

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-511296

(P2008-511296A)

(43) 公表日 平成20年4月17日(2008.4.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-528782 (P2007-528782)	(71) 出願人	507067962
(86) (22) 出願日	平成17年9月2日 (2005.9.2)		アルカミ ペルテジョ アントニオ
(85) 翻訳文提出日	平成19年5月1日 (2007.5.1)		スペイン国, イ-28700 サン セバ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/009449		スチャン デ レイエス, フランシスコ
(87) 国際公開番号	W02006/024533		グエーレロ, 1 ペタ 7
(87) 国際公開日	平成18年3月9日 (2006.3.9)	(74) 代理人	100074192
(31) 優先権主張番号	200402123		弁理士 江藤 剛
(32) 優先日	平成16年9月2日 (2004.9.2)	(72) 発明者	アルカミ ペルテジョ アントニオ
(33) 優先権主張国	スペイン (ES)		スペイン国, イ-28700 サン セバ
			スチャン デ レイエス, フランシスコ
		(72) 発明者	アレジョ ヘルベルグ アリ
			スペイン国, イ-28039 マドリッド
			, ガルデニアス 2-4エー
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス性TNFレセプター及び関連のタンパク質のケモカイン結合活性

(57) 【要約】

ウイルス性TNFレセプター及び関連するタンパク質のケモカイン結合活性。本発明はケモカイン及びそれらの類似物を結合するため及び/又はTNFRsの免疫賦活性特性を高めるために又はケモカインがそれに対応する細胞表面レセプターに結合するのを阻止するために及び/又はケモカイン生物学的活性を調整するために、誘導体及び断片を含んでいるボックスウイルスとそれらの機能的な同族体とからウイルス性腫瘍壊死因子レセプター(vTNFRs) CrmB又はCrmD又はCTD同族体(CTD1, CTD2及びCTD3)のC-末端領域(CTD)に関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ケモカイン及びそれらの類似物を結合するのに使用するため及び/又はTNFRsの免疫賦活性特性を高めるために、誘導体及び断片を含んでいるボックスウイルスとそれらの機能的な同族体とからのウイルス性腫瘍壊死因子レセプター(vTNFRs)CrmB又はCrmD又はCTD同族体(CTD1, CTD2及びCTD3)のC-末端領域(CTD)。

【請求項 2】

ケモカインがそれに対応する細胞表面レセプターに結合するのを阻止するのに使用するため及び/又はケモカインの生物学的活性を調整するために、誘導体及び断片を含んでいるボックスウイルスとそれらの機能的な同族体とからのvTNFRsCrmB又はCrmD又はCTD同族体(CTD1, CTD2及びCTD3)のCTD。

10

【請求項 3】

CrmBからのCTDがSEQ ID No. 26又はSEQ ID No. 28を有していることを特徴とする請求項1又は2に記載のCrmBからのCTD。

【請求項 4】

CrmDからのCTDがSEQ ID No. 22又はSEQ ID No. 24を有していることを特徴とする請求項1又は2に記載のCrmDからのCTD。

【請求項 5】

CTDがSEQ ID No. 8, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 20, SEQ ID No. 18又はSEQ ID No. 16を含有するか又は遺伝子V201, D12L, B6R又はB21Rによってコード化されたタンパク質のいずれかを含有することを特徴とする請求項1又は2に記載のCTD同族体。

20

【請求項 6】

同一又は他の起源のポリペプチド配列に溶解された請求項1乃至5のいずれか1項に記載のCTD又はCTD同族体を含有している溶融ポリペプチド。

【請求項 7】

前記溶融ポリペプチドがvTNFRsのN-TNF末端結合領域に溶解された請求項1乃至5のいずれか1項に記載のCTDからなることを特徴とする溶融ポリペプチド。

30

【請求項 8】

vTNFRsがヒト起源であることを特徴とする請求項7に記載の溶融ポリペプチド。

【請求項 9】

請求項1乃至5のいずれか1項に記載のCTD又はCTD同族体をコード化している配列又は請求項6乃至8のいずれか1項に記載の溶融ポリペプチドを含有していることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記配列が組織特性又は構造的プロモータから発現される発現カセットを含有していることを特徴とする請求項6乃至9のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 11】

前記配列がウイルス性ベクター又は発現プラスミドの部分を形成することを特徴とする請求項6乃至9のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド。

40

【請求項 12】

生体内においてケモカイン又はケモカイン類似体に結合するのに使用するために、請求項1乃至5のいずれか1項に記載のCTD又はCTD同族体及び/又は請求項6乃至9のいずれか1項に記載の溶融ポリペプチド及び/又は請求項10又は11に記載の発現カセット及び/又はウイルス性ベクターを含有していることを特徴とする医薬組成物。

【請求項 13】

ケモカインが対応する細胞表面ケモカインレセプターに結合するのを阻止するために又は生体内においてケモカインの生物学的活性を抑制するために使用する請求項12に記載

50

の医薬組成物。

【請求項 14】

抗炎症作用を発生するために使用する請求項 12 又は 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

別の免疫抑制剤又は抗炎症物質を含有することを特徴とする請求項 12 乃至 14 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

生体内においてケモカイン、ケモカイン類似体、又はケモカインレセプターを検出又は測定するために、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の C T D と標識化又は固相化された反応体とを含有していることを特徴とする試験キット。

10

【請求項 17】

抗炎症作用を発生するために被験者に投与するための薬剤を製造するために、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の C T D 又は C T D 同族体及び / 又は請求項 6 乃至 9 のいずれか 1 項に記載の溶融ポリペプチド、及び / 又は請求項 10 及び 11 に記載の発現カセット及び / 又はウイルス性ベクターを使用する使用方法。

【請求項 18】

細胞内にウイルス又は寄生虫の侵入を阻止するために前記ウイルス又は寄生虫中に存在するケモカイン類似体に結合する被験者に投与するための薬剤を製造するために請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の C T D 又は C T D 同族体を使用する使用方法。

20

【請求項 19】

請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の C T D 同族体の少なくとも 1 つ及び / 又は v T N F R s の不活性化又は削除による天然痘ウイルスワクチン用の弱毒化方法。

【請求項 20】

C T D 同族体又は v T N F R s に対する抗原の誘導に基づいて、ワクシニア症ウイルス接種によって発生された逆作用及び / 又はヒト疱疹における天然痘ウイルスによって発生された病状の治療のための薬剤を使用するか又は請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の C T D 同族体又は v T N F R s のケモカイン結合活性を抑制する抗原又は反応体を使用する使用方法。

【請求項 21】

ケモカイン又はケモカイン類似体を結合するために、請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載の C T D 又は C T D 同族体を含んでいる反応体で試験される物質を含んでいるサンプルに接触することに基づいていることを特徴とするケモカイン又はケモカイン類似体を含有する物質を検出する物質検出方法物質検出方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はケモカイン (c h e m o k i n e) 活性を変更しかつ複数の腫瘍壊死因子レセプター (T N F R s) の免疫賦活特性を高めるために、ポックスウイルスによってコード化されかつサイトカイン応答変更因子 B 及び D (C r m B 及び C r m D) と呼ばれる複数の腫瘍壊死因子レセプター (T N F R s) 及び同族体、誘導體又はその断片の C - 末端領域 (C T D) の使用に関する。また本発明は本発明のタンパク質を含有する融解ポリペプチド、医薬組成物及び試験キットに関するものである。

40

【背景技術】

【0002】

ポックスウイルスは 200 個の遺伝子までコード化されている複雑な D N A ウイルスである。天然痘ウイルス (V a V) は W H O の世界的な撲滅キャンペーンにおいて疱疹ワクチンとしてのワクシニア症ウイルス (V V) の使用の結果として撲滅された最も壊滅的な人間の病気の 1 つである疱疹の作因病原体であった。牛痘ウイルス (C P V) は V V に関連しかつ多数の哺乳動物における散発性感染を引き起こすケツ (齧) 歯目のウイルスであると考えられている。先天性四肢欠損症ウイルス (E V) は天然のマウスの病原菌であり

50

かつヒト疱疹に類似して引き出されるマウス病であるマウスボックスの作因病原体である。

【0003】

免疫応答はウイルスのごとき病原菌による感染からの有効な保護のメカニズムとして進化してきた。免疫性寄生体を複製するために、免疫応答を回避するためのウイルス性メカニズムが進化してきた(アルカミ及びコスジノウスキー、2000年「Alcami & Koszinowski, 2000」)。ボックスウイルスは寄生体免疫応答に対抗する広範囲のタンパク質をコード化している(アルカミ、2003年、シート等、2003年「Alcami, 2003, Seet et al., 2003」)。ボックスウイルスによってコード化された免疫賦活のメカニズム1つは免疫応答を調整するタンパク質のファミリー、即ちサイトカインを結合する分泌タンパク質の生成である。

10

【0004】

ボックスウイルスによってコード化された4つの分泌されたTNFRsが説明され、そしてサイトカイン応答変更因子B(CrmB), CrmC, CrmD, 及びCrmEと名づけられた(フー等、1994年、ラパレブ等、1998年、サライバ及びアルカミ、2001年、スミス等、1996年「Hu et al., 1994, Loparev et al., 1998, Saraiva & Alcamí, 2001, Smith et al., 1996」)。これらのタンパク質はヒトTNFRsに存在しかつTNF結合細胞外領域を構成しているシステインの豊富な領域(CRDs)と類似するアミノ酸配列を有している。ウイルス性タンパク質はTNFRsの細胞膜透過領域及び細胞内領域を欠いている(図1及び図2)。

20

【0005】

4つのすべてのウイルス性TNFレセプター(vTNFRs)はTNFを結合しかつTNFの生物学的活性を阻止するために、ウイルス感染細胞から分泌されるようになっていく。vTNFRsのCRDsはTNFを結合するように予知され、そしてこれは粘液腫ウイルス(M-T2)によってコード化されたCrmB同族体に関して証明され(シュライパー等、1997年「Schreier et al., 1997」)、そして本発明の固有の実験はCrmDの3つのN-末端CRDsがTNF結合及び抑制活性をコード化することを示している(下記参照)。

【0006】

CrmB及びCrmDと名づけられたvTNFRsの2つの代表的な構成要素はCPVCrmB(SEQ ID No. 11及び12), VaVCrmB(SEQ ID No. 9及び10), CPVCrmD(SEQ ID No. 1及び2)及びEVCrmD(SEQ ID No. 3及び4)である。CrmB及びCrmDはデータベース中の細胞タンパク質と類似するアミノ酸配列を持たない別のCTDを有している(図1及び図2)。この領域はTNF結合に必要とされずそしてその機能は特定されていない。ボックスウイルスによってコード化された3つの開放読み取りフレーム(ORFs)はvTNFRsのCTDに類似するアミノ酸配列を有している。これらのORFsの代表的な構成要素は、EVE12(CTD1)(SEQ ID No. 5及び6), EVE184(CTD2)(SEQ ID No. 19及び20)及びCPVB21R/V218(CTD3)(承認NO. 072758及び(SEQ ID No. 13及び14)である(図1及び図2)。

30

40

【0007】

ケモカインを結合する多数の分泌タンパク質が幾つかのボックスウイルス及びヘルペスウイルスに記載されている(アルカミ等、1998年、ブライアント等、2003年、グラハム等、1997年、ララニ等、1997年、パリー等、2000年、バン・ベルケル等、2000年「Alcami et al., 1998, Bryant et al., 2003, Graham et al., 1997, Lalani et al., 1997, Parry et al., 2000, Van Berkel et al., 2000」)(表1)。これらのウイルス性コード化ケモカイン結合タンパク質(vCK

50

B P s) は 7 個 の 細胞 膜 透 過 領 域 ケ モ カ イ ン レ セ プ タ ー 又 は 他 の 細胞 タ ン パ ク 質 に 類 似 す る ア ミ ノ 酸 配 列 を 持 た ない (ア ル カ ミ 、 2 0 0 3 年 、 シ ー ト 等 、 2 0 0 3 年 、 シ ー ト 及 び マ ク フ ァ デ ン 、 2 0 0 2 年 「 A l c a m i , 2 0 0 3 , S e e t e t a l . , 2 0 0 3 , S e e t & M c F a d d e n , 2 0 0 2 」) 。 ネ ズ ミ の ガ ン マ ヘ ル ペ ス ウ イ ル ス 6 8 (M H V - 6 8) に よ っ て コ ー ド 化 さ れ た C P V 及 び M 3 に よ っ て コ ー ド 化 さ れ た 3 5 k D a v C K B P に つ い て の 構 造 的 及 び 機 能 的 研 究 は こ れ ら の ウ イ ル ス 性 タ ン パ ク 質 が 新 規 な タ ン パ ク 質 領 域 又 は ケ モ カ イ ン を 結 合 す る 能 力 を 有 す る 構 造 を 有 す る こ と を 実 証 し た (ア レ キ サ ン ダ ー 等 、 2 0 0 2 年 、 カ リ フ 等 、 1 9 9 9 年 「 A l e x a n d e r e t a l . , 2 0 0 2 , C a r f i e t a l . , 1 9 9 9 」) 。 感 染 し た 組 織 及 び ウ イ ル ス 性 病 原 中 に 入 る 白 血 球 の 遊 走 を 阻 止 す よ う な 幾 つ か の v C K B P s の 能 力 が 実 証 さ れ た (ブ リ ッ ジ マ ン 等 、 2 0 0 1 年 、 グ ラ ハ ム 等 、 1 9 9 7 年 、 ジ ョ ン ソ ン 及 び マ ク フ ァ デ ン 、 2 0 0 4 年 、 ラ ラ ニ 等 、 1 9 9 9 年 、 リ ー デ ィ ン グ 等 、 2 0 0 3 年 「 B r i d g e m a n e t a l . , 2 0 0 1 , G r a h a m e t a l . , 1 9 9 7 , J o h n s t o n & M c F a d d e n , 2 0 0 4 , L a l a n i e t a l . , 1 9 9 1 , R e a d i n g e t a l . , 2 0 0 3 」) 。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

ウ イ ル ス 性 T N F レ セ プ タ ー (v T N F R s) サ イ ト カ イ ン 応 答 変 更 因 子 B (C r m B) 及 び D (C r m D) の C - 末 端 領 域 (C T D) は 今 日 ま で そ の 機 能 を 発 見 さ れ ず 、 ま た 宿 主 タ ン パ ク 質 に 類 似 す る 配 列 を 有 し て い ない 。 本 発 明 は こ の 領 域 が 多 数 の ケ モ カ イ ン を 結 合 す る 能 力 v T N F R s に 付 与 す る こ と 、 及 び v T N F R s の T N F 結 合 領 域 か ら 独 立 し て 発 現 さ れ た C T D が ケ モ カ イ ン を 結 合 す る こ と を 見 い 出 し た 。 こ の タ ン パ ク 質 領 域 は 分 泌 さ れ る も の と 予 測 さ れ る 3 つ の 別 の ボ ッ ク ス ウ イ ル ス で コ ー ド 化 タ ン パ ク 質 内 に 見 い 出 さ れ 、 そ し て 本 発 明 は 先 天 性 四 肢 欠 損 症 ウ イ ル ス (E V) の E 1 2 遺 伝 子 及 び 牛 痘 ウ イ ル ス (C P V) の B 2 1 R 遺 伝 子 に よ っ て コ ー ド 化 さ れ た そ れ ら の 2 つ が ケ モ カ イ ン を 結 合 す る こ と を 示 し て い る 。 本 発 明 は v T N F R s の C T D が ケ モ カ イ ン を 結 合 す る 新 規 な 構 造 的 領 域 を 特 定 す る こ と を 提 案 す る 。 こ れ ら の タ ン パ ク 質 は 生 体 内 で ケ モ カ イ ン 活 性 を 調 整 し か つ 多 数 の 人 間 の 疾 病 状 態 に お け る 逆 の 免 疫 及 び 炎 症 応 答 を 調 整 す る の に 使 用 さ れ 得 る 。 可 溶 性 T N F R s に 溶 解 さ れ た こ の C T D の 発 現 は す で に 診 療 所 で 使 用 さ れ た T N F R s の 免 疫 賦 活 性 の 特 性 を 高 め る こ と が 可 能 だ り 。 加 え て 、 C T D は v T N F R s の N - 末 端 シ ス テ イ ン の 豊 富 な 領 域 の T N F 結 合 活 性 を 高 め 、 そ し て v T N F R s は T N F リ ガ ン ド 上 科 の 他 の 構 成 要 素 を 結 合 す る 。

【 発 明 の 概 要 】

【 0 0 0 9 】

本 発 明 の 第 1 の 態 様 は ケ モ カ イ ン 及 び そ れ ら の 類 似 物 を 結 合 す る の に 使 用 の た め 及 び / 又 は T N F R s の 免 疫 賦 活 性 の 特 性 を 高 め る た め に 、 ボ ッ ク ス ウ イ ル ス か ら の ウ イ ル ス 性 T N F レ セ プ タ ー C r m B 及 び / 又 は C r m D の C - 末 端 領 域 (C T D) 及 び 機 能 的 な 同 族 体 、 誘 導 体 、 及 び 断 片 を 含 ん で い る ボ ッ ク ス ウ イ ル ス か ら の そ れ ら の 同 族 体 C T D 1 , C T D 2 及 び C T D 3 を 有 し て い る 。

【 0 0 1 0 】

本 発 明 の 好 適 な 態 様 は ケ モ カ イ ン が 対 応 す る 細胞 表面 レ セ プ タ ー に 結 合 す る の を 阻 止 す る の に 使 用 す る た め 及 び / 又 は ケ モ カ イ ン 結 合 活 性 を 調 整 す る た め に 、 ボ ッ ク ス ウ イ ル ス か ら の C r m B 及 び / 又 は C r m D か ら の C T D お よ び 同 族 体 、 誘 導 体 、 及 び 断 片 を 含 ん で い る ボ ッ ク ス ウ イ ル ス か ら の そ れ ら の 同 族 体 C T D 1 , C T D 2 及 び C T D 3 を 有 し て い る 。

【 0 0 1 1 】

ボ ッ ク ス ウ イ ル ス か ら の C r m B 及 び / 又 は C r m D か ら の C T D の 同 族 体 は 、 例 え ば 、 C r m B 及 び / 又 は C r m D か ら の C T D を コ ー ド 化 し て い る ヌ ク レ オ チ ド 配 列 の 突 然 変 異 体 及 び 突 然 変 異 配 列 か ら の 発 現 、 及 び / 又 は 関 連 の 遺 伝 子 配 列 か ら の 使 用 又 は 誘 導 に よ っ て 得 る こ と が 可 能 だ り 。 変 形 例 に お い て 、 そ れ ら は 、 例 え ば 、 タ ン パ ク 質 配 列 か ま た は タ ン パ ク 質 を コ ー ド 化 し て い る ヌ ク レ オ チ ド 配 列 を 包 含 し て い る デ ー タ ベ ー ス を ス ク リ ー

ンすることによってC r m B及び/又はC r m DからのC T Dに類似する遺伝子配列を識別することによって、例えば可能なアルゴリズムを使用するブラストプログラムを使用して同族(ホモロジ)が決定され得るスイスプロットデータベースを例えばスクリーンすることによって得ることができる。配列全体にわたる同族の許容し得るレベルは少なくとも約20%、例えば、約30%である。他のタンパク質を有するC r m B及び/又はC r m DからのC T Dの機能的な断片の同族はこれより低く、例えば、約10%にすることができる。

【0012】

C r m B又はC r m DからのC T D又はC T D同族体(C T D 1, C T D 2及びC T D 3)の誘導体又は断片を含んでいる機能的な同族体は例えば放射性標識化されたケモカインを使用する交差結合アッセイと同等な適宜な方法によって又はサーフェイスプラズマレゾナンス(S P R m、B l A c o r e)のごときタンパク質-タンパク質相互作用を測定する他の方法によりケモカインを結合するようなそれらの能力に関してチェックされ得る。

10

【0013】

本発明の非常に好適な実施形態において、C r m BからのC T DはS E Q I D N o . 26又はS E Q I D N o . 28のいずれかを含み、C r m DからのC T DはS E Q I D N o . 22又はS E Q I D N o . 24のいずれかを含み、そしてC T D同族体(C T D 1, C T D 2及びC T D 3)は以下のS E Q I D N o . 8, S E Q I D N o . 14, S E Q I D N o . 6, S E Q I D N o . 20, S E Q I D N o . 18, S E Q I D N o . 16及び遺伝子C P V V 201(受け入れN o . Q 8 Q M P 4), D 1 2 L(受け入れN o . P 8 7 5 9 8), B 6 R(受け入れN o . 0 7 2 7 4 3)又はB 2 1 R(受け入れN o . 0 7 2 7 5 8)によってコード化されたタンパク質のいずれかを含んでいる。

20

【0014】

本発明の第2の態様は、同族体、誘導体、及び断片を含んでいる本発明のC T Dをコード化する核酸分子を備えている。また、本発明には、後述する核酸の補完ストランド及び遺伝子コードの縮退による同族体、誘導体、及び断片を含んでいる本発明によるC D Tをコード化する配列と異なる核酸分子が含まれている。

【0015】

本発明の好適な実施形態において、C r m BからC T Dをコード化するは、S E Q I D N o . 25又は27のいずれかを含有し、C r m DからC T Dをコード化する配列はS E Q I D N o . 21又はS E Q I D N o . 23のいずれかを有し、そして機能的同族体のC T Dをコード化する配列は以下の遺伝子、V 1 0 4(S E Q I D N o . 7), V 2 0 1, V 2 1 8(S E Q I D N o . 13), D 1 2 L, B 6 R, B 2 1 R, E 1 2(S E Q I D N o . 5), E 1 8 4(S E Q I D N o . 19), V A C W R 1 8 9(S E Q I D N o . 17)又はV A C W R 2 0 6(S E Q I D N o . 15)によってコード化された配列のいずれかを有している(図1及び図2)。

30

【0016】

本発明の第3の態様によれば、溶融ポリペプチドは、同じ起源又は他の起源のポリペプチド配列に溶融された機能的な同族体、誘導体、及び断片を含んでいるC r m B又はC r m D又はC T D同族体(C T D 1, C T D 2及びC T D 3)からのC T Dのいずれかを含有することにより産生され得る。

40

【0017】

本発明の好適な実施形態において、機能的な同族体、誘導体、及び断片を含んでいるC r m B又はC r m D又はC T D同族体(C T D 1, C T D 2及びC T D 3)からのC T Dは共有結合で又は共有結合なしで、他の物質と結合され得る。結合産生体は溶融タンパク質である。可溶性T N F R sに溶融されるC T Dの発現は診療所ですでに使用のT N F R sの免疫賦活特性を高める。C-末端領域はN-末端C R DのT N F結合活性を高める分子枠組みを備え、例えば、C R D(1, 2)結合特性はこの方法において高められる。加

50

えて、この強化はTNFリガンド上科（スーパーファミリー）の他の構成要素にvTNFRs結合を行なうことができる。

【0018】

かくして、本発明のさらに他の態様において、溶融ポリペプチドはヒト起源のTNFRsに溶融されたvTNFRsのN-末端TNF結合領域に溶融された機能的な同族体、誘導体、及び断片を含んでいるCrmb又はCrmd又はそれらのCTD同族体（CTD1、CTD2及びCTD3）からのCTDを含有している。

【0019】

本発明のさらに他の実施形態において、他の起源のポリペプチド配列に溶融された機能的な同族体、誘導体、及び断片を含んでいるCrmb又はCrmd又はCTD同族体（CTD1、CTD2及びCTD3）からのCTDのいずれかを含んで生成される溶融タンパク質はポリペプチド配列にケモカイン結合特性を付与する。

【0020】

一定の目的に関して、結合パートナーは公知の化学的結合方法、例えば、一方のパートナーのビオチン化及びアビジンのごとき、ビオチンの結合パートナーを有する他方の派生化によって、機能的な同族体、誘導体、及び断片を含んでいるCrmb又はCrmd又はCTD同族体（CTD1、CTD2及びCTD3）からのCTDに結合され得る。

【0021】

上述したような機能的な同族体、誘導体、及び断片を含んでいるCrmb又はCrmd又はCTD同族体（CTD1、CTD2及びCTD3）からのCTDのいずれか（本発明のタンパク質）は例えばケモカイン及びそれらの類似体の両方を、タンパク質が到来する親ウイルスの寄生範囲に対応する動物種起源又は特異性と、及び/又はケモカイン及びそれらの類似体をヒト起源及び/又は特異性と結合するのに使用され得る。

【0022】

本発明の範囲内にある本発明のタンパク質の誘導体の中には、欠失又は置換によって調整された本発明のタンパク質をコード化している配列を有しているポリペプチドがあり、これらは本発明のタンパク質のケモカイン結合特性を保持している。例えば、あらゆる免疫を生じるアミノ酸モチーフを削除すること又はかかるモチーフを少ない免疫を生じるアミノ酸配列と交換することが有用となる。変形例において、寄生内に免疫許容誤差を誘発することができる調整は本発明のタンパク質をコード化している配列に導入され得る。

【0023】

本発明は、また、ヌクレオチド配列、例えば、本発明のタンパク質と断片又は他のポリペプチドを有するそれらの溶融生成物のごとき同族体を含んでいるその調整された形状をコード化している適宜なプロモーターを組み込んでいるDNAカセット、及び適宜なプラスミド又は他のベクター、例えばウイルス性ベクターに包含される発現カセットに適用範囲を広げている。

【0024】

本発明のタンパク質は例えばCケモカイン、CCケモカイン、CXCケモカイン又はCX3Cケモカインを結合するのに使用され得る。本発明の態様によれば、本発明のタンパク質はかかるケモカインがそれらのレセプターに結合するのを阻止するか又は生体外で、例えば生物学的サンプル又は生体内で生物学的活性を抑制するのに使用され得る。

【0025】

この作用は、例えば診療及び測定目的のため標識化された反応体を使用する特別な結合試験に利用することができる。標識化された反応体は手による所望の目的の試験の形態に応じて、本発明のタンパク質、又はケモカイン、又はケモカインレセプターのいずれかにすることができる。

【0026】

従って、本発明の態様は、また、かかる試験を実施するための組成物、例えば、本発明のタンパク質の標識化している生成物と、それらのいずれかの基準化された試験アリコートと、本発明のタンパク質を以下に記載する特別な結合試験において処理するのに適する

10

20

30

40

50

固体相に結合する生成物と、反応中の結合パートナーの一方の基準化された試験アリコートとかかる反応体の2つ又はそれ以上を関連付ける試験キットとにある。その試験は、例えば、ケモカイン、又はケモカインレセプターの分析であってもよい。

【0027】

結合作用は、また、本発明のタンパク質によって結合され得るケモカインによって実現された作用の抑制に利用され得る。

【0028】

本発明のさらに他の態様によれば、CrmB及び/又はCrmD及び/又はCTD同族体(CTD1, CTD2及びCTD3)からのCTD、及び/又は機能的な同族体、誘導体又はその断片及び/又は他のタンパク質との溶融及び/又は発現カセット及び/又はプラスミド又は他のベクターを含んでいる医薬組成物は生体内においてケモカイン又はケモカイン類似体に結合するのに使用できるか、又は免疫調整作用を発生させるために、生体内においてケモカインが対応する細胞表面レセプターに結合するのを阻止するのに使用することができる。

10

【0029】

本発明のさらに他の態様によれば、医薬組成物は適切な治療(抗炎症)量において、抗炎症剤として使用するために、本発明のタンパク質を含有することができる。

【0030】

本発明のタンパク質は治療されるべき被験者に供給するために従来の医薬賦形剤に適合するように調合され得る。

20

【0031】

本発明の好適な実施形態によれば、本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質を含んでいる溶融タンパク質のいずれかをコード化しているヌクレオチド配列は適宜なプロモーターの制御下で挿入され得る。遺伝子供給システムはウイルス性又は非ウイルス性ベクターシステムにすることができる。かかるベクターは目標細胞が治療の被験者である寄生の生体内にある時、例えば、抗炎症の目的のために本発明のタンパク質を製造する能力を目標の核酸を入れた細胞に付与するのに使用され得る。かかる抗炎症の目的はケモカイン、即ち、慢性間接リユーマチのごとき炎症性疾患を促進するか又はこの疾患に関連付けられるケモカインによって提供された作用を抑制するような使用を包含することができる。抗炎症の目的は本発明のタンパク質を供給するベクターと同一のベクターから又はかかる他の供給された遺伝子用の別個の供給ベクターからであろうと、ベクター供給システムの要素に対する寄生免疫応答の低減及び/又はベクターシステムによる遺伝子供給後の目標細胞に発現される他の遺伝子生成物に対する寄生免疫応答の低減をも包含している。

30

【0032】

本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質を発現するベクターは例えば適宜にシステム化された供給ルートによって、生体内で細胞に投与され得る。変形例において、投与は目標細胞の場所及び/又は治療されるべき被験者の炎症場所の近傍での静脈注射によるような、例えば、直接注射により行うことができる。

【0033】

投与の形式は本発明のタンパク質に対する寄生の免疫応答を制限するように選択され得る。例えば、本発明のタンパク質又はそれらを発現するベクターシステムは他の免疫抑制剤又は抗炎症物質とともに供給され得る。

40

【0034】

本発明のさらに他の態様は本発明のタンパク質及び/又はvTNFRsなしに対するVVワクチンに関するものである。vTNFRs及びCTD関連のタンパク質はヒトの疱瘡ワクチンとして又は免疫性を誘導するような他の病状からのタンパク質の発現用の組み換え型のウイルス性ベクターとして使用されるVV菌株によって発現される。これらのタンパク質のケモカイン結合活性の中和はウイルス性複製及び/又はウイルス誘導の免疫病理学を制限することにより、VVによる疱瘡ワクチン種痘後に報告される逆作用を減少する。vTNFRs又はCTDのケモカイン結合活性を中和する抗体又は反応体は人間の疱瘡

50

を減じ、致命的な人間の疱瘡を保護しかつVV疱瘡ワクチン種痘によって発生される逆作用を減少する。

【0035】

本発明の他の態様は本発明のタンパク質を含有する反応体を有するケモカイン又はケモカイン類似体を含んでいるサンプルを培養することによるケモカイン又はケモカイン類似体の検出方法を包含している。

【0036】

本発明の他の態様は本発明のタンパク質に対する抗体又はvTNFRs又はCTD同族体のケモカイン結合活性を抑制する反応体に基づいて、VV疱瘡ワクチン種痘によって発生される逆作用又は疱瘡によって発生された病状を治療するための医薬を製造するために本発明のタンパク質を使用するタンパク質の使用方法に関するものである。

10

【0037】

本発明の他の態様については当該技術分野において通常の技術を有する者であれば明らかに導き出すことができる。

【0038】

図1は異なるウイルスにおけるvTNFRs及びCTD同族体の概略を示している。各ウイルスにおける遺伝子の名前が示されている。

【0039】

図2はCTD同族体を有するvTNFRs CrmB及びCrmDの配列表を示している。

20

【0040】

図3はIL-8(CXCL8)結合タンパク質としてのEVCrmDの同定を示している。(a)はVVによって発現されないIL-8結合活性の存在を示したECV感染細胞から培養基までの125I-IL-8の交差結合を示している。(b)は組み換え型VVから発現された全長のCrmDがIL-8を結合するが、CrmDCRD(1-4)は結合しないことを示している。(c)は組み換え型CrmDに対する125I-IL-8の結合が過剰なヒト又はマウスのTNFの存在において抑制されなかったことを示している。(d)はパキユロウイルスシステムにおいて発現されたCPVCrmD及びCrmBに対する125I-IL-8の交差結合を示している。

【0041】

図4はTNF結合及び活性抑制におけるCrmDCRD及びCTDの役割を示している。(a)はEVCrmDCRDs及びCTDの組み合わせを含んでいる構造の概略図を示している。(b)は指示されたCrmD構造を発現するVV組み換え型により感染された細胞からの浮遊物によるU937細胞に対する125I-TNFの結合の競合を示している。(c)は指示された組み換え型VVs又はVVWRにより感染された細胞の浮遊物の増大投与量の存在におけるマウスL929細胞中のTNF-誘導の細胞毒性のパーセンテージとして測定された組み換え型CrmD構造の生物学的活性を示している。(d)は指示された組み換え型パキユロウイルスにより感染された細胞からの浮遊物によるTNF-誘導の細胞毒性の抑制を示している。

30

【0042】

図5はEVCrmDに結合するケモカインを示している。純化された組み換え型EVCrmDタンパク質は5000RUのレベルまでCM5バイオセンサチップにアミン結合された。このチップはバイアコレックス(スウェーデン国,ウブサラ)における市場で入手し得るすべてのヒトケモカインに対する結合をスクリーンするために使用された。すべての場合において、100nMのケモカイン溶液の30µlが10µl/分の流量で注入された。最大結合レベルは各ケモカインに関して解離(複合体の安定化)の120秒後の結合レベルに対してプロットされた。SPR運動分析によって測定されたような示されたケモカインに関する親和性定数を挿入する。運動分析に関して、純化された組み換え型EVCrmDタンパク質は1200RU(Rmax<200RU)のレベルまでCM5バイオセンサチップにアミン結合された。異なるケモカイン濃度が2分間30µl/分の流量で

40

50

注入されかつ解離は追加の5分間で監視された。曲線の寸法合わせ(フィッティング)は1:1ラングマイヤー(Langmuir)結合モデルを使用するバイア(BIA)エバリュエーションソフトウェアにより実施された。

【0043】

図6はラクダ痘ウイルス(CMLV)及びVaVCrmbタンパク質のアミノ酸配列表を示している。維持された残留物は星印によって示されている。突然変異させられた位置は赤で示されている。CRD(1-4)及びCTDが示されている。

【0044】

図7はTNF及びケモカインに結合するVaVCrmbの種々の領域を示している。全長のVaVCrmb, VaVCrmbCRD(1-4)又はVaVCrmbCTDの純化されたタンパク質に対するヒトTNF(赤)及びヒトCXCL12(CK、青)の結合がSPRによって分析された。

10

【0045】

図8はVaVCrmbによるTNF及びケモカイン生物学的活性の抑制を示している。(a)はTNF-誘導の細胞毒性の抑制を示している。TNFはアクチノマイシンD(4g/ml)により補充された完全なDMEMの| |における純化された組み換え型タンパク質の指示量により37°Cで2時間予め培養された。混合物は次いで96-ウエルプレートに前日に植えつけられた 2×10^4 L929細胞に加えられそして細胞の死滅が16~18時間後に評価された。OD_{490nm}のクアドルプリケイツ(平均±SD)が各場合にプロットされた。「細胞」/「セルアクトD」:細胞生存能力の制御; TNF:細胞死滅の制御; 「Crmb」:VaVCrmbにより予め培養されたTNF; 「CRD」:CrmbCRD(1-4)により予め培養されたTNF; 「IgG1」:IgG1により予め培養されたTNF、特異性に関する制御。(b)走化性分析。ヒトCCL25(100nM)が単独で又は純化された組み換え型タンパク質の増大量の存在において30分間37°Cで培養されかつ24ウエル-トランスウエル室の下方の仕切り室内に置かれた。この期間後、 5×10^5 MOLT-4細胞が頂部ウエルに対して0.1%FCSを含んでいる100 |の完全なRPMIに加えられそしてプレートは4時間37°Cで培養した。底部ウエルに向かうMOLT-4細胞の泳動の%はFACS分析によって測定された。100%の移動がケモカインのみの存在において泳動する細胞の数として設定された。

20

30

【0046】

図9はVaVCrmbへのケモカイン結合を示している。純化された組み換え型VaVCrmbタンパク質は5000RUのレベルまでCM5バイオセンサチップにアミン結合された。このチップはバイアコレックス(スウェーデン国, ウプサラ)における市場で利用し得るすべてのヒトケモカインに対する結合をスクリーンするために使用された。すべての場合において、100nMのケモカイン溶液の30µlが10µl/分の流量で注入された。最大結合レベルは各ケモカインに関して解離(複合体の安定化)の120秒後の結合レベルまでプロットされた。SPR運動分析によって測定されたような示されたケモカインに関する親和性定数を挿入する。運動分析に関して、純化された組み換え型VaVCrmbタンパク質は1200RU(Rmax<200RU)のレベルまでCM5バイオセンサチップにアミン結合された。異なるケモカイン濃度が2分間30µl/分の流量で注入されかつ解離は追加の5分間で監視された。曲線の寸法合わせ(フィッティング)は1:1ラングマイヤー(Langmuir)結合モデルを使用するバイア(BIA)エバリュエーションソフトウェアにより実施された。

40

【0047】

図10はVaVCrmbのCRD(1-4)に対するVVkDavCKBPの溶融がケモカインを結合する能力をCrmbに付与することを示している。(a)ケモカイン結合に関する交差結合分析。組み換え型バキュロウイルス「BacVaVCrmbCRD(1-4)」(Bac106), 「BacVaVCrmb」(Bac107), 及び「BacVaVCrmbCRD(1-4)/35K」(Bac109)により感染又は予備感染さ

50

れたHigh 5細胞からの浮遊物が^{1 2 5} | - CCL3により培養された。組み換え型タンパク質とCCL3との間の複合体はEDCを使用することによって交差結合されそして生成物はSDS-PAGE及び放射能写真撮影によって分析された。(b)TNF-誘導の細胞毒性の抑制を示している。TNFはアクチノマイシンD(4 g/ml)により補充された完全なDMEMの| |において対応する浮遊物により37°Cで2時間予め培養された。混合物は次いで96-ウエルプレートに前日に植えつけられた 2×10^4 L929細胞に加えられそして細胞の死滅が16~18時間後に評価された。O.D.490nmが種々のサンプルに対してプロットされた。

【発明を実施するための最良の形態】

【0048】

本発明の実施の形態を実施するための物質及び方法を以下の例において詳しく説明するが、以下の例は本発明の範囲を限定するようなものではない。

【0049】

例

実施例1：物質及び方法

1.1.-ポックスウイルス

CPV, EV及びVVがBsc-I細胞の融合性分子フィルムを感染させることによって生体外で繁殖された。

【0050】

1.2.-ラクダ痘CrmBのクローニング及びVaVCrmBの発生

CrmB遺伝子に対応するラクダ痘ウイルスの菌株CMSのORF264がオリゴヌクレオチドCMLV₂₆₄Eco(5'-GCGGAATTCATGAAGTCCGTATTACTCG)及びCMLV₂₆₄Xco(5'-GCGCTCGAGTAAAAAGTGGGTGGGTTTGG)を使用するPCRによって増幅されそしてテンプレートとしてCMLVDNAに純化された。PCR生成物はプラスミドpRAT1を発生させるためにEcoRI/XhoI組織化されたpBac-I(ノバゲン(Novagen))にクローン化された。増幅された遺伝子中の突然変異の不存在がDNA配列決定によって確認された。VaV(菌株バングディシュ1975;ORF188)に対応するDNAが製造業者の指示に従っている「クイックチェンジマルチサイト指向突然変異生成キット(ストラタジン「Stratagene」)」を使用するプラスミドpRAT1の多重サイト指向突然変異生成によって得られた。導入された突然変異は図6に示されている。サイト指向突然変異生成の幾つかの連続するラウンド後、プラスミドpRAT105が得られた。このプラスミドはオリジナルのpBac-Iミナスミドによって供給されたC-末端Hisタグに溶解されたVaV(BSH1975菌株)CrmBをコード化している配列を含んでいる。すべての突然変異の存在及び望まない追加の突然変異の不存在は直接配列決定によって確認された。

【0051】

1.3.-EV又はCPVからCrmDを発現する組み換え型バキュロウイルス及びワクシニア症ウイルスの構造

バキュロウイルスシステム中の発現に関して、CrmD(表3)のDNAコード化全長又は截形バージョンが特定のオリゴヌクレオチド(表4)によりPCR-増幅され、かつpBAC-1にクローン化された。組み換え型バキュロウイルスは組み換え型pBac-Iプラスミド及び記載された(アルカミ等、1998年)ように直線化されたバキュロウイルスDNAによりトランスフェクトされた(該酸を入れられた)SF21昆虫細胞中の同族組み換えによって発生された。

【0052】

vTNFRsは、また、VV発現システムから発現された。関心のある遺伝子が強力なVVプロモーター(デイピソン及びボス、1990年)からの遺伝子の発現に関してpMJ601にクローン化された。関心のある遺伝子が同族組み換えによりVVゲノムのチミンキナーゼローカスに挿入され、そして組み換え型VVがプロモデオキシウリジンの存

10

20

30

40

50

在において選択されかつカラー（色）選択（ - ガラクトシダーゼの発現及び X - gal による色付け）によって識別された。vTNFRs は、VVウエスタンリザーブ、TNF 結合活性をコード化していないウイルス菌株（アルカミ等、1999年）から発現された。

【0053】

1.4. - VaVCrmb, VaVCrmbCRD (1-4), VaVCrmbCTD, EVE12, EVE184, CPVV218 及び CPV35kDa タンパク質に溶解された VaVCrmbCRD (1-4) を発現する組み換え型バキュロウイルスの発
C - 末端 His タグに溶解された全長 VaVCrmb 遺伝子が pRA107 を発現する
ために EcoRI / SphI 分解 pFastBac1 (インビトロゲン「Invitrogen」) にサブクローン化された。4つの CRDs を包含しかつ残留物 1 (M) ~ 19
2 (C) に対応する VaVCrmb の N - 末端領域がオリゴヌクレオチド VaV 188
Eco (5 ; - GCGGAATTCATGAAGTCCGTATTACTTG) 及びテンプレートとして pRA107 を使用する VaV 188 CRDa1-4 Xho
o (5 ; - GCGCTCGAGACACGATGTGTCTGTGGTTAACTGG) を使用する PCR によって増幅された。増幅された断片は pRA99 を発現するために E
coRI / XhoI 分解 pBac1 (ノバゲン「Novagen」) によって設けられた
C - 末端 His タグによりフレーム内でクローン化された。pRA99 は EcoRI / S
phI で分解されそして His タグに溶解された VaVCrmbCRDs を支持する断片
は pRA106 を発現するために前のように pFastBac1 にクローン化された。V
aVCrmb (残留物 T194 及び L348) の CTD はオリゴヌクレオチド VaV 1
88 Cter - PflMI (5 ; - CGCCCACCCAATGGAACTAGGAC
GACCACTACCGG) 及びテンプレートとして pRA107 を使用する H347
R により PVR で増幅された。この断片は PflMI 及び XhoI により分解されかつ同
一の酵素により分解された pRA107 にクローン化された。これは、pRA108、C
rmb の CTD 及び追加の His タグが続く VaVBrmb (予想される信号ペプチドを
包含する) の 29 の N - 末端残留物から構成される溶融タンパク質をコード化するプラス
ミドを発現する。pRA106, pRA107 及び pRA108 中の望ましくない突然変
異の不存在がすべての場合に完全な挿入を配列決定することによって確認された。

【0054】

EV 遺伝子 E12 はオリゴヌクレオチド E1 (5 ; - GCGGGA - TCCATGAT
AAACATAAACACAACCTAC) 及び E2 (5 ; - GCGGCGGCGCAT -
TAATAGTTCTAGTAGCGCAAG) を使用する PCR によって増幅されそし
てテンプレートとして EV (菌株、naval.Cam) DNA を純化した。PCR 生成
物はプラスミド pMS51 を発現する BamHI / NotI 分解 pBac1 (ノバゲ
ン) にクローン化された。E12 遺伝子は pFastbac (インビトロゲン) バックボ
ーン中の His タグをコード化している C - 末端配列に溶解された E12 遺伝子を含ん
でいるプラスミド pAH18 を付与するように BamHI / XhoI 分解 pRA106
にサブクローン化された。CPV ブライトレッド菌株 ORF V218 は 5 ; V218
EcoRI (5 ; - CGCGAATTCATGATGATATA CGGATTAATA
GC) 及び 3 ; V218 SaII (5 ; - GCGGTCTGACACCATCTGACA
CCACTCATC) を使用して PCR で増幅されそしてテンプレートとしてウイルス性
DNA を純化した。PCR 生成物は pFastbac (インビトロゲン) バックボ
ーン中の His タグをコード化している C - 末端配列に溶解された CPV V218 遺伝子を含
んでいるプラスミド pAG17 を発現するために EcoRI / XhoI 分解 pRA106
にクローン化された。CPV (菌株 ブライトレッド) 35kDa タンパク質の残留物 S
23 ~ V246 に対応する断片は、オリゴヌクレオチド 5 ; 35KBR - S23 (5 ; -
CGCCTCTGAGTCAATCTCATCCTCATCCTC) 及び 3 ; 35KBR (-
ストップ) (5 ; - CGCCTCTGAGGACACACGATATAAGTTTTGC
) を使用して PCR で増幅されそしてテンプレートとしてウイルス性 DNA を純化した。

10

20

30

40

50

PCR生成物は、プラスミドpRA109を発生するためにXhoI分解pRA106にクローン化された。このプラスミドはその信号ペプチドなしでかつFastbac（インビトロゲン）バックボーン中のC-末端Hisタグを有してCPV35kDaVCKBPをコード化している配列にフレーム内で溶解されたVaVCrmBCRD（1-4）をコード化している配列を支持している。

【0055】

組み換え型バキュロウイルスは製造業者によって記載されたようなBac対Bac発現システム（インビトロゲン）を使用して得られた。簡単に、プラスミドpRA106, pRA107, pRA108, pRA109, pAH17及びpAH18は反応能力のあるDH10Bacバクテリアに変換され、転移の場合は対応する組み換え型bacmidを発生する。これらは純化されかつHigh5昆虫細胞にトランスフェクト（核酸注入）されそしてトランスフェクト後3日で、組み換え型バキュロウイルスvBac106, vBac107, vBac108, vBac109<vBacAH17及びvBacAH18が細胞培養浮遊物から採取された。これらのウイルスは更にタンパク質生成のために高いタイターの組み換え型ウイルスストックを発生するために1つの工程において増幅された。

10

【0056】

EVからのE184遺伝子はオリゴヌクレオチド5；E184（5；-GCGGAATTCATGTATAAAAACTAATAACGTTT）及び35；E184 XhoI（5；-CGCCTCGAGAAAAATCATATTTTGAATAATATGTA）で増幅され、そしてテンプレートとしてEV DNAを純化した。PCR生成物はpAH11を発生しているEcoRI及びXhoI分解pRA106プラスミドにクローン化された。正しいDNA配列が確認された。プラスミドpAH11はタンパク質の純化を容易にするためにヒスチジンタグに溶解されたVEE184タンパク質を発現する上述のような組み換え型バキュロウイルスvBacAH11を発生するのに使用された。

20

【0057】

1.5. - タンパク質発現及び純化

組み換え型タンパク質を発現するために、High5細胞が高重複度（10pfu/細胞）で感染させそして感染した培養組織からの浮遊物が感染後3日（d.p.i.）で採取された。これらの浮遊物中のタンパク質の存在がウエスタンブロット及び/又は全長及びN-末端VaVCrmB構造の場合において溶液中のTNF結合分析（アルカミ等、1999年）によって確認された。サンプルはYM-3膜（ミリポア）及びPD-10脱塩コラム（アメルシャム-ファラムシア バイオサイエンス）で結合バッファ（50mMの燐酸塩、300mMのNaCl, 10mMのイミダゾール、pH7.4）に交換されたバッファを使用して攪拌された限外濾過セル（アミコン）でおよそ2.5mlに濃縮された。His-タグが付けられた組み換え型タンパク質は製造業者の推奨に従っているピラピュア金属キレートコラム（ピバサイエンス）を使用して親和性で純化された。純化されたタンパク質の純度及び量はコーマシー（Coomassie）のブルーに色づけされたSDS-ポリアクリルアミドゲルでチェックされた。TNF保護及び走化性の抑制分析に関して、組み換え型タンパク質がPBSに対して透析された。

30

40

【0058】

1.6. - サーフェイス プラスモン レゾナンス（SPR）による生体分子相互作用分析

サイトカイン特異性及び親和性定数がバイアコア（BIAcore）Xバイオセンサ（スウェーデン国、ウプサラ所在のバイアコア社）を使用し測定された。リガンドスクリーニング実験に関して、純化された組み換え型タンパク質が各場合におよそ5000RU（5000pg/mm²）のレベルまでCM5チップにアミン結合された。市場で入手可能なサイトカイン（ペプロテック、R&Dシステムズ）が次いで5μ/分の流量においてHBS-EPPバッファ（10mMのヘペス、150mMのNaCl, 3mMのEDTA, 0.005%（v/v）界面活性剤P20；pH7.4）において100nMで注入され

50

そしてその結合及び分離が監視された。表面は10 mMグリシン - HCl pH 2.0を使用する各注入後に再生された。運動分析に関して、組み換え型タンパク質は低い密度 ($R_{max} < 200 RU$) で固相化された。対応する分析物の種々の濃度が次いで2分の期間にわたって30 μl /分の流量で注入されかつ5分後に分離させた。すべてのバイオアセンサグラムはBIAエバリュエーション3.2ソフトウェアを使用して分析された。大きな屈折率の変化は基準流量細胞応答を減算することによって除去されそしてブランク注入の平均応答は系統だった人為的結果を除去するためにすべての分析物のセンサグラムから減算された。運動データは1:1ラングマイア-モデルに全体的に適合した。

【0059】

1.7. - TNF - 誘導の細胞毒性の抑止

TNF - 誘導の細胞毒性分析は前述したように、マウスL929細胞(ロパレフ等、1998年、サライバ及びアルカミ、2001年、シュライバー等、1997年、スミス等、1996年「Loparev et al., 1998, Saraiva & Alcami, 2001, Schreiber et al., 1997, Smith et al., 1996」)で実施された。TNF(20 ng/ml (R&Dシステムズ)がアクチノマイシンD(4 $\mu g/ml$) (シグマ)により補充された完全なDMEMの| |において純化された組み換え型タンパク質により37°Cで2時間予め培養された。混合物は次いで96孔プレート中で前日に植え付けられた 2×10^4 細胞に加えられそして細胞の死滅が製造業者の推奨に従った「セルタイター(Cell Titer) 96 (商標) 水性1溶液細胞増殖分析」(プロメガ(Promega))を使用して16~18時間後に評価された。

10

20

【0060】

1.8. - 走化性分析

MOLT-4細胞の移動が前記に記載(ザバロス等、1999年)したような3 μm ポアサイズフィルタ(コスター(Costar))を有する24孔トランスウエル(商標)プレートを使用して評価された。簡単に、ヒトCCL25(100 nM) (R&Dシステムズ)が単独で又は純化された組み換え型タンパク質の増大量の存在において30分間37°Cで培養されそして下方の仕切り室内に置かれた。この期間後、 2×10^5 MOLT-4細胞が頂部孔に0.1% FCSを含んでいる100 μl の完全なRPMIに加えられそしてプレートは37°C, 5% CO₂, 95%に湿らされた培養器内で培養された。底の孔に向かうMOLT-4細胞の移動が流量血球計算によって4時間後に測定された。

30

40

50

【0061】

実施例2: 結果

2.1. - EV及びCPVによってコード化されたvTNFR CrmDはケモカインを結合する。

ケモカインを結合する新規なウイルス性の分泌タンパク質を調べるために、本発明は125I-CXCL8による交差結合(クロスリンク)分析を実施しかつボックスウイルスEV(図3a)によってコード化された新規な分泌vCKBPを同定した。この活性はVVサンプル中には不存在であり、VV及び他のボックスウイルスによってコード化された35 kDa vCKBP及びCXCL8に交差結合することができるが、CXCL8についてのその低い親和性によりその生物学的活性を阻止しないタンパク質(アルカミ等、1998年、グラハム等、1997年、ララニ等、1998年)、より大きい分子サイズからなっていた。予期しなかったが、TNFを結合することが知られておりかつEVによってコード化されているvTNFR CrmDがCXCL8を結合する追加の特性(図3b)を有することを見い出した。VV発現システムで発現されたCrmBタンパク質の截形バージョンを使用して、CrmDの3N-末端CRDsがTNF活性を阻止するのに必要であり(図4a, b, c)そしてCTDがTNF結合に必要なではないが、CTDがCrmDにケモカインを結合する能力を付与する(図3b)ことを示した。CrmDの各種の領域はTNFに含まれると思われそしてCrmDに対するCXCL8の交差結合からのケモカ

イン結合はTNF（図3c）の存在においては阻止することはできずそしてCrmdに対するTNFの結合はCXCL8の存在においては抑制されない（図示せず）。サーフェスプラスモンレゾナンス（SPR，バイオアX）技術を使用して、ヒト及びマウス起源の市場で入手し得るすべてのケモカインに対する純化されたEVCrmdの潜在的な相互作用を試験し、そしてCrmdが高い親和性のケモカインを結合することを確認した（図5）。

【0062】

2.2. - CPV及びVaVによってコード化されたvTNFRCrmbはケモカインを結合する。

拡張されたCTDをコード化している他のvTNFRがケモカインを結合するかどうかを試験するために、パキユロウイルスシステムにおいてCPVからCrmbを発現させそしてそれが交差結合分析（図3d）においてCXCL8を結合することを示した。Crmbはヒト病原菌VaV、疱疹の原因となる作用物質によってコード化もされている。本発明は関連のラクダ痘ウイルスからのCrmb遺伝子の幅広い場所に向けられた突然変異生成によってVaVのCrmb遺伝子を発生させ（図6）そしてパキユロウイルスシステム中にタンパク質を発現させた。本発明は最初に、純化されたVaVCrmbタンパク質がTNFを結合し（図7）そしてTNFの生物学的活性を抑制する（図8a）ことを試験した。CrmbはSPRによって入手し得るすべてのヒトケモカインへの結合に関しても試験されそして本発明はCrmbが多数のケモカインに高い親和性で結合する（図9）ことを示した。CTDを欠いているVaVCrmbの截形バージョンはケモカインを結合しない（図7）。そのうえ、VaVCrmbのCTDの発現及び純化はCTDがCrmbのケモカイン結合活性をコード化していることを示した（図7）。これはTNF及びケモカインがCrmbの種々の場所に結合する（図示せず）ことを示しているSPA分析によって裏付けられている。

【0063】

2.3. - VaVによってコード化されたvTNFRCrmbは生体外でCCL25によって誘導されたMOLT-4細胞の泳動を阻止する。

幾つかのケモカインに関するvTNFRCrmb及びCrmdの高い親和性はこれらのウイルス性タンパク質がケモカインを隔離しかつロイコサイト上のそれらの特別なレセプターに対する結合を防止しかつ細胞泳動をトリガする信号を誘発するおとりレセプターとして作用することを示唆している。本発明はケモカインCCL25に应答して関連のレセプターを発現しているMOLT-4細胞の泳動を抑制している（図8b）ことを示している。

【0064】

2.4. - vTNFRs（CTD同族体）のCTDに関連付けられたタンパク質はケモカインを結合する。

上述したように、ポックスウイルスによってコード化された3つのタンパク質はvTNFRs（Crmb及びCrmd）のCTDと類似するアミノ酸配列を有している（図1及び図2）。CTD1，CTD2及びCTD3と名づけられたこれらのたんぱく質はそれらが分泌されていることを示唆しているN-末端信号ペプチドを有している。パキユロウイルスシステムにおけるこれらのタンパク質、EVE12（CTD1），EV184（CTD2）及びCPVB21R（CTD3）のうちの2つの発現は両方のタンパク質が媒体に分泌されていることを示した。純化されたEVE12タンパク質はすべてのマウスケモカインに対する結合に関して試験されそして高い親和性で幾つかのケモカインに結合することが見いだされた（表2）。加えて、純化されたタンパク質CPVB21R及びVE184がマウスからのCCL21，CCL24，CCL25，CCL27，CCL28，CXCL10，CXCL11，CXCL12，CXCL13及びCXCL14に結合することをSPRによって測定し、そしてヒトCCL26TheVWRB7R（CTD2）はエンドプラスミック細網の隙間に移動されるようにかつ分泌されるよりむしろ細胞の内部に保持されるように示された（プライス等、2000年「Price et al.，2

10

20

30

40

50

000」)。CTD同族体の幾つかは同様に細胞の内側で発現されるものと知られているCCL27のごときケモカインの活性を阻止するように機能する(ゴルトツ等、2002年「Gortz et al., 2002」)。B7R遺伝子を欠いているVV突然変異体はネズミ皮肉モデル中で弱毒化される(プライス等、2000年「Price et al., 2000」)。

【0065】

2.5. - EVからのvTNFRs CrmD及びVaVからのCrmBは他のTNFリガンドスーパーファミリー構成要素を結合する。

TNFはTNFリガンド(TNFL)スーパーファミリー(ロックスレイ等、2001年、ワラック等、2001年「Locksley et al., 2001, Wallach, 2001」)として知られる構造的な同一性を有する免疫媒介体の大きなファミリーの構成要素である。EV CrmD及びVaV CrmBは市場で入手可能なすべてのTNFリガンドスーパーファミリー構成要素に対する結合に関してSPRによって試験されそしてAPRIL(TNFL13)(CrmDKd110pM; CrmBKd2nM)及びLIGHT(TNFL14)(CrmDKd140nM; CrmBKd2nM)と結合することが見い出された。これはCrmD及びCrmB(及び他のvTNFRs)が幾つかのTNFリガンドスーパーファミリー構成要素の生物学的活性を抑制し得ることを示唆している。

【0066】

2.6. - vTNFRsのCTDは高い親和性を有するTNFに結合するCRDsの能力に影響を及ぼし得る。

上述されたように、N-末端CRD(1, 2)を含有する截形vTNFRs CrmDはTNFに対する親和性を遊離しかつTNF生物学的活性を阻止しないが、しかしCRD(1-3)はTNFを結合しかつその活性を抑制する(図4a, b, c)。意外にも、CRD(1, 2)がCTDに溶解されて発現されるとき、それはCTDがvTNFR(図4d)のN-末端CRDsのTNF結合活性を高め得ることを示しているTNF抑制活性を回復する。

【0067】

2.7. - ウイルスコード化タンパク質は独立して免疫リガンドを結合する領域から形成される。

ここで示されるデータはvTNFRs CrmB及びCrmDが2つの独立した領域から構成される(図及び図2)ことを示している。N-末端CRDsはTNFを結合する能力を有する一方、CTDは独立した様式においてケモカインと結合する。これはCrmBからのCRD(1, 4)がTNF結合活性を維持しかつCrmBからのCTDが独立して発現されるときケモカイン結合活性を有するという知見によって示されている。ウイルス性のタンパク質のこれらの領域が構造的な分子又は免疫媒介物を結合する領域を有するという概念は、(1)VaV CrmBの純化されたCTDがケモカインと結合する(図7); (2)CPVによってコード化されたCrmB及びCrmDのCTDが交換され得るしそしてさらにケモカイン結合活性をも付与し得る(図示せず); (3)vTNFRCTD(CEE12, EVe184CPV及び6B21R)に関連付けられる3つの異なるタンパク質がケモカイン結合活性をコード化する(表2); (4)VaV CrmBのCRD(1, 4)に対するCPV35kDavCKBPの溶融がこのタンパク質にTNF-抑制活性に影響を与えることなく(図10)ケモカインを結合する能力を付与する、という知見によって強調されている。それゆえ、これらのウイルス性領域は幾つかのサイトカインの活性を阻止する免疫調整タンパク質を発生するために交換又は組み合わせられ得る。本発明はvTNFRsのCTDがケモカイン又は免疫システムに含まれる他のタンパク質のような免疫タンパク質と結合する新規なタンパク質構造及び領域を特定しそしてTNFに加えて他の免疫調整タンパク質を結合する能力をvTNFRsに付与することを提案する。

【0068】

参考文献

10

20

30

40

50

アルカミ、エー、(2003年)。サイトカイン、ケモカイン及びそれらのレセプターのウイルス性擬態。国内啓示逸疫学、第13巻、第36頁乃至第50頁(Alcami, A. (2003). *Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors*. *Nat Rev Immunol* 3, 36 - 50)。

【0069】

アルカミ、エー、カーンナ、エー、ポール、エヌ・エル及びスミス、ジー・エル(1999年)。ワクシニア症ウイルス菌株リスター、ソ連及びエバンス発現流動性かつ細胞表面腫瘍壊死因子レセプター。遺伝子ビールス学ジャーナル、第80巻、第949頁乃至959頁(Alcami, A., Khanna, A., Paul, N.L. & Smith, G.L. (1990). *Vaccinia virus strains Lister, USSR and Evans express soluble and cell-surface tumour necrosis factor receptors*. *J. Gen. Virol.* 80, 949 - 59)。

10

【0070】

アルカミ、エー、コスジノウスキー、ユー・エッチ(2000年)。免疫回避のウイルス性メカニズム。今日の逸疫学、第21巻、第447頁乃至第455頁(Alcami, A. & Koszinowski, U.H. (2000). *Viral mechanisms of immune evasion*. *Immunol. Today* 21, 447 - 55)。

20

【0071】

アルカミ、エー、シモンズ、ジェイ・エー、コリンズ、ピー・ディー、ウィリアムス、ティー・ジェイ、及びスミス、ジー・エル(1998年)。ワクシニア症ウイルスからの流動性ケモカイン結合タンパク質によるケモカイン活性の阻止。(逸疫学ジャーナル、第160巻、第624頁乃至第633頁(Alcami, A., Symons, J.A., Collins, P.D., Williams, T.J. & Smith, G.L. (1998). *Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus*. *J. Immunol.* 160, 624 - 33)。

30

【0072】

アレキサンダー、ジェイ・エム、ネルソン、シー・エー、バン・ベルケル、ブイ、ラウ、イー・ケー、シュトゥッツ、ジェイ・エム、ブレット、ティー・ジェイ、スペック、エス・エッチ、ハンデル、ティー・エム、バージン、エッチ・ダブリュー及びフレ蒙特、ディー・エッチ、(2002年)。ヘルペスウイルス誘引物レセプターによるケモカイン除去の構造的基礎。細胞、第111巻、第343頁乃至第356頁(Alexander, J.M., Nelson, C.A., van Berkel, V., Lau, E.K., Studts, J.M., Brett, T.J., Speck, S.H., Handel, T.M., Virgin, H.W. & Fremont, D.H. (2002). *Structural basis of chemokine sequestration by a herpesvirus decoy receptor*. *Cell* 111, 343 - 56)。

40

【0073】

ブリッジマン、エー、スティーブンソン、ピー・ジー、サイマス、ジェイ・ピー、及びエフシュタチオ、エス(2000年)。ネズミガンマヘルペスウイルス-68によってコード化された分泌ケモカイン結合タンパク質は通常の潜在負荷の確立のために必要である。医学実験ジャーナル、第194巻、第301頁乃至第312頁(Bridgeman, A., Stevenson, P.G., Simas, J.P. & Efsthathiou, S. (2001). *A secreted chemokine binding protein encoded by murine gammaherpesvirus-68 is necessary for the establishment*

50

of a normal latent load. *J Exp Med* 194, 301-12)。

【0074】

ブライアント、エヌ・エー、デービス・ポインター、エヌ、バンデルブラッセン、エー、及びアルカミ、エー、(2003年)。広いスペクトルのケモカイン結合タンパク質としてアルファヘルペスウイルス機能のグリコタンパク質Gイソフォーム。塞栓ジャーナル、第22巻、第833頁乃至第846頁(Bryant, N. A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A. & Alcimi, A. (2003). Glycoprotein G isoforms of some alpha herpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO J.* 22, 833-846)。

10

【0075】

カーフィー、エー、スミス、シー・エー、スモラック、ピー・ジェイ、マクグルー、ジェイ、及びウィリー、ディー・シー、(1999年)。牛痘ウイルスからの流動性の分泌ケモカイン抑制体vCCI (p35)。米国国内化学学会会報、第96巻、第12379頁乃至第12389頁(Carfi, A., Smith, C. A., Smolak, P. J., McGrew, J. & Wiley, D. C. (1999) Structure of a soluble secreted chemokine inhibitor vCCI (p35) from cowpox virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12379-83)。

20

【0076】

デイビソン、エー・ジェイ、及びモス、ピー、(1990年)。異物のタンパク質の高レベル発現用の合成末期のプロモーターを組み込んでいる新規なワクシニア症ウイルス組み換えプラスミド。核酸研究、第18巻、第4285頁乃至第4286頁(Davisson, A. J. & Moss, B. (1990). New vaccinia virus recombination plasmids incorporating a synthetic late promoter for high level expression of foreign proteins. *Nucleic Acids Res* 18, 4285-6)。

30

【0077】

ゴルツ、エー、ニブス、アール・ジェイ、マククリーン、ピー、ジャーミン、ディー、ランビイ、ダブリュー、バード、ジェイ・ダブリュー、及びグラハム、ジー・ジェイ、(2002年)。ケモカインESkine/CCL27はインタクリン及びパラクリン機能の新規なモードを表示する。逸疫学ジャーナル、第169巻、第1387頁乃至第1394頁(Gortz, A., Nibbs, R. J., McLean, P., Jarmin, D., Lambie, W., Baird, J. W. & Graham, G. J. (2002). The chemokine ESkine/CCL27 displays novel modes of intracrine and paracrine function. *J Immunol* 169, 1387-94)。

40

【0078】

グラハム、ケー・エー、ララニ、エー・エス、マーセン、ジェイ・エル、ネス、ティー・エル、バリー、エム、リウ、エル・ワイ、ルーカス、エー、クラーク・ルイス、アイ、モイヤー、アール・ダブリュー、及びマクファデン、ジー、(1997年)。ワクシニア症ウイルス分泌タンパク質のT1/35kDaファミリーはケモカインを結合しかつロイコサイト流入をウイルス感染組織に調整する。ウイルス学、第229巻、第12頁乃至第24頁(Graham, K. A., Lalani, A. S., Macen, J. L., Ness, T. L., Barry, M., Liu, L. Y., Lucas, A., Clark-Lewis, I., Moyer, R. W. & McFadden, G. (1997). The T1/35kDa family of poxvirus-secret

50

ed proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. *Virology* 229, 12-24)。

【0079】

フー、エフ、スミス、シー・エー、及びピックアップ、ディー・ジェイ、(1994年)。牛痘ウイルスはタイプIITNFレセプターの流動性分泌形態をコード化している早期遺伝子の2つのコピーを有している。ウイルス学、第204巻、第343頁乃至第356頁(Hu, F., Smith, C. A. & Pickup, D. J. (1994). Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type IITNF receptor. *Virology* 204, 343-356)。

10

【0080】

ジョンストン、ジェイ・ビー、及びマクファデン、ジー、(2004年)。技術的ノックアウト：ウイルス性の免疫調整遺伝子を選択的に削除することによるポックスウイルス病原を理解する。細胞微生物学、第16巻、第695頁乃至第705頁(Johnston, J. B. & McFadden, G. (2004). Technical knockout: understanding poxvirus pathogenesis by selectively deleting viral immunomodulatory genes. *Cell Microbiol* 6, 695-705)。

20

【0081】

ララニ、エー・エス、グラハム、ケー、モスマン、ケー、ラジャラスナム、ケー、クラーク・ルイス、アイ、ケルビン、ディー、及びマクファデン、ジー、(1997年)。純化された粘液腫ウイルスガンインターフェロンレセプター同族体M-T7はケモカインのヘパリン結合領域と相互作用する。ウイルス学ジャーナル、第171巻、第4356頁乃至第4363頁(Lalani, A. S., Graham, K., Mossman, K., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., Kelvin, D. & McFadden, G. (1997). The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *J Virol* 71, 4356-63)。

30

【0082】

ララニ、エー・エス、マスターズ、ジェイ、グラハム、ケー、リウ、エル、ルーカス、エー、及びマクファデン、ジー、(1999年)。粘液腫ウイルス病気発生中の粘液腫ウイルス流動性CC-ケモカイン抑止体グリコタンパク質M-T1の役割。ウイルス学、第256巻、第223頁乃至第245頁(Lalani, A. S., Masters, J., Graham, K., Liu, L., Lucas, A. & McFadden, G. (1999). Role of the myxoma virus soluble CC-chemokine inhibitor glycoprotein, M-T1, during myxoma virus pathogenesis. *Virology* 256, 233-45)。

40

【0083】

ララニ、エー・エス、ネス、ティー・エル、シンフ、アール、ハリソン、ジェイ・ケー、シート、ビー・ティー、ケルビン、ディー・ジェイ、マクファデン、ジー、及びモイヤー、アール・ダブリュー、(1998年)。流動性CC-ケモカイン抑止体グリコタンパク質の天然痘ウイルスT1/35kDaファミリーの構成要素間の機能的な比較。ウイルス学、第250巻、第173頁乃至第184頁(Lalani, A. S., Ness, T. L., Singh, R., Harrison, J. K., Seet, B. T., Kel

50

vin, D. J., McFadden, G. & Moyer, R. W. (1998). Functional comparisons among members of the poxvirus T1/35kDa family of soluble CC-chemokine inhibitor glycoproteins. *Viriology* 250, 173-84).

【0084】

ロックスレイ、アール・エム、キリーン、エヌ、及びレオナルド、エム・ジェイ、(2001年)。TNF及びTNFレセプタースーパーファミリー：一体化している哺乳類の生物学。細胞、第104巻、第487頁乃至第501頁(Locksley, R. M., Killeen, N. & Lemardo, M. J. (2001). The Tnf and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501)。

10

【0085】

ロパレフ、ブイ・エヌ、パーソンズ、ジェイ・エム、ナイト、ジェイ・シー、パナス、ジェイ・エフ、レイ、シー・エー、ビューラー、アール・エム、ピックアップ、ディー・ジェイ、及びエスポジト、ジェイ・ジェイ、(1998年)。正天然痘ウイルスの第3異種腫瘍壊死因子レセプター。米国国内化学学会会報、第95巻、第3786頁乃至第3791頁(Loparev, V. N., Parsons, J. M., Knight, J. C., Panus, J. F., Ray, C. A., Buller, R. M., Pickup, D. J. & Esposito, J. J. (1998). A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3786-3791)。

20

【0086】

パリー、シー・エム、サイマス、ジェイ・ピー、スミス、ブイ・ピー、ステュアート、シー・エー、ミンソン、エー・シー、エフスタチオウ、エス、及びアルカミ・エー、(2000年)。ヘルペスウイルスによってコード化された広スペクトル分泌ケモカイン結合タンパク質。医学実験ジャーナル、第191巻、第573頁乃至578頁(Parry, C. M., Simas, J. P., Smith, V. P., Stewart, C. A., Minson, A. C., Efsthathiou, S. & Alcamí, A. (2000). A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus. *J. Exp. Med.* 191, 573-8)。

30

【0087】

プライス、エヌ、チャルケ、ディー・シー、ホリンズヘッド、エム、及びスミス、ジー・エル、(2000年)。天然痘ウイルス遺伝子B7Rはエンドプラスミック細網中に残存する18-kDaタンパク質をコード化しかつウイルス毒性に作用する。ウイルス学、第267巻、第65頁乃至第79頁(Price, N., Tschärke, D. C., Hollinshead, M. & Smith, G. L. (2000). Vaccinia virus gene B7R encodes an 18-kDa protein that is resident in the endoplasmic reticulum and affects virus virulence. *Viriology* 267, 65-79)。

40

【0088】

リーディング、ピー・シー、シモンズ、ジェイ・エー、及びスミス、ジー・エル、(2003年)。天然痘ウイルスからの流動性ケモカイン結合タンパク質はウイルス毒性及び感染に対する炎症応答を減少する。逸疫学ジャーナル、第170巻第1435頁乃至第1442頁(Reading, P. C., Symons, J. A. & Smith, G. L. (2003). A soluble chemokine-binding protein from vaccinia virus reduces virus v

50

irulence and the inflammatory response to infection. *J Immunol* 170, 1435-42).

【0089】

サライバ、エム、及びアルカミ、エー、(2001年)。CrmE、ポックスウイルスによってコード化された新規な流動性の腫瘍壊死因子レセプター。ウイルス学ジャーナル、第75巻、第226頁乃至第233頁(Sarava, M. & Alcamì, A. (2001). CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *J. Virol.* 75, 226-33)。

【0090】

シュライバー、エム、セッジャー、エル、及びマクファデン、ジー、(1997年)。M-T2の異なる領域、粘液腫ウイルスTNFレセプター同族体は細胞外TNF結合及び細胞内アポトシス抑制を仲介する。ウイルス学ジャーナル、第71巻、第2171頁乃至第2181頁(Schreiber, M., Sedger, L. & McFadden, G. (1997). Distinct domains of M-T2, the myxoma virus TNF receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition. *J. Virol.* 71, 2171-2181)。

【0091】

シート、ビー・ティー、ジョンストン、ジェイ・ビー、ブルネッティ、シー・アール、バレット、ジェイ・ダブリュー、エベレット、エッチ、キャメロン、シー、サイブラ、ジェイ、ナザリアン、エス・エッチ、ルーカス、エー、及びマクファデン、ジー、(2003年)。ポックスウイルス及び免疫流入。評論逸疫学年鑑、第121巻、第377頁乃至第423頁(Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S. H., Lucas, A. & McFadden, G. (2003). Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* 21, 377-423)。

【0092】

シート、ビー・ティー、及びマクファデン、ジー、(2002年)。ウイルス性ケモカイン結合タンパク質。白血球生物学ジャーナル、第72巻、第24頁乃至第34頁(Seet, B. T. & McFadden, G. (2002). Viral chemokine-binding proteins. *J Leukoc Biol* 72, 24-34)。

【0093】

スミス、シー・エー、フー、エフ・キュー、スミス、ティー・ディー、リチャード、シー・エル、スモラック、ピー、グッドウィン、アール・ジー、及びピックアップ、ディー・ジェイ、(1996年)。牛痘ウイルスゲノムはTNFを結合するが、LTアルファを結合しないCrmBと異なる細胞TNFレセプターの第2流動性同族体をコード化する。ウイルス学、第223巻、第132頁乃至第147頁(Smith, C. A., Hu, F. Q., Smith, T. D., Richards, C. L., Smolak, P., Goodwin, R. G. & Pickup, D. J. (1996). Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT alpha. *Virology* 223, 132-147)。

【0094】

バン・ベルケル、ブイ、バレット、ジェイ、ティファニー、エッチ・エル、フレモント、ディー・エッチ、マーフィー、ピー・エム、マクファデン、ジー、スペック、エス・エ

10

20

30

40

50

ッチ、及びバージン、エッチ・アイ(2002年)。ケモカイン作用を抑制するガンマヘルペスウイルス選択ケモカイン結合タンパク質の同定。ウイルス学ジャーナル、第74巻、第6741頁乃至第6747頁(van Berkel, V., Barrett, J., Tiffany, H.L., Fremont, D.H., Murphy, P.M., McFadden, G., Speck, S.H. & Virgin, H.I. (2000). Identification of a gammaherpesvirus selective chemokine binding protein that inhibits chemokine action. J. Virol. 74, 6741-7)。

【0095】

ワラック、ディー、(2001年)。TNFリガンド及びTNF/NGFレセプターファミリー。ジェイ・オッペンハイム及びエム・フェルドマン：アカデミックプレスによって編集されたサイトカイン参考文献。第377頁乃至第412頁(Wallach, D. (2001). TNF ligand and TNF/NGF receptor families. In Cytokine Reference, pp. 377-412. Edited by J. Oppenheim & M. Feldman: Academic Press)。

【0096】

ザバロス、エー、グティエレス、ジェイ、パローナ、アール、アルダビン、シー及びマルケス(1999年)。切断刃：CCR9、ケモカインTECK用のレセプターとしてのオルファンケモカインレセプターGPR-9-6の同定。逸疫学ジャーナル、第162巻第5671頁乃至第5675頁(Zaballos, A., Gutierrez, J., Varona, R., Ardavin, C. & Marquez, G. (1999). Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. J Immunol 162, 5671-5)。

【0097】

表 1 ポックスウイルス及びヘルペスウイルスによってコード化されたケモカイン結合タンパク質

	タンパク質	ウイルス	結合特異性	参照
vCKBP1	M-17	ポックスウイルス： 粘液腫ウイルス	広いCC	(ララニ等、1997)
vCKBP2	35 kDa, M-T1	ポックスウイルス： ワクシニア症ウイルス 牛痘ウイルス、	ケモカイン	(アルカミ等、1998、グラハム等、1997、シート等、2003、スミス等、1997、スミス及びアルカミ2000)
	vCCI	先天性四肢欠損症ウイルス、 粘液腫ウイルス、天然痘ウイルス、 orfウイルス		(パリー等、2000、バン
				ベルケット等、2000) (ブライアント等、2003)
vCKBP3	M3gG		ブロードブロード	
vCKBP4		ガンマヘルペスウイルス		

10

20

30

40

50

マウスガンマヘルペスウイルス
68アルファヘルペスウイルス
馬ヘルペスウイルス、ウシ亜科
ヘルペスウイルス

【0098】

表 2 SPRによって得られた各種のケモカインについてのEVE12タンパク質の親和性定数 (K_D)。純化された組み換え型タンパク質は低レベルでチオール結合されそしてBIAコ렉ス (BIAcoreX) を使用して高流量で注入された指示ケモカインの各種の濃度がBIAエパリュエーションソフトウェアを使用して測定された。

ケモカイン	K_D (nM)
mCCL21	0.5
mCCL25	0.7
mCCL27	2
mCXCL11	1
mCXCL13	1.5
mCXCL14	1.5

10

【0099】

表 3 vTNFRsを発現するために調製された組み換え型プラスミド。

参照の挿入は指示された一対のオリゴヌクレオチドを使用してウイルス性DNAからPCRによって増幅された (オリゴヌクレオチド配列に関しては表4参照)。EVは菌株ハンプステッドに関するものであり、そしてCPVは菌株ブライトンレッドに関するものである。

20

挿入	pBac1		RS	プラスミド
	オリゴ	Ta		
EVcrmd	5 ; Crmd - 7 3 ; Crmd - 9	55	BamHI XhoI	pMS1
EVcrmd - CRD1, 2	5 ; Crmd - 7 3 ; Crmd - 29	50	BamHI NotI	pMS42
EVcrmd - CRD1, 2, 3	5 ; Crmd - 7 3 ; PT - 3	50	BamHI NotI	pMS46
EVcrmd - CRD1, 2, 3, 4	5 ; Crmd - 7 3 ; PT - 4	50	BamHI NotI	pMS48
EVcrmd - CTD	5 ; PT - 1 3 ; PT - 2	50	NotI XhoI	pPT6
EVcrmd - CRD1, 2 - CTD	pMS42のNotI / XhoI にサブクローン化されたEVcrmdCt			pPT1
EVcrmd - CRD1, 2, 3 - CTD	pMS46のNotI / XhoI にサブクローン化されたEVcrmdCt			pPT2
CPVcrmdB - CTD	5 ; PT - 5 3 ; PT - 6	50	NotI XhoI	pPT5
EVcrmd - CRD1, 2, 3, 4	pMS48のNotI / XhoI にサブクローン化されたEVcrmdCt			pPT3
EVcrmd - CRD1, 2, 3, 4	5 ; SF - 1 3 ; PT - 7	50	EcoRI NotI	pPT4
CPVcrmd - CTD				

30

40

PMJ601				
挿入	オリゴ	Ta	RS	RpMJ601

50

E V c r m D	5 ; C r m D - 7 5 0	B a m H I p M S 1 1
	3 ; C r m D - 1 5	K p n I
E V c r m D -	5 ; C r m D - 7 5 0	B a m H I p M S 1 2
CRD 1 , 2	3 ; C r m D - 2 3	H i n d I I I

【 0 1 0 0 】

表 4 バキュロウイルス及びVVシステムにおいてE V c r m D及びC P V c r m Bの発現のために使用されるオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチド配列 (5 ; > 3 ;)

5 ; C r m D - 7	C G C G T T T A A A C G G A T C C A T G A A G A G A C A C C A T C A T A	10
3 ; C r m D - 9	C G C C T C G A G A T C T C T T T C A C A A T C A T T T G G T G G	
3 ; C r m D - 1 5	C G C G G T A C C T C A A T C T C T T T C A C A A T C A T T T G G	
3 ; C r m D - 2 2	C G C G G T A C C T T A A T C T A T G C T G T T A A A G G A C A G A T C A C	
3 ; C r m D - 2 3	G C G A A G C T T T T A C C A T G G G T A G T A T C C G G A T G G C A C A G C C A C	
3 ; C r m D - 2 4	G C G A A G C T T T T A C C A T G G A C A A G A G G T C T T G T T A A C A G G A T A C	20
3 ; C r m D - 2 9	G C G G C G G C C G C G T A T C C G G A T G C A C A G A C A C	
5 ; P T - 1	G C G G C G G C C G C C A A T T C G A G T A T A G G A A G C A G C A G T A C	
3 ; P T - 2	G C G C T C G A G A T C T C T T T C A C A A T C A T T T G G T G G	
3 ; P T - 3	G C G G C G G C C G C A T C T A T G C T G T A A A A G G A C A G A T C A C	
3 ; P T - 4	G C G G C G G C C G C A C A A G A G G T C T T G T T A A C A G G A T A C	30
3 ; P T - 5	G C G G C G G C C G C C A C T C G G A C G A C C A C T A C C G G T C T C	
3 ; P T - 6	G C G C T C G A G T A A A A A G T G G G T G G G A T A C T G G G A A	
3 ; P T - 7	G C G G C G G C C G C A C A C G A T G T G T C G T T G A C G G G A T A C	
5 ; S F - 1	G C G G G T A C C G A A T T C A C C A T G G A G T C A T A T A T A T T G C T A T T G C	

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 0 1 】

- 【 図 1 】異なるウイルスにおけるv T N F R s及びC T D同族体の概略を示している。
- 【 図 2 a 】C T D同族体を有するv T N F R s C r m B及びC r m Dの多重配列表を示している。
- 【 図 2 b 】C T D同族体を有するv T N F R s C r m B及びC r m Dの多重配列表を示している。
- 【 図 2 c 】C T D同族体を有するv T N F R s C r m B及びC r m Dの多重配列表を示している。
- 【 図 2 d 】C T D同族体を有するv T N F R s C r m B及びC r m Dの多重配列表を示している。
- 【 図 2 e 】C T D同族体を有するv T N F R s C r m B及びC r m Dの多重配列表を示し

10

20

30

40

50

ている。

【図2f】CTD同族体を有するvTNFRs CrmB及びCrmDの多重配列表を示している。

【図2g】CTD同族体を有するvTNFRs CrmB及びCrmDの多重配列表を示している。

【図3】IL-8(CXCL8)結合タンパク質としてのEV CrmDの同定を示している。

【図4】TNF結合及び活性抑制におけるCrmDCRD及びCTDの役割を示している。

【図5】EV CrmDに結合するケモカインを示している。

【図6】ラクダ痘ウイルス(CMLV)及びVaV CrmBタンパク質のアミノ酸配列表を示している。

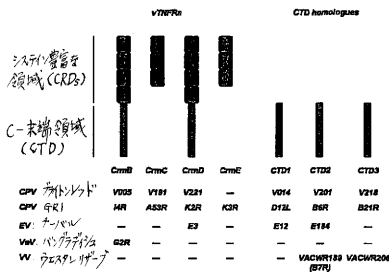
【図7】TNF及びケモカインに結合するVaV CrmBの各種の領域を示している。

【図8】VaV CrmBによるTNF及びケモカイン生物学的活性の抑制を示している。

【図9】VaV CrmBに対するケモカイン結合を示している。

【図10】VaV CrmBのCRD(1-4)に対するVVkD avCKBPの溶融がケモカインを結合する能力をCrmBに付与することを示している。

【図1】



【図2a】

CrmDCPV	-MMNTPSYLLLVYMFVVVSGDVP--YEHNGKCKNGCTYNSNLLCCKQCKDQDFGMVTHSCNT 58
CrmDEV	-MMKMPSYLLLVYMFVVVSGDVP--YYPINGKCKNGCTYNSNLLCCKQCKQDFGMVTHSCNT 58
CrmBVaV	-MKSVLVYLLFLSCIIING--RDAAPYPPNGKCKDFTYKHHLLCCLSCPEGYVSRIGLDS 58
CrmBCPV	-MKS--YIILLLLSCIIINSIDITPEPENGKCKDNEYKHHLLCCLSCPEGYVSRIGLDS 57
E12CPV	-MINININTILIFASLFVA--SFANDYP-----PQGFENKTYTD 37
E12EV	-MINININTILIFASLFVA--SFANDYP-----PQGFENKTYTD 37
B7RVV	-MYKLLITFLVIGALASY-----SNNEYT----- 24
B7REV	-MYKLLITFLVIGAVASY-----SNNEYT----- 24
B21RCPV	MMYGLIACLIFFVTSTASFLYIP-----VIPPTTEDK----- 33
B21RVV	MMYGLIACLIFFVTSTASFLYIP-----VIPPTISEDK----- 33

CrmDCPV	TSNT--KDKCPDGFETSI PNHIEFCLSCRCSSNHVETKSCSNTQDRVVCVCSGYICE 116
CrmDEV	TSNT--KDKCPDGFETSI PNHIEFCLSCRCSSNHVETKSCSNTQDRVVCVCSGYICE 116
CrmBVaV	KTNT--QCTPCGSGTFSRNHLEPACLSCRCSSNHVETKSCSNTQDRVVCVCSGYICE 116
CrmBCPV	KTNT--QCTPCGSGTFSRNHLEPACLSCRCSSNHVETKSCSNTQDRVVCVCSGYICE 116
E12EV	----- 117
E12CPV	----- 117
B7RVV	----- 117
B7REV	----- 117
B21RCPV	----- 117
B21RVV	----- 117

クラス w (1.82) 多重配列表

【配列表】

2008511296000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/009449

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K14/065 G01N33/50 C12N15/62 A61K38/16 C12N15/39		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search forms used) EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/71150 A (HUMAN GENOME SCIENCES, INC; WEI, YING-FEI; RUBEN, STEVEN, M; GENTZ, RE) 30 November 2000 (2000-11-30) sequences SEQ ID NO. 13,14	1-4, 6-18,20
X	US 5 464 938 A (SMITH ET AL) 7 November 1995 (1995-11-07) sequence SEQ ID NO. 6	1-3, 6-18,20
X	LOPAREV VLADIMIR N ET AL: "A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 95, no. 7, 31 March 1998 (1998-03-31), pages 3786-3791, XP002360863 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,2,4, 6-18,20
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*&* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 27 December 2005		Date of mailing of the international search report 10/01/2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Marinoni, J-C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2005/009449

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	-& DATABASE EMBL 'Online! 8 January 1995 (1995-01-08), LOPAREV V.N.: "Cowpox virus tumor necrosis factor receptor II homolog (crmD) gene, complete cds" XP002360963 retrieved from EBI Database accession no. U87234 the sequence -----	1,2,4, 6-18,20
X	DATABASE UniProt 'Online! 1 February 1991 (1991-02-01), "Protein B7 precursor." XP002360964 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:P68445 Database accession no. P68445 the sequence -----	1,2, 5-18,20
X	DATABASE UniProt 'Online! 1 June 2002 (2002-06-01), "CPXV218 protein." XP002360965 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q8QMNO Database accession no. Q8QMNO the sequence -----	1,2, 5-18,20
X	DATABASE UniProt 'Online! 1 August 1990 (1990-08-01), "Protein C13 (Protein B23R)." XP002360966 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:VC13_VACCV Database accession no. VC13_VACCV the sequence -----	1,2, 5-18,20
X	DATABASE UniProt 'Online! 1 June 2002 (2002-06-01), "CPXV014 protein." XP002360967 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q8QN47 Database accession no. Q8QN47 the sequence -----	1,2, 5-18,20
X	DATABASE UniProt 'Online! 1 October 2000 (2000-10-01), "C3R." XP002360968 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q9JFT2 Database accession no. Q9JFT2 the sequence -----	1,2, 5-18,20

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2005/009449

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt 'Online! 1 October 2003 (2003-10-01), "Tumour necrosis factor receptor." XP002360969 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q7TDW8 Database accession no. Q7TDW8 the sequence -----	1, 2, 4, 6-18, 20
X	READING PATRICK C ET AL: "Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence." VIROLOGY. 20 JAN 2002, vol. 292, no. 2, 20 January 2002 (2002-01-20), pages 285-298, XP002360864 ISSN: 0042-6822 the whole document -----	19
A	WO 98/36766 A (ISIS INNOVATION LIMITED; SMITH, GEOFFREY; ALCAMI, ANTONIO; ALCAMI, JOS) 27 August 1998 (1998-08-27) -----	
A	CUNNION K M: "Tumor necrosis factor receptors encoded by poxviruses" MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM 1999 UNITED STATES, vol. 67, no. 4, 1999, pages 278-282, XP002360865 ISSN: 1096-7192 the whole document -----	
A	ALCAMI ANTONIO: "Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors." NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY, vol. 3, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 36-50, XP009059358 ISSN: 1474-1733 -----	
A	ALCAMI A ET AL: "Viral mechanisms of immune evasion" TRENDS IN MICROBIOLOGY 01 SEP 2000 UNITED KINGDOM, vol. 8, no. 9, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 410-418, XP002360867 ISSN: 0966-842X -----	

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/009449

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SMITH V P ET AL: "Expression of secreted cytokine and chemokine inhibitors by ectromelia virus." JOURNAL OF VIROLOGY. SEP 2000, vol. 74, no. 18, September 2000 (2000-09), pages 8460-8471, XP002360868 ISSN: 0022-538X</p>	
A	<p>ALCAMI A ET AL: "Poxviruses: Capturing cytokines and chemokines" SEMINARS IN VIROLOGY 1998 UNITED STATES, vol. 8, no. 5, 1998, pages 419-427, XP002360869 ISSN: 1044-5773</p>	
A	<p>SEET BRUCE T ET AL: "Poxviruses and immune evasion." ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY. VOLUME 21 ANNUAL REVIEWS, 4139 EL CAMINO WAY, P. O. BOX 10139, PALO ALTO, CA, 94303-0139, USA SERIES : ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY (ISSN 0732-0582 (ISSN PRINT)), 2003, pages 377-423, XP002360870 ISSN: 0-8243-3021-8</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/009449

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0071150	A	30-11-2000	AU 5022400 A 12-12-2000 CA 2374674 A1 30-11-2000 EP 1191940 A1 03-04-2002 JP 2003502287 T 21-01-2003
US 5464938	A	07-11-1995	NONE
WO 9836766	A	27-08-1998	NONE

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	39/285 (2006.01)	A 6 1 K	39/285
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	33/00 (2006.01)	A 6 1 P	33/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D

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

(72) 発明者 ルイス アレグエーロ マリア ベゴナ
スペイン国, イ - 4 8 6 7 0 ベランゴ, バジヨ, レンダカリ アグイーレ 2 2

(72) 発明者 ホ イン
イギリス国, キャンブリッジ シービー 4 2 エヌビー, キャンキン ロード 1 5 5

(72) 発明者 サライバ マルガリダ
イギリス国, ロンドン エヌ 1 1 テーダブリュ, ミルナー スクエア 2 6 ビー

(72) 発明者 スミス ピセント ピー
イギリス国, キャンブリッジ シービー 4 1 エス, チェスタートン, ハイ ストリート 1 5 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA63 CA04 DA02 EA02 GA11 HA14 HA17
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA01 DA01 NA14 ZB081
ZB111 ZB211 ZB261 ZB331 ZB371 ZC412
4C085 AA03 BA86 CC08 DD62 EE01
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZB08 ZB11 ZB21 ZB26 ZB33
ZB37 ZC41
4H045 AA10 AA20 AA30 CA01 CA40 DA01 DA50 EA22 EA53 FA74

专利名称(译)	趋化因子结合病毒TNF受体和相关蛋白的活性		
公开(公告)号	JP2008511296A	公开(公告)日	2008-04-17
申请号	JP2007528782	申请日	2005-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	AlcamiPERTEJO ANTONIO		
申请(专利权)人(译)	Arukami Perutejo安东尼奥		
[标]发明人	アルカミペルテジョアントニオ アレジョヘルベルグアリ ルイスアレグエーロマリアベゴナ ホイン サライバマルガリダ スミスビセントピー		
发明人	アルカミペルテジョアントニオ アレジョヘルベルグアリ ルイスアレグエーロマリアベゴナ ホイン サライバマルガリダ スミスビセントピー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 A61K35/76 A61K38/00 A61K48/00 A61K39/285 A61P29/00 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61P29/00 C07K14/005 C07K14/70578 C07K2319/32 C12N2710/14143 C12N2710/24122 G01N2333 /70578 C07K14/065 G01N33/566 G01N33/6863		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 A61K35/76 A61K37/02 A61K48/00 A61K39/285 A61P29/00 A61P31 /12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00.111 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024 /HA14 4B024/HA17 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA01 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZB371 4C084/ZC412 4C085/AA03 4C085/BA86 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB08 4C087 /ZB11 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4C087/ZB37 4C087/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA01 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA50 4H045/EA22 4H045/EA53 4H045 /FA74		
代理人(译)	江藤刚		
优先权	2004002123 2004-09-02 ES		
其他公开文献	JP2008511296A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

病毒TNF受体和相关蛋白的趋化因子结合活性。本发明涉及来自痘病毒的病毒性肿瘤坏死因子受体(vTNFR)CrmB或CrmD或CTD同源物(CTD1,CTD2和CTD3)的C末端结构域(CTD)及其功能同源物,包括衍生物和片段,用于结合趋化因子及其类似物和/或增强TNFR的免疫调节特性或趋化因子与其相应细胞表面受体的结合结合和/或调节趋化因子生物活性。

