

(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2005-528087

(P2005-528087A)

(43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 39/00</b>	A 6 1 K 39/00 H	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-557609 (P2003-557609)	(71) 出願人	502285516 タノックス インコーポレーテッド アメリカ合衆国 テキサス州 77081 -2225 ヒューストン スイート 8 20 ループ セントラル ドライブ 4 888
(86) (22) 出願日	平成15年1月3日(2003.1.3)	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月2日(2004.9.2)	(72) 発明者	リ・カン アメリカ合衆国 テキサス州 77030 ヒューストン アpartment 291 ブレースウッド パーク ドライブ 2 255
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/000307		
(87) 国際公開番号	W02003/057252		
(87) 国際公開日	平成15年7月17日(2003.7.17)		
(31) 優先権主張番号	60/345,909		
(32) 優先日	平成14年1月3日(2002.1.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトマスト細胞により発現される膜タンパク質

## (57) 【要約】

脳、心臓、腎臓、肝臓、気管及び類似の組織中に比べ、ヒトマスト細胞及び肺中で高度に発現される、マスト細胞により発現される膜タンパク質。該タンパク質は、マスト細胞の脱顆粒を包含する、マスト細胞及び肺組織の機能の調節に関与する膜貫通タンパク質である。好ましいタンパク質は、アミノ酸1～82の細胞内領域と、アミノ酸83～105の膜貫通領域と、アミノ酸106～187の細胞外領域を有する187アミノ酸の膜貫通タンパク質(配列番号2)である。

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】  
配列番号 2 ;  
配列番号 2 の変異体 ;  
配列番号 2 の断片 ; 並びに  
配列番号 1 ;  
配列番号 1 の変異体 ; 及び  
配列番号 1 の断片から成る群より選ばれるヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列、  
から成る群より選ばれるアミノ酸配列を含む精製ポリペプチド。 10
- 【請求項 2】  
前記ポリペプチドが、ヌクレオチド 455 ~ 1018 を含む、配列番号 1 の断片によりコードされる、請求項 1 記載の精製ポリペプチド。
- 【請求項 3】  
前記ポリペプチドが、マスト細胞により発現される膜タンパク質又はそのリガンドに特異的に結合し、前記タンパク質の細胞性機能を阻害又は活性化するアゴニスト又はアンタゴニストである請求項 1 記載の精製ポリペプチド。
- 【請求項 4】  
前記ポリペプチドは、マスト細胞により発現される膜タンパク質の可溶性形態及びマスト細胞により発現される膜タンパク質がその天然のリガンドと相互作用する能力に干渉することができる、マスト細胞により発現される膜タンパク質の細胞外領域に由来する可溶性ペプチドから成る群より選ばれるアンタゴニストである請求項 3 記載の精製ポリペプチド。 20
- 【請求項 5】  
配列番号 2 のアミノ酸 106 ~ 187 又はそのアゴニスト断片から成る群より選ばれるアミノ酸配列を含む請求項 4 記載の精製ポリペプチド。
- 【請求項 6】  
前記アゴニスト又はアンタゴニストは抗体である請求項 3 記載の精製ポリペプチド。
- 【請求項 7】  
前記抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二特異的抗体及びヘテロ結合抗体から成る群より選ばれる請求項 6 記載の精製ポリペプチド。 30
- 【請求項 8】  
前記抗体はモノクローナル抗体である請求項 6 記載の精製ポリペプチド。
- 【請求項 9】  
配列番号 1 ;  
配列番号 1 の変異体 ;  
配列番号 1 の断片 ; 並びに  
配列番号 2 ;  
配列番号 2 の変異体 ; 及び  
配列番号 2 の断片から成る群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、  
から成る群より選ばれる単離ポリヌクレオチド。 40
- 【請求項 10】  
配列番号 2 のアミノ酸 106 ~ 187 又はその断片から成る群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む請求項 9 記載の単離ポリヌクレオチド。
- 【請求項 11】  
請求項 9 記載のヌクレオチド配列を含む発現ベクター。
- 【請求項 12】  
請求項 11 記載の発現ベクターを含む宿主細胞 ; 請求項 9 記載のヌクレオチド配列を含 50

む宿主細胞；及び請求項10記載のヌクレオチド配列を含む宿主細胞、から成る群より選ばれた単離された宿主細胞。

【請求項13】

マスト細胞により発現された膜タンパク質を、潜在的な、マスト細胞により発現された膜タンパク質アゴニスト/アンタゴニストに曝露し；そして

前記潜在的なアゴニスト/アンタゴニストが前記タンパク質と相互作用するか否かを決定することを含む、マスト細胞により発現される膜タンパク質アゴニスト及びアンタゴニストを同定するためのスクリーニング方法。

【請求項14】

マスト細胞により発現される膜タンパク質を発現しているマスト細胞又はマスト細胞により発現された、精製されたタンパク質を医薬に曝露し；そして

該医薬が該タンパク質と相互作用するか否か、又は該医薬が前記タンパク質のリガンドの生物学的機能を模倣するか否かを決定することを含む、所望の効能のために医薬を哺乳動物に投与した際に、マスト細胞活性の減少又は増大に伴う不所望の副作用を引き起こしやすいか否かを決定するためのスクリーニング方法。

【請求項15】

マスト細胞により発現される膜タンパク質を発現することができる細胞を、該マスト細胞により発現される膜タンパク質をコードするDNA又はRNAポリヌクレオチドの転写又は翻訳に干渉する分子に曝露することを含む、前記マスト細胞により発現される膜タンパク質をコードするDNA又はRNAポリヌクレオチドの転写又は翻訳に干渉することにより、マスト細胞により発現される細胞性膜タンパク質の発現をブロック又は変調する方法。

【請求項16】

前記分子は、前記マスト細胞により発現される膜タンパク質をコードするDNA又はRNAポリヌクレオチドの適正な転写又は翻訳に干渉する、アンチセンスヌクレオチド、RNAiヌクレオチド及びリボザイムからなる群より選ばれた請求項14記載の方法。

【請求項17】

前記分子は、前記マスト細胞により発現される膜タンパク質をコードするDNA又はRNAポリヌクレオチドの適正な転写又は翻訳に干渉するアンチセンスヌクレオチドである請求項14記載の方法。

【請求項18】

マスト細胞により発現される膜タンパク質を含むとしてもほとんど含まないことが知られている細胞、組織又は体液試料を患者から採取し；

該組織又は体液について、組織中の、マスト細胞により発現される膜タンパク質の存在を分析し；

前記組織又は体液中の、マスト細胞により発現される膜タンパク質の存在に基づいてある免疫疾患に対する患者の疾病素質を予測することを含む、マスト細胞により発現される膜タンパク質を発現する細胞の不所望の活性により引き起こされる疾病を発達させる、患者の疾病素質を診断する方法。

【請求項19】

マスト細胞により発現される膜タンパク質を発現する前記細胞はマスト細胞であり、前記不所望の活性はマスト細胞の脱顆粒である請求項18記載の方法。

【請求項20】

決まった濃度の、マスト細胞により発現される膜タンパク質を含むことが知られている細胞、組織又は体液試料を患者から採取し；

該組織又は体液について、組織中の、マスト細胞により発現される膜タンパク質の量を分析し；

前記組織又は体液中の、マスト細胞により発現される膜タンパク質の量を、正常な細胞、組織又は体液について確立された、決まった又は測定したレベルと比較した差異に基づいてある免疫疾患に対する患者の疾病素質を予測することを含む、マスト細胞により発現される膜タンパク質を発現する細胞の不所望の活性により引き起こされる疾病を発達させ

10

20

30

40

50

る、患者の疾病素質を診断する方法。

【請求項 2 1】

マスト細胞により発現される膜タンパク質を発現する前記細胞はマスト細胞であり、前記不所望の活性はマスト細胞の脱顆粒である請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 2】

マスト細胞により発現される膜タンパク質により媒介される疾患の予防又は治療に有効な量の、マスト細胞により発現される膜タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む、マスト細胞により発現される膜タンパク質により媒介される疾患の予防又は治療方法。

【請求項 2 3】

前記マスト細胞により発現される膜タンパク質のアゴニスト又はアンタゴニストは抗体である請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

細胞、組織若しくは体液又はそれらの成分を、マスト細胞により発現される膜タンパク質に結合する抗体に曝露し；そして

前記細胞、組織若しくは体液又はそれらの成分が、前記抗体に結合するか否かを決定することを含む、特定の細胞、組織又は体液中で発現された、マスト細胞により発現された膜タンパク質を検出するための診断方法。

【請求項 2 5】

単離された、マスト細胞により発現された膜タンパク質又はその抗原性断片を抗原として用いる；

マスト細胞により発現される組換え膜タンパク質を発現する宿主細胞を抗原として用いる；及び

マスト細胞により発現される膜タンパク質遺伝子を含み、マスト細胞により発現される膜タンパク質を発現する DNA 発現ベクターを抗体産生のための抗原として用いる、ことから成る群より選ばれる方法を含む、マスト細胞により発現される膜タンパク質と結合する抗体の生産方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 記載の方法を用いて生産された抗体。

【請求項 2 7】

前記抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二特異的抗体及びヘテロ結合抗体から成る群より選ばれる請求項 2 5 記載の抗体。

【請求項 2 8】

マスト細胞により発現された膜タンパク質及び混入物を含む組成物を、該マスト細胞により発現された膜タンパク質に結合できる抗体に曝露し；

前記マスト細胞により発現された膜タンパク質を該抗体に結合させ；

抗体 - マスト細胞により発現された膜タンパク質複合物を前記混入物から分離し；

前記マスト細胞により発現された膜タンパク質を前記複合物から回収することを含む、組換え細胞培養物、混入物及びネイティブな環境から、マスト細胞により発現された膜タンパク質を単離及び精製する方法。

【請求項 2 9】

前記抗体は、請求項 2 5 記載の抗体である請求項 2 8 記載の方法。

【請求項 3 0】

内発性のマスト細胞により発現される膜タンパク質遺伝子がヘテロ接合的又はホモ接合的に破壊されたゲノムを有し、生物学的に機能的なマスト細胞により発現される膜タンパク質の発現が抑制又は妨げられたトランスジェニックノックアウト動物。

【請求項 3 1】

医薬として許容できる担体と、1 若しくは 2 以上の、マスト細胞により発現される膜タンパク質又はその免疫原性断片とを含む、マスト細胞又は他のマスト細胞により発現される膜タンパク質に媒介される疾患に対して哺乳動物を免疫するのに有用なワクチン。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 2】

1 若しくは 2 以上の、マスト細胞により発現される膜タンパク質又はその免疫原性断片を注射することを含む、マスト細胞又は他のマスト細胞により発現される膜タンパク質に媒介される疾患に対して哺乳動物を免疫する方法。

## 【請求項 3 3】

医薬として許容できる担体と、マスト細胞により発現される膜タンパク質又はその抗原性断片をコードする核酸配列を含むベクターを含む、マスト細胞又は他のマスト細胞により発現される膜タンパク質に媒介される疾患に対して哺乳動物を免疫するのに有用なワクチン。

## 【請求項 3 4】

前記核酸配列は、配列番号 1 ; 配列番号 1 の変異体 ; 及び配列番号 1 の断片から成る群より選ばれる配列である請求項 3 3 記載のワクチン。

10

## 【請求項 3 5】

医薬として許容できる担体と、マスト細胞により発現される膜タンパク質又はその抗原性断片をコードする核酸配列を含むベクターを注射することを含む、マスト細胞又は他のマスト細胞により発現される膜タンパク質に媒介される疾患に対して哺乳動物を免疫する方法。

## 【請求項 3 6】

前記核酸配列は、配列番号 1 ; 配列番号 1 の変異体 ; 及び配列番号 1 の断片から成る群より選ばれる配列である請求項 3 5 記載の方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、広くは細胞性膜タンパク質に関し、特にマスト細胞により発現される膜タンパク質「MCEMP(s)」に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

マスト細胞は、骨髄中の造血幹細胞を起源とするが、その発達は、種々の末端組織中に遊走した後においてのみ完結する。成熟マスト細胞は、その表面にFc RIとして知られる高親和性のIgEレセプターを発現する。Fc RIは、特定のアレルギーと架橋している、レセプターに結合したIgEにより活性化され得る。マスト細胞はまた、IgEとは独立した機構によっても活性化され得る。例えば、補体タンパク質であるC3a及びC5aは、生体内でマスト細胞を活性化することが示されており、また、A23187のようなカルシウムイオノフォアはインビトロでマスト細胞を活性化することが示されている。

30

## 【0003】

マスト細胞は、ヒスタミン、トリプターゼ、プロテアーゼ、ペルオキシダーゼ及び好中球走化性因子のような、広範囲の予め形成された分泌性炎症メディエーターを含む。マスト細胞は、活性化されるとこれらの予め形成されたメディエーター並びにアラキドン酸代謝物(ロイコトリエン)、プロスタグランジン及びサイトカインのような、ある新たに合成された脂質メディエーターを周辺の組織に放出する。典型的には、該細胞は、誘導された免疫調節性及び前炎症性のサイトカイン、例えば、TNF , IL-4, IL-13, IL-5及びIL-10、並びにケモカインの両者を放出する。

40

## 【0004】

ヒトマスト細胞は、喘息及びアトピー性皮膚炎のような、多くの炎症性及びアレルギー性疾患の病因において重要な役割を果たすことがよく知られている。マスト細胞により放出される、予め形成されたメディエーター及び新たに合成されたメディエーターは、ほとんどのアレルギー性反応の初期症状を引き起こし、さらに、サイトカイン生産及び他の機構を介して、後期の反応及び慢性アレルギー性炎症の発現に寄与する。マスト細胞はまた、リンパ滲出性疾患、間質性肺疾患及びリウマチ性関節炎における滑膜のような、多くの

50

腫瘍性、線維性及び炎症性過程においても観察されている。さらに、マスト細胞の数は、炎症性腸疾患のような他の炎症性疾患において大きく増加する。マスト細胞はまた、心不全の発達においても役割を果たしている。心不全の間、マスト細胞はヒト心臓中において数が増加し、その密度は虚心性心筋症においてより高い。米国特許第6140348号は、マスト細胞の脱顆粒を阻害することによる、心不全の予防及び治療方法を開示している。マスト細胞はまた、多発性硬化症においても重要な役割を果たしている。多発性硬化症の脳病巣においてマスト細胞特異的遺伝子が発見され、マスト細胞安定剤が、多発性硬化症の動物モデルである、実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)の程度を緩和することが見出された。

**【0005】**

10

マスト細胞がアレルギー性及び他の炎症性疾患においてこのような重要な役割を果たしているので、マスト細胞の分化、増殖、接着、成熟化、活性化及び脱顆粒を調節する薬剤又は他の剤は、このような疾患の予防又は治療に有用であるかもしれない。従って、マスト細胞媒介疾患において役割を果たす新規なマスト細胞タンパク質を同定し、マスト細胞の活性を調節する薬剤及び方法を開発する必要性が存在する。

**【発明の開示】****【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

従って、本発明の目的は、マスト細胞活性の調節に関与する、マスト細胞により発現される新規な膜タンパク質「MCEMP(s)」を提供することである。

20

**【0007】**

本発明の他の目的は、MCEMPs及びそのリガンドに結合し、その機能及び活性を調節するアゴニスト又はアンタゴニストを提供することである。

**【0008】**

さらに本発明の他の目的は、MCEMPsに結合する抗体及びこのような抗体の生産方法を提供することである。

**【0009】**

さらに本発明の目的は、新規なMCEMPsをコードするヌクレオチド配列を提供することである。

**【0010】**

30

さらに本発明の他の目的は、新規なMCEMPsをコードするヌクレオチド配列を含むベクター及びこのようなベクターを含む宿主細胞を提供することである。

**【0011】**

さらに本発明の目的は、MCEMPアゴニスト及びアンタゴニストを同定するため、及び医薬が動物に投与された際に望ましくない副作用を引き起こしやすいか否かを決定するためのスクリーニング方法を提供することである。

**【0012】**

本発明の他の目的は、MCEMPsの発現を阻止又は調節する方法を提供することである。

**【0013】**

本発明の他の目的は、不所望のMCEMP活性により引き起こされる疾患を発達させる、哺乳動物の素因を診断する方法を提供することである。

40

**【0014】**

本発明のさらなる目的は、MCEMPにより媒介される疾患を、哺乳動物において予防又は治療する方法を提供することである。

**【0015】**

特定の細胞、組織又は体液により発現されるMCEMPsを検出するための診断方法を提供することである。

**【0016】**

組換え細胞培養物、混入物及びネイティブな環境からMCEMPsを単離及び精製する方法を提供することである。

50

## 【0017】

本発明のさらなる目的は、MCEMP媒介疾患に対するワクチン及び哺乳動物へのワクチン接種の方法を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0018】

これら及び他の目的は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する新規なMCEMP、該タンパク質をコードするヌクレオチド配列、並びに該ヌクレオチド配列を発現し該タンパク質を生産するベクター及び宿主細胞を提供することにより達成される。MCEMPは、脱顆粒、接着、遊走、アポトーシス及びマスト細胞メディエーターの放出のような、マスト細胞機能に影響を与えるのに有効な、アゴニスト及びアンタゴニスト抗体の生産に使用される。該抗体は、MCEMPアゴニスト及びアンタゴニストのスクリーニング、及び医薬が医療目的のために動物に投与された場合に望ましくない副作用を引き起こしやすいか否かのスクリーニングのために有用である。

10

## 【0019】

本発明の他のさらなる目的、特徴及び利点が、当業者にとって明らかになるであろう。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0020】

## 定義

「精製ポリペプチド」という語は、同定され、ネイティブな環境において精製されたポリペプチドに通常付随する少なくとも1つの混入ポリペプチドから分離されたポリペプチドを意味し、特に細胞性環境から分離されたポリペプチドを意味する。

20

## 【0021】

「単離されたポリヌクレオチド」という語は、同定され、ネイティブな環境において単離されたポリヌクレオチドに通常付随する少なくとも1つの混入ポリヌクレオチドから分離されたポリヌクレオチドを意味し、特に細胞性環境から分離されたポリヌクレオチドを意味する。

## 【0022】

「ネイティブ」という語は、ポリヌクレオチド、ポリペプチド配列又は他の分子を記述するために用いられた場合には、天然の供給源から分離することができる、ウイルス、原核細胞又は真核細胞のような生物中に存在し、構造、性質又は機能が意図的に修飾されていない、例えばポリペプチド又はポリヌクレオチド配列のような、天然中に見出される、ポリペプチド、ポリヌクレオチド又は他の分子を意味する。配列番号1に示されるヌクレオチド配列を有する、単離されていない細胞性ポリヌクレオチドはネイティブポリヌクレオチドであり、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する、精製されていない細胞性ポリペプチドはネイティブポリペプチドである。

30

## 【0023】

「配列同一性パーセント」という語は、2つ又はそれ以上のヌクレオチド又はアミノ酸配列の比較において見出される配列の類似性の百分率である。同一性パーセントは、例えば、MEGALIGNプログラム(DNASTAR, Inc., ウィスコンシン州Madison)を用いることにより電子的に決定することができる。MEGALIGNプログラムは、例えばクラスタル(clustal)法(例えばHiggins, D. G. and P. M. Sharp (1988) Gene 73:237-244を参照)である異なる方法により2つ又はそれ以上の配列のアラインメントを生成する。クラスタルアルゴリズムが、全てのペア間の距離を調べることにより、配列をクラスターにグループ化する。クラスターは、ペアとして整列され、次にグループに整列される。2つのアミノ酸配列、例えば配列Aと配列Bの類似性百分率は、配列Aの長さマイナス配列A中のギャップ残基の数マイナス配列B中のギャップ残基の数を、配列Aと配列Bの一致した残基の合計で割り、100倍することにより計算される。2つのアミノ酸配列の間で類似性が低い又ははないギャップは、類似性百分率の決定には含まれない。ヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、例えばHein, J. (1990) Methods Enzymol. 183:626-645に記載されたJotun Hein法のような、この分野において知られた方法により計数又は計算される。配列間の同一性

40

50

は、例えばハイブリダイゼーション条件を変えるなどのような、この分野において知られた他の方法によっても決定することができる。

【0024】

「変異体」という語は、ポリヌクレオチド配列を記述するために用いられた場合には、ネイティブの対応物(counterpart)と1又は2以上のヌクレオチドが異なり、かつ、ネイティブの対応物と同一又は類似する生物学的機能を有するか又はネイティブの対応物と同一又は類似する生物学的機能を有さないがネイティブの対応物を同定又は単離するプローブとして有用なヌクレオチド配列を意味する。好ましい変異体は、ネイティブの対応物と比較した場合に少なくとも85%、好ましくは少なくとも90~95%、最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、並びにストリンジェント条件下においてネイティブの配列又はその相補物に結合するヌクレオチド配列である。最も好ましい変異体は、ネイティブの対応物と同一のアミノ酸配列をコードするが、遺伝暗号の縮重に基づいてのみネイティブのヌクレオチド配列と異なるヌクレオチド配列である。

10

【0025】

「変異体」という語は、ポリペプチド配列を記述するために用いられた場合には、修飾、置換、挿入及び欠失を包含する変異によりネイティブの対応物と1又は2以上のアミノ酸が異なり、かつ、ネイティブの対応物と同一又は類似する生物学的機能を有するか又はネイティブの対応物と同一又は類似する生物学的機能を有さないがネイティブの対応物に結合する抗体を生産するための免疫原として、又はネイティブの対応物に対するアゴニスト若しくはアンタゴニストとして有用なアミノ酸配列を意味する。好ましい変異体は、ネイティブの対応物と比較した場合に少なくとも70%、好ましくは少なくとも85%、最も好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有するポリペプチドである。最も好ましい変異体は、保存的なアミノ酸置換を有するポリペプチドである。

20

【0026】

「断片」という語は、ポリヌクレオチドを記述するために用いられた場合は、ストリンジェント条件下においてそのネイティブな対応物又はその相補物と結合する、ネイティブな対応物のヌクレオチド配列サブセットを意味する。好ましい断片は、ネイティブ配列の少なくとも25ないし50の連続するヌクレオチドから成るヌクレオチド配列を有する。最も好ましい断片は、ネイティブ配列の少なくとも50ないし100の連続するヌクレオチドから成るアミノ酸配列を有する。

30

【0027】

「断片」という語は、ポリペプチドを記述するために用いられた場合は、ネイティブの対応物の何らかの生物活性を維持するか又はネイティブの対応物と結合する抗体を生産することができる免疫原として働く、ネイティブの対応物のアミノ酸配列サブセットを意味する。好ましい断片は、ネイティブ配列の少なくとも10ないし20の連続するアミノ酸から成るアミノ酸配列を有する。最も好ましい断片は、ネイティブ配列の少なくとも20ないし30の連続するアミノ酸から成るアミノ酸配列を有する。

【0028】

「アゴニスト」という語は、MCEMPsの正常な機能を高め、促進し又は刺激するあらゆる分子を意味する。アゴニストの1つのタイプは、そのリガンドと同様にMCEMPと相互作用する分子であり、抗体又は抗体断片を包含する。

40

【0029】

「アンタゴニスト」という語は、MCEMPsの正常な機能をブロックし、妨害し、阻害し又は中和するあらゆる分子を意味する。アンタゴニストの1つのタイプは、MCEMPsとそのリガンドの相互作用を妨げる分子であり、抗体又は抗体断片を包含する。アンタゴニストの他のタイプは、ネイティブなMCEMPsの適正な転写を阻害するアンチセンスヌクレオチドである。

【0030】

「保存的なアミノ酸置換」という語は、ポリペプチド中のアミノ酸が、類似の側鎖を有するアミノ酸で置換されていることを意味する。例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロ

50

イシン及びイソロイシンは、脂肪族側鎖を有し、セリン及びスレオニン、ヒドロキシ側鎖を有し、アスパラギン及びグルタミンはアミド含有側鎖を有し、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンは芳香族側鎖を有し、リジン、アルギニン及びヒスチジンは塩基性の側鎖を有し、システイン及びメチオニンはイオウ含有側鎖を有する。好ましい保存的アミノ酸置換は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、及びアスパラギン - グルタミンである。

【0031】

「ストリンジェント条件」という語は、0.2x SSC及び0.1% SDS中での42 における洗浄若しくは0.015 M NaCl、0.0015 Mクエン酸ナトリウム、0.1% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>での50 における洗浄を伴う、(1) 0.1%ウシ血清アルブミン、0.1% Ficoll、0.1% ポリビニルピロリドン、50 mMリン酸ナトリウムバッファー、pH 6.5、750 mM NaCl、75 mM クエン酸ナトリウムを含む50%(vol/vol)ホルムアミド中、42 におけるハイブリダイゼーション、(2) 5x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 Mクエン酸ナトリウム)、50 mMリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5x デンハルツ溶液、超音波処理サケ精子DNA (50 µg/ml)、0.1% SDS及び10%デキストラン硫酸を含む50%ホルムアミド中、42 におけるハイブリダイゼーション、又は同様な低イオン強度並びに高温洗浄剤及び同様な変性剤を用いる同様な操作を意味する。

10

【0032】

ここで用いる「アンチセンス」という語は、特定のDNA又はRNA配列に相補的なヌクレオチド配列を含むあらゆる組成物を意味する。「アンチセンス鎖」という語は、「センス鎖」と相補的な核酸鎖を意味する。アンチセンス分子はペプチド核酸を包含し、合成又は転写を包含するいずれの方法により製造されたものであってよい。相補的ヌクレオチドは、一旦細胞に導入されると、細胞により生産される天然の配列に結合して二本鎖を形成し、転写又は翻訳をブロックする。アンチセンス鎖を示すために「ネガティブ」、センス鎖を示すために「ポジティブ」という表記をときどき使用する。

20

【0033】

「ノックアウト」という語は、単一細胞、選択された複数の細胞又は哺乳動物の全細胞の内発性遺伝子(MCEMPs遺伝子のような)によりコードされるポリペプチドの少なくとも一部の発現を部分的に又は完全に減少させることを意味する。哺乳動物は、内発性遺伝子のうち1個の対立遺伝子が破壊された「ヘテロ接合ノックアウト」、又は内発性遺伝子の両方の対立遺伝子が破壊された「ホモ接合ノックアウト」であり得る。

30

【0034】

「MCEMP(s)」という語は、ウシ、ヒツジ、ブタ、マウス、ウマ及び好ましくはヒトを包含する、あらゆる種、特に哺乳動物から得られ、天然、合成、半合成又は組換えであるか否かに関わらずあらゆる供給源から得られる、実質的に精製されたMCEMPsのアミノ酸配列を意味する。

【0035】

ここに記載した特定の方法論、プロトコール、セルライン、ベクター及び試薬は、変わることがあるので、本発明は、これらに限定されるものではない。さらに、ここに記載した用語は、特定の具体例を記述するためにのみ用いており、本発明の範囲を限定することを意図しない。ここ及び添付の請求の範囲において用いる単数形の冠詞は、文脈から明らかにそうではない場合を除き、複数をも意味する。例えば、「1つの宿主細胞」は、複数のこのような宿主細胞をも包含する。

40

【0036】

遺伝暗号の縮重の故に、本発明のMCEMPsをコードする多くのヌクレオチド配列を生産することができる。これらの配列のいくつかは、いずれかの公知の天然のヌクレオチド配列に高度に相同的であろうし、いくつかはこれらに最小限に相同的であろう。本発明は、可能なコドンの選択に基づく組合せを選択することにより作られ得るヌクレオチド配列の全ての可能な個々の変異を意図する。これらの組合せは、天然のMCEMPsをコードするヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号に従って作ることができ、全ての

50

このような変異は具体的に開示されているものと考えられる。

【0037】

他に定義されている場合を除き、ここで用いる全ての技術及び科学用語並びに頭文字語は、当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本発明の実施において、ここに記載したのと類似する又は均等なあらゆる方法及び材料を用いることができるが、ここでは好ましい方法、装置及び材料を記載する。

【0038】

ここに記載する全ての特許及び文献は、本発明に用いることができるかもしれない、ここに報告されたタンパク質、酵素、ベクター、宿主及び方法を記載し及び開示する目的で、法により許される範囲内でここに組み入れられたものとする。もっとも、これらの記述は、本発明が先行発明よりも前に発明されたものではないとの自認であると解釈されるものではない。

10

【0039】

本発明

ポリペプチド

1つの局面において、本発明は、配列番号2；配列番号2の変異体；配列番号2の断片；並びに配列番号1、配列番号1の変異体及び配列番号1の断片から成る群より選ばれるヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列；から成る群より選ばれるアミノ酸配列を包含する精製されたポリペプチドを提供する。

【0040】

20

本発明の精製ポリペプチドは、ヒトマスト細胞及び肺において高度に発現される、マスト細胞により発現される膜タンパク質（「MCEMP(s)」）である。該タンパク質は、マスト細胞及び肺組織機能の調節に關与する膜貫通タンパク質である。好ましい具体例では、該タンパク質は、配列番号2に示す配列を有する、187アミノ酸から成るタンパク質（「MCEMP1」）である。この好ましいタンパク質は、アミノ酸1～82の細胞内領域、アミノ酸83～105の膜貫通領域及びアミノ酸106～187の細胞外領域を有する。

【0041】

本発明のポリペプチドは、該タンパク質に結合し、マスト細胞及び肺細胞の構造、性質、又は脱顆粒、接着、遊走、アポトーシス及びマスト細胞内容物の放出のような、生物学的機能を包含する機能に影響を与える抗体を創製するために使用される。好ましくは、該抗体は、マスト細胞メディエーターの産生を活性化するMCEMPアゴニストとして、又はヒスタミン、TNF 及びロイコトリエンのような、マスト細胞前炎症性メディエーターの産生を阻害するMCEMPアンタゴニストとして機能する。

30

【0042】

アゴニスト及びアンタゴニスト

他の局面では、本発明は、MCEMPに特異的に結合し、その発現又は作用を阻害し又は活性化するアゴニスト及びアンタゴニストを提供する。アゴニスト及びアンタゴニストのタイプは、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖類、少糖類、ヌクレオチド、有機分子、生物有機分子、ペプチド模倣物、薬剤及びその代謝物、並びに転写及び翻訳制御配列を包含するがこれらに限定されるものではない。

40

【0043】

1つの具体例では、該アンタゴニストは、MCEMPの可溶性形態及びMCEMPsの細胞外領域から誘導された、MCEMPがその天然のリガンドと相互作用する能力に干渉することができる可溶性ポリペプチドである。好ましくは、該アンタゴニストは配列番号2のアミノ酸106～187又はそのアンタゴニスト断片から成る群より選ばれるペプチドである。これらのアンタゴニストは、天然のリガンドに結合することにより該リガンドがMCEMPsに結合することをブロックし、該リガンドがそのネイティブのレセプターに結合することを防止する。

【0044】

好ましくは、該アゴニスト及びアンタゴニストは、MCEMPに特異的に結合し、例えば、

50

脱顆粒の活性化又は阻害及びマスト細胞メディエーターの放出の制御のようなその生物学的作用及び機能に影響する抗体である。

【0045】

アンタゴニスト抗体は、例えば脱顆粒及びマスト細胞内容物の放出により引き起こされる病気のような、マスト細胞の活性化により特徴付けられる疾患の予防又は治療に用いられる。アゴニスト抗体は、比較的低いマスト細胞メディエーター濃度により特徴付けられる疾患の予防又は治療に用いられる。

【0046】

該アゴニスト及びアンタゴニストは、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及びじんま疹のようなアレルギー疾患；移植片拒絶及び移植片対宿主疾患を包含する、移植関連疾患；水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎、乾癬を包含する自己免疫疾患又は免疫媒介皮膚疾患；リウマチ性関節炎、若年性慢性関節炎；炎症性腸疾患（すなわち、潰瘍性大腸炎、クローン病）；全身性エリテマトーデス；脊椎関節疾患；全身性硬化症（皮膚硬化症）；特発性炎症性筋疾患（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫汎血球減少症、発作性夜間ヘモグロビン尿症）、自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫媒介血小板減少症）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；糖尿病；免疫媒介腎疾患（腎炎、管状間質性腎炎）；多発性硬化症、特発性脱髄性多発性神経炎又はギラン バレー症候群、及び慢性炎症性脱髄多発性神経炎のような、中枢及び末梢神経系の脱髄疾患；感染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型及び他の非肝萎縮性ウイルス）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎及び硬化性胆管炎のような肝胆道系疾患；嚢胞性線維症、グルテン感受性腸症及びウィップル病のような炎症性及び線維性肺疾患；好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏症性肺実質炎のような肺の免疫性疾患を包含する種々の免疫疾患の治療に用いられるが、これらに限定されるものではない。

10

20

【0047】

抗体及び抗体生産

他の局面では、本発明は、MCEMPアゴニスト又はアンタゴニストとして機能する抗体を包含する、本発明のMCEMPsに結合する抗体及びこのような抗体の生産方法を提供する。1つの具体例では、該方法は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を包含する、抗原に対する抗体の生産のための公知のプロトコールにおいて、本発明のMCEMPsに結合する抗体を生産するために、単離されたMCEMPs又はその抗原性断片を抗原として用いることを含む。他の具体例では、該方法は、組換えMCEMPsを発現する宿主細胞を抗原として用いることを含む。さらなる具体例では、該方法は、MCEMP遺伝子を含むDNA発現ベクターを用いて、抗体を生産するための抗原としてのMCEMPを発現することを含む。

30

【0048】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、一価抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二特異的抗体及びヘテロ結合抗体を包含する抗体の生産方法は、当業者に周知である。

【0049】

ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、免疫原を単独で又はアジュバントと共に注射することにより哺乳動物中で生産することができる。典型的には、1回又は2回以上の皮下又は腹腔内注射を用いて哺乳動物に免疫原を注射することができる。免疫原は、目的のポリペプチド、又は、該ポリペプチドと、免疫される哺乳動物中で免疫原性を有することが知られている他のポリペプチドとを含む融合タンパク質を包含し得る。免疫原はまた、組換えMCEMPを発現し、又はMCEMP遺伝子を含むDNA発現ベクターを発現する細胞を包含し得る。このような免疫原性タンパク質の例として、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及びダイズトリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されるものではない。アジュバントの例として、フロインドの完全アジュバント及びMPL-TDMアジュバント（モノリン酸化リピッドA、合成トレハロースジコリノマイコレート(di

40

50

corynomycolate) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。免疫化プロトコールは、過度な実験なしに当業者によって選択され得る。

#### 【0050】

##### モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)により記載されたような、ハイブリドーマ法を用いて生産することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適当な宿主哺乳動物を免疫原で免疫し、該免疫原に特異的に結合するであろう抗体を産生する又は産生することができるリンパ球を誘起する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。免疫原は典型的には、目的のポリペプチド又は該ポリペプチドを含む融合タンパク質を包含する。ヒト由来の細胞が望まれるならば、一般的に、末梢血リンパ球(「PBLs」)細胞が用いられる。非ヒト哺乳動物由来の細胞が望まれるならば、脾細胞又はリンパ節細胞が用いられる。リンパ球は次いで、例えばポリエチレングリコールのような適切な融合剤を用いて不死化セルラインと融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp 59-103 (Academic Press, 1986))。不死化セルラインは、通常、癌化された哺乳動物細胞であり、特に齧歯動物、ウシ又はヒトのミエローマ細胞である。通常、ラット又はマウスのミエローマセルラインが用いられる。ハイブリドーマ細胞は、融合しなかった不死化細胞の増殖又は生存を阻害する1又は2以上の物質を好ましく含む、適切な培地中で培養することができる。例えば、親細胞が、ヒポキサンチングアニンホスフォリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)酵素を欠損している場合には、ハイブリドーマのための培地は典型的にはヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む(HAT培地)であろう。HAT培地は、HGPRT欠損細胞の増殖を防止する。

10

20

#### 【0051】

好ましい不死化セルラインは、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支持し、HAT培地のような培地に感受性であるものである。より好ましい不死化セルラインは、米国カリフォルニア州San DiegoのSalk Institute Cell Distribution Centerから入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍から誘導されたようなマウスミエローマライン並びに米国メリーランド州RockvilleのAmerican Type Culture Collectionから入手可能なSP2/0又はX63-Ag8-653である。ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマセルラインもまた、ヒトモノクローナル抗体の生産に用いられることが記載されている(Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。マウスミエローマセルラインNS0もまた用いることができる(European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire UK)。ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマセルラインは、この分野において周知であり、また、ヒトモノクローナル抗体を生産するために用いることができる。

30

#### 【0052】

次に、ハイブリドーマ細胞の培養に用いた培地中に目的のポリペプチドに対するモノクローナル抗体が存在するかどうかを分析する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により生産されるモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降又は例えば放射免疫測定(RIA)若しくは酵素結合免疫吸着測定(ELISA)のようなインビトロの結合アッセイにより測定する。このような技術及びアッセイはこの分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のScatchard解析により測定することができる。

40

#### 【0053】

所望のハイブリドーマ細胞を同定した後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、常法により増殖させることができる。この目的のための好ましい培地は、ダルベッコの修飾イーグル培地及びRPMI-1640培地を包含する。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物中で腹水として生体内で増殖させることもできる。

#### 【0054】

50

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、プロテイン A - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーのような従来の免疫グロブリンの精製方法により培地又は腹水から単離又は精製される。

【0055】

モノクローナル抗体はまた、例えば米国特許第4,816,567に記載されたような組換えDNA法によっても生産することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、例えば、マウス抗体のH鎖及びL鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブ (Innis M. et al. In "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications", Academic, San Diego, CA (1990), Sanger, F.S, et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 74:5463-5467 (1977))を用いることにより、従来方法を用いて容易に単離し配列決定することができる。ここに記載するハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。DNAは、一旦単離すると、発現ベクター中に入れることができる。該ベクターは次いで、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)細胞又は本来免疫グロブリンタンパク質を生産しないミエローマ細胞のような宿主細胞中にトランスフェクトする。組換え宿主細胞は、所望のモノクローナル抗体を生産するために用いられる。DNAはまた、例えば、相同マウス配列に代えてヒトのH鎖及びL鎖定常領域をコードする配列で置換し又は非免疫グロブリンポリペプチドをコードする配列の全部又は一部に該免疫グロブリンコード配列を共有結合することにより修飾することもできる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常領域を置換し又は抗体の1つの抗原結合部位の可変領域を置換してキメラ2価抗体を創製することができる。

【0056】

1価抗体は、免疫グロブリンL鎖及び修飾H鎖の組換え発現を用いて生産することができる。H鎖は一般的にFc領域中のいずれの点においても切断してH鎖架橋を防止することができる。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換し又は欠失させて架橋を防止することができる。同様に、1価抗体を生産するためにインビトロ法を用いることができる。公知の方法を用いる、抗体の消化は、抗体断片、好ましくはFab断片を生産するために用いることができる。

【0057】

抗体及び抗体断片は、McCafferty, et al., Nature 348:552-554 (1990)に記載された技術を用いて生成された抗体ファージライブラリーを用いて生産することができる。Clackson, et al., Nature 352:624-628 (1991)及びMarks, et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを用いた、マウス及びヒト抗体の単離をそれぞれ記載している。続いて発行された文献には、チェーンシャフリングによる高親和性(nM範囲)ヒト抗体の生産(Marks, et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992))並びに極めて大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染及びインビボ組換え(Waterhouse, et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993))が記載されている。このように、これらの技術は、モノクローナル抗体を単離するための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実行できる代替技術である。また、DNAは、例えば、相同マウス配列をヒトH鎖及びL鎖定常領域をコードする配列で置換する(米国特許第4,816,567; Morrison, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984))ことにより、又は非免疫グロブリンポリペプチドをコードする配列の全部若しくは一部を、免疫グロブリンコード配列に共有結合することにより修飾することができる。典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常領域を置換し、又は抗体の1つの抗原結合部位の可変領域を置換して、1つの抗原に対して特異性を有する1つの抗原結合部位と、異なる抗原に対して特異性を有する他の抗原結合部位を含む、キメラ2価抗体を創製することができる。

【0058】

抗体はまた、化学的融合ではなく電氣的融合を用いてハイブリドーマを形成して生産することもできる。この技術はよく確立されている。融合に代えて、例えばエプシタイン

バールウイルス又は癌化遺伝子を用いて、B細胞を癌化して不死化させることもできる「Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity」、Zurawaki, V. R. et al, in 「Monoclonal Antibodies」 Kennett R. H. et al監修、Plenum Press, N.Y. 1980, pp 19-33.

【0059】

ヒト化抗体

ヒト化抗体は、Winter in Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327(1988); 及びVerhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)により記載された方法を用いて生産することができる。ヒト化は、齧歯動物のCDR配列をヒト抗体の対応する配列で置換することにより達成される。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源から導入された1又は2以上のアミノ酸を有する。このような「ヒト化」抗体は、無損のヒト可変領域よりも実質的に少ない部分が非ヒト種からの対応配列により置換されている、キメラ抗体である。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくつかのCDR残基及びおそらくいくつかのFR残基が齧歯動物抗体の類似の部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。非ヒト(例えばマウス又はウシ)抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はFv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>若しくは非ヒト免疫グロブリン由来の最小の配列を含む他の抗原結合サブ配列のような免疫グロブリン断片である。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)からの残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット又はウサギのような非ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基によって置換されているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を包含する。ときどき、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基により置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体又は移入されたCDR又はフレームワーク配列のいずれにも見出されない残基を含む。一般に、ヒト化抗体は、全て又は実質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、全て又は実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である、実質的に全て又は少なくとも1つ、典型的には2個の可変領域を含む。ヒト化抗体は、最適には、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。

【0060】

ヒト抗体

ヒト抗体は、例えば、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991) and Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)に記載されたファージディスプレイライブラリーなどの、この分野で知られた種々の技術を用いて生産することができる。ヒトモノクローナル抗体は、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)及びBoemer et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)に記載された技術を用いて生産することができる。あるいは、免疫すると内発性免疫グロブリンの生産なしにヒト抗体の全レパートリーを産生することができる、例えばマウスのような、トランスジェニック動物が利用可能である。このようなトランスジェニックマウスは、カリフォルニア州FremontのAbgenix, Inc.及びニュージャージー州AnnandaleのMedarex, Inc.から入手可能である。キメラ及び生殖系列突然変異マウスの抗体H鎖ジョイニング(joining)領域(JH)遺伝子をホモ接合欠損させることにより、内発性抗体生産の完全な阻害がもたらされる。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイをこのような生殖系列突然変異マウスに導入し、抗原で攻撃するとヒト抗体を生産するであろう。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993); 及びDuchosal et al. Nature 355:258 (1992)を参照のこと。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーから誘導することもできる(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Vaughan, et al., Nature Biotech 14:309 (1996))。

【0061】

二重特異的抗体

10

20

30

40

50

二重特異的抗体は、2個のH鎖が異なる特異性を有する、2個の免疫グロブリンH鎖/L鎖ペアの組換え共発現により生産することができる。二重特異的抗体は、少なくとも2個の異なる抗原に対して結合特異性を有する、モノクローナルの、好ましくはヒト又はヒト化抗体である。本発明では、結合特異性のうちの1つはMCEMPに対するものであり、もう一方は、他のいずれの抗原に対するものでもよく、好ましくは細胞表面レセプター又はレセプターサブユニットに対するものである。免疫グロブリンのH鎖及びL鎖はランダムに組み合わされるので、これらのハイブリドーマは可能な10種類の異なる抗体の混合物を生産する。しかしながら、これらの抗体の1個のみが正しい二重特異的構造を有する。正しい分子の回収及び精製は、通常、アフィニティクロマトグラフィーにより達成される。

10

**【0062】**

所望の結合特異性を有する抗体の可変領域(抗原抗体結合部位)は、免疫グロブリン定常領域配列に融合することができる。融合は、好ましくは、ヒンジ、CH2及びCH3領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリンH鎖定常領域との間で行なわれる。好ましくは、L鎖結合に必要な部位を含む、第1のH鎖定常領域(CH1)が、融合の少なくとも1つに存在する。免疫グロブリンH鎖、及び、所望ならば、免疫グロブリンL鎖をコードするDNAを、別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に共トランスフェクトする。二重特異的抗体を生産するのに適した技術は、Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)に記載されている。

**【0063】****ヘテロコンジュゲート抗体**

ヘテロコンジュゲート抗体は、例えば、1つの抗体のアミノ基を、他の抗体又は他のポリペプチドのチオール基に結合することにより、公知のタンパク質融合法により生産することができる。必要ならば、チオール基は、公知の方法により導入することができる。例えば、抗体又は抗体断片とポリペプチド毒素とを含む免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いて、又はチオエーテル結合を形成することにより生産することができる。この目的のための適切な試薬の例として、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミデートを挙げることができる。このような抗体は、免疫系細胞に、不所望の細胞を標的とさせるため又はHIV感染を治療するために用いることができる。

20

**【0064】****ポリヌクレオチド**

他の局面において、本発明は、配列番号1、配列番号1の変異体及び配列番号1の断片並びに配列番号2、配列番号2の変異体及び配列番号2の断片から成る群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列から成る群より選ばれるヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。1つの具体例では、該単離されたポリヌクレオチドは、配列番号2の106~187のアミノ酸及びそのアンタゴニスト断片から成る群より選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を包含する。

30

**【0065】**

本発明の単離されたポリヌクレオチドは、好ましくは、マスト細胞及び肺機能の調節に関与するMCEMPsのコード配列である。該ポリヌクレオチドは、MCEMPsに特異的に結合し、マスト細胞の脱顆粒を阻害又は活性化するアゴニスト及びアンタゴニスト抗体を生産するために用いられる工程において抗原として機能するMCEMPsを生産するために用いられる。

40

**【0066】****ベクター及び宿主細胞**

他の局面では、本発明は、本発明のMCEMPsをコードするヌクレオチド配列を含むベクター、及びこのようなベクターを含む宿主細胞を提供する。該ベクターは、配列番号2、又は、1つの具体例では、配列番号1のヌクレオチド455~1018を、MCEMPsの発現に必要ないずれかの調節、発現又は他のベクター配列と共に含む。

**【0067】**

50

例えば、宿主細胞は哺乳動物細胞（例えばCHO細胞）、原核細胞（例えば大腸菌）又は酵母細胞（例えばサッカロミセス・セレビシエ）であり得る。脊椎動物の融合ポリペプチドを生産する方法がさらに提供され、これは、脊椎動物の融合ポリペプチドが発現するのに適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物から融合ポリペプチドを回収することを含む。本発明は、ネイティブパターンのグリコシル化が付随する又は付随しないタンパク質及びポリペプチドを包含する。酵母又は哺乳動物の発現系（例えばCOS-7細胞）内で発現した場合には、組換えタンパク質は、対応するネイティブのタンパク質と分子量及びグリコシル化パターンが同様か又は有意に異なり得る。哺乳動物のMCEMPsを、大腸菌のような細菌の発現系中で発現させると、非グリコシル化分子を与える。不活化されたN-グリコシル化部位を有する変異タンパク質も本発明の範囲に入る。このような変異体は、より均一で還元された炭水化物形態として発現される。

10

#### 【0068】

##### MCEMPsの組換え発現

単離され、精製された組換えMCEMPsは、本発明に従い、対応するヌクレオチド配列を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞中で該ヌクレオチド配列を発現させてポリペプチドを生産することにより提供される。

#### 【0069】

##### 発現ベクター

前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え発現ベクターは、周知の技術により作製することができる。発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルス又は昆虫遺伝子から誘導されたような、適切な転写又は翻訳調節ヌクレオチド配列と動作的に連結されたヌクレオチド配列を含む。調節配列の例として、転写プロモーター、オペレーター、エンハンサー、mRNAリボソーム結合部位、並びに転写及び翻訳の開始及び終止を制御する適切な配列を挙げることができる。ヌクレオチド配列は、適切なポリペプチドのために、調節配列が該ヌクレオチド配列と機能的に関連しているときに「動作的に連結」されている。従って、プロモーターヌクレオチド配列は、該プロモーターヌクレオチド配列が、適切なヌクレオチド配列の転写を制御するならば、MCEMP配列に動作的に連結されている。

20

#### 【0070】

通常複製開始点により与えられる、所望の宿主細胞中で複製する能力と、形質転換体を同定することができる選択遺伝子を追加的に発現ベクターに組み込んでよい。

30

#### 【0071】

さらに、天然にはMCEMPsに付随しない、適切なシグナルペプチドをコードする配列を発現ベクターに組み込むこともできる。例えば、シグナルペプチド（分泌リーダー）のためのヌクレオチド配列を、ポリペプチドが最初は該シグナルペプチドを含む融合タンパク質として翻訳されるように、フレームを併せてポリペプチド配列に融合することができる。意図する宿主細胞中で機能するシグナルペプチドは、適切なポリペプチドの細胞外分泌を促進する。シグナルペプチドは、ペプチドが細胞から分泌された後、ペプチドから切り離すことができる。

#### 【0072】

##### 宿主細胞

MCEMPsの発現のための適切な宿主細胞は、原核生物、酵母、古細菌及び他の真核生物細胞を包含する。細菌、菌類、酵母及び哺乳動物細胞宿主に使用するための適切なクローニング及び発現ベクターはこの分野において周知である。例えば、Pouwels et al. Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985)。ベクターは、プラスミドベクター、一本鎖若しくは二本鎖ファージベクター、又は一本鎖若しくは二本鎖RNA若しくはDNAウイルスベクターであり得る。このようなベクターは、DNA及びRNAを細胞内に導入するための周知の技術によって、ポリヌクレオチド、好ましくはDNAとして細胞内に導入することができる。ファージ及びウイルスベクターの場合には、ベクターもまた、感染及び形質導入のための周知の技術によって、パッケージ化又はカプセル化ウイルスとして

40

50

細胞内に導入することができ、このように導入することが好ましい。ウイスルベクターは、複製可能又は複製不能であり得る。後者の場合には、ウイルスの増殖は、一般的に相補的な宿主細胞内のみで起きる。本DNA構築物から誘導されるRNAを用い、無細胞翻訳系を用いて該タンパク質を生産することもできる。

#### 【0073】

本発明において宿主細胞として有用な原核生物は、大腸菌又はバチルスのような、グラム陰性又はグラム陽性生物を包含する。原核生物宿主細胞内では、ポリペプチドは、原核宿主細胞内での組換えポリペプチドの発現を容易にする、N末端のメチオニン残基を含んでいてもよい。N末端のMetは、発現された組換えMCEMPsから切り離してもよい。組換え原核宿主細胞発現ベクターのために一般的に用いられるプロモーター配列は、 $\lambda$ -ラクターマーゼ及びラクトースプロモーター系を包含する。

10

#### 【0074】

原核宿主細胞に用いられる発現ベクターは、一般的に1又は2以上の表現型選択マーカ-遺伝子を含む。表現型選択マーカ-遺伝子は、例えば、抗生物質耐性を与えるタンパク質をコードする遺伝子又は自己栄養要求を供給するタンパク質をコードする遺伝子である。原核宿主細胞のための有用な発現ベクターの例として、クローニングベクターpBR322 (ATCC 37017)のような市販のプラスミドから誘導される発現ベクターを挙げることができる。pBR322は、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性遺伝子を含む、従って、形質転換された細胞を同定する単純な手段を提供する。pBR322を用いて発現ベクターを構築するために、適切なプロモーター及びDNA配列がpBR322ベクターに挿入される。他の市販のベク

20

#### 【0075】

組換え原核宿主細胞発現ベクターに一般的に用いられるプロモーター配列は、T7 (Rosenberg, A.H., Lade, B. N., Chui, D-S., Lin, S-W., Dunn, J. J., and Studier, F. W. (1987) *Gene (Amst.)* 56, 125-135)、 $\lambda$ -ラクターマーゼ (ペニシリナーゼ)、ラクトースプロモーター系 (Chang et al., *Nature* 275:615, (1978)及びGoeddel et al., *Nature* 281:544, (1979))、トリプトファン(trp)プロモーター系 (Goeddel et al., *Nucl. Acids Res.* 8:4057, (1980))及びtacプロモーター (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412 (1982))を包含する。

30

#### 【0076】

本発明における宿主細胞として有用な酵母は、*Saccharomyces*, *Pichia*, *K. Actinomyces*及び*Kluyveromyces*属の酵母を包含する。酵母ベクターはしばしば、2 $\mu$ 酵母プラスミドからの複製開始点配列、自発的複製配列(ARS)、プロモーター領域、ポリアデニル化配列、転写終止のための配列、及び選択マーカ-遺伝子を含むであろう。酵母ベクターのために適したプロモーター配列は、とりわけ、メタロチオネイン、3-ホスフォグリセレートキナーゼ (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255:2073, (1980))又はエノラーゼ、グリセロールアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスフォフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスフォグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、ホスフォグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼのような他の糖分解酵素 (Holland et al., *Biochem.* 17:4900, (1978))のプロモーターを包含する。酵母発現に用いるのに適した他のベクター及びプロモーターは、Fleer et al., *Gene*, 107:285-195 (1991)にさらに記載されている。酵母及び酵母形質転換プロトコールのために適した他のプロモーター及びベクターは、この分野において周知である。

40

#### 【0077】

酵母形質転換プロトコールは、当業者に知られている。このようなプロトコールの1つ

50

は、Hinnen et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 75:1929 (1978)により記載されている。Hinnenのプロトコルは、選択培地中でTrp<sup>+</sup>sup.+形質転換体を選択するものであり、該選択培地は、0.67% 酵母窒素塩基、0.5% カザミノ酸、2% グルコース、10 μg/ml アデニン及び20 μg/ml ウラシルから成る。

#### 【0078】

この分野において周知の哺乳動物又は昆虫宿主細胞培養系もまた組換えMCEMPsの発現のために用いることができる。例えば、昆虫細胞中での外来タンパク質の生産のためのバキュロウイルス系(Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988))又は哺乳動物発現のためのチャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いることができる。哺乳動物宿主細胞発現ベクターのための転写及び翻訳制御配列は、ウイルスゲノムから切り出すことができる。一般的に用いられているプロモーター配列及びエンハンサー配列は、ポリオーマウイルス、アデノウイルス2、サルウイルス40(SV40)及びヒトサイトメガロウイルスから誘導される。SV40ウイルスゲノムから誘導されるDNA配列は、例えばSV40開始点、初期及び後期プロモーター、エンハンサー並びにスプライス及びポリアデニル化部位のような、哺乳動物宿主細胞中での構造遺伝子配列の発現のための他の遺伝子要素を提供するために用いることができる。ウイルス初期及び後期プロモーターは、両方とも、ウイルスの複製開始点をも含むかもしれない断片としてウイルスゲノムから容易に得られるので特に有用である。哺乳動物宿主細胞に用いるための発現ベクターの例は、この分野において周知である。

#### 【0079】

利益がある場合には、MCEMPsは、融合部分に結合されたMCEMPを有する融合タンパク質として発現させてもよい。融合部分は、しばしば、例えば、アフィニティクロマトグラフィーによる、融合タンパク質の単離及び精製を可能にすることによりタンパク質の精製に役立つ。融合タンパク質は、タンパク質のカルボキシル末端及び/又はアミノ酸末端に結合された融合部分を含むタンパク質をコードする、融合核酸配列で形質転換された組換え細胞を培養することにより生産することができる。好ましい融合部分は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、2価の金属イオンに結合することができるポリヒスチジン部分及びマルトース結合タンパク質を包含するがこれらに限定されるものではない。

#### 【0080】

MCEMPsは、認知できるリーダーペプチドを欠いているので、外来性のシグナルペプチドを可溶性MCEMPのN末端に有利に融合してその分泌を促進することができる。該シグナルペプチドは、宿主細胞からの分泌の後に切断することができる。細胞を溶解し、組換え可溶性タンパク質を細胞質から回収する必要性は従って回避される。本発明の1つの具体例において、可溶性融合タンパク質は、精製を容易にするため又はダイマーの形成のために追加された、第2のポリペプチドに融合されたMCEMP1の細胞外領域から誘導された第1のポリペプチドを含む。適当な第2のポリペプチドは、可溶性タンパク質の分泌を阻害しない。可溶性ポリペプチドの例は、全細胞外領域を含むものを包含する。本発明の可溶性タンパク質の代表例は、配列番号2のアミノ酸、配列番号2のアミノ酸1~82から選択されるポリペプチド、配列番号2のアミノ酸6~65、又はMCEMP1リガンドに結合する能力を維持するあらゆる断片を包含するが、これらに限定されるものではない。可溶性ポリペプチドを包含する、切断された形態の本発明のタンパク質は、多くの常法のいずれかにより調製することができる。

#### 【0081】

##### 発現及び回収

本発明によると、単離及び精製されたMCEMPsを上記した組換え発現系により生産することができる。該方法は、該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、ポリペプチドの発現を促進するのに十分な条件下で培養することを含む。該ポリペプチドは、次いで、用いる発現系に応じ、培地又は細胞抽出物から回収される。当業者に知られているように、用いる宿主細胞のタイプ及び組換えポリ

ペプチドが培地中に分泌されるか否かなどの因子に応じ、組換えポリペプチドを精製するための方法は異なるであろう。組換えポリペプチドを分泌する発現系を用いる場合には、先ず培地を濃縮する。濃縮工程に続き、濃縮物を、ゲルろ過媒体のような精製マトリックスに施すことができる。あるいは、例えば、ペンダントジエチルアミノエチル(DEAE)基を有するマトリックス又は基体のような、陰イオン交換樹脂を用いることもできる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、又はタンパク質精製に一般的に採用される他のタイプであり得る。また、陽イオン交換工程を用いることもできる。適切な陽イオン交換体は、スルホプロピル又はカルボキシメチル基を含む種々の不溶性マトリックスを包含する。さらに、疎水性RP-HPLC媒体(例えばペンダントメチル若しくは他の脂肪族基を有するシリカゲル)を用いた1又は2以上の逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)工程、イオン交換HPLC(例えば、ペンダントDEAE又はスルホプロピル(SP)基を有するシリカゲル)、又は疎水性相互作用HPLC(例えば、ペンダントフェニル、ブチル、又は他の疎水性基を有するシリカゲル)を用いて該タンパク質をさらに精製することができる。上記した精製工程のいくつか又は全て、及び種々の組合せは、この分野において周知であり、これらを採用して単離及び精製された組換えポリペプチドを提供することができる。

10

#### 【0082】

細菌培養において生産される組換えポリペプチドは、通常、先ず宿主細胞を破碎し、遠心し、不溶性ポリペプチドの場合には細胞ペレットから、可溶性ポリペプチドの場合には上清から抽出し、次いで、濃縮、塩析、イオン交換及びアフィニティ精製の1若しくは2以上、又はサイズ排除クロマトグラフィー工程により単離される。最後に、RP-HPLCを最終精製工程のために採用することができる。微生物細胞は、凍結-解凍サイクル、音波処理、機械的破碎又は細胞溶解剤の使用を包含する、いずれの便利な方法によっても破碎することができる。

20

#### 【0083】

##### アゴニスト及びアンタゴニストスクリーニング

他の局面では、本発明は、マスト細胞により発現される膜タンパク質アゴニスト及びアンタゴニストを同定するためのスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法は、マスト細胞により発現される膜タンパク質を、潜在的なマスト細胞により発現される膜タンパク質アゴニスト/アンタゴニストに曝露し、潜在的アゴニスト/アンタゴニストが該タンパク質と相互作用するか否かを調べることを含む。もし潜在的なアゴニスト/アンタゴニストが該タンパク質と相互作用するならば、特に、該タンパク質と結合するならば、患者に生体内投与され、ネイティブのマスト細胞により発現される膜タンパク質に曝露されたときに実際にアゴニスト又はアンタゴニストとして機能するであろうことが強く推測される。上記方法を用いて同定されたアゴニスト及びアンタゴニストは、メディエーターを生産することができるマスト細胞を該アゴニスト/アンタゴニストに曝露し、マスト細胞の脱顆粒を測定することにより、アゴニスト又はアンタゴニストとして特徴付けることができる。アゴニストは脱顆粒を増大し、アンタゴニストは脱顆粒を減少させるであろう。他のスクリーニング方法は、MCEMP DNA結合配列を含むレポーター遺伝子構築物で細胞をトランスフェクトすることを含む。好ましくは、潜在的アゴニスト/アンタゴニストは、有機化合物、又は抗体を包含するポリペプチドである。該スクリーニング法は、疾患、特に非疾患状態に比べて、サイトカインの生産が比較的低い又は比較的高いことにより特徴付けられる疾患の予防又は治療のために薬剤として機能するかもしれない化合物を同定するのに有用である。

30

40

#### 【0084】

##### 悪い副作用のスクリーニング

さらなる局面において、本発明は、望ましい効用を得るために医薬を動物に投与した場合に、マスト細胞活性、特に脱顆粒の減少又は増大に付随する望ましくない副作用を引き起こしやすいか否かを決定するためのスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法は、MCEMPを発現するマスト細胞又は精製MCEMPを医薬に曝露し、該医薬が該タンパク

50

質と相互作用するか否か又は該タンパク質のリガンドの生物学的機能を模倣するか否かを決定することを含む。もし、該医薬がMCEMPsと相互作用するならば、所望の効用のために該医薬を動物に投与すると、該医薬が悪い副作用を引き起こす蓋然性がある。悪い副作用は、マスト細胞の機能又は活性の不所望の変更、特に不所望の脱顆粒に起因する。この方法によりスクリーニングされる医薬は、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖類、少糖類、ヌクレオチド、有機分子、生物有機分子、ペプチド模倣物、薬理的剤及びその代謝物、並びに転写及び翻訳制御配列を包含するがこれらに限定されるものではない。好ましい具体例では、特定の効能のために投与される抗体をスクリーニングして、それがMCEMPsと交差反応するか、したがって、それが意図する効能のために投与された際に不所望の副作用を引き起こしやすいか否かを調べる。

10

## 【0085】

## MCEMP発現変調

さらに他の局面では、本発明は、MCEMPsをコードするDNA又はRNAポリヌクレオチドの転写又は翻訳を干渉することによりMCEMPsの発現をブロック又は変調するための方法を提供する。該方法は、MCEMPsを発現することができる細胞を、該タンパク質をコードするDNA又はRNAポリヌクレオチドの適正な転写又は翻訳を干渉する分子に曝露することを含む。該分子は、有機分子、生物有機分子、アンチセンスヌクレオチド、RNAiヌクレオチド又はリボザイムであり得る。

## 【0086】

好ましい具体例では、該方法は、MCEMPをコードするDNA又はMCEMPをコードするDNAの発現を調節するDNAと三重らせんを形成するアンチセンスであるポリヌクレオチドに細胞を曝露することにより、MCEMPsの発現をブロック又は変調することを含む。細胞は、該タンパク質の発現を阻害又は制御するのに十分な量のアンチセンスポリヌクレオチド又は三重らせん形成性ポリヌクレオチドに曝露される。また、本発明は、MCEMPをコードするDNA又はMCEMPをコードするDNAの発現を調節するDNAと三重らせんを形成するアンチセンスであるポリヌクレオチドを動物に投与することにより、動物内でのMCEMPsの発現をブロック又は変調する方法を提供する。動物は、該動物内においてMCEMPsの発現を阻害又は調節するのに十分な量のアンチセンスポリヌクレオチド又は三重らせん形成性ポリヌクレオチドを投与される。好ましくは、アンチセンスポリヌクレオチド又は三重らせん形成性ポリヌクレオチドはDNA又はRNAポリヌクレオチドである。

20

30

## 【0087】

細胞をアンチセンスポリヌクレオチドに曝露する方法及びアンチセンスポリヌクレオチドを動物に投与する方法は、この分野において周知である。好ましい方法では、該ポリヌクレオチドは、公知の方法を用いて細胞性ゲノム内に組み込まれ、細胞内で発現することを許される。発現されたアンチセンスポリヌクレオチドは、MCEMPsをコードするポリヌクレオチドに結合し、それらの転写又は翻訳を干渉する。

## 【0088】

該方法は、例えばマスト細胞や肺細胞のような種々のタイプの細胞の研究をする際にMCEMP発現を阻害するのに有用であり、また、非疾患状態と比較して過度の細胞活性、特に脱顆粒により特徴づけられる動物の疾患の予防又は治療のために有用である。

40

## 【0089】

## 疾病素質診断

他の局面では、本発明は、MCEMPsを発現する細胞の不所望の活性により引き起こされる疾病を発達させる、患者の疾病素質を診断する方法を提供する。該発明は、患者のある細胞、組織又は体液中にMCEMPsが存在し又はその量が増大していることは、該患者がある免疫疾患に対する疾病素質を有していることを示しているという発見に基づく。1つの具体例では、該方法は、MCEMPsを含むとしてもほとんど含まないことが知られている細胞、組織又は体液試料を患者から採取し、該組織又は体液について、組織中のMCEMPsの存在を分析し、MCEMPsの存在に基づいてある免疫疾患に対する患者の疾病素質を予測することを含む。他の具体例では、該方法は、定まったレベルのMCEMPsを含むことが知られている、細

50

胞、組織又は体液試料を患者から採取し、該組織又は体液について、組織中のMCEMPsのレベルを分析し、正常な細胞、組織又は体液について確立された、定められた又は測定されたレベルと比較した、該組織又は体液中のMCEMPsの量の変化に基づいてある免疫疾患に対する患者の疾病素質を予測することを含む。MCEMPsの定められたレベルは、文献値に基づいて知られた量又は正常な細胞、組織若しくは体液中の量を測定することにより事前に定められた量であり得る。特に、ある組織又は体液中のMCEMPsレベルを測定することにより、患者における免疫疾患を、特異的かつ早期に、好ましくは疾患が起きる前に検出することを可能にする。該方法を用いて診断することができる免疫疾患は、ここに記載した免疫疾患を包含するがこれらに限定されるものではない。好ましい具体例では、組織又は体液は、マスト細胞及び肺組織組織である。

10

#### 【0090】

##### 疾患の予防及び治療

他の局面では、本発明は、哺乳動物における、マスト細胞媒介疾患の予防又は治療方法を提供する。該方法は、疾患の予防又は治療に有効な量のMCEMPアゴニスト又はアンタゴニストを前記哺乳動物に投与することを含む。該アゴニスト又はアンタゴニストは、MCEMP又はそのリガンドに結合し、細胞の活性、特にマスト細胞の脱顆粒を調節して非疾患状態に特徴的なマスト細胞メディエーターレベルを生み出す。好ましくは、該疾患は、アレルギー、喘息、自己免疫又は他の炎症性疾患である。最も好ましくは、該疾患はアレルギー又は喘息である。

#### 【0091】

MCEMPアゴニスト又はアンタゴニストの投与量は、当該哺乳動物の年齢、大きさ及び性質並びに疾患により変化する。当業者は、これらの因子に基づき投与量を決定することができる。アゴニスト又はアンタゴニストは、例えば、疾患の状態を緩和するために2、3日にわたって1回若しくは数回投与したり、又はアレルギーや喘息の予防のために長期間にわたって定期的に投与したりするような、当該疾患に合った治療計画に沿って投与することができる。

20

#### 【0092】

アゴニスト及びアンタゴニストは、注射及びインプラントを用いた方法等を包含する、いずれの許容できる方法によっても哺乳動物に投与することができる。注射及びインプラントが好ましい。なぜなら、これらは、投与のタイミング及び投与量を精密に制御することができるからである。アゴニスト及びアンタゴニストは、好ましくは非経口投与される。ここで、非経口投与とは、静脈内、筋肉内若しくは腹腔内注射又は皮下インプラントを意味する。

30

#### 【0093】

注射により投与する場合には、アゴニスト及びアンタゴニストは、種々の賦形剤、アジュバント、添加剤及び希釈剤のようないずれかの生物適合性並びにアゴニスト及びアンタゴニストに対する適合性を有する担体を含む注射可能な製剤として哺乳動物に投与することができる。非揮発性発熱物質を有さない水、滅菌水及び静菌水のような水性担体も、注射可能な溶液を形成するのに適している。これらの形態の水に加え、数種類の他の水性担体を用いることができる。これらは、塩化ナトリウム、リンゲル、デキストロース、デキストロースと塩化ナトリウム、及び乳酸化リンゲルのような、滅菌可能な等張性注射組成物を包含する。綿実油、ゴマ油又は落花生油のような非水性担体、及びミリスチン酸イソプロピルのようなエステルもまた、該組成物のための溶媒系として用いることができる。さらに、抗菌保存料、酸化防止剤、キレート化剤及び緩衝剤を包含する、組成物の安定性、滅菌性及び等張性を高める種々の添加物を添加することができる。もっとも、用いられるいずれの担体、希釈物又は添加物も、生物適合性並びに本発明のアゴニスト及びアンタゴニストとの適合性を有している必要がある。

40

#### 【0094】

##### MCEMPポリペプチド診断薬

本発明の抗体はまた、特定の細胞、組織若しくは体液又はこれらの成分中で発現される

50

MCEMPsを検出する診断方法に用いることもできる。該方法は、細胞、組織若しくは体液又はこれらの成分を、MCEMPに結合する本発明の抗体に曝露し、該細胞、組織若しくは体液又はこれらの成分が該抗体に結合するかどうかを調べることを含む。該抗体に結合する細胞、組織若しくは体液又はこれらの成分は、MCEMPsを含む細胞、組織若しくは体液又はこれらの成分であると診断される。このような方法は、特定の細胞、組織又は体液が、MCEMPsを含むことが前から知られているあるタイプの細胞、組織又は体液の1つであるかどうかを決定するのに有用である。例えば、競合的結合アッセイ、直接又は間接サンドイッチアッセイ、及び異質又は均質段階で行なわれる免疫沈降アッセイのような、この分野において知られた種々の診断方法を用いることができる。

#### 【0095】

診断薬キットにモノクローナル抗体を用いるのではなく、MCEMPsに結合する、標識され検出可能な他の化合物を用いることによってMCEMPsの存在を検出することが可能である。このような化合物は、化合物ライブラリー及び/又はペプチドライブラリーをスクリーニングすることにより単離することができる。MCEMPsと相互作用することができるライブラリーのメンバーは、ペプチドのようなリンカー又は該化合物をマーカーに結合する他の共有結合化学結合物を用いて、蛍光マーカー又は放射マーカーで標識することができる。得られる標識化合物は、診断薬キットに用いて、周知の方法によりMCEMP陽性細胞の存在を示すことができる。

#### 【0096】

##### MCEMPポリペプチド精製

本発明の抗体はまた、組換え細胞培養物、混入物及びネイティブな環境からMCEMPsを単離及び精製する方法に用いることもできる。該方法は、MCEMPs及び混入物を含む組成物を、MCEMPsに結合できる抗体に曝露し、MCEMPsを該抗体に結合させ、抗体-MCEMP複合物を前記混入物から分離し、MCEMPsを前記複合物から回収することを含む。例えば、組換え細胞培養物又はネイティブの供給源からMCEMPsを回収する親和性精製などの、この分野において公知の種々の精製方法を用いることができる。この方法において、MCEMPsを選択する抗体は、Sephadex樹脂又はろ紙のような適当な支持体上に、この分野において周知の方法により不動化される。次に、不動化された抗体は、精製すべきMCEMPs及び混入物を含む試料組成物と接触させられる。次に、支持体は、不動化抗体に結合したMCEMPs以外の、試料中の実質的に全ての材料を除去することができる適当な溶媒により洗浄される。最後に、支持体は、MCEMPsを抗体から除去する、別の適当な溶媒で洗浄される。

#### 【0097】

##### ノックアウト動物

他の局面では、本発明は、内発性MCEMP遺伝子がヘテロ接合的又はホモ接合的に破壊されたゲノムを有し、生物学的に機能的なMCEMPsの発現が抑制又は妨げられたノックアウト動物を提供する。好ましくは、本発明のノックアウト動物は、内発性MCEMP遺伝子がホモ接合的に破壊されたものである。好ましくは、本発明のノックアウト動物はマウスである。ノックアウト動物は、当業者に知られた技術を用いて容易に作製することができる。遺伝子破壊は、生物学的に不活性なポリペプチドをもたらす、ポリペプチドコード領域のいずれかの部分への停止コドンの導入、ポリペプチドの発現を抑制し又は妨げる、プロモーター又は他の調節配列中への突然変異の導入、遺伝子を不活化する、該遺伝子中への外来配列の挿入、及び該遺伝子からの配列の欠失を包含する、数種類の方法により達成することができる。

#### 【0098】

哺乳動物の生殖系列中に特定のDNA配列を導入し、これらの配列(導入遺伝子)の各次世代への安定な伝達を達成する、数種類の技術が利用可能である。最も一般的に用いられている技術は、受精した卵母細胞の前核にDNAを直接マイクロインジェクションすることである。これらの卵母細胞から誘導されたマウス又は他の動物は、約10~20%の頻度で、育種により異なるトランスジェニックマウスラインをもたらすであろうトランスジェニックファウンダーである。胚の操作及びマイクロインジェクションを介して、マウスの

10

20

30

40

50

ようなトランスジェニック動物を発生させることはこの分野において常套化された。例えば、米国特許第4,736,866号、第4,870,009号及び第4,873,191号並びにHogan, B., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)。同様な方法が、他のトランスジェニック動物の生産にも用いられる。

【0099】

胚性幹細胞(「ES細胞」)技術は、特異的に欠失された遺伝子を有するノックアウトマウス(及び他の動物)を創製するために用いることができる。インビトロで培養でき遺伝的に修飾できる全能性胚性幹細胞を、マウス胚と凝集させるか又はこれにマイクロインジェクションし、該遺伝的修飾をその新生仔に伝えることができるキメラマウスを作出する。直接育種を介して、この遺伝子を欠失するマウスを得ることができる。遺伝的に修飾された動物の作出に数種類の他の方法が利用可能である。例えば、トランスジェニックマウスの作出のために、細胞質内精子注入技術(ICSI)を用いることができる。この方法は、精母細胞の頭を未受精卵母細胞の細胞質にマイクロインジェクションし、卵母細胞の受精及びその後の着床胚の適切な細胞分裂の活性化を引き起こすことが必要である。このようにして得られたマウス胚は、偽妊娠受容雌に移入される。該雌は、同腹のマウスを産むであろう。トランスジェニックマウスの作出に適用されるICSIでは、精子又は精母細胞の頭の懸濁液を、所望のDNA分子(導入遺伝子)を含む溶液とインキュベートする。これらは精子と相互作用し、一旦マイクロインジェクションされると、外来DNAのための担体として働く。卵母細胞の中に一旦入ると、該DNAはゲノムに組み入れられ、トランスジェニックマウスを与える。この方法は、伝統的な前核マイクロインジェクションプロトコールを用いた、これまでに得られているトランスジェニックマウスの収率よりも、高い収率(80%超)をもたらす。

【0100】

ワクチン

他の局面では、本発明は、医薬として許容できる担体と、1若しくは2以上のMCEMPs又はその免疫原性断片とを含む、マスト細胞又は他のMCEMP媒介疾患に対して哺乳動物を免疫するのに有用なワクチンを提供する。該ワクチンは、MCEMP媒介疾患に罹患している又は罹りやすい哺乳動物に投与される。該ワクチンは、免疫された哺乳動物体内において、MCEMPsと相互作用する抗体の形成を誘起し、MCEMPs発現細胞の活性及び機能を調節し、これはマスト細胞又は他のMCEMP発現細胞の濃度を調節することを包含する。該ワクチンは、1若しくは2以上のMCEMPs若しくはその免疫原性断片を単独で、又は適当なアジュバント及び/又は他の抗原及び治療剤と共に含むことができる。

【0101】

さらなる局面では、本発明は、1若しくは2以上のMCEMPs又はその免疫原性断片を哺乳動物に注射することを含む、マスト細胞又は他のMCEMP媒介疾患に対する、哺乳動物の免疫方法を提供する。MCEMP又はその免疫原性断片は、単独で、又は適切なアジュバント及び/又は他の抗原及び治療剤と共に注射することができる。

【0102】

一般的に、抗原は、主要組織適合性複合物(MHC)分子、すなわち、MHCクラスI分子及びMHCクラスII分子を用いて免疫系に提示される。MCEMPsのような内発性又は自己抗原は、通常、MHCクラスI分子に結合され、細胞障害性T細胞(CTL)に対して提示される。ウイルス抗原のような外来性抗原は、通常、MHCクラスII分子に結合し、B細胞と相互作用して抗体を産生するT細胞に対して提示される。

【0103】

MHCクラスII限定抗原又はクラスII抗原として知られる、クラスII経路を介して提示される抗原は、T細胞により認識され、T細胞を活性化する。これらの活性化されたT細胞は、クラスII抗原に対する完全な免疫応答を引き起こす。自己抗原は通常、MHCクラスII経路を介して免疫系に提示されないため、免疫系はこれらの自己抗原を外來抗原であると認識せず、このような抗原に対する完全な免疫応答を形成しない。

【0104】

10

20

30

40

50

1 具体例では、MCEMP抗原は、免疫応答を刺激又は操作するように設計された他の抗原と共に同時に又は同期内に注射される。好ましくは、MCEMP抗原は、MCEMP抗原及び細胞性免疫応答を誘起するように設計された他の抗原を含む構築物の一部として注射される。このような他の抗原は、T細胞への抗原提示を促進し、免疫系によって外来抗原と認識されないのが典型的には不完全な免疫応答を誘起する、MCEMPのような抗原に対するより高い免疫応答を引き起こすように設計される。

【0105】

典型的には、MCEMPはクラスII抗原と共に注射される。免疫系により自己抗原であると認識され、弱い又は不完全な免疫応答を誘起する、MCEMP抗原と共に、MHCクラスII経路を介して免疫系を刺激する他の抗原を用いることは、MCEMP抗原が免疫系により外来抗原であるとして扱われ、完全な免疫系応答を誘起することを確実にすることを助長する。好ましくは、MCEMP抗原及びクラスII抗原は、該両抗原が単一分子の部分である構築物の一部である。他の局面では、本発明は、MCEMP抗原及び他の抗原を単一の分子内に含む構築物を提供する。好ましくは、他の抗原はクラスII抗原である。

10

【0106】

他の局面では、本発明は、医薬として許容できる担体と、MCEMP又はその抗原性断片をコードする核酸配列を含むベクターとを含む、マスト細胞又は他のMCEMP媒介疾患に対して哺乳動物を免疫するのに有用なワクチンを提供する。好ましくは、該ワクチンは、配列番号1、配列番号1の変異体、及び配列番号1の断片から成る群より選ばれるヌクレオチド配列を含む。最も好ましくは、該ワクチンは、配列番号2(「MCEMP1」)に示す配列を有するMCEMP又はその抗原性断片、特に細胞外領域(アミノ酸106~187)若しくはその抗原性断片、をコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【0107】

本発明のヌクレオチドワクチンは、自己と非自己を識別することにおける免疫系の機能不全により引き起こされる疾患の予防又は治療に有用である。該ワクチンは、免疫系に自己防御的免疫性を惹起させ、したがって、その有害な活性を、このような応答が必要な時だけに限定する。特に、DNAワクチンは、体液性及び細胞性免疫応答の両方の生成のためにインピボで抗原を発現する新規な手段である。この技術は、外来の抗原及び腫瘍に対する免疫だけではなく、T細胞レセプター遺伝子又は自己サイトカインのような自己抗原に対する免疫を得るためにも成功的事であることがわかっている。DNAワクチン接種は、ある構築物の生産物に対する細胞性及び体液性応答の両者を誘起するので、病気の又は不所望の細胞を根絶するのに極めて有効なツールである。遺伝子発現カセットを生きた宿主に直接注射することにより、多くの細胞を、導入された遺伝子の産物の生産のための工場に形質転換する。これらの送達された遺伝子の発現は、重要な免疫学的結果をもたらす。新規に発現された抗原に対する宿主の特異的免疫活性化をもたらす。免疫化へのこのユニークなアプローチは、伝統的な抗原に基づくアプローチの欠点を克服することができ、安全で有効な予防的及び治療的ワクチンを提供する。宿主の正常細胞(非造血性)は、MCEMP抗原を発現し、免疫系に提示することができる。トランスフェクトされた細胞は、クラスI又はクラスII主要組織適合性複合物(MHCI, MHCII)と共に、該抗原の断片を細胞表面上に提示する。MHCIの提示は、トランスフェクトされた細胞を破壊するCTLを送る細胞媒介免疫応答への遭難信号として働く。一般的に、細胞変性ウイルスが宿主の正常細胞に感染すると、ウイルスのタンパク質が内発的に処理され、MHC分子により細胞の表面上にそのまま又は断片化されて提示される。正常細胞にトランスフェクトされ発現される、外来性の特定される核酸は、ウイルス感染を模倣することができる。

30

40

【0108】

ここに記載するベクター上にコードされる免疫原性融合ポリペプチドは、T細胞エピトープ部分とB細胞エピトープ部分とを含む。このベクターにコードされるT細胞エピトープ部分は、複数(すなわち、2、3、4、5、6又はそれ以上)のクラスII主要組織適合性(MHC)分子の抗原提示部位に結合してMHC:抗原:T細胞抗原レセプターから成る3成分複合物をT細胞抗原レセプターと形成することができる、広範囲又は「ユニバーサル」な

50

ヘルパーT細胞エピトープを含む。「非内発性タンパク質」とは、処置される個人にとって内発性ではないタンパク質を意味する。免疫原性融合ポリペプチドのT細胞エピトープ部分として有用な、このような非内発性タンパク質又はその断片は、破傷風トキソイド；ジフテリア毒素；クラスII MHC関連不変鎖；インフルエンザ赤血球凝集T細胞エピトープ；キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)；百日咳ワクチン、バシレカルメッテ-グエリン(BCG)結核ワクチン、ポリオワクチン、はしかワクチン、おたふくかぜワクチン、風疹ワクチン及びツベルクリンの精製タンパク質誘導体(PPD)を包含する公知のワクチンからのタンパク質；並びにAlexander et al. (Immunity, 1: 751-761 (1994))により記載された天然のアミノ酸を含む分子のような、複数のクラスII組織適合性分子の抗原提示部位に結合する合成ペプチドを包含する。MCEMPエピトープ部分に結合されると、T細胞エピトープ部分は、免疫原性融合ポリペプチドをして免疫寛容を破らせ抗体が内発性MCEMPsと反応するようにさせることができる。「免疫寛容を破る」とは、生物が通常は免疫原性であると認識しない、内発性BLSAのようなタンパク質に対する免疫応答を、生物が行なうように強制することを意味する。

10

## 【0109】

DNAワクチンは、最近では、種々の感染症に対する免疫化のための有望なアプローチであることが示されている。Michel, M L et al., Huygen, K, et al., and Wang, B, et al. 微生物抗原遺伝子を含む裸のDNAを送達することにより、宿主内での抗原特異的免疫応答が誘起される。DNA系ワクチンを用いた抗原特異的免疫応答の誘起は、いくつかの有望な効果を示す。Wolff, J. A., et al.最近の研究により、CEA及びMUC-1のためのDNA媒介ワクチンを用いた免疫化の潜在的な実行容易性が示された。Conry, R. M., et al. and Graham, R. A., et al.

20

## 【0110】

DNA系ワクチン接種は、生きた弱毒化ウイルスによる免疫化よりも、抗原の発現、毒性及び病原性の制御の程度が大きいことが示されている。前記薬理的に許容できる、DNAワクチン接種のための担体及び前記送達担体の構築、操作及び使用は、「T細胞調節のための遺伝子治療」と題する抗癌治療についてのDowへの米国特許第5,705,151号に詳細にされており、この特許は、その全体がここに記載されているのと同様にここに組み入れられたものとする。

## 【0111】

さらなる局面において、本発明は、医薬として許容できる担体と、MCEMP又はその抗原性断片をコードする核酸配列を含むベクターとを注射することを含む、マスト細胞又は他のMCEMP媒介疾患に対して哺乳動物を免疫する方法を提供する。好ましくは、該方法は、配列番号1、配列番号1の変異体、及び配列番号1の断片から成る群より選ばれるヌクレオチド配列を含むワクチンを注射することを含む。最も好ましくは、該ワクチンは、配列番号2(「MCEMP1」)に示す配列を有するMCEMP又はその抗原性断片、特に細胞外領域(アミノ酸106~187)若しくはその抗原性断片、をコードするヌクレオチド配列を含む。

30

## 【0112】

MCEMP1の同定

MCEMP1は、ヒトマスト細胞mRNAをテスターとして使い、ヒトTHP-1(~45%)、Daudi(~35%)及びTF-1(~20%)セルラインからのmRNAの組合せをドライバーとして用いたサブトラクティブハイブリダイゼーションにより同定した。約45のサブトラクティブクローンを単離し、配列決定し、公衆が利用できるヌクレオチド/タンパク質データベースで同一性を検索した。サブトラクティブハイブリダイゼーションにより単離された、369塩基対(bp)の挿入物を有するcDNAクローンのみが、部分的cDNA配列を含む多くのESTクローンに合致したが、これは、GenBankデータベースにおける既知の又は予測されるタンパク質をコードするいずれのcDNA配列とも有意な相同性を有していなかった。

40

## 【0113】

該369bpの挿入配列に基づく2つのオリゴヌクレオチドプライマー、5' CTCCAGAAAGGTGATGAA 3' (配列番号3)及び

50

5' TAGACAGAAAACACGCCGCAGTA 3' (配列番号4)

を合成し、ヒト末梢血白血球cDNAライブラリー (OriGene Technologies, Inc., メリーランド州Rockville)をスクリーニングするために用いた。数種類のcDNAクローンが単離され塩基配列決定された。該cDNA配列を、GenBankデータベース中のゲノム配列と比較することにより、mRNAの3つのオルタナティブスプライシング型が同定された。cDNAクローンのうちの2つは、異常なmRNA転写物であった。なぜなら、全ての3種類のリーディングフレームにおける推定翻訳産物が、停止コドンにより中断されるからである。しかしながら、cDNAクローンの過半数は、MCEMP1遺伝子中の7個のエクソンから誘導される、タンパク質産物を予測するものであった。このようなcDNAクローンの1つ(9E)は、完全長コード領域(564 bp)と、約450 bpの5'非翻訳領域と、約726 bpの3'非翻訳領域を含んでいた。

10

【0114】

さらに、開始メチオニンコドンのカバーするオリゴプライマー5' GACCATGGAAGTGGAGGAAATCTAC 3' (配列番号5)及び停止コドンのカバーするオリゴプライマー5' GCAGGTGCAGCCCATCTT 3' (配列番号6)を用いたRT-PCRにより、HMC-1セルラインからcDNAクローンが得られた。これらのcDNAは、187アミノ酸のポリペプチドをコードしていた。予測された開始メチオニンコドンは、完全なKozak配列モチーフ(ACCATGG)に伴われ、翻訳開始に最適なものとされていた。cDNAクローン間で、アミノ酸残基167において対立遺伝子変異(Ile Val)が見られ、これは、最初のコドン位置の単ヌクレオチド変異(ATT GTT)により引き起こされていた。

【0115】

コンピューターを用いた解析により、MCEMP1は、アミノ酸残基83~105に位置する膜貫通配列を有していることが予測された。認知できるN末端の疎水性リーダー配列は存在するように思われなかった。MCEMP1の予測される分子量は21 kDaであった。ヌクレオチド配列及びアミノ酸配列の両者をGenBank又はEuropean Molecular Biology Laboratoryデータベースで比較したところ、それはThe RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team 及びFANTOM Consortiumにより同定された推定マウス配列であるBAB25183と37%のアミノ酸の同一性を有していた。ねじ切りに基づく折り畳み認識法(threading-based fold recognition method (Kelley et al., J. Mol. Biol. 299:499-520 (2000)))を用いて三次元構造予測を行なった。短く述べると、既知のタンパク質構造のライブラリーを用い、MCEMP1配列を「ねじ切り」(threaded)し、適合性を点数化した。点数化システムにおいて4つの成分を用いた。1D及び3D配列プロフィールは、二次構造及びサルベーションポテンシャル情報(salvation potential information)と連結した。膜貫通らせんの予測により、MCEMP1が膜貫通領域(アミノ酸83~105)を含むことが示されたので、折り畳み過程は、N末端部分(アミノ酸1~82)とC末端部分(アミノ酸106~187)に分けて適用して正確性を改良した。その結果、N末端領域(アミノ酸6~65)は、免疫グロブリン様 サンドイッチ折り畳みをとると思われ、マウスT細胞レセプター 鎖の免疫グロブリンドメインと21%の同一性を有していた。

20

30

【0116】

実施例

本発明を、以下の好ましい具体例の実施例によりさらに例示する。もっとも、これらの実施例は、単に例示のために記載するものであり、他に断りがない限り本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

40

【0117】

実験方法

細胞培養

20% FBS (Sigma-Aldrich, ミズーリー州St. Louis), 2 mM L-グルタミン, 50 µM 2-ME, 100 U/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシン, 10 µg/ml ゲンタマイシン, 80 ng/ml SCF, 50 ng/ml IL-6及び5 ng/ml IL-10を添加したRPMI1640(Invitrogen)培地から成る培地中で、ヒト臍帯血CD34<sup>+</sup> (Bio-Whittaker, メリーランド州Walkersville)を9週間培養した。細胞を、抗トリプターゼモノクローナル抗体で染色してマスト細胞のパーセント

50

を決定した。細胞浮遊液を、 $5 \times 10^5$  細胞/mlの密度で播種し、サイトカイン添加培地は1週間毎に交換した。組換えヒトIgEを、IgE交差結合実験に用いた。他のセルラインは、ATCCの推奨に従って培養した。

#### 【0118】

##### 発現構築物及びトランスフェクション

Flag-タグ化MCEMP1 cDNAを、2個のオリゴプライマー  
5' CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGAAGTGGAGGAAATCTACAAGC 3' (配列番号7)及び5'  
TTGAGGTGAGGACTGTGGCATT 3' (配列番号8)を用いてPCRで増幅した。  
PCR産物をpcDNA3.1 D/5-Hisベクター(Invitrogen)にクローン化した。これにより、N末端  
10 10 P1-FVが生成された。MCEMP1のN末端領域とFc<sub>1</sub>融合構築物(MCEMP1T-Fc<sub>1</sub>)のために、  
アミノ酸1~83をコードする領域をPCRで増幅し、増幅産物を、さらなるPCRのサイクル  
によりFc<sub>1</sub>コード領域に連結した(SOEing, Ho, S. et al. 1989, Gene 77: 51-59)。融  
合タンパク質のコード領域をpSecTag/FRT/V5-His-TOPO (Invitrogen)にクローニングした  
。

Lipofectamine Plus system (Invitrogen)を用いて一過性トランスフェクションを行なっ  
た。20 µgのプラスミドDNAを、100 mm組織培養ディッシュ中の293T細胞にトランス  
フェクトし、40時間後、タンパク分析のために、細胞をPBS系、無酵素細胞分離バッ  
ファー(Invitrogen)中に回収した。

#### 【0119】

##### タンパク質抽出及びウェスタンブロット解析

$3 \times 10^5$ 個の細胞を100 µLのddH<sub>2</sub>O中に再懸濁し、等体積の2x試料ローディングバッ  
ファーを添加した後98 で5分間加熱することにより全細胞タンパク質試料を調製した。  
可溶性画分から膜画分を分離するために、 $5 \times 10^5$ 個の細胞を、ホモジナイゼーション又  
は凍結融解サイクルにより溶解操作に付した。ホモジナイゼーションでは、細胞を先ず15  
0 µLのddH<sub>2</sub>O中で10分間インキュベートし、次いで、#22シリンジ針を複数回通過させた  
。次に、10x溶解バッファー(200 mM Tris-HCl, pH7.6; 700 mM KCl; 50 mM EDTA)の1/10  
を加え、5分間インキュベートした。凍結融解法では、細胞を1x溶解バッファー中に懸  
濁し、凍結-融解を3回行なった。マイクロ遠心機における最大速度で遠心を行なうこと  
により、不溶性膜画分を可溶性タンパク質から分離した。該タンパク質を15% SDS-PAGEで  
30 30 分離した。抗Flagモノクローナル抗体(Sigma)又は抗V5モノクローナル抗体(Invitrogen)  
を用い、以前に記載した[26]ようにウェスタンブロットを行なった。

#### 【0120】

##### 免疫蛍光染色

トランスフェクトした293T細胞( $1 \times 10^6$ )を洗浄し、100 µLの1% BSA含有無酵素細胞分  
離バッファー(Invitrogen)で4 で20分間前インキュベートした。次に、細胞を、同じ  
バッファー中で、FITC-結合抗Flagモノクローナル抗体(20 µg/ml)(Sigma-Aldrich)又は抗  
V5モノクローナル抗体(10 µg/ml)(Invitrogen)と共に30分間インキュベートした。3回  
洗浄した後、100 µLの1%パラホルムアルデヒド含有1x PBS中に再懸濁した。あるいは、  
40 40 ヒト臍帯血由来マスト細胞、HMC-1及びTHP-1細胞を抗MCEMP1モノクローナル抗体と共にイ  
ンキュベートし、次いで二次抗体であるFITC-結合ヤギ抗マウスIgG抗体と共にインキュベ  
ートした。全ての試料は、FACScan (Becton Dickinson, ニュージャージー州Franklin La  
ke)を用いて及び/又は顕微鏡により分析した。

#### 【0121】

##### 抗MCEMP1モノクローナル抗体の生成

N末端コード領域(アミノ酸1~83)及びC末端コード領域(アミノ酸105~187)を  
含む抗原ディスプレイ構築物によりマウスを免疫した。ハイブリドーマクローンが生成さ  
れ、常法によりスクリーニングした。ELISAスクリーニングにおいて、我々は96ウェルプ  
レートでMCEMP1-FV又はMCEMP1融合タンパク質で被覆し、ハイブリドーマクローンの上清  
とインキュベートした。ヤギ抗マウスIgGを二次抗体として用いて信号を生じさせた。  
50 50

## 【 0 1 2 2 】

## ビオチン化膜タンパク質の免疫沈降

細胞表面膜タンパク質を、10 mg/mlのD-ビオチノイル-e-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Boehringer)/10 mMホウ酸ナトリウム, pH8.8/150 mM塩化ナトリウム中でビオチン化した。細胞をよく洗浄し、0.5% NP40及びプロテアーゼ阻害剤混合物(Boehringer)を含む1 x PBS中で溶解した。抗MCEMP1モノクローナル抗体及びプロテイン A -Sepharoseビーズ(Amersham)を用い、製造者の推奨に従って免疫沈降を行なった。免疫沈降したタンパク質をSDS-PAGEで分離し、ビオチン化したタンパク質を、ストレプトアビジン-HRP及びECL Detection Reagents (Amersham)により検出した。

## 【 実施例 1 】

## 【 0 1 2 3 】

## MCEMP1 mRNA発現の定量的リアルタイムPCR解析

Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Inc.)を用いてMCEMP1ヌクレオチド配列から、2組のオリゴヌクレオチドプライマー、  
5' AAGGTGATGAATGAATAGGACTGA 3' (配列番号 9) 及び  
5' CCACCGTGACATGCCGAGACT 3' (配列番号 10)  
を選択し、合成し、RT-PCR反応に用いてMCEMP1の発現を監視した。

## 【 0 1 2 4 】

CYBR Green試薬を用い、製造者の指示書に従い、ABI Prism 7900 (Applied Biosystems, Inc.)配列検出システムでリアルタイム定量PCRを行なった。次の細胞中でのMCEMP1の発現レベルを測定するためにRNAを単離した。Daudi (パーキットリンパ腫由来のBリンパ芽球セルライン、ATCC No. CCL-213), THP-1(単球性白血病セルライン、ATCC No. TIB202), TF-1 (骨髄前駆セルライン、ATCC No. CRL-2003), HMC-1 (マスト細胞セルライン)、一次単球、一次B細胞、一次好塩基球、CD34+前駆細胞、インビトロで培養した、第5週及び第9週の臍帯血由来マスト細胞(CBMC)、マクロファージ及びLPSで活性化されたマクロファージ、HPB-ALL(T細胞白血病セルライン)、一次リンパ球、好中球、一次ヒト血管内皮細胞(HUVAC)。

## 【 0 1 2 5 】

上記したセルラインからの等量のRNAを、反応におけるPCR鋳型として用いて閾値サイクル( $C_t$ )を得た。18S RNAからの既知の $C_t$ を用いて、前記 $C_t$ を正規化し、 $C_t$ を得た。異なるセルラインにおけるMCEMP1の遺伝子発現の相対レベルを比較するために、最低の発現レベルをベースとして用いて $C_t$ 値を計算し、次いでこれを真の倍数発現相違値(real fold expression difference values)に変換した。MCEMP1 mRNAは、第5週及び第9週の、インビトロで培養されたマスト細胞中に発現していることがわかった。中程度のレベルが単球中で見られた。調べた5種類のヒト組織では、MCEMP1はマスト細胞及び肺細胞中で高度に発現しているが、心臓、肝臓、脳、気管及び腎臓中ではほとんど発現が観察されなかった。

## 【 実施例 2 】

## 【 0 1 2 6 】

## MCEMP1タンパク質の発現

MCEMP1遺伝子産物を決定するために、2つのオリゴプライマー、  
5' CACCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGAAGTGGAGGAAATCTACAAGC 3' (配列番号 11) 及び  
5' TTGAGGTGAGGACTGTGGCATT 3' (配列番号 12)を用い、MCEMP1 cDNAをPCRにより増幅し、MCEMP1のN末端にFlagタグ配列を結合し、C末端にV5タグを融合した配列をpcDNA3.1D/V5-His vector (Invitrogen)にクローニングした。得られたクローン、pMCEMP1-FVを一過性に293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション40時間後、トランスフェクトした細胞を回収し、ホモジナイゼーション又は凍結-融解サイクル法により膜画分と細胞質画分に分離した。抗Flag又は抗V5モノクローナル抗体及び抗マウスIgG結合体を用いてウェスタンブロット解析を行なった。MCEMP1は、主な35 kDaのタンパク質として発現された。MCEMP1でトランスフェクトした細胞中には、マイナーな型の29及び32 kDaのタン

10

20

30

40

50

パク質も存在した。全てのタンパクバンドが、計算された分子量27 kDa(21 kDaプラス6 kDaのタグ)よりも大きかったという事実は、293T細胞中で、MCEMP1が翻訳後修飾、例えばグリコシル化を受けたことを意味している。細胞を分画すると、膜画分中にはMCEMP1が存在していたが、細胞質中にはほとんど存在していなかった。

【実施例3】

【0127】

MCEMP1-結合分子の投与

抗体及び生物学的に活性なその断片のような、本発明のアンタゴニスト的又はアゴニスト的MCEMP1結合分子は、適当な医薬製剤として、静脈注射、静脈大量注射、腹腔内、皮内、筋肉内、皮下、鼻内、気管内、脊髄内、頭蓋内及び経口投与を包含するがこれらに限定されない種々の投与経路で投与することができる。このような投与により、それらが内発性MCEMP1と結合することが可能になり、MCEMP1の作用を阻害/刺激する。これらのアンタゴニストは、MCEMP1の天然のリガンドの結合をブロックすることもできる。

10

【0128】

このような抗体の推定投与量は、血清中10ないし500 µg/mlである。実際の投与量は、最適投与量を決定するための常法、すなわち、インビトロ及びインビボ実験からの投与量範囲を外挿し、次いで該範囲内の種々の投与量を投与してどれが最も効果的かを決定する事により臨床試験において決定することができる。

【実施例4】

【0129】

細胞内局在化

MCEMP1がタイプII膜貫通タンパク質として発現されるか否かを決定するために、MCEMP1 FVでトランスフェクトした細胞を、ホモジナイゼーション又は凍結-融解法により溶解し、遠心により膜画分(ペレット)を可溶性画分から分離した。抗Flagモノクローナル抗体及び抗V5モノクローナル抗体の両者による検出により、MCEMP1は主として膜画分に存在しており、可溶性画分中にはほとんど検出されなかった。Flag-およびV5-タグ化MCEMP1が細胞表面上に発現されるか否か及び膜中でのその向きをさらに調べるために、MCEMP1 FVでトランスフェクトした細胞を、生きた状態で、FITC-結合抗Flagモノクローナル抗体又は抗V5モノクローナル抗体と共にインキュベートした。蛍光顕微鏡観察及びフローサイトメトリー分析により、抗V5モノクローナル抗体は膜上のMCEMP1-FVに結合したが、抗Flagモノクローナル抗体は膜に結合しなかったことが示された(表1)。これらの結果は、MCEMP1が、C末端を細胞膜の外側に露出し、N末端が細胞質内に入っているタイプII膜貫通タンパク質であることを示している。

20

30

【実施例5】

【0130】

MCEMP1に対するマウスモノクローナル抗体の特徴付け

マウスモノクローナル抗体(mAb)をMCEMP1に対して生成させ、ELISA、FACS及びウェスタンブロット分析によりスクリーニングした。mAbのうちの3つをよく特徴付けた。抗体クローンAZ1C11はMCEMP1-FV及びMCEMP1T-Fcの両方に結合したが、抗体クローンAZ1A8及びAZ3H6は、全長のMCEMP1融合タンパクにのみポジティブに結合した。このことは、AZ1A8及びAZ3H6は、MCEMP1のC末端領域と特異的に相互作用し、クローンAZ1C11はMCEMP1のN末端領域と相互作用することを示している。MCEMP1-Fc融合タンパク質でトランスフェクトしたTHP-1及び293t細胞の免疫蛍光染色により、上記結果、すなわち、抗体クローンAZ1A8及びAZ3H6は、生きた細胞中のMCEMP1のC末端に結合し、クローンAZ1C11は生きた細胞に結合しなかったことが確認された。しかしながら、ウェスタンブロット分析では、AZ1A8及びAZ3H6はMCEMP1に結合せず、クローンAZ1C11がMCEMP1に結合した。

40

【実施例6】

【0131】

臍帯血由来マスト細胞(CBMC)及びHMC-1細胞中のネイティブMCEMP1の発現及び検出

リアルタイムRT-PCR分析により、MCEMP1がマスト細胞中及び2種の長く培養されたセル

50

ラインHMC-1及びTHP-1中において、区別的に発現されていることが示された。CBMC, HMC-1及びTHP-1細胞の免疫蛍光染色によりこれらの結果が確認された。ネイティブMCEMP1は、抗体クローンAZ1A8及びAZ3H6によりこれらの3種類の細胞内で検出されたが、試験した他の細胞内では検出されなかった。抗体のCBMC及びHMC-1細胞への結合は、用量依存的、すなわち、抗体のインプットが多いほど、抗体で染色した細胞による蛍光強度のシフトが大きかった。CBMC中でのMCEMP1の発現は、ビオチン化膜タンパク質の免疫沈降によりさらに分析した。抗MCEMP1抗体により分子量約21kDのタンパク質が検出されたが、試験した他の抗体のいずれによっても検出されなかった。検出されたMCEMP1は、アミノ酸配列から予測される分子量と同じ分子量を有していたので、ネイティブMCEMP1はグリコシル化されていない。

10

## 【0132】

## 【表1】

MCEMP1-FVでトランスフェクトされた293T細胞の免疫蛍光染色

抗体	抗V5		抗Flag	
	生きている	固定	生きている	固定
pV252-FV	+	+	-	+
pcDNA3.1	-	-	-	-

## 【0133】

明細書において、本発明の典型的な好ましい具体例を開示し、また、特定の用語を用いたけれども、それらは一般的かつ記述的な意味のみに用いており、限定の目的のために用いているものではなく、本発明の範囲は請求の範囲に記載されている。明らかなように、上記の教示に照らし、本発明の多くの修飾及び変形が可能である。従って、請求の範囲内において、本発明は、特に記述したものと異なるように実施することができることが理解される。

20

## 【配列表】

[2005528087000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/00307
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : A61K 39/395, 39/00; G01N 33/53; C12P 21/06, 15/00; C07H 21/04; C12N 15/00 US CL : 424/194.1, 130.1; 435/ 7.1; 435/69.1, 225.3, 320.1; 536/23.1, 24.5; 800/21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/194.1, 536/23.1,		
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) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 9830582 A2 (GENETICS INSTITUTE, INC.) 16 July 1998 (16.07.1998), especially page 56.	1-12 and 33-36
A	US 6,207,876 B1 (KELLEMS et al) 27 March 2001 (27.03.2001), column 73, line 53 bridging column 74.	13-24 and 30-32
X	WILLHEIM et al. Purification of Human Basophils and Mast Cells by Multistep Separation Techniques and mAb to CDw17 and CD117/c-kit J. Immunol. Methods. May 1995, Vol. 182, No. 1, pages 115-129, especially materials and methods.	25-29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"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 19 May 2003 (19.05.2003)		Date of mailing of the international search report 24 JUL 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Phuong Huynh</i> Telephone No. (703) 308-0196

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US03/00307

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

PIR\_73, SwissProt\_40, SPTREMBL\_21, Geneseq\_101002, EMBASE, BIOSIS, SCISEARCH, CAPLUS, MEDLINE on STN

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	N	4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 39/395	Y	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/00	A 6 1 K 45/00		4 H 0 4 5
A 6 1 P 1/04	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 P 1/16	A 6 1 P 1/00		
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 1/04		
A 6 1 P 5/14	A 6 1 P 1/16		
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 3/10		
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 5/14		
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 7/04		
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 7/06		
A 6 1 P 11/02	A 6 1 P 9/00		
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/00		
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 11/02		
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 11/06		
A 6 1 P 17/04	A 6 1 P 13/12		
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/00		
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 17/04		
A 6 1 P 21/00	A 6 1 P 17/06		
A 6 1 P 25/02	A 6 1 P 19/02		
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 21/00		
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 25/02		
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 29/00		
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 29/00	1 0 1	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 31/12		
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 37/02		
C 0 7 K 14/705	A 6 1 P 37/06		
C 0 7 K 16/28	A 6 1 P 37/08		
C 1 2 N 1/15	A 6 1 P 43/00	1 1 1	
C 1 2 N 1/19	C 0 7 K 14/705		
C 1 2 N 1/21	C 0 7 K 16/28		
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/15		
C 1 2 P 21/00	C 1 2 N 1/19		
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 1/21		
G 0 1 N 33/15	C 1 2 P 21/00	C	
G 0 1 N 33/50	C 1 2 P 21/08		
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/15	Z	
	G 0 1 N 33/50	Z	
	G 0 1 N 33/53	D	
	C 1 2 N 5/00	A	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, 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, M X, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 リ・ユーチェン  
 アメリカ合衆国 テキサス州 77030 ヒューストン アpartment 291 ブレーズウ  
 ッド パーク ドライブ 2255
- (72)発明者 ワン・シェンウー  
 アメリカ合衆国 テキサス州 77479 シュガーランド シラー パーク レーン 4711
- (72)発明者 フ・グアンファイ  
 アメリカ合衆国 テキサス州 77054 ヒューストン 893 ケンブリッジ 8282
- (72)発明者 ヤオ・ツェンビン  
 アメリカ合衆国 テキサス州 77479 シュガーランド ウェザーストーン サークル 52  
 30

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB01 BB10 BB50 BB51 CB01 DA36 FA11 FB03 FB12  
 GC15  
 4B024 AA01 AA15 BA31 BA44 BA61 BA63 CA01 CA11 DA02 EA04  
 HA11 HA17 HA20  
 4B064 AG20 AG26 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA90 AB01 AB04 BA02 CA24 CA25 CA44 CA45 CA46  
 4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 AA17 BA01 BA02 BA22 BA35  
 CA53 MA17 MA66 MA67 NA14 ZA022 ZA202 ZA222 ZA342 ZA362  
 ZA532 ZA552 ZA592 ZA662 ZA682 ZA752 ZA812 ZA892 ZA942 ZA962  
 ZB052 ZB072 ZB082 ZB112 ZB132 ZB152 ZB332 ZC062 ZC352 ZC412  
 4C085 AA03 AA13 AA14 AA16 AA33 BB11 CC21 GG02 GG03 GG06  
 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA20  
 ZA22 ZA34 ZA36 ZA53 ZA55 ZA59 ZA66 ZA68 ZA75 ZA81  
 ZA89 ZA94 ZA96 ZB05 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB33  
 ZC06 ZC35 ZC41  
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20 EA31 EA54  
 FA72 FA74

专利名称(译)	由人肥大细胞表达的膜蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005528087A</a>	公开(公告)日	2005-09-22
申请号	JP2003557609	申请日	2003-01-03
[标]申请(专利权)人(译)	唐纳士公司		
申请(专利权)人(译)	Tanokkusu公司		
[标]发明人	リカン リユーチェン ワンシェンウー フグアンファイ ヤオツエンビン		
发明人	リ・カン リ・ユーチェン ワン・シェンウー フ・グアンファイ ヤオ・ツエンビン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/02 A61P29/00 A61P31/12 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07H21/04 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/00 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/567 G01N33/569		
CPC分类号	A01K2217/075 A61K39/00 A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/02 A61P29/00 A61P31/12 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/705 C07K16/28 C12Q1/6886 C12Q2600/136 G01N33/56972 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K39/00.H A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.Y A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P25/02 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/12 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.111 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/00.C C12P21/08 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB01 2G045/BB10 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA15 4B024/BA31 4B024/BA44 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/HA11 4B024/HA17 4B024/HA20 4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/BA35 4C084/CA53 4C084/MA17 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA202 4C084/ZA222 4C084/ZA342 4C084/ZA362 4C084/ZA532 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB052 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB332 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4C084/ZC412 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA33 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG06 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA20 4C086/ZA22 4C086/ZA34 4C086/ZA36 4C086/ZA53 4C086/ZA55 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA75 4C086		

/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZA96 4C086/ZB05 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB11  
 4C086/ZB13 4C086/ZB15 4C086/ZB33 4C086/ZC06 4C086/ZC35 4C086/ZC41 4H045/AA11 4H045  
 /AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA31  
 4H045/EA54 4H045/FA72 4H045/FA74

代理人(译) 谷川栄次郎

優先権 60/345909 2002-01-03 US

外部链接 [Espacenet](http://Espacenet)

摘要(译)

与人脑，心脏，肾脏，肝脏，气管和类似组织相比，肥大细胞表达的膜蛋白在人肥大细胞和肺中高表达。蛋白质是参与肥大细胞和肺组织功能的调节，包括肥大细胞脱粒的跨膜蛋白。优选的蛋白是187个氨基酸的跨膜蛋白，其具有包含氨基酸1至82的细胞间结构域，包含氨基酸83至105的跨膜结构域和包含氨基酸106至187的细胞外结构域 ( SEQ ID NO : 2 )。

MCNP1-FVでトランスフェクトされた293T細胞の免疫蛍光染色

抗体	抗V5		抗Flag	
	生きている	固定	生きている	固定
pV252-FV	+	+	-	+
pcDNA3.1	-	-	-	-