスタンダードを使用して、プレートリーダーを0にする（バックグラウンド）。サンプルおよびスタンダードを加えた後、プラスチックラップでプレートを覆い、室温で2時間インキュベートする。洗浄緩衝液で3回洗浄した後、５０μｌの二次抗体、ラット抗マウスＩｇＥ－西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体を、洗浄緩衝液中５％のウシ血清アルブミン中２５０ｎｇ/ｍｌの濃度にて添加する。そのプレートに、プラスチックラップで蓋をし、室温で2時間インキュベートする。洗浄緩衝液で3回洗浄した後、０．１Ｍクエン酸緩衝液中０．５ｎｇ/ｍｌのｏ－フェニレンジアミン基質１００μｌをどのウェルにも添加する。１０分後、反応を、５０μｌの１２．５％硫酸で停止し、４９０ｎｍにおける吸光度をＭＲ５０００プレートリーダー（Ｄｙｎａｔｅｃｈ）で測定する。標準曲線を、スタンダードＩｇＥ濃度から作成し、抗原濃度をＸ軸（対数目盛）に、そして吸

光度をｙ軸（一様目盛）にとる。サンプル中のＩｇＥの濃度を、その標準曲線から内挿する。

【０１３０】

気管支肺胞洗浄および細胞分析を、以前に記載された方法（Ｋｌｅｅｂｅｒｇｅｒら、（１９９０）Am. Ｊ. Ｐｈｙｓｉｏｌ. ２５８、３１３－３２０）通りに実施する。肺を抽出した後、その肺の組織学的研究を行う。事前の器具使用が人工産物を導入し得るので、これらの研究には別の動物を使用する。従って、少数のグループの動物を、様々な前処理を受けたコホートとまったく同じように平行して処理するが、ただし、これらの動物は、気管支応答性試験以外の他の試験には用いない。気管支応答性試験の後、肺を取り出し、液体窒素に浸す。凍結切片化および組織学的な実験を、当業者に明らかな様式で実行する。

【０１３１】

マウスＴＨ２ＡＦ１経路をブロックするポリクローナル抗体を、感作されたマウスまたは感作されていないマウスにおいて、気管支応答性、血清ＩｇＥおよび気管支肺胞洗浄液に対するこの経路の機能をダウンレギュレートするため、およびこの経路の重要性を評価するために、治療的に用いる。抗体による前処理後、基礎の気管支反応性亢進、気管支肺胞洗浄液およびＩｇが一致するコントロールと比較した血清ＩｇＥレベルを、決定する。

【０１３２】

（実施例１０）

（喘息のマウスモデルにおけるＴＨ２ＡＦ１の役割－感作されたマウスの気管応答）

動物および操作は、本質的には実施例８に記載される通りである。鼻呼吸によるＡｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ抗原（１：１００希釈）の感作を、気管支反応性亢進、気管支肺胞洗浄液、および血清ＩｇＥに対する効果を評価するために行う。マウスに、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓまたは生理食塩水を鼻腔内に投与し（月、水、金曜日；三週間）、そして最後の投与の２４時間後に表現型を調べる。ＴＨ２ＡＦ１抗体による前処理の効果を使用して、マウスにおいてＴＨ２ＡＦ１をダウンレギュレートすることの効果を評価する。

【０１３３】

（実施例１１）

（抗マウスＩＬ－９抗体によるインビボにおけるＴＨ２ＡＦ１シグナル伝達のブロッキング）

動物および操作は、本質的に実施例８に記載のとおりである。Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ　ｆｕｍｉｇａｔｕｓ抗原（１：１００希釈）の経鼻呼吸による感作を、気管支反応性亢進、気管支肺胞洗浄液、および血清ＩｇＥに対する効果を評価するために行った。マウスに、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓまたは食塩水を鼻腔内に投与し（月、水、金曜日；三週間）、最後の投与から２４時間後に表現型を調べた。抗ＩＬ－９抗体による前処理の効果を用いて、マウスにおけるＴＨ２ＡＦ１のダウンレギュレーションの効果を評価した。これらの研究は、抗ＩＬ－９抗体による前処理が、マウス肺におけるＴＨ２ＡＦ１発現レベルをダウンレギュレートし得ることを示した（示さず）。

【０１３４】

（実施例１２）

（ＴＨ２ＡＦ１は分泌因子である）

ＴＨ2ＡＦ1が、ＸｅｎｏｐｕｓやＲｏａｃｈホモログの場合と同様に（Ｎｉｓｈｉｈａｒａら、（１９８６）Ｂｉｏｃｈｅｍ. ２５，６０１３－６０２０；およびＬｉｃａｓｔｒｏら、（１９９１）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ. ２３，１０１－１０５）、分泌性タンパクであるか否かを試験するために、全長マウスＴＨ2ＡＦ１　ｃＤＮＡの全コード領域を、ＣＭＶプロモーター、それに続くポリリンカークローニング部位およびポリアデニル化シグナルを含む、ｐｃＤＮＡ発現ベクターにクローニングした。このベクターはまた、ネオマイシン耐性遺伝子を含み、これにより、安定してトランスフェクトされた細胞の選択が可能である。ヒト胎児腎臓２９３（ＨＥＫ２９３）細胞を、製造業者のプロトコル（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）に示されるように、リポフェクタミンを用いてトランスフェクトした。何もトランスフェクトしていない細胞（偽（ｍｏｃｋ））、空のベクターをトランスフェクトした細胞、およびＴＨ２ＡＦ１発現ベクターでトランスフェクトした細胞を、Ｇ４１８を含む培地で２週間の間で選択した。Ｇ４１８耐性

細胞は、空のベクターおよびＴＨ２ＡＦ１発現ベクターでトランスフェクトした培養物中で増殖したが、トランスフェクトされていない細胞（偽（ｍｏｃｋ））においては増殖が見られなかった。次いで、実施例７に記載の抗血清を用いて、ＴＨ２ＡＦ１遺伝子発現について培養物を試験した。ＴＨ２ＡＦ１発現ベクターをトランスフェクトした細胞由来の馴化培地（ＣＭ）の分析は、空のベクターをトランスフェクトした細胞とは対照的に、これらの細胞由来のＣＭ中にタンパク質を見い出した（図９）。この図は、ＴＨ２ＡＦ１を安定に発現している２９３細胞（レーン１）または空のベクターを有する２９３細胞由来のＣＭのウエスタンブロットの結果を示す。矢印は、予想される分子量のバンドである。

【０１３５】

（実施例１３）

（ＴＨ２ＡＦ１はヒトリンパ球を活性化する）

Ｒｏａｃｈ卵母細胞由来のＴＨ２ＡＦ１ホモログは、ヒトリンパ球のマイトジェン活性を刺激し得る（Ｌｉｃａｓｔｒｏら、（１９９１）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２３、１０１－１０５；Ｋｏｍｉｙａら、（１９９８）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．２５１、７５９－７６２）。実施例１２に記載の空のベクターまたはＴＨ２ＡＦ１を発現している細胞由来のＣＭを用いて、ＴＨ２ＡＦ１が、ＸｅｎｏｐｕｓやＲｏａｃｈのホモログの場合と同様に（Ｎｉｓｈｉｈａｒａら、（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２５、６０１３－６０１６；Ｌｉｃａｓｔｒｏら、（１９９１）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２３、１０１－１０５）、ヒトＰＢＭＣを活性化し得るか否かを決定した。静脈穿刺により健常なボランティアから得た、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を用いた。末梢血を、リン酸緩衝化生理食塩水に１：４で希釈し、そして単核細胞を、以前に記載のように（Ｇｒａｓｓら、（１９９８） Ｊ． Ｂｉｏｌ． Ｃｈｅｍ． ２７３、２４０１６－２４０２４）、フィコールーハイパーク（ｆｉｃｏｌｌ－ｈｙｐａｑｕｅ）勾配上での遠心分離により単離した。次いで、細胞を、空のベクターまたはＴＨ２ＡＦ１をトランスフェクトした細胞由来の１０％（最終容量）のＣＭ（実施例１２を参照のこと）を補充したか、または補充していない増殖培地（ＲＰＭＩ－１６４０＋１０％非働化胎仔ウシ血清）の２４ウェルプレート中

に、１×１０^{5}細胞／ウェルでプレートし、そして培養物を、５％の血清中、３７℃で２４時間インキュベートした。図１０は、２９３－ＴＨ２ＡＦ１細胞由来のＣＭが、空のベクターまたは培地のみの存在下で増殖させた培養物とは対照的に、細胞凝集体（矢印で示される）によって示されるように、ＰＢＭＣ培養物の細胞活性化を生じたことを示す。これらのデータは、ＴＨ２ＡＦ１が、インビボで体液性応答に関与するリンパ球の活性化に関連する因子であることを示唆する（実施例６を参照のこと）。

【０１３６】

（実施例１４）

（ＴＨ２ＡＦ１の組換え産生およびヒトリンパ球に対する生物学的活性）

哺乳動物細胞によって産生された場合、ＴＨ２ＡＦ１は、マウスおよびヒトのリンパ球のマイトジェン活性を刺激し得る（実施例１３に示されるように）。ＴＨ２ＡＦ１の組換え産生はまた、ＰｉｃｈｉａやＥ．ｃｏｌｉのような他の組換え発現系を使用して達成され得る。このことを実証するために、全長マウスＴＨ２ＡＦ－１を、メタノール誘導性のｐＰＩＣ酵母発現ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にクローニングした。手短に言うと、このｃＤＮＡを、ＸｈｏＩ部位（この全長ｃＤＮＡのコドン１８に挿入されている）およびＸｂａＩ部位（天然の終始コドンの下流に位置する）を用いて、クローニングベクターから消化した。この挿入物を精製し、そしてｐＰＩＣベクターのＸｈｏＩ－ＸｂａＩ部位にクローニングした。このＸｈｏＩ部位は、酵母からの分泌のためのｐＰＩＣベクター内に含まれているα因子とのインフレームの融合を可能にする。次いで、この組換えベクターを、製造業者のプロトコル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に従い、Ｐｉｃｈｉａにトランスフェクトした。組換え酵母クローンを、実施例７に記載の抗血清を用いて、ＴＨ２ＡＦ１発現についてウエスタンブロットにより選択した。組換えクローンＡ１は、メタノール誘導下で分泌性ＴＨ２ＡＦ１を産生することが見い出された。このクローン由来の上清のアリコートを、メタノール誘導後の種々の時点で収集し、そして２５μｌのタンパク質サンプル緩衝液を添加し、１８％Ｔｒｉｓ－グリシン　ＳＤＳゲル（Ｎｏｖｅｘ）上での分析に供した。記載のように（Ｎｉｃｏｌａｉｄｅｓら、（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａ

ｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９４、１３１７５－１３１８０）、抗ＴＨ２ＡＦ１抗血清を用いて、ウエスタンブロットを行った。図１１に示される結果は、クローンＡ１由来の分泌性ＴＨ２ＡＦ１の産生、およびＴＨ２ＡＦ１の最大発現が、メタノール誘導後４８時間で生じることを実証する。次いで、４８時間メタノールで誘導した、このクローン由来の上清およびｐＰＩＣの空ベクターのみ由来の上清を用いて、マウス脾細胞のマイトジェン活性を測定した。手短に言うと、記載されるように（Ｎｉｃｏｌａｉｄｅｓら、（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９４、１３１７５－１３１８０）に、脾臓を、（Ｂ６Ｄ２）Ｆ１から取り出した。次いで、単離した脾臓細胞を洗浄し、１×１０^{5}細胞/ｍｌでプレートし、そして５μｇ/ｍｌのＰＨＡ、あるいはＴＨ２ＡＦ１または空ベクターを産生するＰｉｃｈｉａについての１０％馴化培地を補充した９６ウェルマイクロタイタープレートに、０．１ｍｌずつ分配した。図１２に示されるように、脾細胞は、ＴＨ２ＡＦ１の添加により活性化された。これらのデータは、機能的研究のために酵母ベクターから生物学的に活性なＴＨ２ＡＦ１を産生する能力、および抗血清生成のための試薬を産生する能力を実証する。

【０１３７】

（実施例１５）

（喘息におけるＴＨ２ＡＦ１の発現）

マウス喘息モデルにおいて、ＴＨ２ＡＦ１は、喘息様表現型と密接に関連しているようである。ＴＨ２ＡＦ１が、喘息であることが臨床的に診断された患者において生産されているか否かを決定するために、実施例７に記載の抗血清を用いて、喘息患者または喘息でない患者由来の気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）サンプルをスクリーニングした。実施例１２に示されるように、ＴＨ２ＡＦ１は、分泌性分子であり、ヒト肺細胞において産生される場合には、ＢＡＬ液（ＢＡＬＦ）中に分泌されるはずである。手短かに言うと、記載のように（Ｈｕｎｎｉｎｇｈａｋｅら、（１９７９）Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．９７、１４９－１６０）、軽度の段階の喘息を有することが臨床的に診断されたボランティア患者（ステロイド使用を行っていない）および正常固体を、局所麻酔し、そしてそれらの気道を、生理食塩水で洗浄した。次いで、回収したサンプルを２０００ＲＰＭで遠心分離

し、細片を除去した。タンパク分析のために、５０μｌのＢＡＬＦを、タンパク質サンプル緩衝液に再懸濁し、煮沸し、そして実施例１４に記載のように、サンプルをウエスタンブロッティングによって分析した。図１３は、代表的データを示し、ここで、喘息患者由来のＢＡＬＦは、喘息でない患者とは対照的に、気道において検出可能なレベルのＴＨ２ＡＦ１を有する。このデータは、ＴＨ２ＡＦ１が、ヒト喘息に関連し、それ故、この疾患をブロックするための薬学的標的を表し得ることを実証する。さらに、このデータは、ＴＨ２ＡＦ１が、低段階の喘息を同定するための診断マーカーとして作用し得ることを示唆する。

【０１３８】

本発明は、種々の科学的な材料、手段および例を参照して、本明細書中に記載および例示されたが、本発明は、その目的のために選択された材料および手段の特定の組み合わせに制限されないことが理解される。このような詳細の多くの変更は、当業者によって理解される程度に含まれ得る。本明細書および実施例は、先の特許請求の範囲に示されている本発明の実際の範囲および精神を有する単なる例示としてみなされることが意図される。本出願に参照される全ての参考文献、特許および特許出願は、それらの全体が参考として本明細書中に援用される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Dong, Qu
Levitt, Roy C.
Nicolaides, Nicholas
Zhou, Yuhong
Louahed, Jamila
Maloy, W. Lee
Magainin Pharmaceuticals, Inc.

<120> Asthma Associated Factors as Targets for Treating
Atopic Allergies Including Asthma and Related Disorders

<130> 36870-5078-WO

<140>
<141>

<150> US 60/132,138
<151> 1999-05-01

<150> US 09/325,571
<151> 1999-06-06

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 1104
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(1005)
<223> mTH2AF1 sequence from FVB & TG5 lung

<400> 1
gaaaggttcc tgtcattact cagctagcaa ctctcagctc ctgcctggtg cagagggaag 60

accacc atg acc caa ctg ggc ttc ctg ctg ttt atc atg gtt gcc acc 108
Met Thr Gln Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ile Met Val Ala Thr
1 5 10

aga ggg tgc agt gca gct gaa gag aac ctg aac acc aac aga tgg ggc 156
Arg Gly Cys Ser Ala Ala Glu Glu Asn Leu Asn Thr Asn Arg Trp Gly
15 20 25 30

aaa tat ttt ttt ttc tct ctg ccc aga agc tgc aag gaa atc aag cag 204
Lys Tyr Phe Phe Phe Ser Leu Pro Arg Ser Cys Lys Glu Ile Lys Gln
35 40 45

gag gac aca aag gca caa gat ggt ctc tat ttc ctg cgc acg gag aat 252
Glu Asp Thr Lys Ala Gln Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Glu Asn

```
                50                  55                  60

ggt gtc atc tac cag acc ttc tgt gac atg acc act gca ggt ggt ggc   300
Gly Val Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Thr Ala Gly Gly Gly
        65                  70                  75

tgg acc ctg gtg gct agt gtg cat gag aac aac atg cgt ggg aag tgc   348
Trp Thr Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asn Met Arg Gly Lys Cys
    80                  85                  90

act gtg ggt gat cgc tgg tcc agt cag caa ggc aac aga gct gac tac   396
Thr Val Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Asn Arg Ala Asp Tyr
95                  100                 105                 110

cca gag ggg gat ggc aac tgg gcc aac tac aac acc ttt ggg tct gca   444
Pro Glu Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala
                115                 120                 125

gag gct gcc aca agt gat gac tac aag aac cct ggc tac ttc gac atc   492
Glu Ala Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Ile
            130                 135                 140

cag gct gag aac ctg ggc atc tgg cat gtg ccc aac aaa agc ccc ctg   540
Gln Ala Glu Asn Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Lys Ser Pro Leu
        145                 150                 155

cac acc tgg agg aac agc tcc ctg ctg agg tac cgc acc ttc act ggc   588
His Thr Trp Arg Asn Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Phe Thr Gly
    160                 165                 170

ttc ctg cag cac ttg gga cat aac ctg ttt ggc ctc tac cag aag tac   636
Phe Leu Gln His Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Leu Tyr Gln Lys Tyr
175                 180                 185                 190

cca gtg aaa tac aac gaa gga aag tgt tgg act gac aat ggc cca gca   684
Pro Val Lys Tyr Asn Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Ala
                195                 200                 205

tta cct gtg gtc tat gac ttt ggt gat gct cag aag aca gcc tct tat   732
Leu Pro Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Gln Lys Thr Ala Ser Tyr
            210                 215                 220

tac tcc ccc tat ggc cag atg gaa ttc act gca gga tat gtt cag ttc   780
Tyr Ser Pro Tyr Gly Gln Met Glu Phe Thr Ala Gly Tyr Val Gln Phe
        225                 230                 235

aga gta ttt aat aat gag aga gca gcc agt gcc ttg tgt gct ggc atg   828
Arg Val Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Ser Ala Leu Cys Ala Gly Met
    240                 245                 250

aag gtc act gga tgt aat act gaa tat cac tgc atc ggt gga gga gga   876
Lys Val Thr Gly Cys Asn Thr Glu Tyr His Cys Ile Gly Gly Gly Gly
255                 260                 265                 270

ttc ttc cca gaa ggt aac ccc gtg cag tgt gga gac ttt gct gca ttt   924
Phe Phe Pro Glu Gly Asn Pro Val Gln Cys Gly Asp Phe Ala Ala Phe
```

```
                275                 280                 285

gat tgg aat gga tat gga act cac att tgg tac agc agt agc cgg gag   972
Asp Trp Asn Gly Tyr Gly Thr His Ile Trp Tyr Ser Ser Ser Arg Glu
            290                 295                 300

ata act gaa gca gct gtg ctt cta ttc tat cgc tgagaactct gcgggattgg 1025
Ile Thr Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
        305                 310

ccttgacttc tccattgtgg gctccaaggc atgagaaact ctgacttagt aactagaatg 1085

ctaatgagca ataaagcag                                              1104


<210> 2
<211> 313
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Met Thr Gln Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ile Met Val Ala Thr Arg Gly
  1               5                  10                  15

Cys Ser Ala Ala Glu Glu Asn Leu Asn Thr Asn Arg Trp Gly Lys Tyr
             20                  25                  30

Phe Phe Phe Ser Leu Pro Arg Ser Cys Lys Glu Ile Lys Gln Glu Asp
         35                  40                  45

Thr Lys Ala Gln Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Glu Asn Gly Val
     50                  55                  60

Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Thr Ala Gly Gly Gly Trp Thr
 65                  70                  75                  80

Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asn Met Arg Gly Lys Cys Thr Val
                 85                  90                  95

Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Asn Arg Ala Asp Tyr Pro Glu
            100                 105                 110

Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala Glu Ala
        115                 120                 125

Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Ile Gln Ala
    130                 135                 140

Glu Asn Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Lys Ser Pro Leu His Thr
145                 150                 155                 160

Trp Arg Asn Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Phe Thr Gly Phe Leu
                165                 170                 175

Gln His Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Leu Tyr Gln Lys Tyr Pro Val
            180                 185                 190
```

```
Lys Tyr Asn Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Ala Leu Pro
        195                 200                 205

Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Gln Lys Thr Ala Ser Tyr Tyr Ser
    210                 215                 220

Pro Tyr Gly Gln Met Glu Phe Thr Ala Gly Tyr Val Gln Phe Arg Val
225                 230                 235                 240

Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Ser Ala Leu Cys Ala Gly Met Lys Val
                245                 250                 255

Thr Gly Cys Asn Thr Glu Tyr His Cys Ile Gly Gly Gly Gly Phe Phe
            260                 265                 270

Pro Glu Gly Asn Pro Val Gln Cys Gly Asp Phe Ala Ala Phe Asp Trp
        275                 280                 285

Asn Gly Tyr Gly Thr His Ile Trp Tyr Ser Ser Ser Arg Glu Ile Thr
    290                 295                 300

Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
305                 310
```

<210> 3
<211> 1104
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(1005)
<223> mTH2AF1 sequence from FVB small intestine

<400> 3
gaaaggttcc tgtcattact cagctagcaa ctctcagctc ctgcctggtg cagagggaag 60

```
accacc atg acc caa ctg gga ttc ctg ctg ttt atc atg gtg gct acc    108
       Met Thr Gln Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ile Met Val Ala Thr
         1               5                  10

aga ggt tgc agt gca gct gaa gag aac ctg gac acc aac agg tgg ggc   156
Arg Gly Cys Ser Ala Ala Glu Glu Asn Leu Asp Thr Asn Arg Trp Gly
 15                  20                  25                  30

aat tct ttc ttt tcc tct ctg ccc aga agc tgc aag gaa atc aag cag   204
Asn Ser Phe Phe Ser Ser Leu Pro Arg Ser Cys Lys Glu Ile Lys Gln
                35                  40                  45

gag cac aca aag gca caa gat ggt ctc tat ttc ctg cgc acg aag aat   252
Glu His Thr Lys Ala Gln Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Lys Asn
            50                  55                  60

ggt gtc atc tac cag acc ttc tgt gac atg acc act gca ggt ggt ggc   300
```

```
Gly Val Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Thr Ala Gly Gly Gly
         65                  70                  75

tgg acc ctg gtg gct agt gtg cat gag aac aac atg cgt ggg aag tgc   348
Trp Thr Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asn Met Arg Gly Lys Cys
     80                  85                  90

act gtg ggt gat cga tgg tcc agt cag caa ggc aac aga gct gac tac   396
Thr Val Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Asn Arg Ala Asp Tyr
 95                 100                 105                 110

cca gag ggg gat ggc aac tgg gcc aac tac aac acc ttt ggg tct gca   444
Pro Glu Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala
                115                 120                 125

gag gct gcc aca agt gat gac tac aag aac cct ggc tac ttt gac atc   492
Glu Ala Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Ile
            130                 135                 140

cag gct gag aac ctg ggc atc tgg cat gtg ccc aac aaa agc ccc ctg   540
Gln Ala Glu Asn Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Lys Ser Pro Leu
        145                 150                 155

cac aac tgg agg aag agc tcc ctg ctg agg tac cgc acc ttc act ggc   588
His Asn Trp Arg Lys Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Phe Thr Gly
    160                 165                 170

ttc ctg cag cac ttg gga cat aat ctg ttt ggc ctc tac aag aag tac   636
Phe Leu Gln His Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Lys Tyr
175                 180                 185                 190

ccg gtg aaa tac gga gaa gga aag tgt tgg act gac aat ggt cca gca   684
Pro Val Lys Tyr Gly Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Ala
                195                 200                 205

tta cct gta gtc tat gac ttt ggt gat gct cgg aag aca gcc tct tat   732
Leu Pro Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Arg Lys Thr Ala Ser Tyr
            210                 215                 220

tac tcc ccc tct ggc cag agg gaa ttt act gca gga tat gtt cag ttc   780
Tyr Ser Pro Ser Gly Gln Arg Glu Phe Thr Ala Gly Tyr Val Gln Phe
        225                 230                 235

aga gtg ttt aat aat gag aga gcg gcc agt gcc ttg tgt gct ggc gtg   828
Arg Val Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Ser Ala Leu Cys Ala Gly Val
    240                 245                 250

agg gtc act gga tgt aat act gaa cat cac tgc atc ggt gga gga gga   876
Arg Val Thr Gly Cys Asn Thr Glu His His Cys Ile Gly Gly Gly Gly
255                 260                 265                 270

ttc ttc cca gaa ggt aac ccc gtg cag tgt gga gac ttt gct tca ttt   924
Phe Phe Pro Glu Gly Asn Pro Val Gln Cys Gly Asp Phe Ala Ser Phe
                275                 280                 285

gat tgg gat gga tat gga act cac aat ggg tac agc agt agc cgg aag   972
```

```
Asp Trp Asp Gly Tyr Gly Thr His Asn Gly Tyr Ser Ser Ser Arg Lys
            290                 295                 300

ata act gaa gca gcc gtg ctt ctg ttt tat cgc tgagaactct gcgggattgg 1025
Ile Thr Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
        305                 310

ccctgacttc tccattgtgg gctccaaggc atgagaaaca ctgacttagt aactgaaatg 1085

ctaatgagca ataaagcag                                              1104


<210> 4
<211> 313
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Met Thr Gln Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ile Met Val Ala Thr Arg Gly
  1               5                  10                  15

Cys Ser Ala Ala Glu Glu Asn Leu Asp Thr Asn Arg Trp Gly Asn Ser
             20                  25                  30

Phe Phe Ser Ser Leu Pro Arg Ser Cys Lys Glu Ile Lys Gln Glu His
         35                  40                  45

Thr Lys Ala Gln Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Lys Asn Gly Val
     50                  55                  60

Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Thr Ala Gly Gly Gly Trp Thr
 65                  70                  75                  80

Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asn Met Arg Gly Lys Cys Thr Val
                 85                  90                  95

Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Asn Arg Ala Asp Tyr Pro Glu
            100                 105                 110

Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala Glu Ala
        115                 120                 125

Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Ile Gln Ala
    130                 135                 140

Glu Asn Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Lys Ser Pro Leu His Asn
145                 150                 155                 160

Trp Arg Lys Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Phe Thr Gly Phe Leu
                165                 170                 175

Gln His Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Lys Tyr Pro Val
            180                 185                 190

Lys Tyr Gly Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Ala Leu Pro
        195                 200                 205
```

```
Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Arg Lys Thr Ala Ser Tyr Tyr Ser
    210                 215                 220

Pro Ser Gly Gln Arg Glu Phe Thr Ala Gly Tyr Val Gln Phe Arg Val
225                 230                 235                 240

Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Ser Ala Leu Cys Ala Gly Val Arg Val
                245                 250                 255

Thr Gly Cys Asn Thr Glu His His Cys Ile Gly Gly Gly Gly Phe Phe
            260                 265                 270

Pro Glu Gly Asn Pro Val Gln Cys Gly Asp Phe Ala Ser Phe Asp Trp
        275                 280                 285

Asp Gly Tyr Gly Thr His Asn Gly Tyr Ser Ser Ser Arg Lys Ile Thr
    290                 295                 300

Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
305                 310
```

<210> 5
<211> 1104
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(1005)
<223> mTHZAF1 sequence from TG5 transgenic mouse small intestine

<400> 5

```
gaaaggttcc tgtcattact cagctagcaa ctctcagctc ctgccctgtg cagagggaag 60

accacc atg acc caa ctg ggc ttc ctg ctg ttt atc atg gtt gcc acc    108
       Met Thr Gln Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ile Met Val Ala Thr
         1               5                  10

aga ggg tgc agt gca gct gaa aag aac ctg gac acc aac aga tgg ggc   156
Arg Gly Cys Ser Ala Ala Glu Lys Asn Leu Asp Thr Asn Arg Trp Gly
 15                  20                  25                  30

aat tct ttc ttt tcc tct ctg ccc aaa agc tgc aag gaa atc aag cag   204
Asn Ser Phe Phe Ser Ser Leu Pro Lys Ser Cys Lys Glu Ile Lys Gln
                35                  40                  45

gag gac aga aag gca caa gat ggt ctc tat ttc ctg cgc acg aag aat   252
Glu Asp Arg Lys Ala Gln Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Lys Asn
            50                  55                  60

ggt gtc atc tac cag acc ttc tgt gac atg acc act gca ggt ggt ggc   300
Gly Val Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Thr Ala Gly Gly Gly
        65                  70                  75
```

```
tgg acc ctg gtg gct agt gtg cac gag aac aac atg cac ggg aag tgc   348
Trp Thr Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asn Met His Gly Lys Cys
 80                  85                  90

act gtg ggc gat cgc tgg tcc agt cag caa ggc aac aga gct gat tac   396
Thr Val Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Asn Arg Ala Asp Tyr
 95                 100                 105                 110

cca gag ggg gat ggc aac tgg gcc aac tac aac acc ttt ggg tct gca   444
Pro Glu Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala
                115                 120                 125

gag ggt gcc aca agt gat gac tac aag aac cct ggc tac ttt gac atc   492
Glu Gly Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Ile
            130                 135                 140

cag gct gag aac ctg ggc atc tgg cat gtg ccc aac aac agc ccc ctg   540
Gln Ala Glu Asn Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Asn Ser Pro Leu
        145                 150                 155

cac aac tgg agg aac agc tcc ctg ctg agg tac cgc acc ttc act ggc   588
His Asn Trp Arg Asn Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Phe Thr Gly
    160                 165                 170

ttc ctg cag cgc ttg ggc cat aat ctg ttt ggt ctc tac cag aag tat   636
Phe Leu Gln Arg Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Leu Tyr Gln Lys Tyr
175                 180                 185                 190

ccg gtg aaa tat gga gaa gga aag tgt tgg act gac aat ggc cca gca   684
Pro Val Lys Tyr Gly Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Ala
                195                 200                 205

tta cct gtg gtc tat gac ttt ggt gat gct cag aag aca gcc tct tat   732
Leu Pro Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Gln Lys Thr Ala Ser Tyr
            210                 215                 220

tac tca ccc tct ggc cgg aat gaa ttc act gca gga tat gtt cag ttc   780
Tyr Ser Pro Ser Gly Arg Asn Glu Phe Thr Ala Gly Tyr Val Gln Phe
        225                 230                 235

aga gtg ttc aat aat gag aga gca gcc agt gcc ttg tgt gct ggc gtg   828
Arg Val Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Ser Ala Leu Cys Ala Gly Val
    240                 245                 250

agg gtc act gga tgt aat act gaa cat cac tgc atc ggt gga gga gga   876
Arg Val Thr Gly Cys Asn Thr Glu His His Cys Ile Gly Gly Gly Gly
255                 260                 265                 270

ttc ttc cca gaa ggt aac ccc gtg cag tgt gga gac ttt gcg tca ttt   924
Phe Phe Pro Glu Gly Asn Pro Val Gln Cys Gly Asp Phe Ala Ser Phe
                275                 280                 285

gat gcg aat gga tat gga act cac att tgg tac agc aat agc cgg gag   972
Asp Ala Asn Gly Tyr Gly Thr His Ile Trp Tyr Ser Asn Ser Arg Glu
            290                 295                 300
```

ata act gaa gca gct gtg ctt ctg ttt tat cgc tgagaactct gcgggattgg 1025
Ile Thr Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
305 310

ccctgacttc tccattgtgg gctccaaggc atgagaacca ctgacatagt aactaaaatg 1085

ctaatgagca ataaagcag 1104

<210> 6
<211> 313
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Met Thr Gln Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ile Met Val Ala Thr Arg Gly
1 5 10 15

Cys Ser Ala Ala Glu Lys Asn Leu Asp Thr Asn Arg Trp Gly Asn Ser
20 25 30

Phe Phe Ser Ser Leu Pro Lys Ser Cys Lys Glu Ile Lys Gln Glu Asp
35 40 45

Arg Lys Ala Gln Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Lys Asn Gly Val
50 55 60

Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Thr Ala Gly Gly Gly Trp Thr
65 70 75 80

Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asn Met His Gly Lys Cys Thr Val
85 90 95

Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Asn Arg Ala Asp Tyr Pro Glu
100 105 110

Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala Glu Gly
115 120 125

Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Ile Gln Ala
130 135 140

Glu Asn Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Asn Ser Pro Leu His Asn
145 150 155 160

Trp Arg Asn Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Phe Thr Gly Phe Leu
165 170 175

Gln Arg Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Leu Tyr Gln Lys Tyr Pro Val
180 185 190

Lys Tyr Gly Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Ala Leu Pro
195 200 205

Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Gln Lys Thr Ala Ser Tyr Tyr Ser
210 215 220

```
Pro Ser Gly Arg Asn Glu Phe Thr Ala Gly Tyr Val Gln Phe Arg Val
225                 230                 235                 240

Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Ser Ala Leu Cys Ala Gly Val Arg Val
                245                 250                 255

Thr Gly Cys Asn Thr Glu His His Cys Ile Gly Gly Gly Gly Phe Phe
            260                 265                 270

Pro Glu Gly Asn Pro Val Gln Cys Gly Asp Phe Ala Ser Phe Asp Ala
        275                 280                 285

Asn Gly Tyr Gly Thr His Ile Trp Tyr Ser Asn Ser Arg Glu Ile Thr
    290                 295                 300

Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
305                 310
```

<210> 7
<211> 1104
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(1005)
<223> mTH2AF1 sequence from DBA2 small intestine

<220>
<221> unsure
<222> (1080)
<223> n = a or c or g or t.

<400> 7

```
gaaaggttcc tgtcattact cagctagcaa ctctcagctc ctgcctggtg cagagggaag 60

accacc atg acc caa ctg gga ttc ctg ctg ttt atc atg gtg gct acc    108
       Met Thr Gln Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ile Met Val Ala Thr
         1               5                  10

aga ggt tgc agt gca gct gaa gag aac ctg gac acc aac agg tgg ggc   156
Arg Gly Cys Ser Ala Ala Glu Glu Asn Leu Asp Thr Asn Arg Trp Gly
 15                  20                  25                  30

aat tct ttc ttt tcc tct ctg ccc aga agc tgc aag gaa atc aag cag   204
Asn Ser Phe Phe Ser Ser Leu Pro Arg Ser Cys Lys Glu Ile Lys Gln
                35                  40                  45

gag cac aca aag gca caa gat ggt ctc tat ttc ctg cgc acg aag aat   252
Glu His Thr Lys Ala Gln Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Lys Asn
            50                  55                  60

ggt gtc atc tac cag acc ttc tgt gac atg acc act gca ggt ggt ggc   300
Gly Val Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Thr Ala Gly Gly Gly
```

```
        65                  70                  75

tgg acc ctg gtg gct agt gtg cat gag aac aac atg cgt ggg aag tgc   348
Trp Thr Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asn Met Arg Gly Lys Cys
     80                  85                  90

act gtg ggt gat cga tgg tcc agt cag caa ggc aac aga gct gac tac   396
Thr Val Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Asn Arg Ala Asp Tyr
 95                 100                 105                 110

cca gag ggg gat ggc aac tgg gcc aac tac aac acc ttt ggg tct gca   444
Pro Glu Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala
                115                 120                 125

gag gct gcc aca agt gat gac tac aag aac cct ggc tac ttt gac atc   492
Glu Ala Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Ile
            130                 135                 140

cag gct gag aac ctg ggc atc tgg cat gtg ccc aac aaa agc ccc ctg   540
Gln Ala Glu Asn Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Lys Ser Pro Leu
        145                 150                 155

cac aac tgg agg aag agc tcc ctg ctg agg tac cgc acc ttc act ggc   588
His Asn Trp Arg Lys Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Phe Thr Gly
    160                 165                 170

ttc ctg cag cac ttg gga cat aat ctg ttt ggc ctc tac aag aag tac   636
Phe Leu Gln His Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Lys Tyr
175                 180                 185                 190

ccg gtg aaa tac gga gaa gga aag tgt tgg act gac aat ggt cca gca   684
Pro Val Lys Tyr Gly Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Ala
                195                 200                 205

tta cct gta gtc tat gac ttt ggt gat gct cgg aag aca gcc tct tat   732
Leu Pro Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Arg Lys Thr Ala Ser Tyr
            210                 215                 220

tac tcc ccc tct ggc cag agg gaa ttt act gca gga tat gtt cag ttc   780
Tyr Ser Pro Ser Gly Gln Arg Glu Phe Thr Ala Gly Tyr Val Gln Phe
        225                 230                 235

aga gtg ttt aat aat gag aga gcg gcc agt gcc ttg tgt gct ggc gtg   828
Arg Val Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Ser Ala Leu Cys Ala Gly Val
    240                 245                 250

agg gtc act gga tgt aat act gaa cat cac tgc atc ggt gga gga gga   876
Arg Val Thr Gly Cys Asn Thr Glu His His Cys Ile Gly Gly Gly Gly
255                 260                 265                 270

ttc ttc cca gaa ggt aac ccc gtg cag tgt gga gac ttt gct tca ttt   924
Phe Phe Pro Glu Gly Asn Pro Val Gln Cys Gly Asp Phe Ala Ser Phe
                275                 280                 285

gat tgg gat gga tat gga act cac aat ggg tac agc agt agc cgg aag   972
Asp Trp Asp Gly Tyr Gly Thr His Asn Gly Tyr Ser Ser Ser Arg Lys
```

290 295 300

ata act gaa gca gcc gtg ctt ctg ttt tat cgc tgagaactct gcgggattgg 1025
Ile Thr Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
305 310

ccctgacttc tccattgtgg gctccaaggc atgagaaaca ctgacttagt aactngaatg 1085

ctaatgagca ataaagcag 1104

<210> 8
<211> 313
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8
Met Thr Gln Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ile Met Val Ala Thr Arg Gly
1 5 10 15

Cys Ser Ala Ala Glu Glu Asn Leu Asp Thr Asn Arg Trp Gly Asn Ser
20 25 30

Phe Phe Ser Ser Leu Pro Arg Ser Cys Lys Glu Ile Lys Gln Glu His
35 40 45

Thr Lys Ala Gln Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Lys Asn Gly Val
50 55 60

Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Thr Ala Gly Gly Gly Trp Thr
65 70 75 80

Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asn Met Arg Gly Lys Cys Thr Val
85 90 95

Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Asn Arg Ala Asp Tyr Pro Glu
100 105 110

Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala Glu Ala
115 120 125

Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Ile Gln Ala
130 135 140

Glu Asn Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Lys Ser Pro Leu His Asn
145 150 155 160

Trp Arg Lys Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Phe Thr Gly Phe Leu
165 170 175

Gln His Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Lys Tyr Pro Val
180 185 190

Lys Tyr Gly Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Ala Leu Pro
195 200 205

```
Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Arg Lys Thr Ala Ser Tyr Tyr Ser
    210                 215                 220

Pro Ser Gly Gln Arg Glu Phe Thr Ala Gly Tyr Val Gln Phe Arg Val
225                 230                 235                 240

Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Ser Ala Leu Cys Ala Gly Val Arg Val
                245                 250                 255

Thr Gly Cys Asn Thr Glu His His Cys Ile Gly Gly Gly Gly Phe Phe
            260                 265                 270

Pro Glu Gly Asn Pro Val Gln Cys Gly Asp Phe Ala Ser Phe Asp Trp
        275                 280                 285

Asp Gly Tyr Gly Thr His Asn Gly Tyr Ser Ser Ser Arg Lys Ile Thr
    290                 295                 300

Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
305                 310
```

<210> 9
<211> 1104
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(1005)
<223> mTH2AF1 sequence from C57BL/6 small intestine

<220>
<221> unsure
<222> (1081)
<223> r = a or g.

<400> 9
gaaaggttcc tgtcattact cagctagcaa ctctcagctc ctgcctggtg cagagggaag 60

```
accacc atg acc caa ctg gga ttc ctg ctg ttt atc atg gtt gct acc    108
       Met Thr Gln Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ile Met Val Ala Thr
         1               5                  10

aga ggt tgc agt gca gct gaa gag aac ctg gac acc aac agg tgg ggc   156
Arg Gly Cys Ser Ala Ala Glu Glu Asn Leu Asp Thr Asn Arg Trp Gly
 15                  20                  25                  30

aat tct ttc ttt tcc tct ctg ccc aga agc tgc aag gaa atc aag cag   204
Asn Ser Phe Phe Ser Ser Leu Pro Arg Ser Cys Lys Glu Ile Lys Gln
                 35                  40                  45

gag cac aca aag gca caa gat ggt ctc tat ttc ctg cgc acg aag aat   252
Glu His Thr Lys Ala Gln Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Lys Asn
             50                  55                  60
```

```
ggt gtc atc tac cag acc ttc tgt gac atg acc act gca ggt ggt ggc   300
Gly Val Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Thr Ala Gly Gly Gly
         65                  70                  75

tgg acc ctg gtg gct agt gtg cat gag aac aac atg cgt ggg aag tgc   348
Trp Thr Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asn Met Arg Gly Lys Cys
     80                  85                  90

act gtg ggt gat cgc tgg tcc agt cag caa ggc aac aga gct gac tac   396
Thr Val Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Asn Arg Ala Asp Tyr
 95                 100                 105                 110

cca gag ggg gat ggc aac tgg gcc aac tac aac acc ttt ggg tct gca   444
Pro Glu Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala
                115                 120                 125

gag gct gcc aca agt gat gac tac aag aac cct ggc tac ttt gac atc   492
Glu Ala Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Ile
            130                 135                 140

cag gct gag aac ctg ggc atc tgg cac gtg ccc aac aaa agc ccc ctg   540
Gln Ala Glu Asn Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Lys Ser Pro Leu
        145                 150                 155

cac aac tgg agg aag agc tcc ctg ctg agg tac cgc acc ttc act ggc   588
His Asn Trp Arg Lys Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Phe Thr Gly
    160                 165                 170

ttc ctg cag cac ttg gga cat aat ctg ttt ggc ctc tac aag aag tac   636
Phe Leu Gln His Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Lys Tyr
175                 180                 185                 190

cca gtg aaa tac gga gaa gga aag tgt tgg act gac aat ggc cca gca   684
Pro Val Lys Tyr Gly Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Ala
                195                 200                 205

tta cct gtg gtc tat gac ttt ggt gat gct cgg aag aca gcc tct tat   732
Leu Pro Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Arg Lys Thr Ala Ser Tyr
            210                 215                 220

tac tcc ccc tct ggc cag agg gaa ttt act gca gga tat gtt cag ttc   780
Tyr Ser Pro Ser Gly Gln Arg Glu Phe Thr Ala Gly Tyr Val Gln Phe
        225                 230                 235

aga gtg ttt aat aat gag aga gcg gcc agt gcc ttg tgt gct ggc gtg   828
Arg Val Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Ser Ala Leu Cys Ala Gly Val
    240                 245                 250

agg gtc act gga tgt aat act gaa cat cac tgc atc ggt gga gga gga   876
Arg Val Thr Gly Cys Asn Thr Glu His His Cys Ile Gly Gly Gly Gly
255                 260                 265                 270

ttc ttc cca gaa ggt aac ccc gtg cag tgt gga gac ttt gcg tca ttt   924
Phe Phe Pro Glu Gly Asn Pro Val Gln Cys Gly Asp Phe Ala Ser Phe
                275                 280                 285
```

```
gat tgg gat gga tat gga act cac aat ggg tac agc agt agc cgg aag   972
Asp Trp Asp Gly Tyr Gly Thr His Asn Gly Tyr Ser Ser Ser Arg Lys
            290                 295                 300

ata act gaa gca gct gtg ctt ctg ttt tat cgc tgagaactct gcgggattgg 1025
Ile Thr Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
        305                 310

ccctgacttc tccattgtgg gctccaaggc atgagaaaca ctgacttagt aactgraatg 1085

ctaatgagca ataaagcag                                              1104
```

<210> 10
<211> 313
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10

```
Met Thr Gln Leu Gly Phe Leu Leu Phe Ile Met Val Ala Thr Arg Gly
  1               5                  10                  15

Cys Ser Ala Ala Glu Glu Asn Leu Asp Thr Asn Arg Trp Gly Asn Ser
             20                  25                  30

Phe Phe Ser Ser Leu Pro Arg Ser Cys Lys Glu Ile Lys Gln Glu His
         35                  40                  45

Thr Lys Ala Gln Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Lys Asn Gly Val
     50                  55                  60

Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Thr Ala Gly Gly Gly Trp Thr
 65                  70                  75                  80

Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asn Met Arg Gly Lys Cys Thr Val
                 85                  90                  95

Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Asn Arg Ala Asp Tyr Pro Glu
            100                 105                 110

Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala Glu Ala
        115                 120                 125

Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Phe Asp Ile Gln Ala
    130                 135                 140

Glu Asn Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Lys Ser Pro Leu His Asn
145                 150                 155                 160

Trp Arg Lys Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Phe Thr Gly Phe Leu
                165                 170                 175

Gln His Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Lys Tyr Pro Val
            180                 185                 190

Lys Tyr Gly Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Ala Leu Pro
```

```
        195                 200                 205

Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Arg Lys Thr Ala Ser Tyr Tyr Ser
    210                 215                 220

Pro Ser Gly Gln Arg Glu Phe Thr Ala Gly Tyr Val Gln Phe Arg Val
225                 230                 235                 240

Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Ser Ala Leu Cys Ala Gly Val Arg Val
                245                 250                 255

Thr Gly Cys Asn Thr Glu His His Cys Ile Gly Gly Gly Gly Phe Phe
            260                 265                 270

Pro Glu Gly Asn Pro Val Gln Cys Gly Asp Phe Ala Ser Phe Asp Trp
        275                 280                 285

Asp Gly Tyr Gly Thr His Asn Gly Tyr Ser Ser Ser Arg Lys Ile Thr
    290                 295                 300

Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
305                 310
```

<210> 11
<211> 1092
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (104)..(1042)
<223> hTH2AF1 sequence from A549 human cell line

<400> 11
tgaaaasctg cactctgttg agctccaggg cgcagtggag ggagggagtg aaggagctct 60

```
ctgtacccaa ggaaagtgca gctgagactc agacaagatt aca atg aac caa ctc   115
                                                 Met Asn Gln Leu
                                                   1

agc ttc ctg ctg ttt ctc ata gcg acc acc aga gga tgg agt aca gat   163
Ser Phe Leu Leu Phe Leu Ile Ala Thr Thr Arg Gly Trp Ser Thr Asp
  5                  10                  15                  20

gag gct aat act tac ttc aag gaa tgg acc tgt tct tcg tct cca tct   211
Glu Ala Asn Thr Tyr Phe Lys Glu Trp Thr Cys Ser Ser Ser Pro Ser
                25                  30                  35

ctg ccc aga agc tgc aag gaa atc aaa gac gaa tgt cct agt gca ttt   259
Leu Pro Arg Ser Cys Lys Glu Ile Lys Asp Glu Cys Pro Ser Ala Phe
            40                  45                  50

gat ggc ctg tat ttt ctc cgc act gag aat ggt gtt atc tac cag acc   307
Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Glu Asn Gly Val Ile Tyr Gln Thr
```

```
        55                  60                  65

ttc tgt gac atg acc tct ggg ggt ggc ggc tgg acc ctg gtg gcc agc   355
Phe Cys Asp Met Thr Ser Gly Gly Gly Gly Trp Thr Leu Val Ala Ser
     70                  75                  80

gtg cat gag aat gac atg cgt ggg aag tgc acg gtg ggc gat cgc tgg   403
Val His Glu Asn Asp Met Arg Gly Lys Cys Thr Val Gly Asp Arg Trp
 85                  90                  95                  100

tcc agt cag cag ggc agc aaa gca gac tac cca gag ggg gac ggc aac   451
Ser Ser Gln Gln Gly Ser Lys Ala Asp Tyr Pro Glu Gly Asp Gly Asn
                105                 110                 115

tgg gcc aac tac aac acc ttt gga tct gca gag gcg gcc acg agc gat   499
Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala Glu Ala Ala Thr Ser Asp
            120                 125                 130

gac tac aag aac cct ggc tac tac gac atc cag gcc aag gac ctg ggc   547
Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Tyr Asp Ile Gln Ala Lys Asp Leu Gly
        135                 140                 145

atc tgg cac gtg ccc aat aag tcc ccc atg cag cac tgg aga aac agc   595
Ile Trp His Val Pro Asn Lys Ser Pro Met Gln His Trp Arg Asn Ser
    150                 155                 160

tcc ctg ctg agg tac cgc acg gac act ggc ttc ctc cag aca ctg gga   643
Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Asp Thr Gly Phe Leu Gln Thr Leu Gly
165                 170                 175                 180

cat aat ctg ttt ggc atc tac cag aaa tat cca gtg aaa tat gga gaa   691
His Asn Leu Phe Gly Ile Tyr Gln Lys Tyr Pro Val Lys Tyr Gly Glu
                185                 190                 195

gga aag tgt tgg act gac aac ggc ccg gtg atc cct gtg gtc tat gat   739
Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Val Ile Pro Val Val Tyr Asp
            200                 205                 210

ttt ggc gac gcc cag aaa aca gca tct tat tac tca ccc tat ggc cag   787
Phe Gly Asp Ala Gln Lys Thr Ala Ser Tyr Tyr Ser Pro Tyr Gly Gln
        215                 220                 225

cgg gaa ttc act gcg gga ttt gtt cag ttc agg gta ttt aat aac gag   835
Arg Glu Phe Thr Ala Gly Phe Val Gln Phe Arg Val Phe Asn Asn Glu
    230                 235                 240

aga gca gcc aac gcc ttg tgt gct gga atg agg gtc acc gga tgt aac   883
Arg Ala Ala Asn Ala Leu Cys Ala Gly Met Arg Val Thr Gly Cys Asn
245                 250                 255                 260

act gag cac cac tgc att ggt gga gga gga tac ttt cca gag gcc agt   931
Thr Glu His His Cys Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Phe Pro Glu Ala Ser
                265                 270                 275

ccc cag cag tgt gga gat ttt tct ggt ttt gat tgg agt gga tat gga   979*
Pro Gln Gln Cys Gly Asp Phe Ser Gly Phe Asp Trp Ser Gly Tyr Gly
```

```
          280                 285                 290

act cat gtt ggt tac agc agc agc cgt gag ata act gag gca gct gtg   1027
Thr His Val Gly Tyr Ser Ser Ser Arg Glu Ile Thr Glu Ala Ala Val
        295                 300                 305

ctt cta ttc tat cgt tgagagtttt gtgggaggga acccagacct ctcctcccaa   1082
Leu Leu Phe Tyr Arg
    310

ccatgagatc                                                        1092


<210> 12
<211> 313
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Met Asn Gln Leu Ser Phe Leu Leu Phe Leu Ile Ala Thr Thr Arg Gly
  1               5                  10                  15

Trp Ser Thr Asp Glu Ala Asn Thr Tyr Phe Lys Glu Trp Thr Cys Ser
             20                  25                  30

Ser Ser Pro Ser Leu Pro Arg Ser Cys Lys Glu Ile Lys Asp Glu Cys
         35                  40                  45

Pro Ser Ala Phe Asp Gly Leu Tyr Phe Leu Arg Thr Glu Asn Gly Val
     50                  55                  60

Ile Tyr Gln Thr Phe Cys Asp Met Thr Ser Gly Gly Gly Gly Trp Thr
 65                  70                  75                  80

Leu Val Ala Ser Val His Glu Asn Asp Met Arg Gly Lys Cys Thr Val
                 85                  90                  95

Gly Asp Arg Trp Ser Ser Gln Gln Gly Ser Lys Ala Asp Tyr Pro Glu
            100                 105                 110

Gly Asp Gly Asn Trp Ala Asn Tyr Asn Thr Phe Gly Ser Ala Glu Ala
        115                 120                 125

Ala Thr Ser Asp Asp Tyr Lys Asn Pro Gly Tyr Tyr Asp Ile Gln Ala
    130                 135                 140

Lys Asp Leu Gly Ile Trp His Val Pro Asn Lys Ser Pro Met Gln His
145                 150                 155                 160

Trp Arg Asn Ser Ser Leu Leu Arg Tyr Arg Thr Asp Thr Gly Phe Leu
                165                 170                 175

Gln Thr Leu Gly His Asn Leu Phe Gly Ile Tyr Gln Lys Tyr Pro Val
            180                 185                 190

Lys Tyr Gly Glu Gly Lys Cys Trp Thr Asp Asn Gly Pro Val Ile Pro
```

```
        195                 200                 205

Val Val Tyr Asp Phe Gly Asp Ala Gln Lys Thr Ala Ser Tyr Tyr Ser
    210                 215                 220

Pro Tyr Gly Gln Arg Glu Phe Thr Ala Gly Phe Val Gln Phe Arg Val
225                 230                 235                 240

Phe Asn Asn Glu Arg Ala Ala Asn Ala Leu Cys Ala Gly Met Arg Val
                245                 250                 255

Thr Gly Cys Asn Thr Glu His His Cys Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Phe
            260                 265                 270

Pro Glu Ala Ser Pro Gln Gln Cys Gly Asp Phe Ser Gly Phe Asp Trp
        275                 280                 285

Ser Gly Tyr Gly Thr His Val Gly Tyr Ser Ser Ser Arg Glu Ile Thr
    290                 295                 300

Glu Ala Ala Val Leu Leu Phe Tyr Arg
305                 310
```

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR antisense primer mLectin7

<400> 13
gggttcttgt agtcatcact tgtggcag 28

<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR antisense primer mLectin9

<400> 14
tgcagaccca aaggtgttgt agttggc 27

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR antisense primer mLectin10

<400> 15
ctgccacaag tgatgactac aagaaccc 28

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR antisense primer mLectin8

<400> 16
cgtgcagtgt ggagactttg ctgca 25

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR sense primer mLectin20

<400> 17
gaaaggttcc tgtcattact cagc 24

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR antisense primer mLectin23

<400> 18
ctgctttatt gctcattagc attc 24

<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR antisense primer hLectin7

<400> 19
agggttcttg tagtcatcgc tcgtgg 26

<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR antisense primer hLectin9

<400> 20
agatccaaag gtgttgtagt tggccc 26

<210> 21
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR antisense primer hLectin2

<400> 21
gctctagatc tcatggttgg gaggaggg 28

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR sense primer hLectin16

<400> 22
gaaagctgca ctctgttgag c 21

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: PCR sense primer hLectin18

<400> 23
gcagctgaga ctcagacaag 20

<210> 24
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Mouse sense
PCR primer

<400> 24
ggatcctaat acgactcact atagggagac caccatggca gctgaagaga acctg 55

<210> 25
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Mouse
antisense PCR primer

<400> 25
ggtccttatc acttgtcatc gtcgtccttg tagtcgcgat agaatagaag c 51

<210> 26
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Human sense
PCR primer

<400> 26
ggatcctaat acgactcact atagggagac caccatgagt acagatgagg ctaatactta 60
c 61

<210> 27
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Human
antisense PCR primer

<400> 27
ggatccttat cacttgtcat cgtcgtcctt gtagtcacga tagaatagaa gcacagc 57

【図面の簡単な説明】

【図１】

図１は、抑制性ＰＣＲ　ｃＤＮＡ差引き技術の模式図である。

【図２】

図２は、ＴＧ５の腸（ＴＨ２ＡＦ１．ｃ）、ＦＶＢの小腸（ＴＨ２ＡＦ１．ｓ）、ならびにＴＧ５およびＦＶＢの肺（ＴＨ２ＡＦ１．１）に由来するマウスのＴＨ２ＡＦ１イソ型のアラインメントである。

【図３】

図３は、ＩＬ－９トランスジェニックマウス（ＴＧ５）と比較した正常マウス（ＦＶＢ）の肺でのＴＨ２ＡＦ１の発現である。ＧＡＤＰＨは、内部コントロールとして使用される

【図４】

図４は、ＤＢＡ（Ｍ）マウスおよびＣ５７ＢＬ／６（Ｂ６）マウスの肺中のＴＨ２ＡＦ１の発現である。ＲＮＡのローディングは下段のパネルに示される。

【図５】

図５は、組換えサイトカインの気管内投与を伴うかまたはそれを伴わないＣ５７ＢＬ／６マウスの肺中のＴＨ２ＡＦ１の発現である。ＲＮＡローディングは、下段のパネルに示される。

【図６】

図６は、抗原に暴露されたＴＧ５（Ｔ）およびＦＶＢ（Ｆ）マウスの肺中のＴＨ２ＡＦ１の発現である。

【図７】

図７は、マウスおよびヒトの両方のＴＨ２ＡＦ１タンパク質を検出し得る抗体の産生を示す。抗ＴＨ２ＡＦ１（６８７３ａおよび６８７４ａ）はマウスおよびヒトのＦｌａｇタグ化タンパク質を認識する。ＴＮＦパネルは、インビトロでの翻訳反応による出発物質を示す。ＩｇＧパネルは、ウサギの予備免疫抗血清を使用する免疫沈降（ＩＰ）を示す。Ｆｌａｇパネルは、Ｆｌａｇタグ化ＴＨ２ＡＦ１タンパク質のＩＰを示す。パネル６８７３および６８７４は、抗ＴＨ２ＡＦ１抗血清を用いるＴＨ２ＡＦ１タンパク質のＩＰを示す。レーン１：プログラムされていない溶解物；レーン２：マウスのＴＨ２ＡＦ１－Ｆｌａｇ鋳型を用いてプログラムされた溶解物；レーン３：ヒトのＴＨ２ＡＦ１－Ｆｌａｇ鋳型を用いてプログラムされた溶解物；レーン４：ネガティブコントロールとしてのヒトのＩＬ－９レセプターを用いてプログラムされた溶解物。

【図８】

図８は、気道の炎症の抗原モデルにおける低分子量の分子によるＴＨ２ＡＦ１のダウンレギュレーションの図である。ＧＡＤＰＨは、内部コントロールとして使用される。

【図９】

図９は、ウェスタンブロットによるＴＨ２ＡＦ１タンパク質の分泌を示す。

【図１０】

図１０は、ＴＨ２ＡＦが、インビトロでヒトのリンパ球を活性化し得ることを示す。

【図１１】

図１１は、酵母細胞中でのＴＨ２ＡＦ１の組換え産生を示す。

【図１２】

図１２は、組換えＴＨ２ＡＦ１がヒトの初代リンパ球に対して有糸分裂促進活性を有すること示す。脾臓細胞は、ＰＨＡまたはＴＨ２ＡＦ１の有り無しで配置され、そして４８時間増殖させられる。リンパ球の活性化は、細胞性の凝集（矢印）の数によって決定された。

【図１３】

図１３は、喘息患者の肺において見出されたＴＨ２ＡＦ１を示す。

【図１】

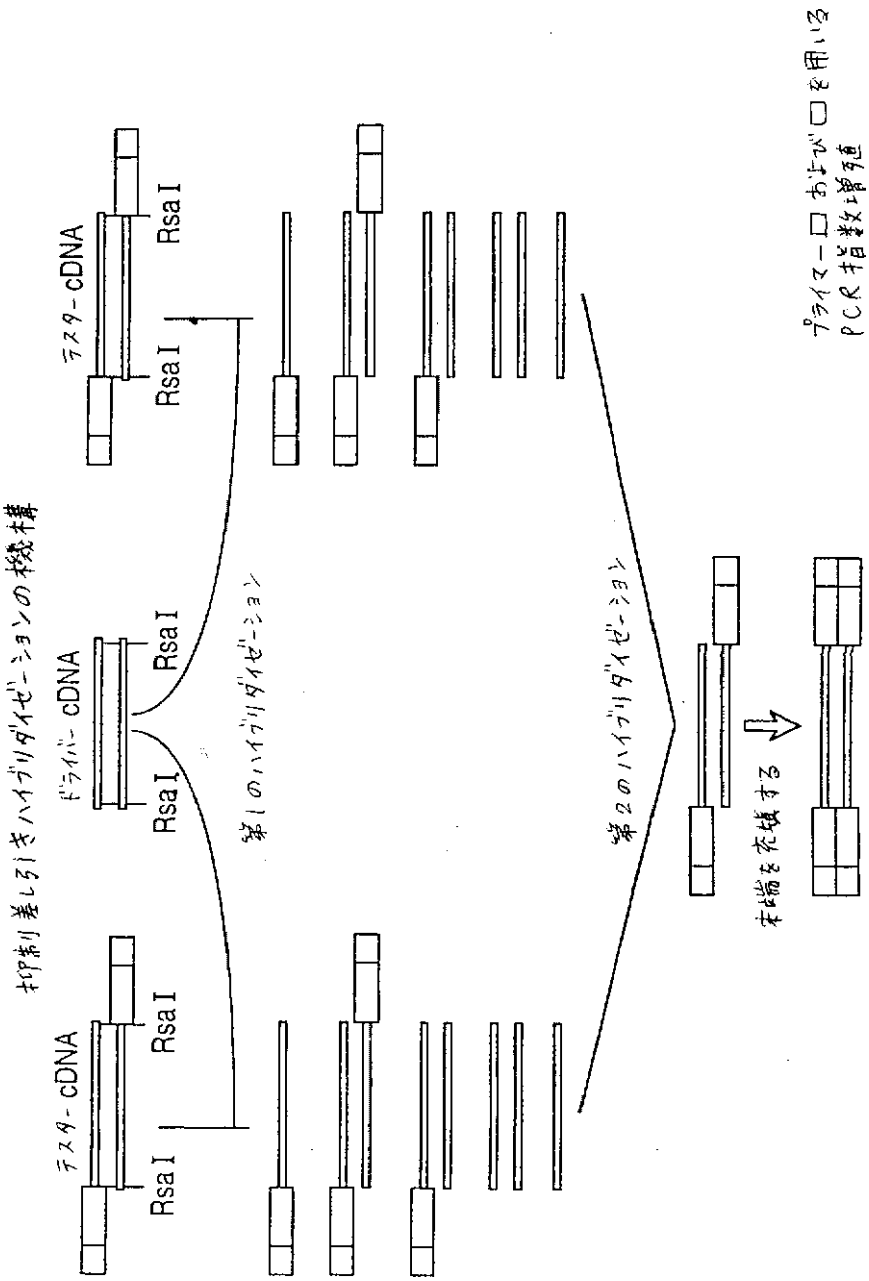


図 1
抑制差しひきハイブリダイゼーションの機構
テスター cDNA
ドライバー cDNA
Rsa I
第1のハイブリダイゼーション
第2のハイブリダイゼーション
末端を充填する
プライマーDおよびDを用いる
PCR指数増幅

【図２】

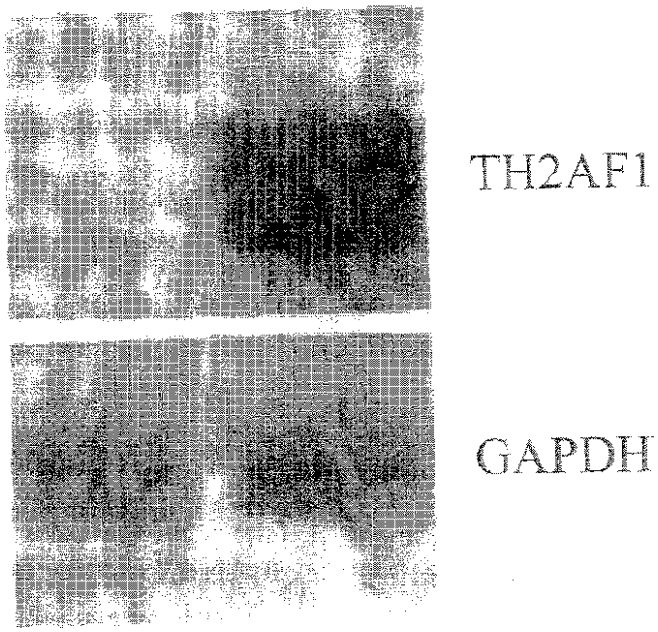
図 2

Clustal W 形式のアライメント

```
                10        20        30        40        50        60        70
TH2AF1.1  MTQLGFLLFIMVATRGCSAAEENLNTNRWGKYFFFSLPRSCKEIKQEDTKAQDGLYFLRTENGVIYQTFC
TH2AF1.s  MTQLGFLLFIMVATRGCSAAEENLDTNRWGNSFFSSLPRSCKEIKQEHTKAQDGLYFLRTKNGVIYQTFC
TH2AF1.c  MTQLGFLLFIMVATRGCSAAEKNLDTNRWGNSFFSSLPKSCKEIKQEDRKAQDGLYFLRTKNGVIYQTFC
          ********************** ** *****  ** ***:********  ********** **********

                80        90        100       110       120       130       140
TH2AF1.1  DMTTAGGGWTLVASVHENNMRGKCTVGDRWSSQQGNRADYPEGDGNWANYNTFGSAEAATSDDYKNPGYF
TH2AF1.s  DMTTAGGGWTLVASVHENNMRGKCTVGDRWSSQQGNRADYPEGDGNWANYNTFGSAEAATSDDYKNPGYF
TH2AF1.c  DMTTAGGGWTLVASVHENNMHGKCTVGDRWSSQQGNRADYPEGDGNWANYNTFGSAEGATSDDYKNPGYF
          **********************:********************************** ************

                150       160       170       180       190       200       210
TH2AF1.1  DIQAENLGIWHVPNKSPLHTWRNSSLLRYRTFTGFLQHLGHNLFGLYQKYPVKYNEGKCWTDNGPALPVV
TH2AF1.s  DIQAENLGIWHVPNKSPLHNWRKSSLLRYRTFTGFLQHLGHNLFGLYKKYPVKYGEGKCWTDNGPALPVV
TH2AF1.c  DIQAENLGIWHVPNNSPLHNWRNSSLLRYRTFTGFLQRLGHNLFGLYQKYPVKYGEGKCWTDNGPALPVV
          ********************:********** ****:** **********************:*******:**********

                220       230       240       250       260       270       280
TH2AF1.1  YDFGDAQKTASYYSPYGQMEFTAGYVQFRVFNNERAASALCAGMKVTGCNTEYHCIGGGGFFPEGNPVQC
TH2AF1.s  YDFGDARKTASYYSPSGQREFTAGYVQFRVFNNERAASALCAGVRVTGCNTEHHCIGGGGFFPEGNPVQC
TH2AF1.c  YDFGDAQKTASYYSPSGRNEFTAGYVQFRVFNNERAASALCAGVRVTGCNTEHHCIGGGGFFPEGNPVQC
          *******:********* *: ********************************:;******** ********************

                290       300       310
TH2AF1.1  GDFAAFDWNGYGTHIWYSSSREITEAAVLLFYR
TH2AF1.s  GDFASFDWDGYGTHNGYSSSRKITEAAVLLFYR
TH2AF1.c  GDFASFDANGYGTHIWYSNSREITEAAVLLFYR
          ****;**  *****  ** ** **********
```

【図３】

FIG. 3



【図４】

FIG. 4

【図５】

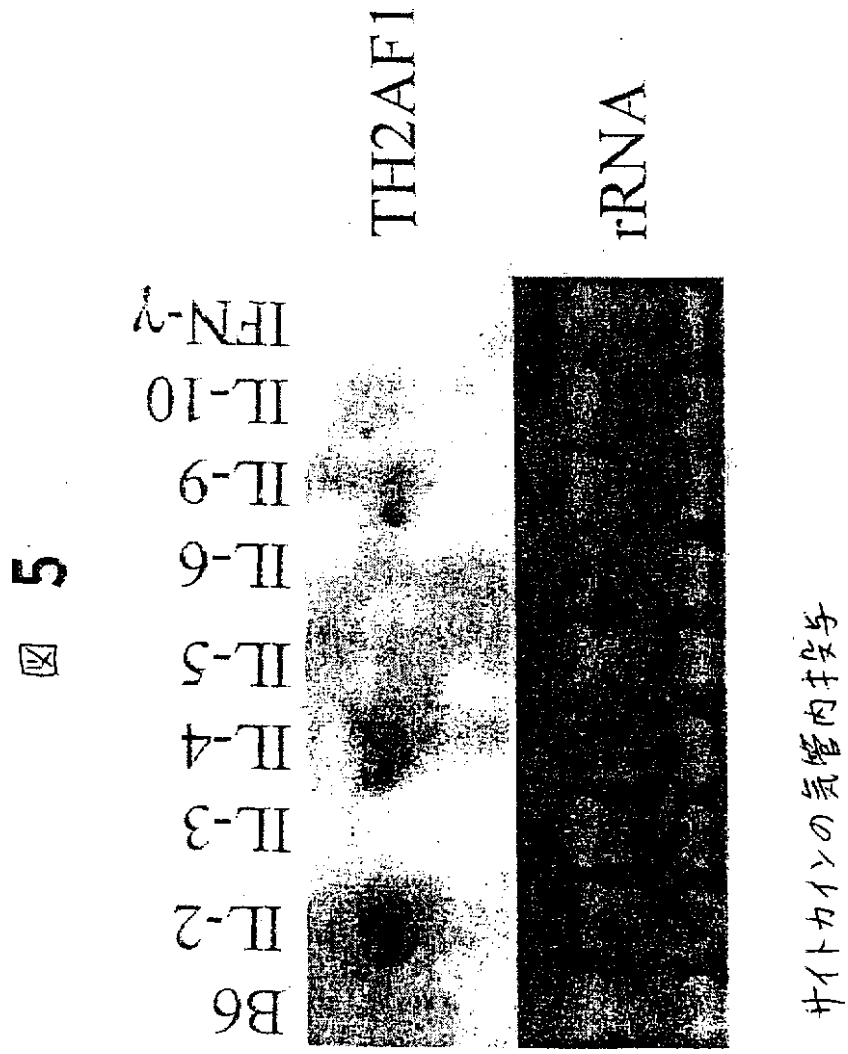
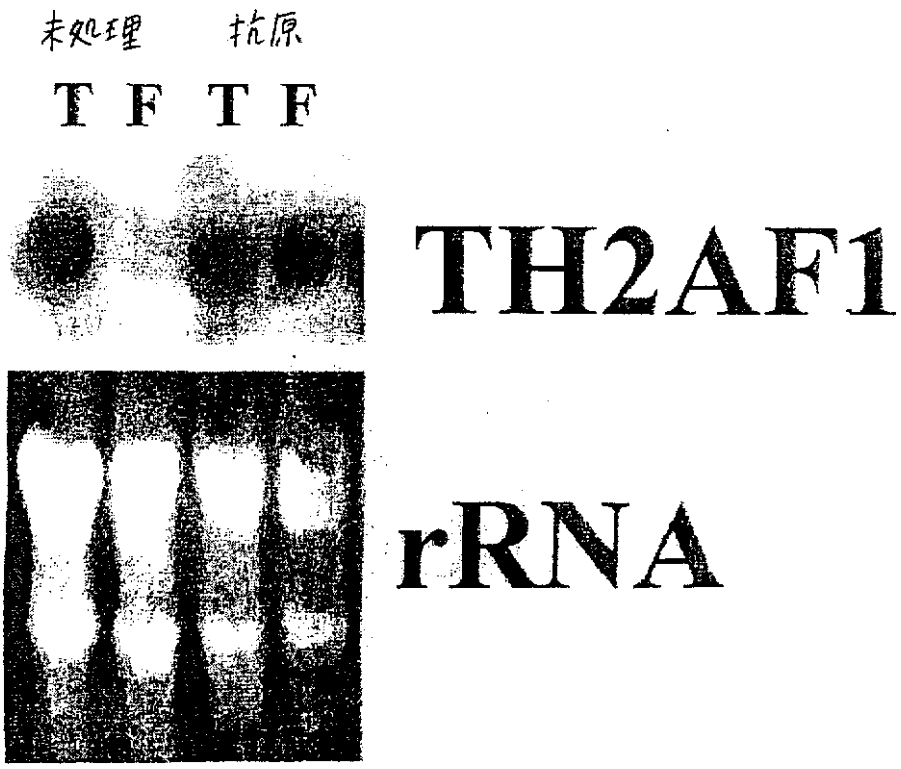


図 5
TH2AF1
rRNA
B6
IL-2
IL-3
IL-4
IL-5
IL-6
IL-9
IL-10
IFN-γ
サイトカインの気管内投与

【図６】



【図７】

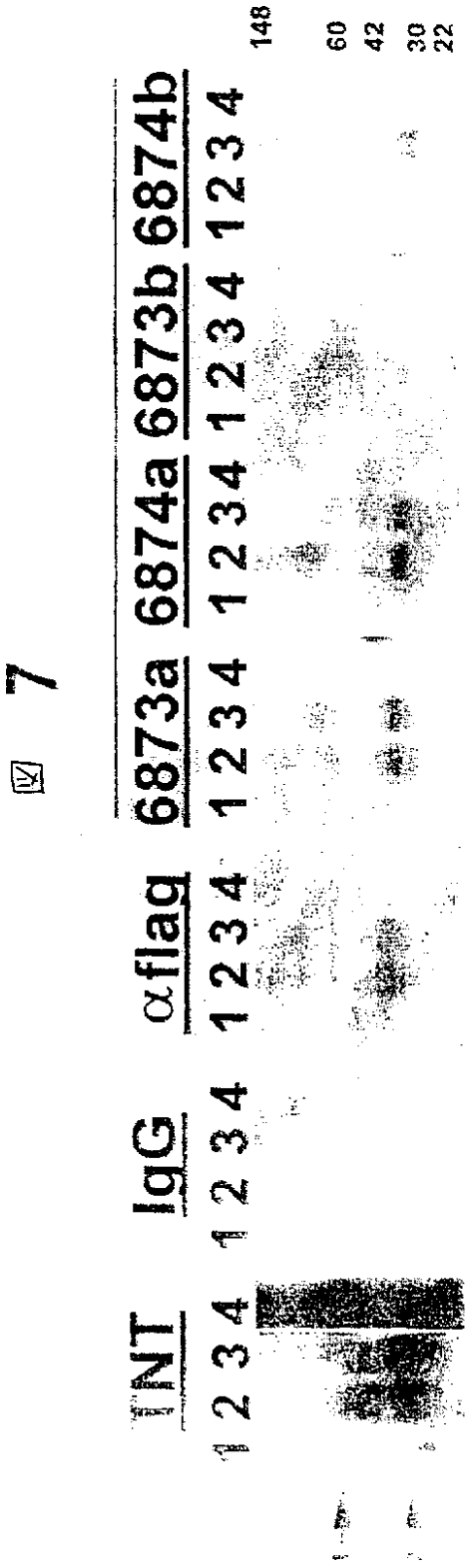
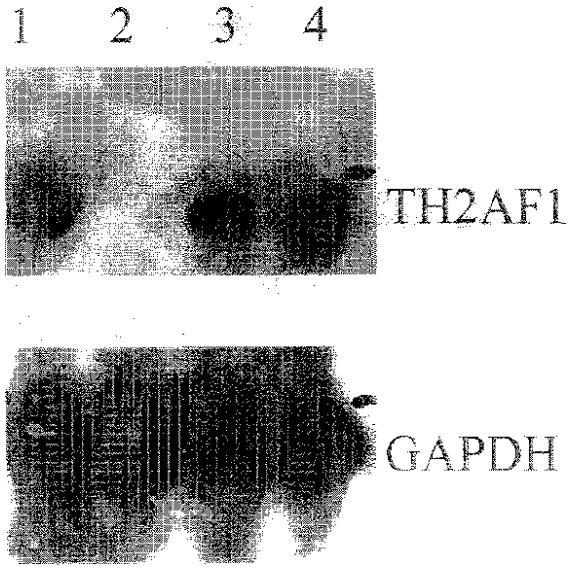


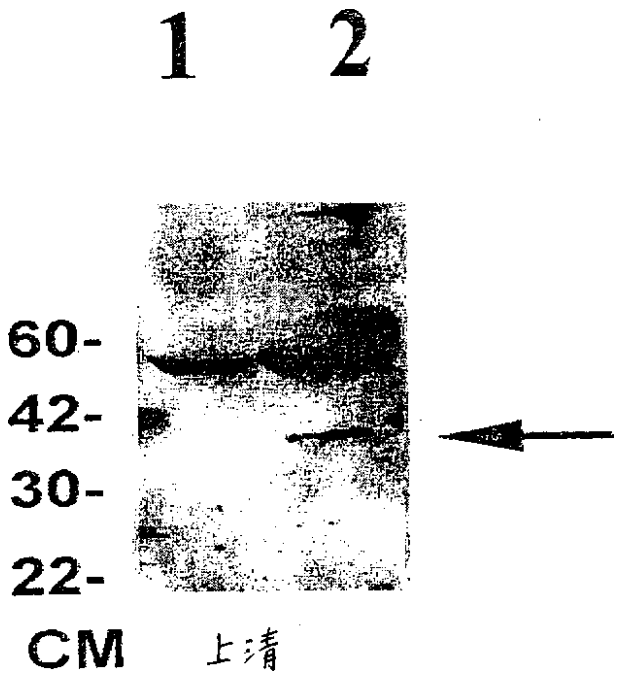
図 7
INT
IgG
αflag
6873a
6874a
6873b
6874b
1 2 3 4
148
60
42
30
22
= hIL-9Rの推定分子量
= TH2AF1-FLAGの推定分子量

【図８】

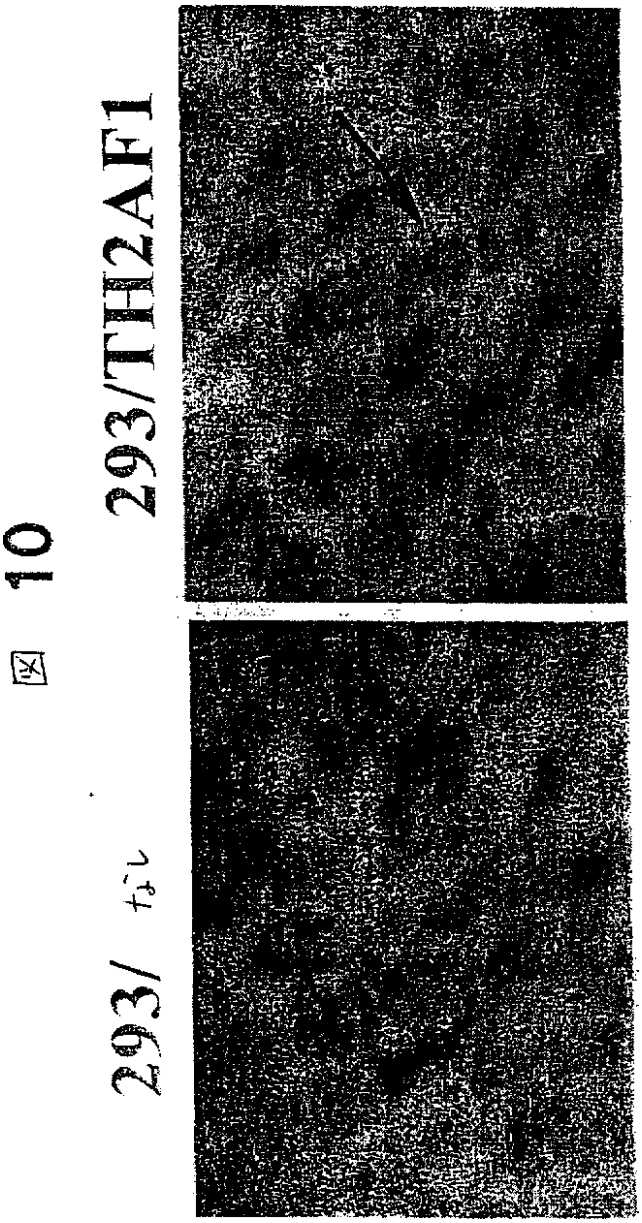
FIG. 8



【図９】



【図１０】



【図１１】

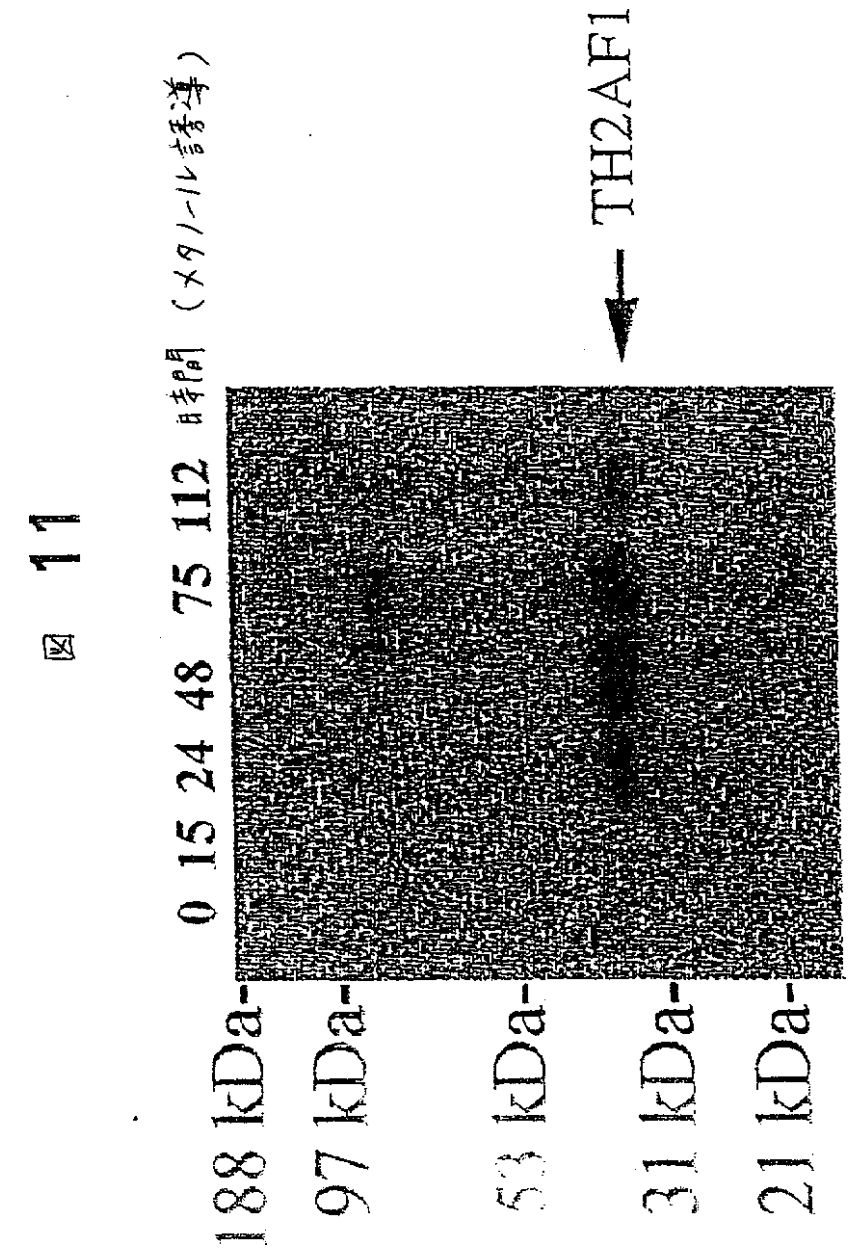
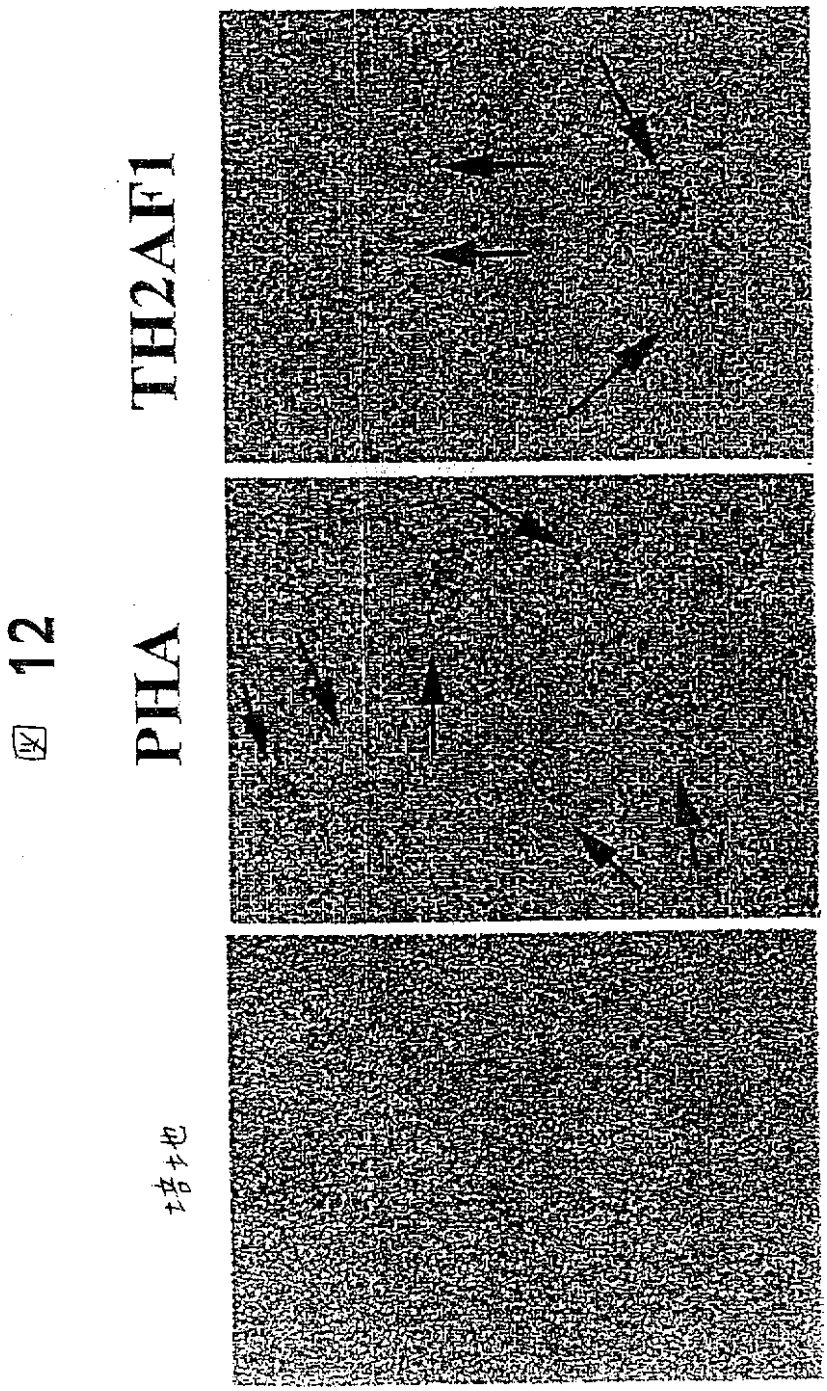
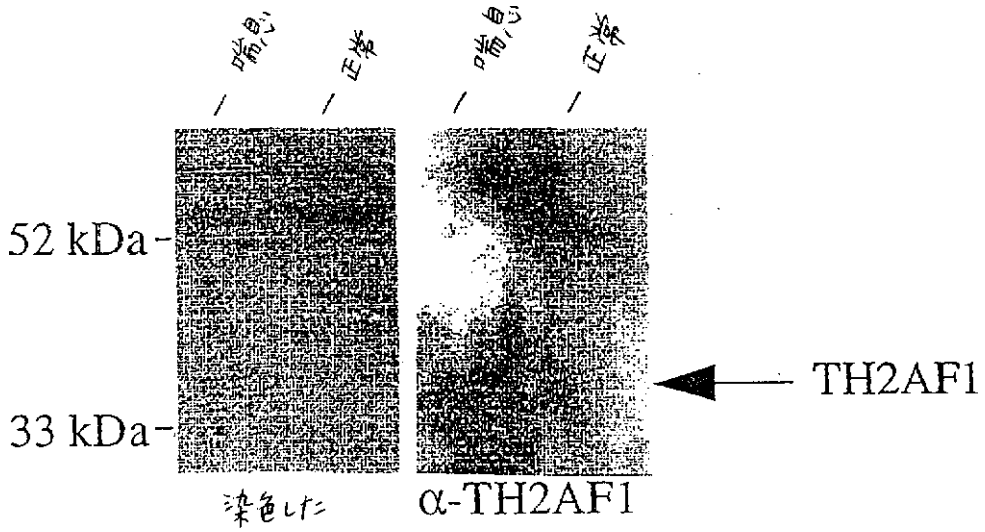


図 11
0 15 24 48 75 112 時間（メタノール誘導）
TH2AF1
188 kDa-
97 kDa-
53 kDa-
31 kDa-
21 kDa-

【図１２】



【図１３】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/11712

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) :Please See Extra Sheet.
US CL :Please See Extra Sheet.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 424/133.1; 435/6, 7.1, 69.1, 91.1, 252.3, 320.1; 514/ 2, 12, 44; 530/387.9, 388.1; 536/23.5

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE, BIOSIS, CANCERLIT, EMBASE, SCISEARCH, COMPUGEN, MASPAR
TH2AF1, allergy, antibody, nucleic acid, polypeptide, TH2, IL-10, atopic, IL-9

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/02546 A2 (UNIVERSITY OF MANITOBA) 22 January 1998 (22.01.98), see entire document.	1-36

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"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
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"	document member of the same patent family
"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		

Date of the actual completion of the international search
26 SEPTEMBER 2000

Date of mailing of the international search report
26 OCT 2000

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer
MARY TUNG
Telephone No. (703) 308-0196

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/11712

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

A61K 38/16; A61P11/06, C12N 15/12,15/70, 15/74, 15/79; C07K 14/435, 16/18

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

424/133.1; 435/6, 7.1, 69.1, 91.1, 252.3, 320.1; 514/ 2, 12, 44; 530/387.9, 388.1; 536/23.5

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	FI		ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考)
Ａ６１Ｋ 45/00		Ａ６１Ｋ	48/00	４Ｃ０８５
48/00		Ａ６１Ｐ	1/04	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ 1/04			11/06	４Ｈ０４５
11/06			37/02	
37/02			37/08	
37/08		Ｃ０７Ｋ	14/47	
Ｃ０７Ｋ 14/47			16/18	
16/18		Ｃ１２Ｎ	1/15	
Ｃ１２Ｎ 1/15			1/19	
1/19			1/21	
1/21		Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ
5/10		Ｃ１２Ｑ	1/02	
Ｃ１２Ｐ 21/02			1/68	Ａ
Ｃ１２Ｑ 1/02		Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ
1/68		Ｃ１２Ｐ	21/08	
Ｇ０１Ｎ 33/53		Ｃ１２Ｒ	1:91	
// Ｃ１２Ｐ 21/08		Ｃ１２Ｎ	15/00	ＺＮＡＡ
(Ｃ１２Ｑ 1/02			5/00	Ａ
Ｃ１２Ｒ 1:91)				
(Ｃ１２Ｑ 1/68				
Ｃ１２Ｒ 1:91)				

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

(72)発明者　レビット,　ロイ　シー.
アメリカ合衆国　ペンシルベニア　19002, アンブラー,　マーステングリーン　コート　660
(72)発明者　マーロイ,　ダブリュー.　リー
アメリカ合衆国　ペンシルベニア　19446, ランズデイル,　クレアモント　ドライブ　106

(72)発明者　チョウ，　ユーホン
アメリカ合衆国　ペンシルベニア　19025，
ドレシャー，　エスティー．　ジョージ
ストリート　1801
(72)発明者　ニコレイディス，　ニコラス　シー．
アメリカ合衆国　ペンシルベニア　19061，
ブースワイン，　シーダー　ミル　コー
ト　４

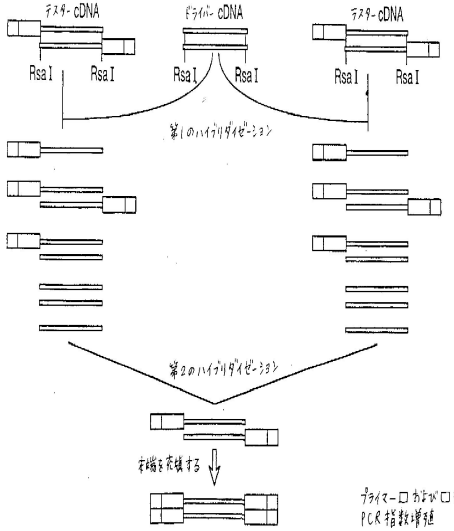
Ｆターム(参考)　4B024 AA01 AA11 BA43 BA61 CA02
CA04 CA12 DA02 DA05 DA12
EA04 GA03 GA11 GA18 GA19
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ42
QQ53 QQ58 QR08 QR14 QR18
QR32 QR36 QR42 QR50 QR55
QR56 QR59 QR62 QR66 QR72
QR77 QS25 QS34
4B064 AF27 AG26 AG27 BA14 CA02
CA06 CA10 CA19 CC24 DA03
DA04 DA13 DA14
4B065 AA26X AA77X AA90X AA90Y
AA93Y AB01 BA02 BA25
CA23 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA13 AA16 BA35 BA36 NA14
ZA59 ZB07 ZB11 ZB13
4C085 AA13 AA14 DD62 EE03
4C086 AA01 AA02 AA04 EA16 MA03
NA14 ZA59 ZB07 ZB11 ZB13
4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 BA54
CA40 EA22 EA54 FA72 FA74

专利名称(译)	与哮喘相关的因素是治疗特应性过敏的目标，包括哮喘和相关疾病		
公开(公告)号	JP2002542814A	公开(公告)日	2002-12-17
申请号	JP2000615733	申请日	2000-05-01
申请(专利权)人(译)	Jenera公司		
[标]发明人	ロウアヘドジャミラ ドンチャールズク レビットロイシー マーロイダブリューリー チョウユーホン ニコレイディスニコラスシー		
发明人	ロウアヘド, ジャミラ ドン, チャールズ ク レビット, ロイ シー. マーロイ, ダブリュー. リー チョウ, ユーホン ニコレイディス, ニコラス シー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/56 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/16 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P11/06 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/435 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/70 C12N15/74 C12N15/79 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C12R1/91		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 A61P1/04 A61P11/06 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/24		
FI分类号	A61K31/56 A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P11/06 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D C12P21/08 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA61 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR18 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B064/AF27 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/BA14 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA03 4B064/DA04 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065/AA77X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065/CA23 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA16 4C084/BA35 4C084/BA36 4C084/NA14 4C084/ZA59 4C084/ZB07 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD62 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA03 4C086/NA14 4C086/ZA59 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA54 4H045/CA40 4H045/EA22 4H045/EA54 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/132138 1999-05-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

已经鉴定并分离了新的IL-9诱导的TH2相关基因，为IL-9介导的疾病例如特应性过敏和哮喘相关疾病提供了治疗靶标。 它 本发明还提供了用于鉴定该基因的方法，以及该基因及其产物的小分子抑制剂在治疗这些疾病中的用途，所述生物学样品是使用对该蛋白质具有特异性的抗体。 包括通过测量其中的基因表达水平来诊断对特应性过敏或哮喘相关疾病的易感性的方法和评估治疗的方法。 还包括该蛋白质作为治疗自身免疫性疾病的治疗剂的用途。

図 1



プライマー口カナダ口を用いる
PCR指数増幅