

(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2016-522165

(P2016-522165A)

(43) 公表日 平成28年7月28日(2016.7.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/47 (2006.01)</b>	C07K 14/47 ZNA	4B024
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B063
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18	4B065
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4C084
<b>C12N 1/19 (2006.01)</b>	C12N 1/19	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-505852 (P2016-505852)	(71) 出願人	515274918 イエオーイステイトゥート・エウロペオ・ ディ・オンコロジア・エッセ・エツレ・エ ツレ
(86) (22) 出願日	平成26年4月4日 (2014.4.4)		
(85) 翻訳文提出日	平成27年12月1日 (2015.12.1)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/056878		
(87) 国際公開番号	WO2014/162007		イタリア・ミラノ・1-20121・ミラ ノ・ヴィア・フィロドランマティチ・10
(87) 国際公開日	平成26年10月9日 (2014.10.9)		
(31) 優先権主張番号	13162326.6	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成25年4月4日 (2013.4.4)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胸腺間質性リンパ球新生因子フラグメント及びその使用

## (57) 【要約】

本発明は、炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理の処置又は/及び予防及び/又は診断及び/又はモニタリングにおける使用のための、a) ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列、その誘導体及びフラグメントからなるポリペプチド、b) 前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、d) 前記ポリヌクレオチドを含むベクター、c) 前記ポリペプチドを発現する遺伝子操作された宿主細胞、又はd) TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のアンタゴニストからなる群より選択される化合物に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項1】**

- a) ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列のフラグメント、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列のフラグメントであるポリペプチド、
- b) 前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- c) 前記ポリヌクレオチドを含むベクター、
- d) 前記ポリペプチドを発現する遺伝子操作された宿主細胞からなる群より選択される化合物。

10

**【請求項2】**

TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列が、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)のアミノ酸配列から、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列からなる、請求項1に記載の化合物。

**【請求項3】**

ポリペプチドが、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)のアミノ酸配列のaa.4~63から本質的になる配列、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列に含まれる、請求項2に記載の化合物。

20

**【請求項4】**

ポリペプチドが、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)の配列のaa.4~40若しくはaa.24~63から、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列から本質的になる配列を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の化合物。

**【請求項5】**

ポリペプチドが、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)の配列のaa.4~40又はaa.24~63から本質的になるアミノ酸配列から、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列からなる、請求項1から4のいずれか一項に記載の化合物。

30

**【請求項6】**

ポリペプチドが、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)のアミノ酸配列のaa.4~63から、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列から本質的になる、請求項2に記載の化合物。

**【請求項7】**

免疫調節活性を有する、請求項1から6のいずれか一項に記載の化合物。

**【請求項8】**

免疫調節活性が、抗炎症活性である、請求項7に記載の化合物。

40

**【請求項9】**

医学的使用のための、好ましくは、炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の処置及び/若しくは予防における使用のため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の診断及び/若しくは予後診断のための方法における使用のため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置の有効性のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置のスクリーニングのための、請求項1から8のいずれか一項に記載の化合物。

50

## 【請求項10】

炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理の処置及び/又は予防における使用のための、

- a) ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列からなるポリペプチド、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列からなるポリペプチド、
- b) 前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- c) 前記ポリヌクレオチドを含むベクター、
- d) 前記ポリペプチドを発現する遺伝子操作された宿主細胞からなる群より選択される化合物。

10

## 【請求項11】

炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の診断及び/若しくは予後診断のための方法における使用のため、

並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置の有効性のモニタリングのため、

並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置のスクリーニングのための、

- a) ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列からなるポリペプチド、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列からなるポリペプチド、並びに/或いは、ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)からなるポリペプチド、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列からなるポリペプチド、
- b) 前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- c) 前記ポリペプチドの少なくとも1つに選択的に結合可能なその抗体又はフラグメント

20

d) 前記ポリヌクレオチドに特異的なプライマー及び/又はプローブ、からなる群より選択される化合物。

30

## 【請求項12】

TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列が、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)のアミノ酸配列から、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成若しくは誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列からなる、請求項10から11のいずれか一項に記載の使用のための化合物。

## 【請求項13】

前記誘導体が、配列番号1と、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子由来のコードされた対応する領域のアミノ酸配列と、少なくとも41%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%の同一性のパーセンテージを有するポリペプチドを含む群から選択される、請求項1から8のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項9から12のいずれか一項に記載の使用のための化合物。

40

## 【請求項14】

ポリペプチドの合成の誘導体である、請求項1から8及び13のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項9から13のいずれか一項に記載の使用のための化合物。

## 【請求項15】

前記フラグメントが、少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも17、より好ましくは少なくとも20、更により好ましくは少なくとも37又は40アミノ酸の長さを有するポリペ

50

プチドを指す、請求項1から8及び13のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項9から12のいずれか一項に記載の使用のための化合物。

【請求項16】

ポリヌクレオチドが、RNA又はDNAからなる群より選択され、好ましくは前記ポリヌクレオチドがDNAであるか、及び/又は前記ポリヌクレオチドが配列、配列番号1をコードする配列を含む、請求項1から8、13から15のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項9から15のいずれか一項に記載の使用のための化合物。

【請求項17】

ベクターが、プラスミド、ウイルス粒子及びファージからなる群より選択される発現ベクターである、請求項1から8のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項9から10及び12から16のいずれか一項に記載の使用のための化合物。

10

【請求項18】

宿主細胞が、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、動物細胞、及び植物細胞からなる群より選択され、好ましくは前記宿主細胞が動物細胞である、請求項1から8及び13から15のいずれか一項に記載の化合物又は請求項9から10及び12から16のいずれか一項に記載の使用のための化合物。

【請求項19】

炎症応答によって特徴づけられる障害又は病理の処置又は/及び予防における使用のための、TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のアンタゴニストである化合物であって、前記アンタゴニストが、

20

- TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)に、若しくはそのフラグメントに選択的に結合し、TSLPの長いアイソフォームの活性を中和することができる、抗体若しくは抗体フラグメント、

- TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)受容体に選択的に結合可能な抗体若しくは抗体フラグメント、又は

- 単離されたTSLPの長いアイソフォーム受容体、  
である、化合物。

【請求項20】

前記抗体が、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体、又はその合成若しくは組換えの誘導體であり、好ましくは前記抗体が、ヒト化モノクローナル抗体である、請求項11から12又は請求項19のいずれかに一項に記載の使用のための化合物。

30

【請求項21】

ヒト又は動物が、障害又は病理に罹患している、請求項9から20のいずれか一項に記載の使用のための化合物。

【請求項22】

少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤及び請求項1から8のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項10から21のいずれか一項に記載の化合物を含み、任意選択で、少なくとも1つの免疫調節剤を更に含む、医薬組成物。

【請求項23】

請求項1から8のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項10から21のいずれか一項に記載の化合物、及び少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤を含み、任意選択で、少なくとも1つの免疫調節剤を更に含む、炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理の処置又は/及び予防における使用のための医薬組成物。

40

【請求項24】

全身的、経口、局部、好ましくは直腸、又は局所の投与のための請求項22又は23に記載の医薬組成物。

【請求項25】

対象における、炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の診断及び/若しくは予後診断のため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治

50

療的な処置の有効性のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置のスクリーニングのための方法であって、

- a) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列、並びに/或いは

b) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応するタンパク質

からなる少なくとも1つのポリペプチドの量を測定する工程、

又は、対象から得られた単離された生物学的サンプル中で、前記ポリペプチドのうちの1つ又は複数をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの量を測定する工程、並びに

- この値を対照サンプル由来の値と比較する工程

を含む方法。

【請求項26】

以下の式:a)の量/b)の量に従って、a)の量とb)の量との間の比を算出する工程を更に含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

a)及び/又はb)の量を測定する工程が、

- 対象から得られた生物学的サンプルと、

a) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列、並びに/或いは、

b) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応するタンパク質

に選択的に結合することができる少なくとも1つの抗体とを、抗体-抗原複合体の形成のための条件下で接触させる工程と、

- 前記複合体を検出する工程と

を含む、請求項25又は26に記載の方法。

【請求項28】

炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の診断及び/若しくは予後診断のため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置の有効性のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置のスクリーニングのためのキットであって、

- a) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列、並びに/或いは

b) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応するタンパク質

からなる少なくとも1つのポリペプチドの量を測定する手段、

並びに/或いは、前記ポリペプチドの1つ又は複数をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの量を測定する手段、

並びに任意選択で、

- 制御手段

を含むキット。

【請求項29】

炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理を処置及び/又は予防するための方法であって、

10

20

30

40

50

- a) ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列からなるポリペプチド、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列からなるポリペプチド、
- b) 前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
- c) 前記ポリヌクレオチドを含むベクター、
- d) 前記ポリペプチドを発現する、遺伝子操作された宿主細胞
- からなる群より選択される化合物の有効量を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項30】

ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列のフラグメントが、請求項1から8のいずれか一項に規定の、又は請求項13から18のいずれか一項に規定のポリペプチドである、請求項25から27及び29のいずれか一項に記載の方法、又は請求項28に記載のキット。

【請求項31】

炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理を処置及び/又は予防するための方法であって、有効量のTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のアンタゴニストを、それを必要とする対象に投与する工程を含み、前記アンタゴニストが、

- TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)、若しくはそのフラグメントに選択的に結合可能な、及びTSLPの長いアイソフォームの活性を中和可能な抗体若しくは抗体フラグメント、

- TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)受容体に選択的に結合可能な抗体若しくは抗体フラグメント、又は

- 単離されたTSLPの長いアイソフォーム受容体

である、方法。

【請求項32】

障害又は病理がTh1及び/又はTh2関連である、請求項9から21のいずれか一項に記載の使用のための化合物、又は請求項23から24のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物、又は請求項25から27、29～31のいずれか一項に記載の方法、又は請求項28若しくは30に記載のキット。

【請求項33】

前記障害又は病理が、炎症性腸疾患、結腸直腸がん、乾癬、アトピー性皮膚炎、敗血症、サルコイドーシス、尖圭コンジローム、紅色苔癬、基底細胞癌、光線角化症、紅斑性狼瘡、脳の炎症、アレルギー、同種移植拒絶及び癌腫からなる群より選択される、請求項9から21のいずれか一項に記載の使用のための化合物、又は請求項23から24のいずれか一項に記載の使用のための医薬組成物、又は請求項25から27、29から31のいずれか一項に記載の方法、又は請求項28若しくは30に記載のキット。

【請求項34】

ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号1)について結合特異性を有する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、ヒトTSLPの長いアイソフォームに特異的に結合するが、ヒトTSLPの短いアイソフォーム(配列番号2)には結合しない、抗体又はその抗原結合フラグメント。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォームのフラグメント、並びに抗炎症剤及び/又は恒常性剤としてのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)は、いくつかの生理学的な免疫活性に関与するサイ

10

20

30

40

50

トカインである。TSLPは、いくつかの恒常性の免疫応答において重要な役割を果たす。

【0003】

TSLPは、胸腺のハッサル小体において発現され、樹状細胞(DC)の能力(Watanabeら、2005)及び形質細胞様DC(Hanabuchiら、2010)の能力を調節して、天然のT制御性(Treg)細胞の発達を駆動する。TSLPはまた、外来抗原の非存在下でT細胞の恒常性のポリクローナル増殖も促進し得る(Watanabeら、2004)。腸では、TSLPは、腸上皮細胞によって発現されて、IL-12p70を産生する能力が低下した非炎症性のDCを教育して(Rimoldら、2005)、誘導性Tregの分化を駆動する(Ilievら、2009)。TSLPは、またトール様受容体アゴニストに対して応答してDCによって発現され(Kashyapら、2011; Spadoniら、2012)、腸のCD103+DCによって定常状態である(Spadoniら、2012)。マウスの系におけるDC由来のTSLPは、Th17に向かうそれらの分化を制限することによって、及びTregの発達を助長することによってT細胞に対して直接作用する(Spadoniら、2012)。一貫して、TSLP又はTSLPのシグナル伝達が必要であれば、おそらくT細胞に対する直接作用(Spadoniら、2012)を介して、又は炎症を低減することを補助する好中球エラスターゼの内因性のインヒビターである分泌型白血球ペプチダーゼインヒビター(SLPI)の上皮細胞による放出を通じて(Reardonら、2011)、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発性の大腸炎に対する感受性の増大がもたらされる(Reardonら、2011; Spadoniら、2012; Taylorら、2009)。注目すべきは、TSLP発現は、微生物叢に、及び具体的には核酸に依存し、IRF3転写因子を介する(Negishら、2012)。これによって、ウイルス感染(Fontenotら、2009)及び二本鎖RNA(Kinoshitaら、2009)に反応するTSLPの即時的な放出が説明され得、これがウイルス特異的なCD8+エフェクターT細胞(Yadavaら、2013)の活性化をもたらす。TSLPには、寄生生物の排除に生理学的に関連するTh2型の反応の誘導を必要とする(Zaphら、2007)。

10

20

【0004】

反対に、TSLPは、いくつかの免疫障害で病因となる役割を果たすことが示された。実際、TSLPは、TSLP処理DCでのOX-40リガンド発現の上方制御を介して(Itoら、2005)、IL-4、IL-5、IL-13及びTNF- $\alpha$ (Soumelisら、2002)の放出を伴う強力なアレルギー性Th2反応の発達を駆動し得る。TSLPは、喘息患者の気道で過剰発現され、Th2サイトカインに関連する(Ferreiraら、2012; Yingら、2005)。一貫して、TSLP遺伝子多型は、喘息感受性に関連しており(Haradaら、2011; Hunninghake遺伝子多型2010; Liu遺伝子多型2012)、TSLPは、マウスモデルにおいて喘息の進行に関与することが示された(Al-Shamiら、2005; Zhouら、2005)。TSLPはまた、Th2炎症を更に促進する傾向がある好塩基球の分化にも直接関与する(Siracusaら、2011)。従って、TSLPは、他のアレルギー性障害、例としては、アトピー性皮膚炎及び食物アレルギーに関与する(Ziegler、2012)。

30

【0005】

従って、一見したところTSLPは、融和することが困難である生理学的及び病理学的な活性の両方を有する。TSLPは、ヒトでは2つの異なるアイソフォーム、すなわち、独立したプロモーター(UCSCゲノムブラウザ)によって各々が駆動される、「長い」アイソフォーム(lTSLP)及び「短い」アイソフォーム(sTSLP又はshTSLP)で見出される。

【0006】

Xie Yら(J. of Dermatological Science, Jun 2012;66(3):233~237.)は、初代ヒトケラチノサイトにおける長型TSLP及び総TSLPの転写物の発現を比較した;具体的には、彼らは、TLRリガンド、炎症促進性及びTh2サイトカインは、長型のTSLP遺伝子発現を上方制御したが、短型は上方制御しなかったことを示し、このことは、長いTSLPが、炎症状態下でTSLPタンパク質の産生に寄与することを示している。刺激なしで、短型は、構成的に発現される、又は培養条件において、過剰増殖で、又はVDR(ビタミンD受容体)アゴニスト(すなわち、カルシトリオール)とともに更に上方制御された。以下の2つの研究(Di Piazzaら、; Demehriら、)では、TSLP媒介性の炎症は、皮膚がんのいくつかのマウスモデルでは腫瘍抑制性であり得ることが実証される。がんにおけるTSLPシグナル伝達は、状況次第であるので、TSLP不活性化治療剤の現在の発達における注意が示唆される。

40

【0007】

50

Di Piazza Mら(Cancer cell. 2012 Oct 16;22(4):479~93.)は、皮膚の発癌の間のTSLPの役割に取り組んだ。彼らは、TSLP媒介性の炎症が、CD4及びCD8 T細胞に対して直接作用することによって、皮膚の発癌に対して防御することを実証した。更に、彼らは、TSLPが、T細胞に直接作用することによって、抗腫瘍の炎症を誘発し得、これが -カテニン-依存性皮膚腫瘍の増殖を妨げることも示した。Demehri Sら(Cancer cell. 2012 Oct 16;22(4):494~505)は、TSLPが、皮膚でTh2分極化の炎症性の微小環境において優性な抗腫瘍応答を誘発することを実証した。具体的には、彼らは、バリア欠陥のある皮膚が放出する高レベルのTSLPが、重度の炎症を生じ、これがノッチ欠損(Notch-deficient)表皮クローンの段階的な排除、及び皮膚腫瘍形成に対する耐性を生じることを示した。

【0008】

Di Piazza MらもDemehri Sらも、TSLPの短いアイソフォームについても、TSLPの抗炎症性の役割についても言及しなかった。

【0009】

Harada Mら(American J of Respir Cell Mol Biol 2009;40:368~74.)は、2つのTSLPスプライシングバリエーション、すなわち短いものと長いものとを言及しているが、短いものの潜在的な抗炎症性の役割は記載していない。He JQら(J Allergy Clin Immunol 2009)は、遺伝子バリエーション(異なる遺伝子多型)を記載したが、TSLPのスプライシングバリエーションは記載しなかった。Taylor BCら(J Exp Med 2009)は、TSLP-TSLPRの相互作用が、腸の病原体である鞭虫属(Trichuris)に対する免疫について重要であることを示した。TSLPR(-/-)マウスは、IL-12/23p40及びIFN- $\gamma$ の産生の上昇を示し、デキストラン硫酸ナトリウムに対する曝露の際の腸の炎症の増大を発症し、これによって、炎症性腸疾患のマウスモデルで、TSLPについて以前には認識されていない免疫調節性の役割が実証された。彼らは、腸の微小環境におけるTSLPの機能が、炎症促進性サイトカイン産生を直接又は間接的のいずれかで阻害し、重度の腸炎症の発症を妨げることを補助することであり得ることを示唆した。この研究は、TSLPの異なるアイソフォームについては言及していない。

【0010】

特許出願であるUS2010/0021486は、Th2媒介性炎症状態の処置のための組成物に関する。組成物は、過剰な媒介性炎症状態でヒトを処置するためのワクチンとして用いられる、非霊長類のTSLP又はそのフラグメントを含む。他の非ヒト哺乳動物中のTh2媒介性炎症状態の処置のために、ワクチン化されるべきその種のTSLPを抗原として用いている。

【0011】

特許出願であるWO2005007186は、具体的には、TSLPを投与することによって腫瘍を処置する方法、及び新生物の診断方法に関する。診断方法は、サンプルを、抗TSLP又は抗TSLP-受容体とともにインキュベートする工程、並びに抗体-抗原複合体の形成を検出する工程を含む。新生物とは、乳房腫瘍、結腸腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍又は前立腺腫瘍であり得る、上皮由来のがん性腫瘍である。

【0012】

TW201206471は、ヒト乳がんに関する免疫療法アプローチについての組成物及び方法について言及している。乳がん曝露されたDCによるOX40Lの上方制御をブロックすることによって、腫瘍発達及びIL-13分泌を阻害し、それによって、それらが炎症性IL-13+TNF[ $\gamma$ ]+IL-10neg CD4+T細胞(Th2細胞)を生成する能力をブロックする、胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)及び/又はOX40Lの任意のアンタゴニスト。具体的には、これは、胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)に結合してその活性を中和する1つ又は複数の活性剤を含むヒト対象における上皮由来の腫瘍の処置のための治療組成物を指し、1つ又は複数の活性剤は、抗TSLP抗体、抗TSLP抗体フラグメント、抗TSLP抗体-担体コンジュゲート、TSLP結合融合タンパク質、TSLPアンタゴニスト、TSLPインヒビター-TSLP受容体アンタゴニスト、又はTSLPブロッキング剤(腫瘍の発達を阻害するのに十分な量で適切な培地中に任意選択で可溶化されるか、分散されるか又は懸濁されている)からなる群より選択される。

【0013】

US2012020988は、免疫学的疾患の処置に有用な、ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子受容

10

20

30

40

50

体 (TSLPR) に特異的に結合する抗体について言及している。

- 【先行技術文献】
- 【特許文献】
- 【0014】
- 【特許文献1】US2010/0021486
- 【特許文献2】WO 2005007186
- 【特許文献3】TW201206471
- 【特許文献4】US2012020988
- 【特許文献5】米国特許第4,235,871号
- 【特許文献6】米国特許第4,501,728号 10
- 【特許文献7】米国特許第4,837,028号
- 【特許文献8】米国特許第5,019,369号
- 【特許文献9】米国特許第5,075,109号
- 【特許文献10】米国特許第4,452,775号
- 【特許文献11】米国特許第4,667,014号
- 【特許文献12】米国特許第4,748,034号
- 【特許文献13】米国特許第5,239,660号
- 【特許文献14】米国特許第3,832,253号
- 【特許文献15】米国特許第3,854,480号
- 【非特許文献】 20
- 【0015】
- 【非特許文献1】Xie Y $\bar{r}$  (J. of Dermatological Science, Jun 2012;66(3):233 ~ 237.)
- 【非特許文献2】Di Piazza M $\bar{r}$  (Cancer cell. 2012 Oct 16;22(4):479 ~ 93.)
- 【非特許文献3】Demehri S $\bar{r}$  (Cancer cell. 2012 Oct 16;22(4):494 ~ 505)
- 【非特許文献4】Harada M $\bar{r}$  (American J of Respir Cell Mol Biol 2009;40:368 ~ 74.)
- 【非特許文献5】He JQ $\bar{r}$  (J Allergy Clin Immunol 2009)
- 【非特許文献6】Taylor BC $\bar{r}$  (J Exp Med 2009)
- 【非特許文献7】<http://genome.ucsc.edu>
- 【非特許文献8】[http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr5%3A110404856-110414355&hgsid=197243096\\_TsWaq2VphIzNP2DIjsuWks3iDOt](http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr5%3A110404856-110414355&hgsid=197243096_TsWaq2VphIzNP2DIjsuWks3iDOt) 30
- 【非特許文献9】SMITH及 $\bar{r}$  WATERMAN (Ad.App.Math.、第2巻、482頁、1981)
- 【非特許文献10】NEDDLEMAN及 $\bar{r}$  WUNSCH (J.Mol.Biol.、第48巻、443頁、1970)
- 【非特許文献11】PEARSON及 $\bar{r}$  LIPMAN (Proc. Natl. Acd. Sci. USA、第85巻、2444頁、1988)
- 【非特許文献12】Edgar、Robert C、Nucleic Acids Research、第32巻、1792頁、2004
- 【非特許文献13】Sambrook $\bar{r}$  (Molecular Cloning:A Laboratory Manual、1989)
- 【非特許文献14】Pharmaceutics and Pharmacy Practice、J.B.Lippincott Co.、Philadelphia、Pa.、Banker及 $\bar{r}$  Chalmers編、238 ~ 250頁(1982)
- 【非特許文献15】ASHP Handbook on Injectable Drugs、Toissel、第4版、622 ~ 630頁(1986) 40
- 【非特許文献16】Remington's Pharmaceutical Science(第17版、Mack Publishing Company、Easton、PA、1985)
- 【非特許文献17】Szoka $\bar{r}$ 、Ann. Rev. Biophys. Bioeng.、9:467(1980)
- 【非特許文献18】Matteoli G $\bar{r}$  Gut 2010
- 【非特許文献19】Geem D $\bar{r}$  J Vis Exp 2012
- 【非特許文献20】Livak及 $\bar{r}$  Schmittgen、Methods. 2001
- 【非特許文献21】Tsilingiri K. $\bar{r}$  J Vis Exp.2013
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0016】 50

現在まで、試薬の欠失に起因して各々のアイソフォームの活性を評価することは困難である。従って、新規な治療剤又は診断バイオマーカーを提供するために、TSLPの2つのアイソフォームの機能を検討して、TSLPの逆説的な役割を説明するためのツールを見出す必要性がやはり感じられる。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明者らは、本明細書において、パキュロウイルス中でTSLPの各アイソフォームをクローニングして発現し、驚くべきことに、2つの異なるアイソフォームが、別個の免疫学的応答を惹起することが見出され:長いアイソフォームは、Th2応答を駆動し、一方、短いアイソフォームは、DCが細菌に応答して、IL-12p70、TNF-a及びIL-6のような炎症性サイトカインを産生する能力を阻害するので強力に抗炎症性である。結果として、短いTSLP馴化されたDCは、Th1 T細胞分化を阻害する。それらは、短いアイソフォームが、定常状態で、腸上皮細胞で発現される唯一のものであることを見出し、それらは、TSLPの恒常性活性が短いアイソフォームによって媒介され、これは、TSLPの逆説的な役割を説明し得ることを提唱する。

10

【0018】

発明の詳細な説明

本発明者らは、炎症応答の発達の制御を媒介するいくつかのエフェクターを特定し、特に1つが非常に興味深いことを見出した。これは、上皮細胞によって産生される、胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)と呼ばれるサイトカインである。ヒトでは、TSLPの2つの相同アイソフォームである、「長い」アイソフォーム(159AA、配列番号2)及び「短い」アイソフォーム(63AA、配列番号1)が発現される。TSLPの今まで最もよく特徴付けられた形態は長いものであったけれども、著者らは、長いアイソフォームについての推定のプロモーターがUCSCデータベースに存在する細胞株のほとんどでほぼ完全に不活性であることを見出した(<http://genome.ucsc.edu>、具体的には、TSLPについて[http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr5%3A110404856-110414355&hgsid=197243096\\_TsWaq2VphIzNP2DIjsuWKS3iD0t3](http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr5%3A110404856-110414355&hgsid=197243096_TsWaq2VphIzNP2DIjsuWKS3iD0t3))。それどころか、短いアイソフォームについてのプロモーター領域は、多数の異なる転写因子に結合する高い能力を有しており、タンパク質は種々の組織で容易に発現されると考えられた。

20

【0019】

この予備的データに基づいて、著者らは、パキュロウイルス中で各アイソフォームをクローニングして、発現し、2つの異なるアイソフォームが、別個の免疫学的応答を惹起することを示した。長いアイソフォームは、Th2応答を駆動し、一方、短いアイソフォームは、単球由来のDCが細菌に応答して、IL-12p70、IL1b、TNF-a及びIL-6のような炎症性サイトカインを産生する能力を阻害するので強力に抗炎症性である。著者らは、短いアイソフォームが、定常状態で腸上皮細胞によって発現される唯一のものであることを見出した。代わりに、長いアイソフォームは、反対の傾向を示し、実際、炎症の組織でのみ上皮細胞によって発現される。本発明者らは、TSLPの恒常性活性が、短いアイソフォームによって媒介され、これが、TSLPの逆説的な役割を説明し得ることを提唱する。

30

【0020】

著者らは、短いTSLPの存在下では、IFN- (本明細書では、IFNg又はIFNとも示す)産生は、末梢血単核細胞の混合リンパ球反応において用量依存性の方式で有意に下方制御されることを見出した。長いアイソフォームは、代わりにIFN- の上方制御を生じた。更に、短いアイソフォームで馴化された、単球由来の樹状細胞は、サイトカイン分泌プロファイリングによって立証されるとおり、細菌のチャレンジ後に炎症性の能力の低下を示した。更に、長い型の特異的な抗体を得て、これを用いてタンパク質レベルで健常及びIBDの組織での免疫蛍光による2つのアイソフォームの発現をモニターした。著者らは、リアルタイムPCRによって得られた、以前に言及されたデータを確認した。

40

【0021】

著者らは、TSLPの2つのアイソフォームの機能を研究するための全てのツールを生成し

50

た。実際、短いアイソフォーム中に存在しない長いTSLPのフラグメント(配列番号2のaa.1~96)を、クローニングして、大腸菌(E.coli)の中で、DsbAタグとともに発現した。得られたタンパク質を用いて、フロイント不完全アジュバントの存在下で2匹のウサギを免疫した。動物の血清を得て、両方のアイソフォーム及びDsbAに対するそれらの特異性について試験した。抗DsbA抗体を、DsbAロードされたカラムを用いて除去し、得られた調製物を、もう一度試験した。長いアイソフォームを認識するが、短いカスタム合成されたペプチドは認識しないポリクローナル抗体を、HPLCによってウサギの血清から精製した。

【0022】

最終的に、リアルタイムPCRによってまた、未処置のセリアック病患者、並びに健常な皮膚と、いくつかの病理学的状態、例としては、乾癬、アトピー性皮膚炎、サルコイドーシス及び菌状息肉腫との間において同様の傾向を有する差次的発現を確認した。2つのアイソフォームの差次的発現はまた、健常な皮膚と、尖圭コンジローム、紅色苔癬、基底細胞癌、光線角化症、紅斑性狼瘡及び癌腫由来の皮膚との間でも観察された。TSLPの短い及び長いアイソフォームは両方とも、結腸がん患者の新生物組織で下方制御される。著者らは、樹状細胞のような免疫細胞もまた、TSLPを発現することを見出した。IBDでは、ITSLPは、補充された免疫細胞によって大幅に上方制御される。従って、本発明者らは、2つのアイソフォームが、異なる活性を有し、sTSLPは抗炎症性であり、ITSLPは炎症性であると仮定して確認した。

10

【0023】

本発明者らは、短いTSLPの使用を、全身に、経口的に、又は局所的に投与される抗炎症剤として提案する。

20

【0024】

従って、本発明の目的は、

- a) ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列のフラグメント、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列のフラグメントであるポリペプチド、
  - b) 前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、
  - c) 前記ポリヌクレオチドを含むベクター、
  - d) 前記ポリペプチドを発現する遺伝子操作された宿主細胞
- からなる群より選択される化合物である。

30

【0025】

好ましくは、TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)の前記C末端アミノ酸配列は、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)のアミノ酸配列から、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列からなる。

【0026】

より好ましくは、上で規定されたポリペプチドは、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)のアミノ酸配列のaa.4~63から本質的になる配列、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列に含まれる。

40

【0027】

好ましい態様では、上で規定されたポリペプチドは、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)の配列のaa.4~40若しくはaa.24~63から、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列から本質的になる配列を含む。

【0028】

好ましくは、上で規定されたポリペプチドは、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)の配列のaa.4~40若しくはaa.24~63から本質的になるアミノ酸配列から、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体

50

、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列からなる。

【0029】

本発明の別の好ましい実施形態では、ポリペプチドは、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)のアミノ酸配列のaa.4~63から、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列から本質的になる。上記の化合物は好ましくは、免疫調節活性を有し、より好ましくは、前記免疫調節活性は、抗炎症活性である。

【0030】

上で規定された化合物は、バイオマーカーとして使用されてもよい。

10

【0031】

本発明の別の目的は、医学的使用のための、好ましくは、炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の処置及び/若しくは予防における使用のため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の診断及び/若しくは予後診断のための方法における使用のため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置の有効性のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置のスクリーニングのための、上で規定された化合物である。

【0032】

上で規定された化合物は、特に、上で規定された方法においてバイオマーカーとして使用されてもよい。

20

【0033】

本発明の更なる目的は、炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理の処置及び/又は予防における使用のための、

a) ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列からなるポリペプチド、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列からなるポリペプチド、

b) 前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

c) 前記ポリヌクレオチドを含むベクター、

d) 前記ポリペプチドを発現する遺伝子操作された宿主細胞からなる群より選択される化合物である。

30

【0034】

本発明の別の目的は、炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の診断及び/若しくは予後診断のための方法における使用のため、

並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理のモニタリングのため、

並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置の有効性のモニタリングのため、

並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置のスクリーニングのための、

a) ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列からなるポリペプチド、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列からなるポリペプチド、

及び/又は

ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)からなるポリペプチド、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列からなるポリペプチド、

40

50

- b)前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
 c)前記ポリペプチドの少なくとも1つに対して選択的に結合可能なその抗体又はフラグメント、  
 d)前記ポリヌクレオチドに特異的なプライマー及び/又はプローブからなる群より選択される化合物。

## 【0035】

好ましくは、上で規定された化合物において、TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列は、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)のアミノ酸配列から、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成若しくは誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する領域のアミノ酸配列からなる。

10

## 【0036】

好ましくは、上記の誘導体は、配列番号1と、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子由来のコードされた対応する領域のアミノ酸配列と、少なくとも41%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%の同一性のパーセンテージを有するポリペプチドを含む群から選択される。

## 【0037】

好ましい態様では、上で規定された化合物又は上で規定された使用のための化合物は、ポリペプチドの合成の誘導体である。

## 【0038】

好ましくは、前記フラグメントは、少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも17、より好ましくは少なくとも20、更により好ましくは少なくとも37又は40アミノ酸の長さを有するポリペプチドを指す。

20

## 【0039】

上で規定された化合物において、又は上で規定された使用のための化合物において、ポリヌクレオチドは好ましくは、RNA又はDNAからなる群より選択され、より好ましくは、前記ポリヌクレオチドはDNAであるか、及び/又は前記ポリヌクレオチドは配列、配列番号1をコードする配列を含む。

## 【0040】

上で規定された化合物において、又は上で規定された使用のための化合物において、ベクターは好ましくは発現ベクターであり、より好ましくは、プラスミド、ウイルス粒子及びファージからなる群より選択される。

30

## 【0041】

上で規定された化合物において、又は上で規定された使用のための化合物において、宿主細胞は、好ましくは、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、動物細胞、及び植物細胞からなる群より選択され、好ましくは、前記宿主細胞は動物細胞である。

## 【0042】

本発明の更なる目的は、炎症応答によって特徴づけられる障害又は病理の処置又は/及び予防における使用のための、TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のアンタゴニストである化合物であって、前記アンタゴニストが、

40

- TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)に、若しくはそのフラグメントに選択的に結合し、TSLPの長いアイソフォームの活性を中和することができる、抗体若しくは抗体フラグメント、

- TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)受容体に選択的に結合することができる、抗体若しくは抗体フラグメント、又は

- 単離されたTSLPの長いアイソフォーム受容体

である、化合物である。

## 【0043】

前記抗体は好ましくは、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体、又はその合成若しくは組換えの誘導体であり、より好ましくは、前記抗体は、ヒトモノクローナル

50

抗体である。

【0044】

好ましい実施形態では、ヒト又は動物は、障害又は病理に罹患している。

【0045】

本発明の別の目的は、上で規定された少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤及び化合物を含み、任意選択で、好ましくは抗炎症剤である少なくとも1つの免疫調節剤を更に含む医薬組成物である。

【0046】

更なる目的は、上で規定された化合物、及び少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤を含み、任意選択で、好ましくは抗炎症剤である少なくとも1つの免疫調節剤を更に含む、炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理の処置又は/及び予防における使用のための医薬組成物である。

10

【0047】

本発明によれば、少なくとも1つの免疫調節剤は、コルチコステロイド(すなわち、ベクロメタゾン/ベクロメタゾン、ブデソニド、フルニソリド、プロピオン酸フルチカゾン、トリアムシノロン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン(prednisolone)/プレドニゾロン(prednisolon)、プレドニゾン等)、非ステロイド(すなわち、アスピリン、イブプロフェン及びナプロキセン等)抗炎症剤、ビタミンD3等であってもよい。

【0048】

上記の医薬組成物は好ましくは、全身的、経口、局部、好ましくは直腸、又は局所の投与のためである。

20

【0049】

本発明の別の目的は、対象における、炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の診断及び/若しくは予後診断のため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置の有効性のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置のスクリーニングのための方法であって、

- a) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列、並びに/或いは

30

b) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応するタンパク質

からなる少なくとも1つのポリペプチドの量を測定する工程、

又は、対象から得られた単離された生物学的サンプル中で、前記ポリペプチドの1つ又は複数をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの量を測定する工程、並びに

- この値を対照サンプル由来の値と比較する工程

を含む方法である。

40

【0050】

好ましい態様では、本発明の方法は、以下の式:a)の量/b)の量に従って、a)の量とb)の量との間の比を算出する工程を更に含む。

【0051】

好ましくは、a)及び/又はb)の量を測定する工程は、

- 対象から得られた生物学的サンプルと、

a) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列、及び/或いは、

b) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコー

50

ドされた対応するタンパク質

に選択的に結合可能な少なくとも1つの抗体とを、抗体-抗原複合体の形成のための条件下で接触させる工程と、

- 前記複合体を検出する工程とを含む。

【0052】

本発明の別の目的は、炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の診断及び/若しくは予後診断のため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置の有効性のモニタリングのため、並びに/又は炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理の治療的な処置のスクリーニングのためのキットであって、

- a) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列、並びに/或いは

b) ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)、又はTSLPのオーソロガス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応するタンパク質

からなる少なくとも1つのポリペプチドの量を測定する手段、

並びに/或いは、前記ポリペプチドの1つ又は複数をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドの量を測定する手段、

並びに任意選択で、

- 制御手段

を含むキットである。

【0053】

制御手段を用いて、対照サンプル由来の値に対して、上で規定された化合物の量又は量の増大を比較してもよい。値は、例えば、公知の標準を参照して、正常な対象から、又は正常な集団から得てもよい。

【0054】

上で規定された少なくとも1つの化合物の量を測定する手段は好ましくは、少なくとも1つの抗体、その機能的なアナログ若しくは誘導体である。前記抗体、その機能的なアナログ若しくは誘導体は、前記化合物に特異的である。

【0055】

好ましい実施形態では、本発明のキットは、

- 前記化合物に特異的な固相固定の抗体と、

- リガンド特異的なバイオマーカー複合体の検出手段と

を含む。

【0056】

本発明によるキットは、例えば、緩衝液、担体、マーカー等及び/又は使用説明書等の慣習的な支援物を更に含んでもよい。

【0057】

炎症応答によって特徴付けられる、障害又は病理を診断及び/又は予後診断するための方法又はキットの場合、対照由来の値は、健常な患者から、又は炎症応答によって特徴付けられない別の障害又は病理に罹患した患者から採取されたサンプル中で測定された値であってもよい。炎症応答によって特徴付けられる、障害又は病理をモニタリングするための方法又はキットの場合、障害又は病理の進行は、モニターされて、対照サンプル由来の値は、種々の時点で同じ対象から、又は別の患者から採取されたサンプル中で測定した値によってもよい。治療的な処置の有効性をモニタリングするための方法又はキットの場合、対照サンプル由来の値は、治療の開始の前に同じ対象から採取した、又は治療の経過の間に種々の時点で採取したサンプル中で測定された値によってもよい。炎症応答によって特徴付けられる、障害又は病理の治療的な処置のスクリーニングのための方法又はキット

10

20

30

40

50

の場合、対照サンプル由来の値は、処置なしで対象から、及びアッセイすべき物質を用いて処置された対象から、又は参照処置で処置された対象から、採取されたサンプル中で測定された値の平均であってもよい。

【0058】

本発明では、「量を測定する」という表現は、それぞれのタンパク質及び/又はそのmRNA及び/又はそのDNAの量又は濃度又はレベルを、好ましくは半定量的又は定量的に測定することと意図され得る。タンパク質の測定は、直接又は間接的に行われてもよい。直接の測定とは、タンパク質から直接得られるシグナルに基づいて、バイオマーカーの量又は濃度測定を指し、これはサンプル中に存在するタンパク質分子の数と直接相関する。このシグナル(これは、強度シグナルとも呼ばれ得る)は、例えば、バイオマーカーの化学的又は物理的な特性の強度値を測定することによって得てもよい。間接的な測定としては、二次的な成分(例えば、遺伝子発現産物からの異なる成分)及び生物学的な測定システム(例えば、細胞応答、リガンド、「タグ」又は酵素反応産物の測定)から得られた測定が挙げられる。

10

【0059】

詳細な説明で用いる場合、「量」という用語は、限定するものではないが、タンパク質及び/又はそのmRNA及び/又はそのDNAの絶対量又は相対量、並びにこれら又はこれらから生じ得るものに関連する任意の他の値又はパラメータを指す。このような値又はパラメータは、直接の測定によって得られた、タンパク質の物理的又は化学的いずれかの特性から得られたシグナルの強度値、例えば、イムノアッセイ、質量分析又は核磁気共鳴における強度値を含む。更に、これらの値又はパラメータとしては、間接的な測定、例えば、本明細書に記載の任意の測定システムによって得られる値が挙げられる。サンプル中のmRNA及びDNAを測定する方法は当該分野で公知である。核酸レベルを測定するために、試験サンプル中で細胞を溶解してもよく、その溶解液中の、又は溶解液から精製若しくは半精製されたRNA中のmRNAのレベルは、当業者になじみ深い任意の種々の方法によって測定され得る。このような方法としては、検出可能に標識したDNA若しくはRNAプローブ(すなわち、ノーザンブロッティング)を用いるハイブリダイゼーションアッセイ、又は適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いる定量的若しくは半定量的なRT-PCR方法論が挙げられる。或いは、定量的又は半定量的なインサイチュハイブリダイゼーションアッセイを、例えば、組織切片、又は未溶解の細胞懸濁液、及び検出可能に標識した(例えば、蛍光又は酵素標識)DNA若しくはRNAのプローブを用いて行ってもよい。mRNAを定量するための追加の方法としては、RNA保護アッセイ(RPA)、cDNA及びオリゴヌクレオチドマイクロアレイ、発現示差解析法(representation difference analysis)(RDA)、ディファレンシャルディスプレイ、EST配列解析、及び遺伝子発現連鎖解析(serial analysis of gene expression)(SAGE)が挙げられる。

20

30

【0060】

b)において上で規定された化合物(すなわち、ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応するタンパク質)の測定された量を、対照サンプルから得られた値と比較することによって、対象から単離した試験サンプル中の前記化合物の量がより高い値に相当する場合、対象は、炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理が存在する、又は前記障害若しくは病理の増悪に向かう場合がある。

40

【0061】

b)において上で規定された化合物の測定された量を、対照サンプルから得られた値と比較することによって、対象から単離した試験サンプル中の前記化合物の量が同様又はより低い値に相当する場合、対象は、炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理に罹患していない、又はそれぞれ障害若しくは病理の改善に向かう場合がある。

【0062】

a)において上で規定された化合物(すなわち、ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号

50

2)のC末端アミノ酸配列、又はTSLPのオーソログ遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組み換え誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列)の測定された量を、対照サンプルから得られた値と比較することによって、対象から単離した試験サンプル中の前記化合物の量が、同様又はより高い値に相当する場合、対象は、炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理に罹患していない、又はそれぞれ障害若しくは病理の改善に向かう場合がある。

【0063】

a)において上で規定された化合物の測定された量を、対照サンプルから得られた値と比較することによって、対象から単離した試験サンプル中の前記化合物の量が、より低い値に相当する場合、対象は、炎症応答によって特徴付けられる障害若しくは病理が存在している、又は前記障害若しくは病理の増悪に向かう場合がある。

10

【0064】

或いは、「量を測定する」という表現は、分子の変更を測定することを意図する。前記変更は、上で規定された化合物の量における増大又は低下を反映し得る。B)の増大は、疾患の増悪に相関し得る。b)の低下は、疾患の改善に、又は対象の回復に相関し得る。a)の低下は、疾患の増悪と相関し得る。a)の増大は、疾患の改善と、又は対象の回復と相関し得る。

【0065】

好ましい実施形態では、コントロールサンプルから得られた値は、以下の式:a)の量/b)の量に従って、a)の量とb)の量との間の比の量との間の比として算出され得る。

20

【0066】

本発明の方法を用いて、異なる病理の間を識別してもよく、例えば、上で規定された化合物のうちの1つの量は、各病理において、同じ方法で変化する(例えば、それは増大するか又は低下する)が、1つの病理において上で規定された他の化合物の量は、別の病理が一定のままで、変化する(それは増大するか又は低下する)。例えば、本発明の方法を適用して、乾癬とアトピー性皮膚炎との間を識別することが可能である。実際、乾癬では、ITSLPの量が増大するが、sTSLPの量は変化しない。従って、この場合、以下の式:a)の量/b)の量に従って、a)の量とb)の量との間の比の量との間の比の変化が、対照サンプルの値と比較して、測定される。

【0067】

アトピー性皮膚炎では、ITSLPの量が増大し、一方sTSLPの量が低下される。従って、この場合は、以下の式:a)の量/b)の量に従って、a)の量とb)の量との間の比の量との間の比の種々の変化が、対照サンプルの値と比較して、測定される。

30

【0068】

本発明の更なる目的は、炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理を処置及び/又は予防するための方法であって、

a)ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列からなるポリペプチド、又はTSLPのオーソログ遺伝子又は相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列からなるポリペプチド、

40

b)前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

c)前記ポリヌクレオチドを含むベクター、

d)前記ポリペプチドを発現する遺伝子操作された宿主細胞

からなる群より選択される化合物の有効量を、それを必要とする対象に投与する工程含む方法である。

【0069】

本発明では、ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列のフラグメントは、好ましくは上で規定されたポリペプチドである。

【0070】

本発明の別の目的は、炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理を処置及び/又は

50

予防するための方法であって、有効量のTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)のアンタゴニストを、それを必要とする対象に投与する工程を含み、前記アンタゴニストが、

- TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)、若しくはそのフラグメントに対して選択的に結合可能な、及びTSLPの長いアイソフォームの活性を中和可能な、抗体若しくは抗体フラグメント、

- TSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)受容体に選択的に結合可能な抗体若しくは抗体フラグメント、又は

- 単離されたTSLPの長いアイソフォーム受容体

である、方法である。

【0071】

好ましくは、炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理はTh1及び/又はTh2関連である。

【0072】

好ましくは、炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理は、炎症性腸疾患、結腸直腸がん、乾癬、アトピー性皮膚炎、敗血症、サルコイドーシス、尖圭コンジローム、紅色苔癬、基底細胞癌、光線角化症、紅斑性狼瘡、脳の炎症、アレルギー、同種移植拒絶及び癌腫からなる群より選択される。

【0073】

好ましくは、炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理は、セリアック病である。

【0074】

上で規定された化合物は好ましくは、上記の障害又は病理のバイオマーカーである。

【0075】

本発明の別の目的は、ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号1)に結合特異性を有する、抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトTSLPの長いアイソフォームに特異的に結合するが、ヒトTSLPの短いアイソフォーム(配列番号2)には結合しない、抗体又はその抗原結合フラグメント、並びにその医学的使用、具体的には、炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理の処置及び/又は予防におけるその医学的使用である。

【0076】

本発明の抗体は、ITSLPのN末端に含まれる領域(すなわち、配列番号2のTSLPのaa.1~96)を特異的に標的にする。前記領域は、sTSLPには存在しないので、本発明の抗体は、sTSLPを認識しない。本発明の抗体は、ブロック活性を有することが示された(図13を参照のこと)。

【0077】

市販の抗体は、長いTSLPを標的にするが、長いTSLPの特定の標的領域は未知である。提供された抗体によって、選択的に長いアイソフォームを標的にすることで、長いTSLPと短いTSLPとの間を識別することが可能になる。

【0078】

本発明において、障害又は病理は、組織中に、又は血液中に、炎症性メディエーター、例としては、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、IL-1 $\beta$ の増大が存在する場合、炎症応答によって特徴付けられる。同様に、組織は、浸潤性の白血球の増大によって特徴付けられる。

【0079】

本発明において、Th1関連の障害又は病理は、浸潤性免疫細胞による、及び/又はT-betを発現するT細胞の補充による、IFN- $\gamma$ の産生の増大によって特徴付けられる。

【0080】

本発明において、好ましい炎症性腸疾患は、潰瘍性大腸炎である。潰瘍性大腸炎では、TSLPの短いアイソフォームの量は、変化しないが、正常な対象と比較して、ITSLPの量とsTSLPの量との間の比には変化がある(図14を参照のこと)。

【0081】

「それを必要とする対象」又は「対象」とは、ヒト又は動物、好ましくはイヌ(Canis l

10

20

30

40

50

upus familiaris)、ネコ(Felis catus)、ウマ(Equus caballus)、ウシ(Bos Taurus)であってもよい。

【0082】

本発明において、ポリペプチドの「機能的変異体」とは、それらの配列中で1つ又は複数のアミノ酸を変異することによって生成され得、且つそれらの活性、例えば、免疫調節活性又は抗炎症活性を維持するポリペプチドである。実際、本発明のポリペプチドは、必要に応じて、インビトロ及び/又はインビボで、例えば、グリコシル化、ミリストイル化、アミド化、カルボキシル化又はリン酸化によって修飾されてもよく、例えば、当該分野で公知の合成若しくは組換えの技術によって得てもよい。

【0083】

本発明において、「機能的な」とは、例えば、「それらの活性を維持する」、例えば、免疫調節活性又は抗炎症活性を維持するものとする。

【0084】

「アナログ」という用語は、あるポリペプチドを指して本明細書において用いる場合、修飾されたペプチドであって、ペプチドの1つ若しくは複数のアミノ酸残基が、他のアミノ酸残基で置換されているか、及び/又は1つ若しくは複数のアミノ酸残基が、ペプチドから欠失されているか、及び/又は1つ若しくは複数のアミノ酸残基が、ペプチドから欠失されているか、及び又は1つ若しくは複数のアミノ酸残基がペプチドに付加されている、ポリペプチドを意味する。このようなアミノ酸残基の付加又は欠失は、ペプチドのN末端、及び/又はペプチドのC末端で生じてもよい。

【0085】

「誘導体」という用語は、ポリペプチドに関して本明細書において用いる場合、化学的に修飾されたペプチド又はそのアナログであって、少なくとも1つの置換基が未修飾のペプチド又はそのアナログに存在しない、すなわち、共有結合的に修飾されたペプチドを意味する。典型的な修飾は、アミド、炭水化物、アルキル基、アシル基、エステル等である。本明細書において用いる場合、「誘導体」という用語はまた、配列番号1と、又はTSLPのオーソログス遺伝子若しくは相同遺伝子由来のコードされた対応する領域のアミノ酸配列と、例えば、少なくとも41%、好ましくは少なくとも41.5%、50%、54.9%、60%、61.2%、64.1%、65%、70%又は75%、より好ましくは少なくとも85%、一例として、少なくとも90%、更により好ましくは少なくとも95%の同一性のパーセンテージを有する、より長い又はより短いポリペプチドも指す。

【0086】

ホモサピエンス(Homo sapiens)中のTSLPの短いアイソフォームは、長いTSLPのC末端部分の最後の63個のaaと同一であることが留意されるべきである。TSLPは種の間で、例えば、ハツカネズミ(mus musculus)、イヌ、及びネコ及びウシにおいて、高度に保存されており、これらのTSLPはヒトのTSLPとそれぞれ、41.5%、61.2%及び64.1%及び54.9%の同一性を共有する。

【0087】

本明細書において用いる場合、「フラグメント」とは、好ましくは、少なくとも10アミノ酸、より好ましくは、少なくとも15、少なくとも17アミノ酸、又は少なくとも20アミノ酸、更により好ましくは少なくとも25アミノ酸、又は少なくとも37若しくは40アミノ酸、より好ましくは少なくとも50アミノ酸の長さを有するポリペプチドを指す。

【0088】

好ましい実施形態では、長いTSLPのフラグメントはまた、本明細書において、「ヒトTSLPの長いアイソフォーム(配列番号2)」とも呼ばれており、これは、配列番号2の配列aa.29~159に相当する。

【0089】

本明細書において用いる場合、「長いTSLP」又は「ITSLP」又は「TSLPの長いアイソフォーム」という表現は、ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)、又はTSLPのオーソログス遺伝子若しくは相同遺伝子、その機能的変異体、組

10

20

30

40

50

換え若しくは合成の誘導体、フラグメント(例えば、配列番号2のaa.29~159として)、若しくはアナログからコードされた対応する配列からなるポリペプチドを包含し得る。

【0090】

本明細書において用いる場合、「短いTSLP」、「shTSLP」、「sTSLP」又は「TSLPの短いアイソフォーム」という表現は、ヒト胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)の長いアイソフォーム(配列番号2)のC末端アミノ酸配列からなるポリペプチド、又はTSLPのオーソログス遺伝子又は相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされた対応する配列からなるポリペプチドを包含し得る。好ましくは、これは、配列番号1のポリペプチド、又はそのフラグメントをTSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)の配列のaa.4~63、4~40又は24~63として包含する。

10

【0091】

本明細書において用いる場合、2つのアミノ酸配列の間の「同一性のパーセンテージ」とは、前記配列の最高のアラインメントで得られた、比較すべき2つの配列の間の同一のアミノ酸のパーセンテージを意味し、このパーセンテージは、純粹に統計学的であり、これらの2つの配列の間の相違は、アミノ酸配列にまたがってランダムに広がっている。本明細書において用いる場合、「最高のアラインメント」又は「最適のアラインメント」とは、決定された同一性のパーセンテージ(下を参照のこと)が、最高であるアラインメントを意味する。2つのアミノ酸配列の間の配列比較は通常は、最高のアラインメントに応じて以前に整列されたこれらの配列を比較することによって実現される;この比較は、同定するために比較のセグメントで実現され、類似性の局所領域が比較される。比較を行うための最高の配列アラインメントは、マニュアルの方法によるもの以外に、SMITH及びWATERMAN(Ad.App.Math.、第2巻、482頁、1981)が開発した全体的相同性アルゴリズム(global homology algorithm)を用いることによって、NEDDLEMAN及びWUNSCH(J.Mol.Biol.、第48巻、443頁、1970)が開発した局所的相同性アルゴリズム(local homology algorithm)を用いることによって、PEARSON及びLIPMAN(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第85巻、2444頁、1988)が開発した類似の方法を用いることによって、このようなアルゴリズムを用いるコンピュータソフトウェアを用いることによって(GAP、BESTFIT、BLAST P、BLAST N、FASTA、Wisconsin GeneticsソフトウェアパッケージのTFASTA、Genetics Computer Group、575 Science Dr.,Madison, WI USA)、MUSCLE多重アラインメントアルゴリズム(Edgar, Robert C、Nucleic Acids Research、第32巻、1792頁、2004)を用いることによって実現され得る。最高の局所アラインメントを得るために、好ましくは、BLASTソフトウェアを、BLOSUM 62マトリックス、又はPAM 30マトリックスとともに用いてもよい。アミノ酸の2つの配列の間の同一性パーセンテージは、最適に整列されたこれらの2つの配列を比較することによって決定され、アミノ酸配列は、これらの2つの配列の間の最適アラインメントを得るために、参照配列に関して追加又は欠失を含んでもよい。同一性のパーセンテージは、これらの2つの配列の間の同一の位置の数を決定することによって、及びこの数を比較された位置の総数で割ることによって、並びに得られた結果に100を掛けて、これらの2つの配列の間の同一性のパーセンテージを得ることによって算出される。

20

30

【0092】

本発明による「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖のヌクレオチド鎖、又はその相補的な鎖(これは、DNA型のものであってもRNA型のものであってもよい)、又は二本鎖ヌクレオチド鎖(これは、cDNA(相補性)型のものであってもゲノムDNA型のものであってもよい)を指す。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、DNA型、すなわち二本鎖DNAのものである。「ポリヌクレオチド」という用語はまた、修飾されたポリヌクレオチドを指す。

40

【0093】

本発明のポリヌクレオチドは、それらの天然の環境から単離されるか又は精製される。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、Sambrookら(Molecular Cloning:A Laboratory Manual、1989)によって記載される技術のような従来の分子生物学技術を用いて調製されても、化学的な合成によって調製されてもよい。

50

## 【0094】

本発明のポリヌクレオチドはまた、以前に規定されたポリペプチドのコード配列、追加のコード配列、例えば、リーダー配列若しくは前駆タンパク質配列、並びに/又は追加の非コード配列、例えば、イントロン若しくは5'及び/若しくは3'UTR配列を含んでもよい。

## 【0095】

本明細書において用いる場合、「ベクター」という用語は、発現ベクターを指し、例えば、プラスミドの形態、ウイルス粒子、ファージ等であってもよい。このようなベクターとしては、細菌のプラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミド及びファージDNAの組合せに由来するベクター、ウイルスDNA、例えば、ワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、及び仮性狂犬病が挙げられ得る。多数の適切なベクターが当業者に公知であり、市販されている。以下のベクターは、例として提供される。細菌:pQE70、pQE60、pQE-9(QIAGEN社)、pbs、pD10、ファージスクリプト(phagescript)、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH1[beta]a、pNH18A、pNH46A(STRATAGENE社)、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(PHARMACIA社)。真核生物:pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG(STRATAGENE社)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL(PHARMACIA社)。しかし、任意の他のベクターを、それが宿主中で複製可能であり、生存可能である限り用いてもよい。ベクター中のポリヌクレオチド配列、好ましくはDNA配列は、mRNA合成を指向するように、適切な発現制御配列(プロモーター)に対して作動可能に連結される。このようなプロモーターの代表的な例として、原核生物又は真核生物プロモーター、例えば、CMV早期プロモーター、HSVチミジンキナーゼ、早期及び後期のSV40、レトロウイルス由来のLTR、並びにマウスメタロチオネイン-1を挙げることができる。発現ベクターはまた、翻訳開始及び転写ベクターのためのリボソーム結合部位を含有する。ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含んでもよい。更に、ベクターは好ましくは、1つ又は複数の選択マーカー遺伝子を含有し、真核生物細胞培養については、ジヒドロ葉酸レダクターゼ若しくはネオマイシン耐性のような、又は大腸菌中のテトラサイクリン若しくはアンピシリン耐性のような、形質転換された宿主細胞の選択のための表現型形質を提供する。

## 【0096】

本明細書において用いる場合、「遺伝子操作された宿主細胞」という用語は、以前に記載されたポリヌクレオチド、又はベクターを形質導入されるか、形質転換されるか、又はトランスフェクトされた宿主細胞に関する。適切な宿主細胞の代表的な例としては、細菌細胞、例えば、大腸菌、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、真菌細胞、例えば、酵母、昆虫細胞、例えば、Sf9、動物細胞、例えば、CHO又はCOS、植物細胞等を挙げることができる。適切な宿主の選択は、本明細書の教示から当業者の範囲内であるとみなされる。好ましくは、前記宿主細胞は、動物細胞、最も好ましくはヒト細胞である。ポリヌクレオチドの、又は以前に記載されたベクターの宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、又はエレクトロポレーション等の当業者に周知の方法によって達成され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、ウイルスベクター等のベクターであってもよい。

## 【0097】

本発明の別の目的は、配列番号1のペプチドから選択されたペプチドを発現する形質転換された宿主細胞を含む組成物である。

## 【0098】

当業者は、宿主細胞へのポリヌクレオチドの組み込みのための標準的な方法、例えば、トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、ウイルス感染、熱ショック、膜の化学的透過化後の形質転換又は細胞融合後を十分承知している。

## 【0099】

「抗体」という用語は、本明細書において、広義の意味で用いられ、特に、任意のアイソタイプのモノクローナル抗体、例えば、IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE、ポリクローナル

10

20

30

40

50

抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体並びに抗体フラグメントを包含する。特異的な抗原と反応性の抗体は、ファージ若しくは同様のベクター中の組換え抗体のライブラリーの選択等の組換え方法によって、又は抗原若しくは抗原コード核酸を用いて動物を免疫することによって生成され得る。典型的なIgG抗体は、2つの同一の重鎖及び2つの同一の軽鎖(ジスルフィド結合によって連結される)から構成される。各重鎖及び軽鎖は、定常領域及び可変領域を含有する。各可変領域は、「相補性決定領域」(「CDR」)、又は「超可変領域」(抗原のエピトープに結合することを主に担う)と呼ばれる3つのセグメントを含有する。それらは通常は、N末端から連続してナンバリングされたCDR1、CDR2、及びCDR3と呼ばれる。可変領域のより高度に保存された部分は、「フレームワーク領域」と呼ばれる。本明細書において用いる場合、「VH」とは、抗体の免疫グロブリン重鎖の可変領域を指し、これは、Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab'又はF(ab')<sub>2</sub>フラグメントの重鎖を含む。「VL」という言及は、抗体の免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指し、これは、Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab'又はF(ab')<sub>2</sub>フラグメントの軽鎖を含む。「ポリクローナル抗体」とは、1つ若しくは複数の他の非同一の抗体の間で、又はその存在下で産生された抗体である。一般には、ポリクローナル抗体は、非同一の抗体を産生するいくつかの他のBリンパ球の存在下でBリンパ球から産生される。通常は、ポリクローナル抗体は、免疫された動物から直接得られる。「モノクローナル抗体」とは本明細書において用いる場合、実質的に相同な抗体の集団から得られた抗体であり、すなわち、この集団を形成する抗体は、少量で存在し得る、可能性として天然に存在する変異体を除いて、本質的に同一である。これらの抗体は、単一のエピトープに向けられており、従って高度に特異的である。「エピトープ」とは、抗体が結合する抗原上の部位である。本明細書において用いる場合、「キメラ抗体」とは、定常領域又はその一部が、変更されるか、置き換えられるか、又は交換されており、その結果可変領域が、異なる種の定常領域に連結されるか、又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属している抗体である。「キメラ抗体」とはまた、可変領域、又はその一部が変更されるか、置き換えられるか、又は交換されており、その結果定常領域が、異なる種の可変領域に連結されるか、又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属している抗体を指す。キメラ抗体を産生するための方法は、当該分野で公知である。

#### 【0100】

「ヒト化抗体」という用語は、本明細書において用いる場合、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含有するキメラ抗体を指す。ヒト化の目標は、抗体の完全な抗原結合親和性及び特異性を維持しながら、ヒト中に導入するためにマウス抗体等の異種抗体の免疫原性を低下させることである。ヒト化抗体又は他の哺乳動物による非拒絶のために適合された抗体は、リサーフェシング及びCDR移植等のいくつかの技術を用いて作製され得る。ヒト化キメラ抗体は好ましくは、対応するヒト抗体領域から実質的に又は排他的に由来する相補性決定領域以外の定常領域及び可変領域、並びにヒト以外の哺乳動物から実質的に又は排他的に由来するCDRを有する。本発明の抗体は、上記完全長の抗体並びにそのエピトープ結合フラグメントの両方を含む。本明細書において用いる場合、「抗体フラグメント」には、一般に、「エピトープ結合フラグメント」と称される、完全長抗体によって認識されるエピトープに結合する能力を保持する抗体の任意の部分が含まれる。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'及びF(ab')<sub>2</sub>、Fd、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合されたFv(dsFv)及びVL又はVH領域のいずれかを含むフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。一本鎖抗体を含むエピトープ結合フラグメントは、単独で、又は以下:ヒンジ領域、CH1、CH2及びCH3ドメインの全部若しくは一部と組み合わせて可変領域を含んでもよい。

#### 【0101】

「処置する又は処置」及び「予防する又は予防」という用語並びにそれらから派生した単語は、本明細書において用いる場合、100%又は完全な処置又は予防を意味する必要はない。そうではなく、当業者が、潜在的な利点又は治療効果を有すると認識する種々の程度の処置又は予防があり、これに関して、本発明の方法は、例えば、哺乳動物における、炎症に関連する状態の処置又は予防の任意のレベルの任意の量を提供し得る。更に、本発明

10

20

30

40

50

の方法によって提供される処置又は予防は、処置若しくは予防されている疾患の1つ若しくは複数の状態若しくは症状の処置又は予防を含み得る。また、本明細書における目的に関しては、「予防」は、疾患、又はその症状若しくは状態の発生を遅延することを包含し得る。本発明によれば、「有効量」の組成物とは、所望の生物学的効果、この場合、動物又はヒトにおける炎症応答の低下を達成するために十分な組成物である。有効投与量は、レシピエントの年齢、性別、健康及び体重、併用する処置の種類(もしあれば)、処置の頻度、並びに所望の効果の性質に依存することが理解される。好ましい投与量は、過度の実験なしで、当業者によって理解され決定され得るように、個々の対象に仕立てられ得る。本発明の上記のアンタゴニスト又は化合物の有効用量の範囲の例(1mg/kg ~ 100mg/kg、具体的には、全身的に、局所的に、局部的に(例えば、直腸に)及び経口的に投与される)は、本発明を限定する意図はなく、好ましい用量範囲を示す。

10

## 【0102】

本発明は、ヒト及び動物の健康における使用(獣医の使用)、好ましくは、イヌ、ネコ、ウマ、ウシにおいて使用を有する。

## 【0103】

治療又は予防的な使用のために有効な量は、例えば、処置されている疾患又は障害の段階及び重症度、並びに処方医の判定に依存する。用量のサイズはまた、選択される化合物、投与の方法、投与のタイミング及び頻度、並びに任意の有害な副作用の存在、性質及び程度(特定の化合物の投与及び所望の生理学的効果を伴い得る)によって決定される。種々の疾患又は障害は、投与の各々の回又は種々の回で、本発明の化合物をおそらく用いて、複数回の投与を含む長期の処置を要する場合があることが当業者に理解される。開示された化合物は、少なくとも1つの賦形剤(例えば、薬学的に許容される賦形剤)、並びに他の治療剤(例えば、抗炎症剤)を含み得る組成物(例えば、医薬組成物)中で投与され得る。組成物は、非経口、局所、経口又は局部投与を含む任意の適切な経路によって投与され得る。薬学的に許容される賦形剤は好ましくは、上で開示された化合物に対して化学的に不活性である賦形剤、及び使用条件下で副作用又は毒性をほとんど又は全く有さない賦形剤である。このような薬学的に許容される担体としては、限定するものではないが、水、生理食塩水、クレモフォル(Cremophor)EL(Sigma Chemical社、St.Louis、MO)、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、アルコール、及びそれらの組合せが挙げられる。担体の選択は、特定の化合物によって、並びに組成物を投与するために用いられる特定の

20

30

40

の方法によって部分的には決定される。従って、組成物の多種多様な適切な処方物がある。本発明の実施形態の状況における医薬組成物は例えば、丸剤、カプセル、又は錠剤の形態(各々が所定の量の1つ又は複数の活性化合物を含有している)であってもよく、好ましくは、嚥下が容易なようにコーティングされるか、粉末若しくは顆粒の形態であるか、又は溶液若しくは懸濁液の形態であってもよい。経口投与のために、微細な粉末又は顆粒は、希釈、分散及び又は界面活性剤を含有してもよく、例えば、水若しくはシロップ中に、カプセル若しくはサシェ中に乾燥状態で、又は非水溶液若しくは懸濁液(懸濁剤が含まれ得る)の中に、又は結合剤及び潤滑剤が含まれ得る錠剤中に存在してもよい。甘味料、香味剤、防腐剤(例えば、抗菌防腐剤)、懸濁剤、増粘剤、及び/又は乳化剤等の成分もまた、医薬組成物中に存在してもよい。

液体溶液又は懸濁液の形態で投与される場合、処方物は1つ又は複数の活性化合物及び精製水を含有してもよい。液体溶液又は懸濁液中の任意選択の成分としては、適切な防腐剤(例えば、抗菌防腐剤)、緩衝剤、溶剤、及びそれらの混合物が挙げられる。処方物の成分は、2つ以上の機能を果たし得る。防腐剤が用いられてもよい。適切な防腐剤としては、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム及び塩化ベンザルコニウムが挙げられ得る。2つ以上の防腐剤の混合物を任意選択で用いてもよい。防腐剤及びその混合物は、典型的には、総組成物の約0.0001質量% ~ 約2質量%の量で存在する。適切な緩衝剤としては、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、並びに種々の他の酸及び塩が挙げられ得る。2つ以上の緩衝剤の混合物を任意選択で用いてもよい。緩衝剤又はその混合物は典型的には、総組成物の約0.001質量% ~ 約4質量%の量

50

で存在する。経口、エアロゾル、非経口(例えば、皮下、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、腹腔内及びくも膜下腔内)、及び直腸の投与のための以下の処方物は単なる例示であって、決して限定されない。

【0104】

経口投与に適切な処方物は、(a)液体溶液、例えば、水、生理食塩水又はオレンジジュースのような希釈液中に溶解された有効量の化合物;(b)各々が所定の量の活性成分を固体又は顆粒として含有する、カプセル、サシェ、錠剤、ロゼンジ及びトローチ;(c)粉末;(d)適切な液体中の懸濁液体;並びに(e)適切なエマルジョンから構成され得る。液体の処方物としては、希釈液、例えば、水及びアルコール、例えば、エタノール、ベンジルアルコール、及びポリエチレンアルコール(薬学的に許容されるサーファクタント、懸濁剤又は乳化剤の添加の有無にかかわらず)が挙げられ得る。カプセル型は、通常の硬性又は軟性のシェルのゼラチンタイプのものであってもよく、これは例えば、サーファクタント、潤滑剤及び不活性な充填剤、例えば、ラクトース、スクロース、リン酸カルシウム及びコーンスターチを含有する。錠剤型は、ラクトース、スクロース、マンニトール、コーンスターチ、ジャガイモでんぷん、アルギン酸、微結晶性セルロース、アカシア、ゼラチン、グアーガム、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色料、希釈剤、緩衝剤、崩壊剤、湿潤剤、防腐剤、香味剤及び薬学的に適合する担体のうちの1つ又は複数を含んでもよい。ロゼンジ型は、香料、通常は、スクロース及びアカシア又はトラガカントに活性成分を含んでもよく、芳香錠(pastilles)の場合も同様に、ゼラチン及びグリセリン、又は、スクロース及びアカシア等の不活性な基剤中に活性成分を含んでもよく、エマルジョン及びゲル等の場合も、活性成分に加えて当該分野で公知であるような担体を含有していてもよい。上記の化合物は、単独で、又は、他の適切な成分と組み合わせて、吸入を介して投与されるエアロゾル処方物に作製されてもよい。これらのエアロゾル処方物は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等の許容される加圧噴射剤中に入れられてもよい。また、このエアロゾル処方物は、ネブライザー又はアトマイザー等の非加圧製剤用の医薬品として処方されてもよい。非経口投与に適した処方物としては、水性及び非水性の等張無菌注射液(酸化防止剤、緩衝液、静菌剤、及び、処方物を対象のレシピエントの血液と等張性にする溶質を含有していてもよい)、並びに、水性及び非水性無菌懸濁液(懸濁剤、溶解剤、増粘剤、安定剤、及び防腐剤を含んでもよい)が挙げられる。上記の化合物は、薬学的担体中の生理学的に許容される希釈剤、例えば無菌の液体又は液体混合物中で投与されてもよく、これには、水、生理食塩水、デキストロース水溶液及び関連する糖溶液、アルコール、例えば、エタノール、イソプロパノール又はヘキサデシルアルコール、グリコール、例えば、プロピレングリコール、又は、ポリエチレングリコール、グリセロールケタール類、例えば、2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン-4-メタノール、エーテル、例えば、ポリ(エチレングリコール)400、オイル、脂肪酸、脂肪酸エステル又はグリセリド、或いは、アセチル化脂肪酸グリセリドが挙げられ、これらには、薬学的に許容されるサーファクタント(例えば、石鹼又は界面活性剤)、懸濁剤(例えば、ペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース又はカルボキシメチルセルロース)、又は乳化剤、及び、他の医薬アジュバントが添加されている場合と、いない場合がある。非経口処方物で用いられ得るオイルとしては、石油、動物油、植物油、又は合成油が挙げられる。オイルの具体例としては、ピーナッツ油、大豆油、ゴマ油、綿実油、コーン油、オリーブ油、ワセリン、及び鉱油が挙げられる。非経口処方物に用いるための適切な脂肪酸としては、オレイン酸、ステアリン酸、及びイソステアリン酸が挙げられる。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルが、適切な脂肪酸エステルの例である。非経口処方物に用いるための適切な石鹼としては、脂肪酸アルカリ金属塩、アンモニウム塩、及びトリエタノールアミン塩が挙げられ得、適切な界面活性剤としては、(a)陽イオン性界面活性剤、例えばハロゲン化ジメチルジアルキルアンモニウム及びハロゲン化アルキルピリジニウム等、(b)陰イオン性界面活性剤、例えば、アルキル、アリール及びオレフィンスルホネート、アルキル、オレフ

10

20

30

40

50

イン、エーテル及びモノグリセリドスルフェート、並びに、スルホサクシネート等、(c)非イオン性界面活性剤、例えば脂肪族アミノオキシド、脂肪酸アルカノールアミド、及びポリオキシエチレン-ポリプロピレン共重合体等、(d)両性界面活性剤、例えばアルキル-アミノプロピオネート、及び2-アルキル-イミダゾリン第4級アンモニウム塩等、並びに(e)これらの混合物が挙げられる。

#### 【0105】

適切な防腐剤及び緩衝液をこのような処方物中で用いてもよい。注射部位への刺激を最小限に抑えるか又は除くために、このような組成物には、親水親油バランス(HLB)が約12~約17である非イオン性サーファクタントを1つ又は複数含有させてもよい。このような処方物におけるサーファクタントの容量は、約5質量%~約15質量%の範囲である。適切なサーファクタントとしては、モノオレイン酸ソルビタン等のポリエチレンソルビタン脂肪酸エステル、並びに、プロピレンオキシドとプロピレングリコールとの縮合により形成される疎水性基剤とのエチレンオキシドの高分子量付加物が挙げられる。非経口処方物が、アンプル及びバイアル等の単位用量又は複数回用量の密封容器中に存在してもよく、使用直前に、無菌の液体担体、例えば注射用の水の添加しか必要としないフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存してもよい。無菌粉末、顆粒及び錠剤から、用時調製注射液及び懸濁液を調製してもよい。上記の化合物が、注射用処方物として投与されてもよい。注射用組成物のための有効な薬学的担体についての要件は、当業者に周知である。Pharmaceutics and Pharmacy Practice、J.B.Lippincott Co.、Philadelphia、Pa.、Banker及びChalmers編、238~250頁(1982)、並びにASHP Handbook on Injectable Drugs、Toissel、第4版、622~630頁(1986)を参照のこと。経皮的な薬物放出に有用であるものを含む、局所的な処方物は、当業者に周知であり、皮膚への塗布のために本発明の実施形態の状況で適切である。薬学的処方物中の本発明の実施形態の化合物の濃度は、例えば、約1質量%未満、通常は約10質量%又は少なくとも約10質量%から20質量%~50質量%以上程度までで変化し得、選択される特定の投与方式に従って、主に液量及び粘度によって選択され得る。投与可能な(例えば、非経口的に投与可能な)組成物を調製するための方法は、当業者には公知であるか、又は明白であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Science(第17版、Mack Publishing Company、Easton、PA、1985)により詳細に記載されている。上述の医薬組成物に加えて、上記の化合物は、シクロデキストリン封入複合体又はリポソームのような封入複合体として処方されてもよい。リポソームは、特定の組織に対して化合物を標的にするように機能し得る。例えば、Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng.、9:467(1980)及び米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、及び同第5,019,369号に記載のように、リポソームを調製するためには多くの方法が利用可能である。

#### 【0106】

好ましくは、上記のような化合物は、徐放性又は制御された放出の酸耐性送達系で経口又は局部投与のために処方され得る。

#### 【0107】

本発明の薬剤を、1つ又は複数の追加的な治療剤とともに投与する場合、1つ又は複数の追加的な治療剤が、哺乳動物に同時投与され得る。「同時投与する」とは、1つ又は複数の追加的な治療剤及び上記の化合物を十分に近い時間で投与し、その結果化合物が1つ又は複数の追加的な治療剤の効果を増強し得るようにすることを意味する。これに関して、化合物が最初に投与され、1つ又は複数の追加的な治療剤が2番目に投与されてもよく、又はその逆もあり得る。或いは、化合物及び1つ又は複数の追加的な治療剤は同時に投与されてもよい。本発明の実施形態の状況で有用な送達系としては、時間放出、遅延放出及び徐放性送達系であって、これによって本発明の組成物の送達、処置されるべき部位の感作の前に、及びそれを起こすのに十分な時間で生じるような送達系が挙げられる。本発明の組成物は、他の治療剤又は治療と併せて用いられてもよい。このような系によって、本発明の組成物の反復した投与を避け、それによって対象及び医師の利便性を増すことができ、本発明のある特定の組成物の実施形態に特に適切であり得る。多くの種類の放出送達系が利用可能であり、当業者には公知である。それらには、ポリマーベースの系、例えば

、ポリ(ラクチド-グリコリド)、コポリオキサレート類、ポリカプロラクトン類、ポリエステルアミド類、ポリオルトエステル類、ポリヒドロキシ酪酸、及びポリ無水物類が含まれる。薬物を含有する前述のポリマーの微小カプセルが、例えば、米国特許第5,075,109号に記載されている。送達系にはまた、非ポリマー系も含まれ、これは、脂質、例としては、ステロール類、例えば、コレステロール、コレステロールエステル、並びに脂肪酸又は中性脂肪、例えばモノ-、ジ-及びトリ-グリセリド類;ヒドロゲル放出系;シラスティック(sylastic)系;ペプチドベースの系;ワックスコーティング;慣用結合剤及び賦形剤を用いる圧縮錠剤;部分的に融合した移植物;等である。具体例としては、限定するものではないが:(a)活性な組成物が、米国特許第4,452,775号、同第4,667,014号、同第4,748,034号及び同第5,239,660号に記載されるもの等のマトリックス内の型に含有される侵食系、並びに(b)米国特許第3,832,253号及び同第3,854,480号に記載されるようなポリマーから、制御された速度で活性成分が浸透する拡散系が挙げられる。更に、ポンプベースのハードウェア送達系を用いてもよく、これらのいくつかは移植に適合している。

#### 【0108】

本発明の好ましい態様では、本発明による化合物は、サイトカインIFN $\gamma$ を25ng/mlの濃度で50%まで阻害し得る。

#### 【0109】

治療的な処置のスクリーニングのため、又は炎症応答によって特徴付けられる障害又は病理の治療的な処置の有効性をモニタリングするための方法の好ましい実施形態では、障害は、セリアック病であり、治療はグルテンフリー食である。

#### 【0110】

上で規定される化合物の好ましい実施形態では、ポリペプチドは、TSLPの短いアイソフォーム(配列番号1)のaa.24~40のアミノ酸配列から、又はTSLPのオーソロガス遺伝子又は相同遺伝子、その機能的変異体、組換え若しくは合成の誘導体、フラグメント若しくはアナログからコードされる対応する領域のアミノ酸配列から本質的になる配列を含む。

#### 【0111】

本発明において、免疫調節活性とは、1つ又は複数の免疫機能(Farlex Partner Medical Dictionary(C)Farlex 2012)を修飾又は調節する能力、例としては、抗炎症活性を指す。

#### 【0112】

本発明において、抗炎症又は抗炎症性とは、炎症を低下する物質又は処置の特性を指す。本発明において、オーソロガス遺伝子又は相同遺伝子によってコードされる好ましい胸腺間質性リンパ球新生因子(TSLP)は以下である:

gi|354484147|ref|XP\_003504252.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子様[チャイニーズハムスター(*Cricetulus griseus*)](配列番号9)ヌクレオチド:XM\_003504204.1(配列番号25)

gi|255759970|ref|NP\_001157535.1| 胸腺間質性リンパ球新生因子前駆体[ウマ](配列番号10)ヌクレオチド:NM\_001164063.2(配列番号26)

gi|403256664|ref|XP\_003920983.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子[ポリピアリスザル(*Saimiri boliviensis boliviensis*)](配列番号11)ヌクレオチド:XM\_003920934.1(配列番号27)

gi|296193991|ref|XP\_002744731.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子[コモンマーモセット(*Callithrix jacchus*)](配列番号12)ヌクレオチド:XM\_002744685.1(配列番号28)

gi|109078157|ref|XP\_001100503.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子[アカゲザル(*Maca ca mulatta*)](配列番号13)ヌクレオチド:XM\_001100503.2(配列番号29)

gi|402872238|ref|XP\_003900034.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子[アヌビスヒヒ(*Papio anubis*)](配列番号14)ヌクレオチド:XM\_003899985.1(配列番号30)

gi|332221439|ref|XP\_003259868.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子[クロテナガザル(*Nomascus leucogenys*)](配列番号15)ヌクレオチド:XM\_003259820.2(配列番号31)

gi|297675754|ref|XP\_002815824.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子[スマトラオウラン(*Pongo abelii*)](配列番号16)ヌクレオチド:XM\_002815778.2(配列番号32)

10

20

30

40

50

gi|410949156|ref|XP\_003981290.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子[ネコ](配列番号17)ヌクレオチド:XM\_003981241.2(配列番号33)

gi|114601106|ref|XP\_001141816.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子アイソフォーム2[チンパンジー(Pan troglodytes)](配列番号18)ヌクレオチド:XM\_001141816.3(配列番号34)

gi|397512961|ref|XP\_003826800.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子[ボノボ(Pan paniscus)](配列番号19)ヌクレオチド:XM\_003826752.1(配列番号35)

gi|426349610|ref|XP\_004042385.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子アイソフォーム1[ニシロランドゴリラ(Gorilla gorilla gorilla)](配列番号20)ヌクレオチド:XM\_004042337.1(配列番号36)

10

gi|385214965|gb|AF149343.1| 胸腺間質性リンパ球新生因子、部分的[イヌ](配列番号21)ヌクレオチド:JQ698664.1(配列番号37)

gi|301767608|ref|XP\_002919224.1| 予測:胸腺間質性リンパ球新生因子様,部分的[ジャイアントパンダ(Ailuropoda melanoleuca)](配列番号22)ヌクレオチド:XM\_002919178.1(配列番号38)

gi|10946698|ref|NP\_067342.1| 胸腺間質性リンパ球新生因子前駆体[ハツカネズミ](配列番号23)ヌクレオチド:NM\_021367.2(配列番号39)

gi|296482930|tpg|DAA25045.1| 胸腺間質性リンパ球新生因子様[ウシ](配列番号24)ヌクレオチド:GJ061991.1

20

【 0 1 1 3 】

本発明において、「TSLPのオーソロガス遺伝子又は相同遺伝子由来のコードされた対応する配列のフラグメント」(又は短いアイソフォームに対するフラグメント)は、例えば、整列している配列由来の以下の配列であってもよい:

【 0 1 1 4 】

【化 1】

IFALHTRATLISQCPGYSETQRNNAQEMLEV-----KDIQINQTSQIQFIWHSLLQTKY-- (1)  
 IV-TAINNATLNHPCPGHSGIQINNTOAMKRRKREVTNKCLKOVSNLIELWRYFSRSQ----- (2)  
 LFAVRENATLALWCPGYSETQINDTOAMKRRKRRKVTTNKCLEQVSOQLGWRRFIATLRK-- (3)  
 LFAVRENATLALWCPGYSETQINATQEMKRRKRRKVTTNKCLEQVSOQLGWRRFIATLRK-- (4)  
 MFARKKATLALWCPGYSETQINATQAMKRRKRRKVTTNKCLEQVSOQLGWRRFIATLRK (5)  
 MFARKKATLALWCPGYSETQINATQAMKRRKRRKVTTNKCLEQVSOQLGWRRFIATLRK (6)  
 MFAMKKAALALWCPGYSETQINATQAMKRRKRRKVTTNKCLEQVSOQLGWRRFIATLRK (7)  
 VFAMKKAALALWCPGYSETQINATQAMKRRKRRKVTTNKCLEQVSOQLGWRRFIATLRK (8)  
 IFAIRNATLTLQCPGYSGTQINNTQAKKRRKQVTTNKCREQVSHLMELWRRFSRIS---- (9)  
 MFAMKKAALTIWCPGYSETQINATQAMKRRKRRKVTTNKCLEQVSOQLGWRRFIATLRK (10)  
 MFAMKKAALAIWCPGYSETQINATQAMKRRKRRKVTTNKCLEQVSOQLGWRRFIATLRK (11)  
 MFAMKKAALAIWCPGYSETQINATQAMKRRKRRKVTTNKCLEQVSOQLGWRRFIATLRK (12)  
 AFREGTVAALAECPGYAAAPINNTQAKKRRKRRKVTTNKCREQVAHLIGLWRRFSRIS---- (13)  
 IFAIQTRATLTLQCPYSYSGMQINNTQAKKRRKRRKVTTNKCREQVAYLIGLWRRFSRIS---- (14)  
 TFARRRREALNDHCPGYPETERNDGTQEMKAE---VQNICLN-OTSQILRLWYSEMQSPE--- (15)  
 AFVFRHAALAPACPGYSGPQVSRATQAPRVPASERAGPGEPRPPAARRAWTRALITSEG (16)  
 MFAMKKAALAIWCPGYSETQINATQAMKRRKRRKVTTNKCLEQVSOQLGWRRFIATLRK (17)

10

20

gi|354484147|ref|XP\_003504552.1|  
 gi|255759970|ref|NP\_001157535.1|  
 gi|403256664|ref|XP\_003920983.1|  
 gi|296193991|ref|XP\_002744731.1|  
 gi|109078157|ref|XP\_001100803.1|  
 gi|402872238|ref|XP\_003900034.1|  
 gi|322221439|ref|XP\_003259868.1|  
 gi|297675754|ref|XP\_002815824.1|  
 gi|10949156|ref|XP\_003981290.1|  
 gi|114601106|ref|XP\_001141816.1|  
 gi|397512361|ref|XP\_003826800.1|  
 gi|426349610|ref|XP\_004042385.1|  
 gi|385214965|gb|AFI49343.1|  
 gi|301767608|ref|XP\_002919224.1|  
 gi|109466638|ref|NP\_067342.1|  
 gi|296482930|cp|DAA25045.1|  
 gi|190886449|ref|NP\_612561.2|

30

40

- (1) : 配列番号9のaa.121 ~ 176に対応する
- (2) : 配列番号10のaa.86 ~ 143に対応する
- (3) : 配列番号11のaa.97 ~ 157に対応する
- (4) : 配列番号12のaa.97 ~ 157に対応する
- (5) : 配列番号13のaa.97 ~ 159に対応する
- (6) : 配列番号14のaa.97 ~ 159に対応する

50

- (7): 配列番号15のaa.97~159に対応する  
 (8): 配列番号16のaa.97~159に対応する  
 (9): 配列番号17のaa.125~183に対応する  
 (10): 配列番号18のaa.97~159に対応する  
 (11): 配列番号19のaa.97~159に対応する  
 (12): 配列番号20のaa.43~105に対応する  
 (13): 配列番号21のaa.96~154に対応する  
 (14): 配列番号22のaa.90~148に対応する  
 (15): 配列番号23のaa.85~140に対応する  
 (16): 配列番号24のaa.88~150に対応する  
 (17): 配列番号1に対応する

10

## 【0115】

本発明は、ここで、以下の図面を参照して以下の非限定的な例によって記載される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0116】

【図1】ヒトTSLPの異なる既存のアイソフォーム。UCSCゲノムブラウザ(Genome Browser(hg19))由来のヒトTSLP遺伝子座の模式図。頂部で:3つの転写バリエーション(<http://genome.ucsc.edu>及び具体的には、TSLPに関しては:[http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr5%3A110404856-110414355&hgsid=197243096\\_TsWaq2VphIzNP2DIjsuWks3iD0t](http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=chr5%3A110404856-110414355&hgsid=197243096_TsWaq2VphIzNP2DIjsuWks3iD0t))が、写し出され、そのうち2つがコードRNA(2及び3)を生じる。真ん中では:それぞれ、調節性エレメント/エンハンサー、プロモーター及び活性調節性エレメントを印す、重ねられたH3K4Me1、H3K4Me3及びH3K27AcのENCODEのトラックプロファイル。底部では:125の細胞タイプ由来のENCODE DNaseI高感受性部位クラスター、及びChIP-seq実験で評価された転写因子結合領域。

20

【図2】短いTSLPは、ヒトの腸及び皮膚組織上で発現された優勢なアイソフォームである。健常な個体由来の腸組織サンプル(gut)、単離された上皮(IEC)及び固有層(LP)細胞(a)及び皮膚組織サンプル(b)中の短いTSLP及び長いTSLPのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子Gapdhのものに関する。\*\*\* $p < 0.001$ 。

【図3】2つのアイソフォームのクローニング、発現及び精製。市販のTSLP(long Ecoli、R&D systems社)、並びに社内で生成した長いアイソフォーム及び短いアイソフォームの、2つの抗体を用いて行ったウエスタンブロット(1つは、市販されており、かつ両方のアイソフォームを認識し(右)、1つは社内で作成され、長い方のアイソフォームのみを認識する(短い方のアイソフォームは消失する))。分子量は、kDaで表す。

30

【図4】TSLPアイソフォームは、ヒト上皮細胞株において差次的に調節される。(a)分極した未処理のCaco2細胞中の短いTSLP及び長いTSLPのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子Gapdhのものに関する。 $*p < 0.05$ 。(b、c)分極したCaco2細胞におけるTSLPアイソフォームタンパク質発現の定量。未処理のまま(b)又は異なる細菌株(サルモネラ・エンテリカ(*Salmonella enterica*)、血液型亜型チフィリウム(*typhimurium*)SL1344:FB62;大腸菌(*Escherichia coli*)株LF82;大腸菌MG1655)をチャレンジされた(c)細胞由来の溶解液を、ピンキュリン、長いTSLPアイソフォーム及び総TSLPアイソフォームに対する抗体を用いてイムノブロットした。タンパク質レベルは、ピンキュリン発現に対して正規化した。(c)では、データは、未処理の細胞と比較した倍数変化として表現した(a.u.=1)。データは、3つの独立した実験の平均 $\pm$ SDとして示す。 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 。

40

【図5】TSLPアイソフォームは、ヒトケラチノサイト中で差次的に調節される。未処理(a)又はビタミンD若しくはポリ(I:C)で刺激した(b)HaCaT細胞中の短いTSLP及び長いTSLPのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子Gapdhのものに関する。(b)では、データを、未処理の細胞と比較した倍数変化として表現する(a.u.=1)。データは、3つの独立した実験の平均 $\pm$ SDとして示す。 $**p$

50

<0.01、\*\*\*p<0.001。

【図6】短いTSLPは、抗炎症特性を有する。短いTSLP(左)及び大腸菌において(中央)、又はパキユロウイルス系において産生された長いTSLP(右)の漸増濃度の存在下における2つの異なるドナー(比1:1)由来の末梢血単核細胞(PBMC)で行った双方向性混合リンパ球反応(bidirectional mixed lymphocyte reaction)(MLR)におけるIFN産生の定量。IFN産生は、対照(値=1)として未処理のPBMCを考慮する「倍数変化」で表現される。データは、3つの独立した実験の平均±SDとして示される。\*p<0.05、\*\*p<0.01。

【図7a】短いTSLPは、成熟及び未熟なDC活性化状態を変化しない。サルモネラ(Salmonella)(MOI 1:1)によるその後のチャレンジが無しによる、24時間の間の、短いTSLPの示した用量(50、100又は200ng/ml)で馴化された単球由来のDCのFACS分析。

10

【図7b】短いTSLPは、成熟及び未熟なDC活性化状態を変化しない。サルモネラ(Salmonella)(MOI 1:1)によるその後のチャレンジが有りによる、24時間の間の、短いTSLPの示した用量(50、100又は200ng/ml)で馴化された単球由来のDCのFACS分析。

【図8】短いTSLPは、樹状細胞サイトカイン分泌を阻害する。ヒト末梢血から分化した単球由来DCの炎症性サイトカイン分泌の解析。細胞を最初に、24時間、漸増用量の短いTSLPを用いて馴化し、次いで、サルモネラ(クローンFB62)を用いて1時間(比1:1)感染させた。データは、対照(値=1)として、サルモネラのみを用いて処置した細胞を考慮する「倍数変化」で表す。データは、4つの独立した実験の平均±SDとして示す。\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001。

【図9】短いTSLPは、mDCに対する長いTSLPの効果を妨害せず、Th1応答を阻害する。(a)PBMCから単離された骨髄球性樹状細胞(mDC)に対するヒトSTAT5 pY694のフローサイトメトリの評価。新鮮に単離された細胞を、未処理で残すか、又は15分間、等モル用量の短い及び/若しくは長いTSLPとともにインキュベートし、その後に抗pSTAT5抗体若しくは対応するアイソタイプ(灰色)を用いて、細胞内染色プロトコールを行った。(b)24時間の間、(a)で処置したmDCの上清中のCCL17及びCCL22のレベルのELISA分析。データは、2つの独立した実験の平均±SDとして示す。(c)同じ細胞を、TSLPインキュベーション後、洗浄して、異なるドナー由来のヒトのナイーブなCD4 T細胞とともに(比1:5)、6日間共培養した。TNFについてのT細胞の細胞内染色を、PMA(ホルボール-12-ミリスチート-13-酢酸)及びイオノマイシンを用いた4時間の再刺激後に行った。データは、mDCの1つのドナー及びT細胞の2つのドナーで行った2つの独立した実験の平均±SDとして示す。\*\*\*p<0.001。(d)PBMCから単離されたmDCを、未処置のまま残すか、又は漸増用量の短いTSLPとともに24時間インキュベートし、次いで、洗浄後に、(c)にあるとおり、ヒトのナイーブなCD4 T細胞とともに6日間、共培養した。グラフは、共培養(6日)の上清中のIFNレベル(右)及びIFN陽性細胞についての細胞内染色(左)の代表的な解析を示す。

20

30

【図10a】短いTSLPは、エンドトキシン誘導性の炎症効果を、インビボにおいて、TSLPR非依存性の方式で減弱する。漸増用量の短いTSLPを用いてi.p.で処置したマウスの血清における炎症性サイトカインのレベルの解析。短いTSLPを、LPSショック(200µgのLPS)を誘導する前に、2回、12時間及び2時間で注射した。血液を6時間後に採取した。データは、2つの独立した実験の代表である。\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001。

【図10b】短いTSLPは、エンドトキシン誘導性の炎症効果を、インビボにおいて、TSLPR非依存性の方式で減弱する。高用量の短いTSLP(200µg)を用いて(a)のように処置したwt及びtslpr<sup>-/-</sup>マウスの血清中のサイトカインレベル。データは、2つの独立した実験の代表である。\*p<0.05、\*\*p<0.01、\*\*\*p<0.001。

40

【図11】短いTSLPは、マウスをDSS誘発性の腸炎から防御する。短いTSLP(200ug)又はビヒクルi.p.Graphを用いて1日おきに処置したDSS誘発性の腸炎を有するマウスにおける体重変化は最初の体重に対する体重のパーセンテージを示す。\*p<0.05。

【図12a】漸増用量の短いTSLP、全長ペプチド又はN末端(Nterm)及びC末端(Cterm)部分を用いて、図6のように行った双方向性MLRにおけるIFN産生の定量。IFN産生は、対照として(値=1)未処置のPBMCを考慮して、「倍数変化」で表す。データは3つの独立した実験の平均±SDとして示す。\*p<0.05、\*\*p<0.01。

50

【図12b】短いTSLPペプチドを用いて図10のように処置したマウスの血清中の炎症性サイトカインのレベルの解析。データは3つの独立した実験の平均±SDとして示す。\* $p<0.05$ 、\*\* $p<0.01$ 。

【図12c】短いTSLPのアミノ酸配列(#01、配列番号1のaa.4~63に相当する)、及びそのフラグメントのうち2つであって、N末端(#02、配列番号1のaa.4~40に相当する)から、又はタンパク質のC末端(#03、配列番号1のaa.24~63に相当する)からのいずれかで開始し、17のaaが重複しているフラグメント。

【図13】抗長型-TSLP抗体は、プロッキング活性を有する。漸増用量の抗長型TSLP抗体又はアイソタイプ対照の存在下で、長いTSLP(50ng/ml)を用いて24時間処置したmDCの上清中のCCL17レベルのELISA解析。

【図14】長いTSLP発現は、健常な個体と比較した潰瘍性大腸炎(UC)患者由来の腸の細胞において増大する。健常な(H)個体及びUC患者由来の全粘膜腸組織中の短いTSLP及び長いTSLPのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関している。\* $p<0.05$ 。

【図15a】短いTSLP及び長いTSLPは、腸において、タンパク質レベルで、定常状態又は炎症の状態の下で差次的に発現される。健常な個体由来の結腸の切片中の、代表的な免疫組織化学染色の長いTSLP(上部のパネル)及び両方のTSLPアイソフォーム(総TSLP)(下部のパネル)。

【図15b】短いTSLP及び長いTSLPは、腸において、タンパク質レベルで、定常状態又は炎症の状態の下で差次的に発現される。潰瘍性大腸炎患者由来の結腸の切片中の、代表的な免疫蛍光染色の長いTSLP(上部のパネル)及び両方のTSLPアイソフォーム(総TSLP)(下部のパネル)。

【図16-1】潰瘍性大腸炎組織のサイトカイン及び転写因子プロファイリング。健常な個体及びUC患者由来の腸組織における種々の転写因子及びサイトカインmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関している。\* $p<0.05$  \*\* $p<0.01$ 。

【図16-2】潰瘍性大腸炎組織のサイトカイン及び転写因子プロファイリング。健常な個体及びUC患者由来の腸組織における種々の転写因子及びサイトカインmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関している。\* $p<0.05$  \*\* $p<0.01$ 。

【図16-3】潰瘍性大腸炎組織のサイトカイン及び転写因子プロファイリング。健常な個体及びUC患者由来の腸組織における種々の転写因子及びサイトカインmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関している。\* $p<0.05$  \*\* $p<0.01$ 。

【図17】短いTSLP発現は、処置後のセリアック病患者の腸組織において上方制御される。未処置(UCD、 $n=13$ )及び処置された(TCD、グルテンフリー食をしている患者、 $n=15$ )セリアック病(CD)患者の、並びに対照の健常な個体(H、 $n=13$ )の腸の組織サンプル中の短いTSLP及び長いTSLPのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関している。\*\*\* $p<0.001$ 。

【図18】短いTSLP及び長いTSLPは、健常な対応物と比較して腫瘍性の腸の組織中で下方制御される。健常な(組織形成手術から少なくとも7cm遠い)及び結腸直腸がん患者由来の腫瘍性の結腸組織中の長いTSLP及び短いTSLPのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現中の「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関している。\* $p<0.05$ 。

【図19】長いTSLPの発現は、皮膚の種々の炎症性障害で誘導される。炎症性皮膚障害患者由来の組織サンプル中の長いTSLPのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関している。\* $p<0.05$ 、\*\* $p<0.001$ 。

【図20】短いTSLPの発現は、皮膚の種々の炎症性障害において下方制御される。炎症性皮膚障害患者由来の組織サンプル中の短いTSLPのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA

10

20

30

40

50

A発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関する。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.001$ 。

【図2 1】短いTSLP及び長いTSLPは、アトピー性皮膚炎患者の皮膚組織で差次的に発現される。(a)非病変(non-lesional)(NL)及び病変(L)のアトピー性皮膚炎患者由来の皮膚生検中の短いTSLP及び長いTSLPのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関する。 $*p<0.05$ 、 $***p<0.001$ 。(b)NL及びLの患者の組織切片における長いTSLP(上部のパネル)及び両方のTSLPアイソフォーム(総TSLP)(下部のパネル)の代表的な免疫蛍光染色。

【図2 2】長いTSLPの発現は、乾癬患者の皮膚組織において増大される。非病変(NL)及び病変(L)の乾癬患者由来の皮膚生検における短いTSLP及び長いTSLPのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関する。 $**p<0.01$ 。

【図2 3】健常な個体又はUC患者由来の腸細胞における(a);健常な個体(ctr)及びセリアック病患者の腸の生検における(b);アトピー性皮膚炎(c)及び乾癬(d)患者の皮膚生検における、TSLPRのmRNAの定量的リアルタイムPCR解析。mRNA発現における「誘導倍数」は、「ハウスキーピング」遺伝子、Gapdhのものに関する。 $*p<0.05$ 、 $***p<0.001$ 。H:健常な、UC:潰瘍性大腸炎、UCD:未処置セリアック病、TCD:処置されたセリアック病、NL:非病変、L:病変。

【図2 4】炎症を起こした腸のエキソピボ臓器培養モデルに対するTSLP活性の解析。潰瘍性大腸炎患者の外科的標品に由来する組織を、粘膜層と粘膜下層とに分離した。粘膜層を、示した組織の頂端及び基底外側でTSLPアイソフォームとともに一晚培養した。

【発明を実施するための形態】

【0117】

実験手順

配列

長型のヒトTSLPをコードするcDNA(配列番号4):

ATGTTCCCTTTTGCCTTACTATATGTTCTGTCAGTTTCTTTTCAGGAAAATCTTCATCTTACAACCTTGAGGGCTGGTGT  
AACTTACGACTTCACTAACTGTGACTTTGAGAAGATTAAGCAGCCTATCTCAGTACTATTTCTAAAGACCTGATTACAT  
ATATGAGTGGGACCAAAAGTACCGAGTTCAACAACACCGTCTCTTGTAGCAATCGGCCACATTGCCTTACTGAAATCCAG  
AGCCTAACCTTCAATCCCACCGCGGCTGCGCGTCGCTCGCCAAAGAAAATGTTCCGCCATGAAAACCTAAGGCTGCCTTAGC  
TATCTGGTGCCAGGCTATTCGAAAACCTCAGATAAATGCTACTCAGGCAATGAAGAAGAGGAGAAAAAGGAAAGTCACAA  
CCAATAAATGTCTGGAACAAGTGTCACAATTACAAGGATTGTGGCGTCGCTTCAATCGACCTTTACTGAAACAACAGTAA

短型のヒトTSLPをコードするcDNA(配列番号3):

ATGTTCCGCCATGAAAACCTAAGGCTGCCTTAGCTATCTGGTGCCAGGCTATTCGAAAACCTCAGATAAATGCTACTCAGGC  
AATGAAGAAGAGGAGAAAAAGGAAAGTCAACAACCAATAAATGTCTGGAACAAGTGTCACAATTACAAGGATTGTGGCGTC  
GCTTCAATCGACCTTTACTGAAACAACAGTAA

長型のヒトTSLPのアミノ酸配列(配列番号2)

MFPFALLYVLSVSRKIFILQLVGLVLTDFNCFEIKAAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVSCSNRPHCLTEIQ  
SLTFNPTAGCASLAKEMFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKRRKRKVTNNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQQ  
(NCBI Accession n.gi|14719428|ref|NP\_149024.1| 胸腺間質性リンパ球新生因子アイソ  
フォーム1前駆体[ホモサピエンス])

短型のヒトTSLPのアミノ酸配列(配列番号1)

MFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKRRKRKVTNNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQQ(配列番号2のaa.97  
~159にも相当する;NCBI Accession n.gi|190886449|ref|NP\_612561.2| 胸腺間質性リン  
パ球新生因子アイソフォーム2[ホモサピエンス])

短型のヒトTSLPのアミノ酸配列のフラグメント(配列番号1のaa.4~63に相当する):

MKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKRRKRKVTNNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQQ(NCBI Accession n.gi  
|16876879|gb|AAH16720.1| 胸腺間質性リンパ球新生因子[ホモサピエンス])

【0118】

組織サンプリング

腸粘膜を、手術の時点で潰瘍性大腸炎患者の腸から切り出した。健常な腸のサンプルを、結腸がんの手術を受けている患者の健常な組織(腫瘍性の組織から少なくとも7cm遠い)から得た。粘膜層の健常な部分を、病理学者が組織の残りから分離して、直接本発明者らの実験室に移動した。移動は、両方の場合とも、静菌性抗生物質を補充したハックス平衡塩溶液(HBSS)緩衝液中で行った。組織は、移動の間4℃で保持した。セリアック病患者由来の粘膜を、常法の大腸内視鏡検査の間に生検の形態で得た。皮膚生検は、形成手術を受けている健常な個体、又はアトピー性皮膚炎に罹患している患者のいずれかから採取した。臨床診断は、皮膚病理学的な評価によって確認した。全ての組織は、施設の審査委員会が承認したインフォームドコンセントに署名した患者から入手し、これによって診断には必要がない材料を研究目的のために用いることが可能になった。サンプルは、完全に匿名の方式で取り扱い、患者には、組織学的リファレンスをクロスチェックするために病理学者がシリアルナンバーを与えた。

10

## 【0119】

## 上皮内の細胞(IEC)及び固有層(LP)細胞の単離

実験室に到着した際、腸粘膜を、以前に記載のとおり、IEC及びLP細胞の単離のために処理した[Matteoli GらGut 2010]。要するに、組織を小片に切断し、HBSS 1%ウシ胎仔血清(Gibco社)、1mM DTTの中で15分間、37℃で2回洗浄して粘液を除去した。次いで、IECを、HBSS、1%FBS、1mM EDTAを用いて、更に15分間洗浄することによって剥がした。IECは、300gで10分間ペレットにして、RNA抽出のためにTrizol試薬(Ambion、Invitrogen社)で溶解した。残りの組織を1mm<sup>2</sup>の小片に切断して、5%FBSを含むDMEM中に、コラゲナーゼVII

20

## 【0120】

## RNA抽出及びqPCR

RNAを、RNeasy Micro Kit(Qiagen社)を用いて抽出した。RNAは、オリゴ(dT)及びImProm-II(商標)Reverse Transcriptase(Promega社)を用いて逆転写した。定量的リアルタイムPCRを、Applied Biosystems 7900HT Fast RT-PCR System(Applied Biosystems社)でFast SYBR Green PCRキットを用いて行った。結果を2-DCt方法(Livak及びSchmittgen、Methods、2001)を用いて定量した。遺伝子発現を、ハウスキーピング遺伝子、gapdhの発現に対して正規化した。

30

## 【0121】

種々の対のプライマーを、2つの遺伝子について設計した:

LONG TSLP FW:5'-CACCGTCTCTTGAGCAATCG(配列番号5)

LONG TSLP RV:5'-TAGCCTGGGCACCAGATAGC(配列番号6)

SHORT TSLP FW:5'-CCGCCTATGAGCAGCCAC(配列番号7)

SHORT TSLP RV:5'-CCTGAGTAGCATTTATCTGAG(配列番号8)

## 【0122】

## 細菌の株

サルモネラ・エンテリカ血液型垂型チフィリウムSL1344株FB62及び大腸菌株LF82及びMG1655をTBブロス[Arlette Darfeuille Michaudより贈呈]中で培養した。感染のために、細菌を3mlのTB中で37℃で、攪拌しながら一晚増殖させた。翌日、1mLの予備摂取を9mlの新鮮なTB培地中に添加し、指数増殖期に到達するまで(O.D.が0.55~0.65)37℃で攪拌しながら増殖させた。

40

## 【0123】

## 細胞培養

Caco2細胞は、10%のFBS、1%のグルタミン、1%の非必須アミノ酸、1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補充したDMEM中で培養した。HaCaT細胞は、10%のFBS、1%のグルタミン、1%のペニシリン-ストレプトマイシンを補充したDMEM中で培養した。transwell inserts(Co

50

ring社)での増殖のために、 $2 \times 10^5$ 個のcaco2細胞を $6\text{mm}^2$ のトランスウェルに播種し、経上皮の抵抗がほぼ $650\Omega$ になるまで、10~12日間増殖させた。細胞を、1時間、1:100の感染効率で抗生物質の非存在下において、細菌で感染させた。次いで、培地を、 $100\mu\text{g/mL}$ のゲンタマイシンを含有している完全培地で置き換えて、細胞を更に23時間培養した。HaCaT細胞に、活性型のビタミンDであるカルシトリオール( $10\mu\text{M}$ 、Enzo Life Sciences社)、又はポリ(I:C)( $1\mu\text{g/mL}$ )を24時間チャレンジした。チャレンジの終わりに、細胞を、RNA抽出のためにはTrizol(Ambion、Life Technologies社)試薬中で、又はタンパク質抽出のためにはRIPA緩衝液中で溶解した。

#### 【0124】

##### 試薬

TSLP組換えタンパク質、長いTSLP(配列番号2のaa.29~159の配列を有しており、それによって翻訳後に切断されるaa.1~28の配列のシグナルペプチドを提示しない形態である；全長タンパク質に関して:mw 15KDa、Uniprot:Q969D9)を、R&D Systems社から購入した。

#### 【0125】

2つのTSLPアイソフォーム及びフラグメントTSLP(fragTSLP)抗体のクローニング及び発現

長型及び短型のヒトTSLPをコードするcDNAを、PCRによって生成して、pFL-GST移入ベクター(Invitrogen社)のBamHI/SalI部位中にサブクローニングした。得られたバキュロウイルスを、昆虫細胞(Sf9及びHi5細胞)での発現のために用いた。昆虫細胞を、遠心分離によって回収し、溶解緩衝液(20mMのTris[pH 7.4]、300mMのNaCl、5%のグリセロール、1mMのEDTA、1mMのDTT及びプロテアーゼ阻害剤)中に再懸濁し、穏やかに超音波処理して、その溶解液を遠心分離によって清明にした。TSLPフラグメントを、Gluthation Sepharose Beads(Amersham社)に吸収させて、20mMの還元グルタチオン(Sigma社)を補充した溶解緩衝液を用いて溶出した。溶出されたタンパク質を、20mMのTris[pH 7.4]、200mMのNaCl、5%のグリセロール、1mMのEDTA、1mMのDTTを含有する緩衝液中で透析した。

#### 【0126】

抗-長型TSLP特異的な抗体調製のために、短いTSLP(fragTSLP、配列番号2のaa.1~96に相当する)に存在しない長いアイソフォームのフラグメントをクローニングして、大腸菌細胞中で発現させ、同じストラテジーで精製した(DsbAタグ)。ウサギを不完全フロイントアジュバントの存在下でタグ化フラグメントで免疫して、得られた血清を抗-DsbA抗体枯渇させた。

#### 【0127】

##### 短いTSLPペプチドの合成

短いTSLPペプチドを社内で合成して、滅菌水中に再懸濁した。エンドトキシンのレベルは、LAL試験で決定した場合、ペプチド $1\mu\text{g}$ あたり $0.1\text{ng}$ 未満であった。

#### 【0128】

##### 配列:

- 短いTSLP(配列番号1のaa4~63、mw 7KDa、Uniprot:Q96AU7)
- N末端ペプチド(配列番号1のaa4~40、mw 4,2KDa)
- C末端ペプチド(配列番号1のaa24~63、mw 4,8KDa)

#### 【0129】

ペプチドは、HMPB-ChemMatrix樹脂( $0,45\text{mmol/g}$ )上で $0.12\text{mmol}$ のスケールで作動する、Biotage ALSTRA Initiator+ペプチドシンセサイザーで、段階的なマイクロ波支援Fmoc-SPPSで組み立てた。樹脂を、NMP/DCM混合物での使用の前に膨潤させた。Fmoc保護されたアミノ酸の活性化及びカップリングは、Oxyma 0.5M/DIC 0.5M(1:1:1)を用いて、最初の樹脂の負荷よりも5当量過剰で行った。カップリング工程は、75℃で7分間行った。脱保護工程は、室温で、DMF中で20%ピペリジン溶液を用いる処理によって行った( $1 \times 3\text{分} + 1 \times 5\text{分}$ )。各カップリング又は脱保護工程の後、ペプチジル-樹脂を、DMF( $4 \times 5\text{ml}$ )で洗浄した。鎖のアセンブリ後、ペプチドを、90%のTFA、5%の水、2.5%のチオアニソール、2.5%のTISの混合物を用いて樹脂から切断した(3時間、RT)。冷ジエチルエーテル中での沈殿後、粗ペプチ

10

20

30

40

50

ドを遠心分離によって収集して、更に冷ジエチルエーテルで洗浄して、スカベンジャーを除去した。次いで、ペプチドを50%の水性アセトニトリル0.07%TFA緩衝液中で溶解し、分取RP-HPLCによって精製した。

#### 【0130】

RP-HPLC分析及び精製:

分析的及び半分取逆相高性能液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)は、分析目的についてはMD-910マルチチャンネル検出器を装備するか、又は分取目的ではUvidec-100-VI可変UV検出器(全てJASCO社、Tokyo、Japan)を装備したTri Rotar-VI HPLCシステムで行った。Phenomenex Jupiter 5 $\mu$  C18 90 カラム(150 $\times$ 4.6mm)を、分析の実施のために、及びPhenomenex Jupiter 10 $\mu$  C18 90 (250 $\times$ 21.2mm)をペプチド精製のために用いた。データを記録して、Borwinソフトウェアで処理した。2%/分の線形の勾配の0~60%の溶出液B(溶出液A=H<sub>2</sub>O/3%CH<sub>3</sub>CN/0.07%TFA、溶出液B=70%CH<sub>3</sub>CN/30%H<sub>2</sub>O/0.07%TFA)を、分析目的のためには1mL/分の流速で用いた。UV検出は、220~320nmの範囲で記録した。ペプチド精製は、40分にわたる100%のA 30%のBの勾配を用いて、14mL/分の流速で分取RP-HPLCによって達成した。純粋なRP-HPLCの画分(>95%)を合わせて、凍結乾燥した。

10

#### 【0131】

試薬:

鎖のアセンブリの間に用いたHMPB-ChemMatrix樹脂及びN-a-Fmoc-L-アミノ酸は、Iris Biotech GmbH社(Marktreidwitz、Germany)から購入した。エチルシアノグリオキシレート-2-オキシム(Oxyima)は、Novabiochem社(Darmstadt、Germany)から購入し、N,N'-ジメチルホルムアミド(DMF)及びトリフルオロ酢酸(TFA)は、Carlo Erba社(Rodano、Italy)からであった。N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)、ジクロロメタン(DCM)及び全ての他の有機試薬及び溶媒は、他に言及しない限り、高純度でSigma-Aldrich社(Steinheim、Germany)から購入した。固相ペプチド合成(SPPS)のための全ての溶媒は、更なる精製なしで用いた。HPLC等級のアセトニトリル(ACN)及び超純粋な18.2 の水(Millipore-MilliQ)を、液体クロマトグラフィーのための全緩衝液の調製に用いた。クロマトグラフィーカラムは、Phenomenex社(Torrance CA、USA)からであった。

20

#### 【0132】

エンドトキシン混入アッセイ

エンドトキシン混入は、カプトガニ血球抽出成分(Limulus amoebocyte lysate)(LAL)アッセイ(Lonza社、#50-647U)を用いて評価した。

30

#### 【0133】

末梢血単核球混合リンパ球反応

パフィーコート、研究用途のためのインフォームドコンセントを行った健常なドナー(Abbiategrosso hospital、Italy)から入手した。末梢血単核細胞(PBMC)を、Ficoll(GE Healthcare社)勾配遠心分離で分離し、次いで10%のウシ胎仔血清(Gibco社)、1%のグルタミン、1%のピルビン酸塩、1%の非必須AA及び1%のペニシリン-ストレプトマイシンを含有するRPMI1640培地(Lonza社)中に再懸濁して、培養した。2つの異なるドナー由来のPBMCを、種々の濃度で長いTSLP及び短いTSLPの存在下で共培養した(1:1)。5日後上清を収集して、IFN のレベルをELISA(R&D systems社)によって測定した。

40

#### 【0134】

単球由来の樹状細胞分化及び刺激条件

末梢CD14<sup>+</sup>単球は、製造業者の指示に従って、ヒトCD14<sup>+</sup>マイクロビーズ(Miltenyi Biotec社)を用いてPBMCから単離した。次いで、細胞を6日間、IL4(2,5ng/ml)及びGM-CSF(5ng/ml)(BD Biosciences社)の存在下で、完全RPMI1640培地中で培養して、単球由来の樹状細胞を得た。細胞サブセットのパーセンテージ及び表現型を、フローサイトメトリーによって分化の前後に評価した。樹状細胞を、48ウェルのプレート中で、種々の濃度の短いTSLP、又は培養培地単独の存在下で、完全RPMI1640培地中に、1 $\times$ 10<sup>6</sup>/mlで播種した。培養の24時間後、樹状細胞を穏やかに洗浄して、ネズミチフス菌FB62(MOI 1:1)を用いて1時間チャレンジした。次いで、細菌を洗い流し、培地を100 $\mu$ g/mlのゲンタマイシンを含有する培

50

地で置き換えた。サイトカイン分泌を、サイトメトリーピースアッセイFlexセット(BD Biosciences社)によって24時間後に評価した。CBAは、BD Accuri C6(BD Biosciences社)で獲得して、FCAPソフトウェア(BD Biosciences社)を用いて分析した。

#### 【0135】

##### 骨髄球性樹状細胞単離及び刺激条件

骨髄球性BDCA1+細胞を、CD1c(BDCA-1)+樹状細胞単離キット(Miltenyi Biotec社)を製造業者の指示に従って用いてPBMCから単離した。次いで細胞を、示した用量で長いTSLP又は短いTSLPの存在下で、完全RPMI倍地中24時間で培養した。次いで細胞を洗浄し、異なるドナー由来のナイーブなCD4 T細胞とともに共培養した(1のDC:5のTという比)。CD4細胞は、製造業者の指示に従って、ナイーブなCD4+T細胞単離キットII(Miltenyi Biotec社)を用いて単離した。6日後、上清を収集して、細胞をPMA(ホルポール 12-ミリスチン酸塩 13-酢酸、50ng/ml)及びイオノマイシン(1ug/ml)を用いて4時間再刺激した;最後の3時間の間、プレフェルジンA(10ug/ml)を培養物に添加した。その後TNF及びIFN 陽性細胞について細胞内染色を行った。CCL17、CCL22及びIFN レベルを、DCの又はDC-T培養物の上清中で、ELISA(R&D Systems社)によって評価した。

#### 【0136】

##### フローサイトメトリー

細胞を、モノクローナル抗ヒト蛍光コンジュゲート抗体:CD14(M5E2)、CD19(HIB19)、CD11c(B-ly6)、CD45RA(HI100)、CD3(UCHT1)、TNF(Mab11)、IFNg(4S.B3)、TNF(Mab11)(BD Biosciences社より);CD4(RPA-T4)(Ebioscience社より);CD1a(HI149)及びTSLPR(1B4)(Biolegend社より)を用いて染色した。

#### 【0137】

PBMCから単離された骨髄球性細胞を、等モル用量の短いTSLP及び/又は長いTSLP(3,5nM)を用いて、完全RPMI1640( $10^6$ 個の細胞/条件)中で、15分間37 で刺激した。細胞を含んだ対照の条件は、未刺激のまま(ネガティブ対照)であるか、又は過バナジン酸ナトリウム( $\text{Na}_3\text{VO}_8$ 、ポジティブ対照、データ示さず)とともにインキュベートした。インキュベーションの終わりに、細胞を急速に回転させて、BD Cytotfix(商標)緩衝液を用いて、15分間、37 で固定し、氷上で30分間BD(商標)Phosflow Perm Buffer IIIを用いて透過化し、続いてマウス抗-pSTAT5(pY694)抗体(45/Stat5、BD Biosciences社)、又はアイソタイプ抗体(MOPC-21)を用いて細胞内染色した。サンプルを、BD CantotIIフローサイトメーター(BD Biosciences社)上で獲得して、FlowJoソフトウェア(v8.7、Tree Star社)で解析した。

#### 【0138】

##### マウス

雌性C57Bl/6Jマウス(8~10週齢)を、Charles River Laboratories社(Milan, Italy)から入手した。C57Bl/6JバックグラウンドでのTSLPR-欠損マウスは、Dr W.J.Leonard(Laboratory of Molecular Immunology, NHLBI, USA)から提供された。マウスは、特定の病原体を含まない条件下でIFOM-IEOキャンパス動物施設で繁殖して飼育した。全ての実験は、実験動物管理規則(Principle of Laboratory Animal Care)(86/609/EECの指示)で確立されたガイドラインに従って行った。

#### 【0139】

##### LPS誘発性の内毒素性ショック

マウスを、LPS投与(群あたりn=8)の前、12時間及び2時間で、2回、200  $\mu$ lの注射用水中でマウス1匹あたり50、100、200  $\mu$ gで、短いTSLPを用いて腹腔内(i.p.)処置した。対照のマウスには水を与えた。LPS(大腸菌 血清型 026:B6;Sigma-Aldrich社)を、200  $\mu$ lの注射用水中で、マウス1匹あたり200  $\mu$ gで腹腔内に(i.p.)注射した。6時間後、麻酔下で放血によってマウスを安楽死させて、血液を採取した。IFN 、IL6及びIL12-p40のレベルを、血清中で、ELISA(R&D Systems社)によって、製造業者の指示に従って検出した。

#### 【0140】

##### DSS大腸炎

大腸炎は、9日間、飲用水に3%(w/v)DSS(TdB Consultancy AB社、Uppsala, Sweden)を添

10

20

30

40

50

加することによって誘導した。マウスを、短いTSLP(200  $\mu$ lの注射用水中で200  $\mu$ g)を用いてDSS投与の前日及び全研究の間1日おきに処理した(i.p.)。

#### 【0141】

##### 免疫蛍光及び免疫組織化学

健常な及びIBDの粘膜を、ホルランドの固定液(Hollande's fixative)(Polysciences社)中で固定し、Leica ASP300組織プロセッサ中にパラフィン包埋した。5  $\mu$ m厚の切片を脱パラフィン処理して、再水和し、抗原のアンマスキング(Vector laboratories社の溶液)を95 で50分間行った。

#### 【0142】

AD生検は、OCTに含まれた。5  $\mu$ m厚の切片を室温で5分間解凍して、4%のPFA中で15分間固定した。切片を、TBSを用いて3回洗浄した。全ての切片を、TBS-Tween0.05%含有の正常口バ血清中でブロックした。一次抗体を、4 で以下の濃度で一晩インキュベートした:抗TSLP(Abcam社)3  $\mu$ g/mL; 抗-長型TSLP(社内)3.25  $\mu$ g/mL; 抗CD14(Abnova社)5  $\mu$ g/mL。二次抗体(口バ抗-ウサギ555及び口バ抗-マウス488, Molecular Probes社)を、1時間インキュベートして、切片をDAPIで対比染色した。スライドを、Vectashield(Vector laboratories社)でマウントして、Leica SP2共焦点顕微鏡下で可視化した。IHCに関しては、内因性のペルオキシダーゼを、メタノール中、0.3%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>でクエンチした。二次抗体(P0448)及びDAB複合体(K3468)を、DAKO社から購入して、供給業者の指示に従って用いた。

10

#### 【0143】

##### エキソピボ臓器培養

IBD組織に対する短いTSLPの活性を、ヒト腸の粘膜で直接評価した。要するに、IBD粘膜を粘膜下層から分離して、記載のようにマウントした(Tsilingiri K.らJ Vis Exp.2013)。次いで、短いTSLP又は長いTSLPを、頂端側及び基底外側で、20  $\mu$ Lの最終容積で、24時間、示した濃度(10、100及び1000ng/mL)でインキュベートした。

20

#### 【0144】

##### 結果

健常な組織中の短型TSLPの発現は、構成的である

本発明者らは、TSLPアイソフォームのUCSC Genome Browserで分析を行った。本発明者らは、RefSeqにおいてアノテーションされた3つの異なるアイソフォーム(2つの長いアイソフォーム及び1つの短いアイソフォーム)があることを見出した。しかし、長いもののうちコード遺伝子であるとみなされるものは1つだけである。従って、本発明者らは、長いアイソフォームについては、正準のTSLP転写バリエーション1に対して(NCBI Accession n. NM\_033035\_hg19 160 chr5:110407589-110411772)、及び新規に同定された短いアイソフォームについては、転写バリエーション2に対して注目した(NCBI Accession n. NM\_138551\_hg19 64 chr5:110409281-110411772)。2つの転写物は、それぞれ、長いTSLPのC末端部分に対して同一である、159aaの長いアイソフォーム、及び63aaの短いアイソフォームをコードする(図1)。それらは、代替的にスプライシングされたアイソフォームではないが、2つの推定の独立したプロモーターの活性に由来する(図1)。

30

#### 【0145】

TSLPの今まで最もよく特徴付けられた形態は長いものであったが、本発明者らは、長いアイソフォームについての推定のプロモーターが、UCSCデータベースに存在する細胞株のほとんどにおいて、ほぼ完全に不活性であることを見出した(図1)。逆に、短いアイソフォームについてのプロモーター領域は、多数の異なる転写因子に結合する高い能力を有すると考えられる。一貫して、各アイソフォームについて特定のプライマーを用いて健常な腸及び皮膚の生検全体に対して本発明者らがqPCRを行った場合、本発明者らは、短いTSLPは定常状態で発現されるらしいが、一方長いアイソフォームは、参照として用いられるハウスキーピング遺伝子GAPDHと比較した場合、非常にわずかにしか発現されない場合が多いことを見出した(図2a、図2b)。

40

#### 【0146】

本発明者らは、樹状細胞(DC)の炎症性の能力を制御するのに腸上皮細胞由来のTSLPにつ

50

いて重要な恒常性の役割を以前に記載している(Иlievら、2009; Rimoldiら、2005)、本発明者らは、結腸がん患者の健常な組織(組織形成手術から少なくとも7cm)から単離された上皮細胞及び固有層細胞における2つのアイソフォームの差次的発現を、qPCRによって解析した。ここでも、本発明者らは、定常状態の下で、腸上皮細胞及び固有層細胞が、主に短いアイソフォームを発現することを見出した(図2a)。これによって、短いTSLPは、腸でのTSLPの恒常性活性を担う場合があることが示唆された。従って、本発明者らは、昆虫の系(バキュロウイルス由来)においてTSLPの2つのアイソフォームをクローニングして発現して、それによってエンドトキシンの混入を回避し、タンパク質の適切なグリコシル化を可能にすることを決定した。長いTSLPの発現は、容易に達成されたが、短いTSLPの発現は、GSTとの融合タンパク質としてのみ得られた(図3)。この理由のために、本発明者らはまた、全体の短いTSLPペプチド(aa4~63)及び短いアイソフォームの2つのフラグメント(N末端ペプチド(aa4~40)及びC末端ペプチド(aa24~63))を化学的に合成した。エンドトキシンの混入は、カプトガニ血球抽出成分(LAL)アッセイを用いて評価し、作業濃度では検出限界未満であることを見出した(示さず)。

10

#### 【0147】

上皮細胞及びケラチノサイトは、炎症促進性の刺激によるチャレンジ後、長いTSLPの発現を上方制御する

腸では、細菌に応答してIECによって産生されるメディエーターが、免疫細胞の根底にある管腔状態に存在し、従って、生得的及び適応的な両方の免疫応答の形成に能動的な役割を果たすことが示されている。従って、本発明者らは、細菌のチャレンジ後にIECによるTSLPアイソフォームの差次的調節を観察可能かどうか怪しんでいた。この疑問に取り組むために、本発明者らは、最初にcaco-2細胞による2つのアイソフォーム産生の基礎レベルを評価し、ここで本発明者らは、本発明者らが主に腸上皮細胞で観察したものと同一の傾向に注目した(図4a)。このデータをタンパク質レベルで確認するために、短いTSLP中に存在しない長いTSLPのフラグメントに対して標的にされたポリクローナル抗体を、本発明者らの実験室で精製して試験した(図3)。本発明者らは、この抗体を用いて、長いアイソフォームを特異的に検出したが、短いアイソフォームに関しては、彼らは市販の抗体(Abcam社)を用いた。非感染のcaco-2細胞に対するウエスタンブロットのデータによって、rt-PCRで得られたデータが確認された(図4b)。しかし、この傾向は、分極したcaco-2細胞にサルモネラの侵襲性株FB62をチャレンジした場合、完全に逆転された(図4c)。同じことが、本発明者らが、侵襲性の大腸菌株、LF82を用いた場合、あてはまった。興味深いことに、その非侵襲性の対応物MG1655は、長いアイソフォームを上方制御できなかった。最終的に、本発明者らは、皮膚ケラチノサイト細胞株、特にHaCaT細胞株(これも長いTSLPを定常状態では発現しない)で2つのアイソフォーム発現における炎症促進性及び抗炎症性の刺激の効果を検査した(図5a)。本発明者らは、HaCaT細胞に、ビタミンD又はポリI:C、TLR3アゴニストのいずれかを用いてチャレンジした。抗炎症剤、すなわち、ビタミンDは、短いTSLPのmRNAを有意に上方制御したが、ポリI:Cは、長いアイソフォームを上方制御した(図5b)。従って、本発明者らは、IEC及び皮膚のECは、それぞれ、侵襲性の細菌又は炎症促進性の刺激を検出する際に、長いTSLPのみを発現すると結論し得る。

20

30

#### 【0148】

短いTSLPは、双方向性の同種異系の混合白血球反応(MLR)を阻害する

短いTSLPを用いて、同種異系MLR中のIFN- $\gamma$ の産生を阻害し得るか否かを評価した。2つの異なるドナー由来の末梢血単核球(PBMC)を、漸増用量の短いTSLP又は長いTSLPの存在下で同時インキュベートした。本発明者らは、長いTSLPは、供給源とは独立して放出されるIFN- $\gamma$ の量を実際に増大していた(これが市販の供給源であるか、社内製造されたタンパク質であったかにかかわらず)が、短いTSLPは、IFN- $\gamma$ の放出を50%まで阻害していたことを見出した(図6)。これによって、短いTSLPは、抗炎症特性を有し得ることが示される。

40

#### 【0149】

短いTSLPは、MoDCに対して抗炎症活性を有する。

短いTSLPが、IFN- $\gamma$ の産生に影響することを観察して、本発明者らは、その効果が樹状

50

細胞、抗原提示に専門的な免疫細胞及びT細胞活性化に対して直接か否かを分析した。短いTSLPを用いて、追加的な炎症性刺激(ネズミチフス菌)の有無において単球由来(Mo)DCを処置した。MoDCに最初に短いTSLPを用いて24時間インキュベートし、引き続き、細菌で処置するか、又は処置しなかった(等価な感染効率、MOI、1)。短いTSLPで処置したMoDCは、未熟DC及びサルモネラ処置した(成熟)のDCの両方で、成熟マーカーCD80、CD86又はHLA-DRの発現における変化がないことによって示されるように任意の機能的又は形態学的活性化を示さなかった(図7a、図7b)。CD11cは、樹状細胞を特徴付けるマーカーである。しかし、LPS又は細菌の刺激後、短いTSLP処置されたDCは、それらが炎症促進性並びに抗炎症性のサイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL12-p70、IL-10、IL-1 $\beta$ 、IL-6、図8)を放出する能力に強力に影響を受けた。

10

#### 【0150】

短いTSLPは、骨髄球性DCに対して長いTSLPのアンタゴニストとしては作用しない。

TSLPRに対する短いTSLP結合の可能性及びアンタゴニストとしての作用(長いアイソフォーム由来のブロッキングシグナル)を評価するために、骨髄球性DCを、15分間(図9a)、又は24時間(図9b)、2つのアイソフォームを単独で、又は等モル比で一緒に用いて馴化させた。長いTSLPは、STAT5リン酸化(図9a)、並びにCCL17及びCCL22の分泌を有意に増大し(図9b)、これは、短いアイソフォームの非存在下及び存在下の両方における、長いTSLP媒介性のシグナル伝達の特徴である。更に、長いTSLPで馴化したDCは、短いTSLPの存在下でさえ、CD4+TNF+細胞の分化を促進した。従って、短いアイソフォームは、長いアイソフォームに対する対向効果を媒介しないことが考えられる(図9c)。興味深いことに、同じセットの実験では、本発明者らは、短いTSLPで馴化したDCが、Th1細胞のパーセンテージ及びIFN- $\gamma$ 分泌を低減し得ることを見出した(図9d)。これによって、短いTSLPは骨髄球性DCに対して作用して、その炎症特性を阻害し得るが、TSLPRを介して作用するのではなく、従って、受容体依存性であるその活性をブロックしないことが示される。

20

#### 【0151】

短いTSLPは、インビボで抗炎症効果を有する。

短いTSLPの抗炎症効果をまた、インビボで、C57/BL6マウスにおけるエンドトキシンショックのモデルを用いて証明した。マウスを、腹腔内で、短いTSLPを用いてLPSの注射の前12時間及び2時間処置した。LPS注射の6時間後、マウスを屠殺して、血清中のサイトカインを測定した。短いTSLPの処置は、IL-6、IL-12p40及びIFN- $\gamma$ の有意な低下を、用量依存性の方式でもたらした(図10a)。注目されるのは、短いTSLPの抗炎症効果がまた、TSLPRノックアウトマウス(図10b)で顕在化され、これによって、短いTSLPについての作用のTSLPR依存性の機構についての仮説が更に増強される。最終的に、短いTSLPはまた、DSS-誘発性の大腸炎からマウスを保護し、体重損失を有意に制限し、マウスの回復を促進した(図11)。

30

#### 【0152】

インビトロ及びインビボにおける短いTSLPフラグメントの効果

治療用ツールとして短いTSLPを用いる展望を考慮して、本発明者らは、最少活性配列を見出そうと試みた。本発明者らは、タンパク質のN末端から、又はC末端からのいずれかから開始し、17aaの重複がある短いTSLPの2つのフラグメントを設計した(図12c)。本発明者らは、両方のフラグメントを、インビトロで、双方向性の同種異系のMLR中で、及びインビボで、図10に記載されるエンドトキシンショックモデルを用いて試験した。両方のペプチドは、ヒトPBMCに対する効果を有し、IFN- $\gamma$ 分泌を阻害した(図12a)。マウスの系では、代わりに、C末端ペプチドは、全体の短いTSLPと同様に、血清中の炎症性サイトカインのレベルを低下し得たが、N末端は、なんら効果を発揮しなかった(図12b)。しかし、N末端は、インビトロで有効であることが示されたので、当該分野の専門家には、N末端はヒト又は他の生物体では有効である可能性が非常に高いことが公知である。

40

#### 【0153】

カスタムメイドの抗-長型TSLP抗体は、長いTSLPの活性をブロックする。

2つのTSLPアイソフォームは、完全に正反対の効果をも有し、長いものは、炎症性であり

50

、有害であるが、短いものは、炎症応答の発達を阻害すると思われる。本発明者らは、短いTSLP投与が、有益な効果を有するが、並行した治療のストラテジーは、長いTSLPに特異的なブロッキング抗体の使用を包含し得ることを実証した。従って、本発明者らは、それらのカスタムメイドの抗長型TSLP抗体をそのブロッキング活性について試験した。本発明者らは、漸増用量の抗TSLP抗体又はアイソタイプ対照の存在下で、長いTSLPを用いて骨髄球性DCを刺激し、そして24時間後に、本発明者らは、上清中でCCL17のレベルを定量した。両方の抗体がCCL17の分泌を阻害したが、抗-長型TSLPの効果は、アイソタイプ対照と比較してより顕著であった(図13)。この予備的実験によって、それらのカスタムな抗体が、長いTSLPのブロッキング剤として用いられ得ることが示唆される。

#### 【0154】

潰瘍性大腸炎(UC)患者における短い/長いアイソフォームの逆の発現

短いTSLPが腸上皮細胞(IEC)によって定常状態で発現される唯一のアイソフォームであることが示され、その抗炎症性の能力が示されており、本発明者らは、炎症性腸疾患(そのうちUCが一例である)における短いTSLP発現の調節解除があったか否かを評価したかった。健常なサンプル又はUCのサンプルから単離されたIEC及び固有層細胞でのqPCR解析によって、長いアイソフォームの有意な上方制御が示されるが、短いものは修飾されなかった(図14)。同じ結果が、免疫組織化学又は免疫蛍光によってタンパク質レベルで確認された(図15a、図15b)。更に、本発明者らは、UC組織由来の細胞中で、長いTSLPアイソフォーム受容体である、TSLPRの発現の増大を見出した(図23)。

#### 【0155】

長いTSLPの発現は強力な炎症応答を伴う。

著者らは、短いTSLPが、Th1型の反応の発達を阻害することを見出したので、著者らは、短いTSLPの発現の非存在下で、より炎症性の反応に向かって歪曲があったか否かを評価した。更に、長いTSLPはTh2反応に関連しないので、本発明者らは、UC患者がTh1及びTh2の偏向応答によって特徴付けられたか否かを分析した。本発明者らは、炎症に伝統的に関与する転写因子及びサイトカインについて1セットの遺伝子でqPCRを行った。本発明者らは、実際、UC患者では、Th1型の応答の増大が見出した(IFN- $\gamma$  発現の上方制御、同様にTh1分化プログラムの重要な調節因子であるT-betで証明されたとおり、図16)。更に、本発明者らが統計学的な有意性を検出できなかった場合でさえ、Th2歪曲に関与する転写因子(GATA3)の発現、及びTh2型の応答に関与するサイトカイン(IL-4、IL-13)の増大において、本発明者らは、統計学的に有意な上方制御を観察した(図16)。これらの実験からプールされたデータで行った二変数の適合解析によって、長いアイソフォームの存在と、上方制御されたIFN- $\gamma$  発現が直接関連付けられ、これは短いアイソフォームについての場合は異なった。

#### 【0156】

非Th2関連疾患に対する実験概念の証明

本発明の結果を更に確認するために、本発明者らは、2つのアイソフォームの発現をまた、セリアック病及びがん等の非Th2関連の腸の病理でも評価した。本発明者らはまた、セリアック病では、短いTSLPアイソフォームが未処置の患者では強力に下方制御されたが、そのレベルは処置された患者(すなわち、グルテンフリー食の患者、図17を参照のこと)では復元されたことを見出した。注目すべきことに、本発明者らは、長いTSLP又はTSLPRの発現においてなんら増大を検出できず(図17、図23)、これは文献で記載されたものと、すなわち、セリアック病は主にTh1の病理であることと一致している。

#### 【0157】

本発明者らは、TSLPの発現の調節解除をがんでも見出したが、この場合両方のアイソフォームは、それらの正常な対応物と比較して腫瘍性の組織では低下されていた(図18)。しかし、短いTSLPの発現はやはり、長いTSLPの発現よりもかなり高いままである。結局、本発明者らは、皮膚の炎症性障害において短いTSLPの発現を試験した。腸と同様に、本発明者らは、短いアイソフォームのみが定常状態で発現されること(図19~図22)、及び長いTSLPが、尖圭コンジローム、紅色苔癬、基底細胞癌、光線角化症、紅斑性狼瘡及び癌腫等

10

20

30

40

50

の炎症下で上方制御されること(図19)を見出した。短いTSLPレベルは不変のままであるか、又は菌状息肉腫及びサルコイドーシスでは下方制御さえされた(図20)。アトピー性皮膚炎及び乾癬患者に注目して(図21、図22)、本発明者らは、長いTSLPの上方制御を、mRNA及びタンパク質の両方のレベルで見出し、アトピー性皮膚炎については、短いTSLPのmRNAの有意な低下を見出した。TSLPRは、乾癬患者由来の生検では大きく上方制御された(図23)

【 0 1 5 8 】

腸の臓器培養のエキソピボモデル(EVOC)に対する短いTSLPの活性

本発明者らは、本発明者らの実験室で設定したエキソピボの臓器培養モデルに対する短いTSLP及び長いTSLPの活性を試験した(Tsilingiri Kら、J Vis Exp.2013)。外科手術の間に得られた潰瘍性大腸炎患者由来の腸の組織の粘膜層を、無菌の外科用メスで1cm<sup>2</sup>の小片に切断し、無菌の金属グリッド上に置いた。組織を20ulの最終容積中で短いアイソフォーム又は長いアイソフォームのいずれかを100ng/ml及び1000ng/mlで用いて刺激した。図24に示されるとおり、短いTSLPだけが、組織での炎症の進行を改善した、短いTSLPはまた、杯状細胞による粘膜の産生を修復し、組織構造を正常化した(腸陰窩の形成を参照のこと)

【 0 1 5 9 】

(参考文献)

- Al-Shami, A., Spolski, R., Kelly, J., Keane-Myers, A., and Leonard, W.J. (2005). A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med* 202, 829-839.
- Demehri, S., Turkoz, A., Manivasagam, S., Yockey, L.J., Turkoz, M., Kopan, R. (2012). Elevated epidermal thymic stromal lymphopoietin levels establish an antitumor environment in the skin. *Cancer Cell* 22, 494-505.
- Di Piazza, M., Nowell, C.S., Kochm U., Durham, A.D., Radtke, F. (2012). Loss of cutaneous TSLP-dependent immune responses skews the balance of inflammation from tumor protective to tumor promoting. *Cancer Cell* 22, 479-93. 10
- Ferreira, D.S., Annoni, R., Silva, L.F., Buttignol, M., Santos, A.B., Medeiros, M.C., Andrade, L.N., Yick, C.Y., Sterk, P.J., Sampaio, J.L., *et al.* (2012). Toll-like receptors 2, 3 and 4 and thymic stromal lymphopoietin expression in fatal asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 42, 1459-1471.
- Fontenot, D., He, H., Hanabuchi, S., Nehete, P.N., Zhang, M., Chang, M., Nehete, B., Wang, Y.H., Ma, Z.M., Lee, H.C., *et al.* (2009). TSLP production by epithelial cells exposed to immunodeficiency virus triggers DC-mediated mucosal infection of CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16776-16781. 20
- Hanabuchi, S., Ito, T., Park, W.R., Watanabe, N., Shaw, J.L., Roman, E., Arima, K., Wang, Y.H., Voo, K.S., Cao, W., and Liu, Y.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J. Immunol.* 184, 2999-3007. 30
- Harada, M., Hirota, T., Jodo, A.I., Hitomi, Y., Sakashita, M., Tsunoda, T., Miyagawa, T., Doi, S., Kameda, M., Fujita, K., *et al.* (2011). Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 44, 787-793.
- He, J.Q., Hallstrand, T.S., Knight, D., Chan-Yeung, M., Tripp, B., Zamar, D., Bosse', Y., Kozyrskyj, A.L., James, A. *et al.* (2009). A thymic stromal lymphopoietin gene variant is associated with asthma and airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol.* 124, 222-9. 40

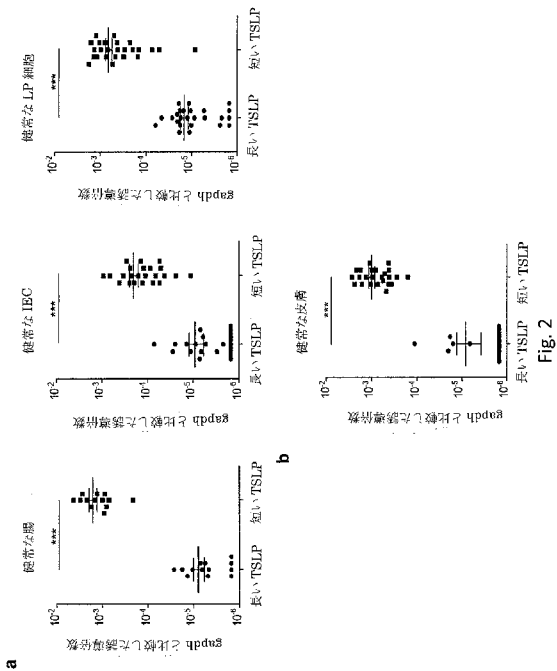
- Hunninghake, G.M., Soto-Quiros, M.E., Avila, L., Kim, H.P., Lasky-Su, J., Rafaels, N., Ruczinski, I., Beaty, T.H., Mathias, R.A., Barnes, K.C., *et al.* (2010). TSLP polymorphisms are associated with asthma in a sex-specific fashion. *Allergy* 65, 1566-1575.
- Iliev, I.D., Spadoni, I., Mileti, E., Matteoli, G., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Foschi, D., Caprioli, F., Viale, G., and Rescigno, M. (2009). Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 58, 1481-1489. 10
- Ito, T., Wang, Y.H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X., Yao, Z., Cao, W., and Liu, Y.J. (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 202, 1213-1223.
- Kashyap, M., Rochman, Y., Spolski, R., Samsel, L., and Leonard, W.J. (2011). Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells. *J Immunol* 187, 1207-1211.
- Kinoshita, H., Takai, T., Le, T.A., Kamijo, S., Wang, X.L., Ushio, H., Hara, M., Kawasaki, J., Vu, A.T., Ogawa, T., *et al.* (2009). Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA. *The Journal of allergy and clinical immunology* 123, 179-186. 20
- Liu, W., Xu, L.S., Liu, Q.J., Dong, F.Z., Qiu, R.F., Wen, M.C., Han, Y.L., Tang, N.B., Kang, L.J., Wu, J.X., *et al.* (2012). Two single nucleotide polymorphisms in TSLP gene are associated with asthma susceptibility in Chinese Han population. *Exp Lung Res* 38, 375-382.
- Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I.D., Mileti, E., Fallarino, F., Puccetti, P., Chieppa, M., Rescigno, M. (2010). Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 59, 595-604. 30
- Negishi, H., Miki, S., Sarashina, H., Taguchi-Atarashi, N., Nakajima, A., Matsuki, K., Endo, N., Yanai, H., Nishio, J., Honda, K., and Taniguchi, T. (2012). Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 21016-21021.
- Reardon, C., Lechmann, M., Brustle, A., Gareau, M.G., Shuman, N., Philpott, D., Ziegler, S.F., and Mak, T.W. (2011). Thymic stromal lymphopoietin-induced expression of the endogenous inhibitory enzyme SLPI mediates recovery from colonic inflammation. *Immunity* 35, 223-235. 40
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M. (2005). Intestinal immune homeostasis is

- regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 507-514.
- Siracusa, M.C., Saenz, S.A., Hill, D.A., Kim, B.S., Headley, M.B., Doering, T.A., Wherry, E.J., Jessup, H.K., Siegel, L.A., Kambayashi, T., *et al.* (2011). TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature* 477, 229-233.
- Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Hö, S., Antonenko, S., Lauerma, A., *et al.* (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3, 673-680. 10
- Spadoni, I., Iliev, I.D., Rossi, G., and Rescigno, M. (2012). Dendritic cells produce TSLP that limits the differentiation of Th17 cells, fosters Treg development, and protects against colitis. *Mucosal Immunol* 5, 184-193.
- Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., and Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J Exp Med* 206, 655-667. 20
- Watanabe, N., Hanabuchi, S., Soumelis, V., Yuan, W., Ho, S., de Waal Malefyt, R., and Liu, Y.J. (2004). Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nature immunology* 5, 426-434.
- Watanabe, N., Wang, Y.H., Lee, H.K., Ito, T., Cao, W., and Liu, Y.J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436, 1181-1185.
- Xie, Y., Takai, T., Chen, X., Okumura, K., Ogawa, H. (2012). Long TSLP transcript expression and release of TSLP induced by TLR ligands and cytokines in human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 66, 233-7. 30
- Yadava, K., Sichelstiel, A., Luescher, I.F., Nicod, L.P., Harris, N.L., and Marsland, B.J. (2013). TSLP promotes influenza-specific CD8+ T-cell responses by augmenting local inflammatory dendritic cell function. *Mucosal Immunology* 6, 83-92.
- Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J., Lee, T.H., and Corrigan, C. (2005). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 174, 8183-8190. 40
- Zaph, C., Troy, A.E., Taylor, B.C., Berman-Booty, L.D., Guild, K.J., Du, Y., Yost, E.A., Gruber, A.D., May, M.J., Greten, F.R., *et al.* (2007). Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature* 446, 552-556.

Zhou, B., Comeau, M.R., De Smedt, T., Liggitt, H.D., Dahl, M.E., Lewis, D.B., Gyarmati, D., Aye, T., Campbell, D.J., and Ziegler, S.F. (2005). Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* 6, 1047-1053.

Ziegler, S.F. (2012). Thymic stromal lymphopoietin and allergic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 130, 845-852.

【 図 2 】



【 図 3 】

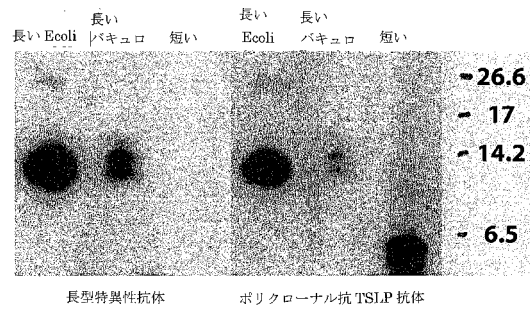


Fig. 3

【 図 4 】

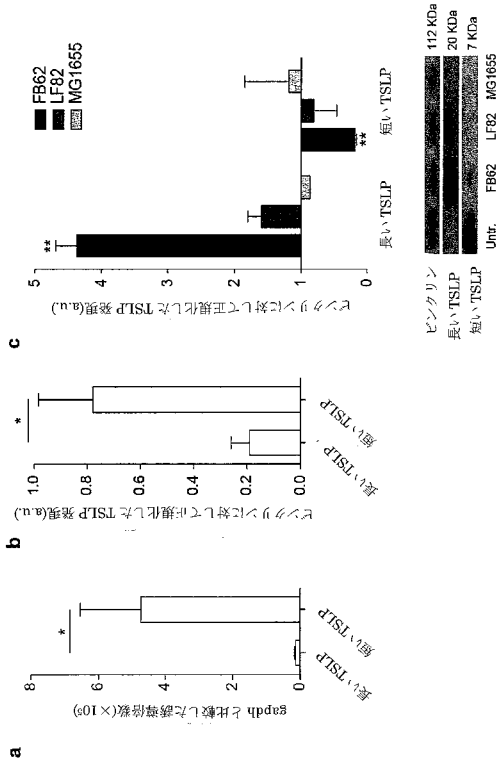


Fig. 4

【 図 5 】

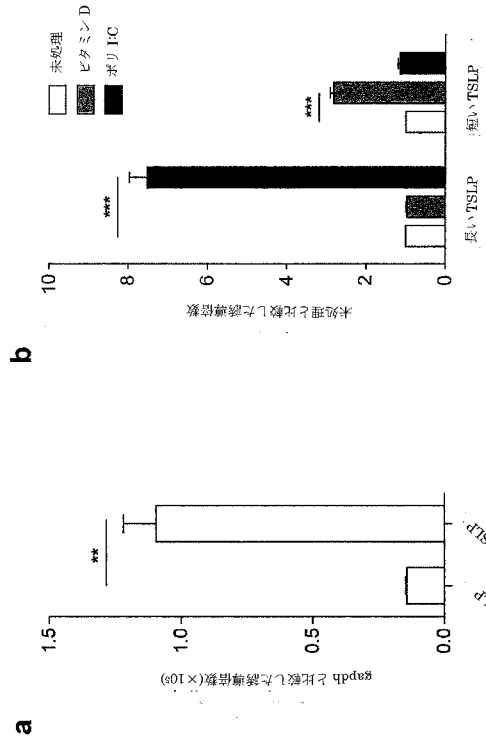


Fig. 5

【 図 10 a 】

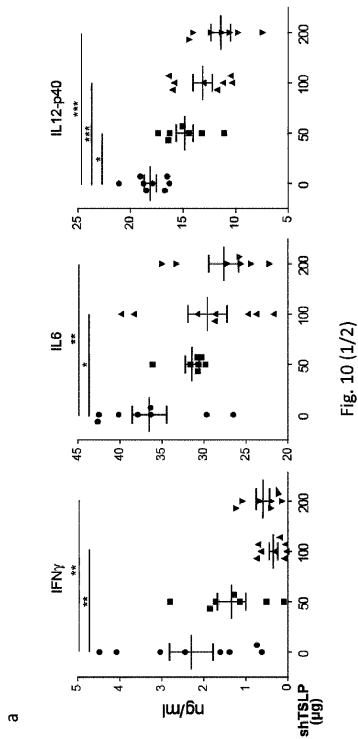


Fig. 10 (1/2)

【 図 11 】

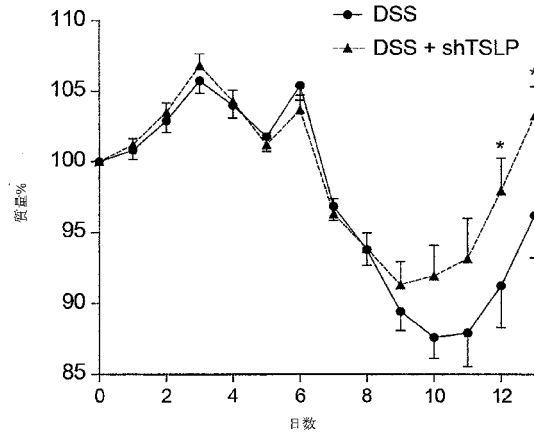


Fig. 11

【 図 1 3 】

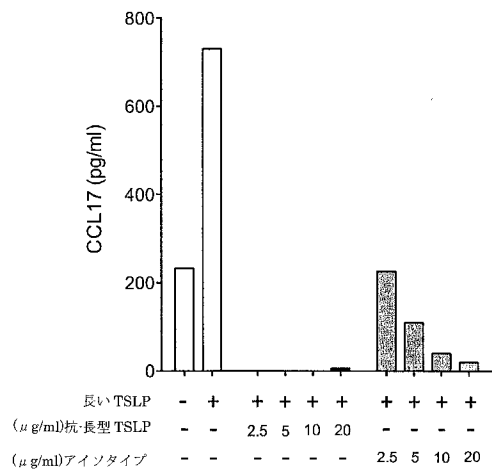


Fig. 13

【 図 1 4 】

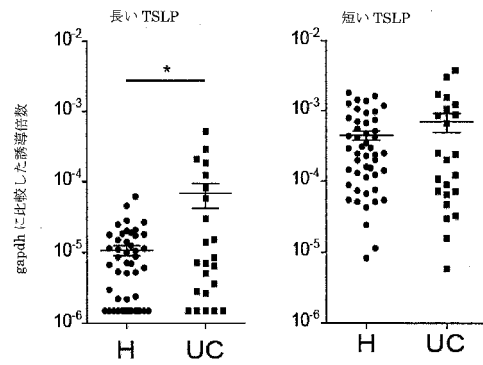


Fig. 14

【 図 1 6 - 3 】

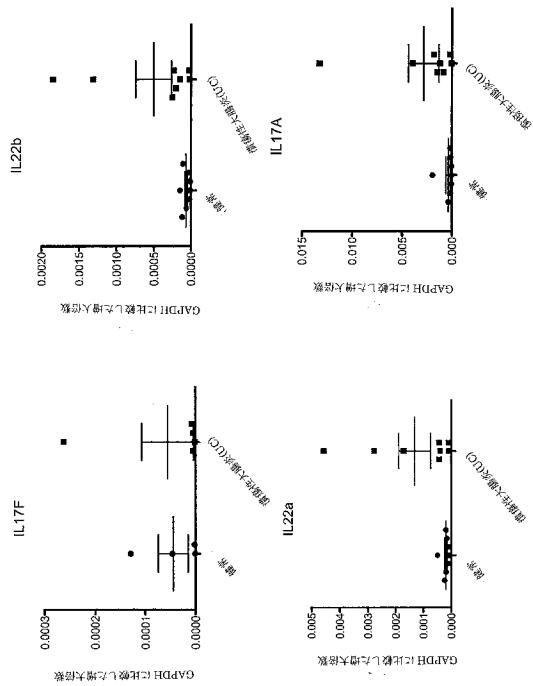


Fig. 16 (3/3)

【 図 1 7 】

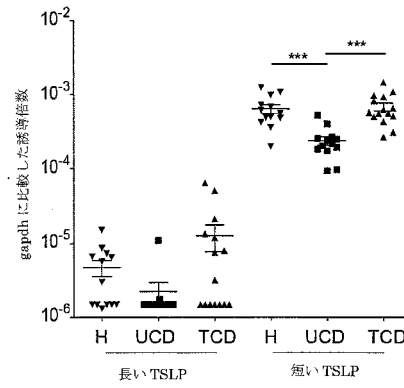


Fig. 17



【 図 7 a 】

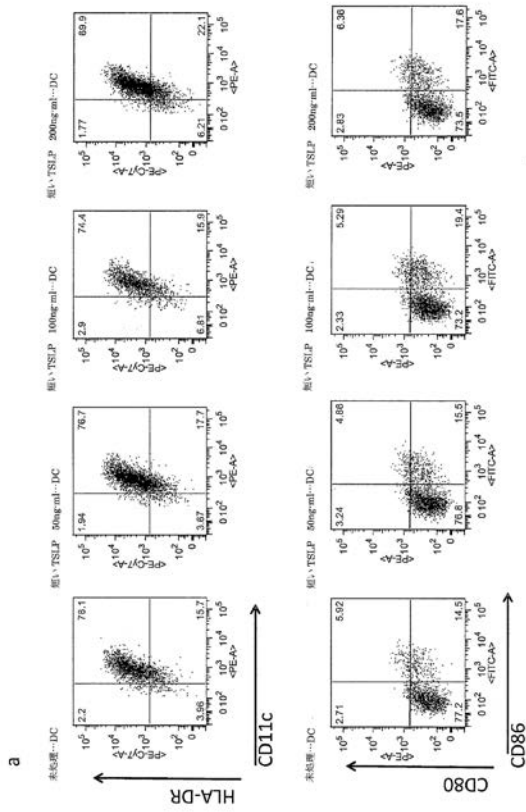


Fig. 7 (1/2)

【 図 7 b 】

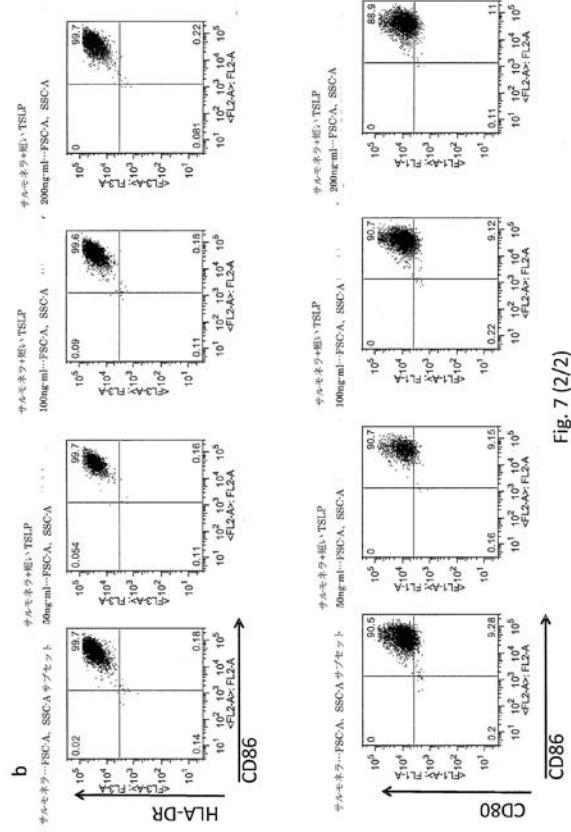


Fig. 7 (2/2)

【 図 8 】

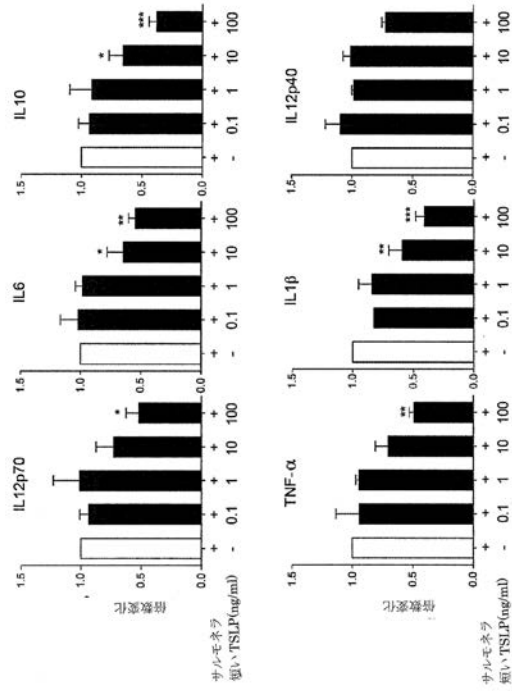


Fig. 8

【 図 9 】

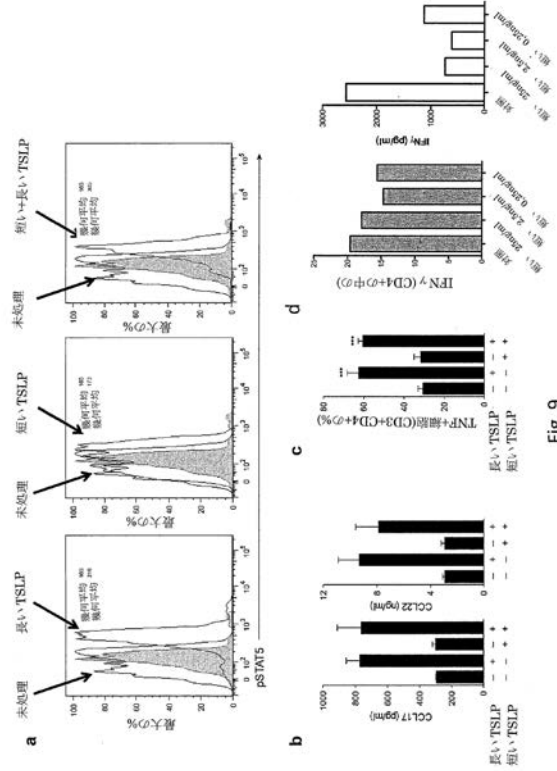


Fig. 9

【 図 1 0 b 】

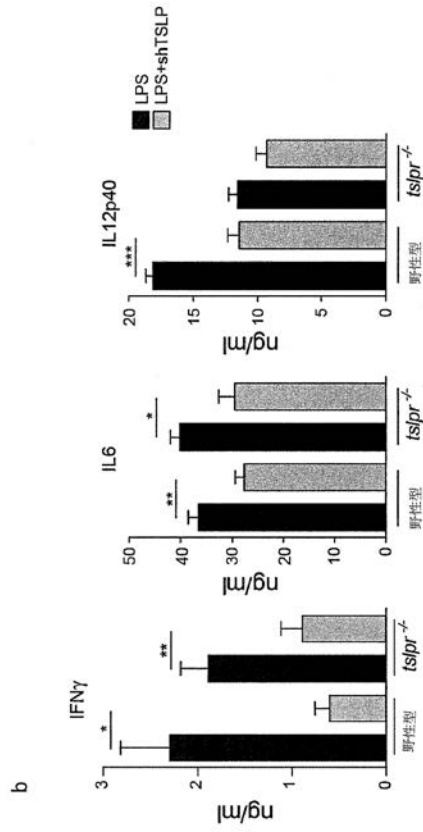
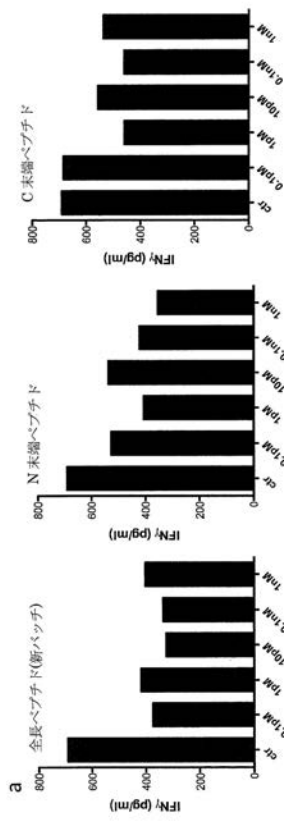
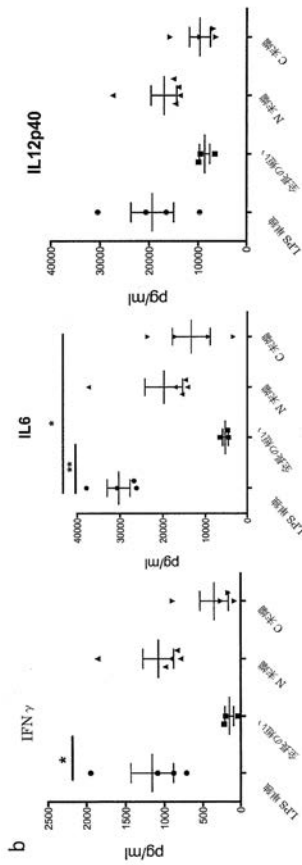


Fig. 10 (2/2)

【 図 1 2 a 】



【 図 1 2 b 】



【 図 1 2 c 】



【 図 15 a 】

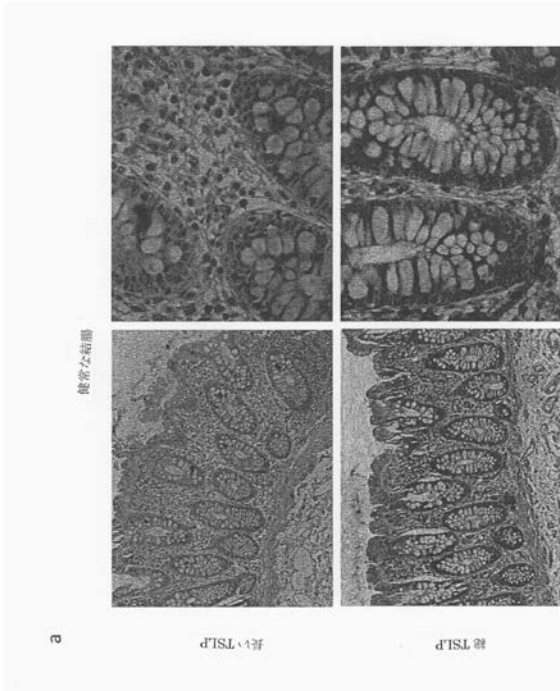


Fig. 15 (1/2)

【 図 15 b 】

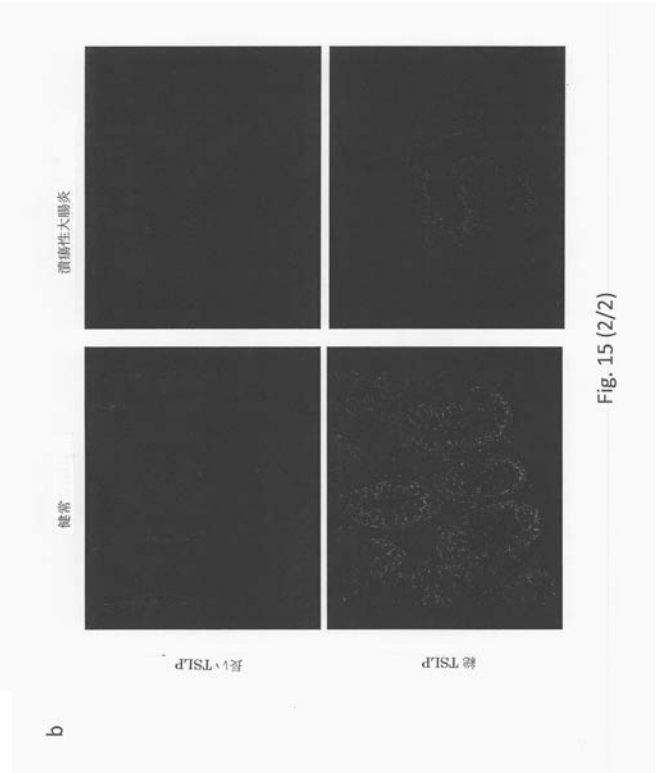


Fig. 15 (2/2)

【 図 16 - 1 】

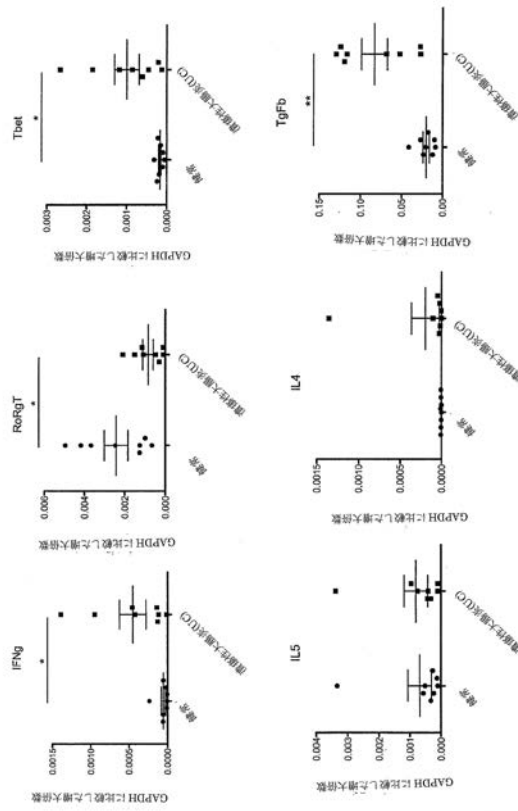


Fig. 16 (1/3)

【 図 16 - 2 】

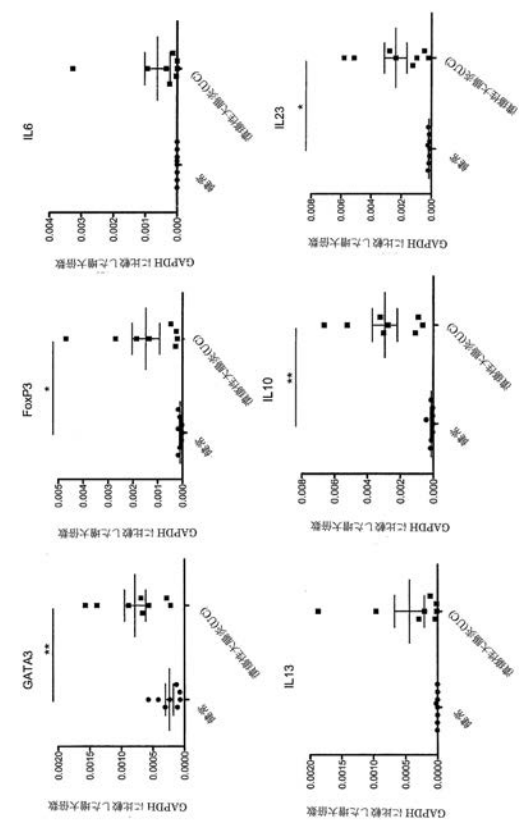


Fig. 16 (2/3)



【 図 2 4 】

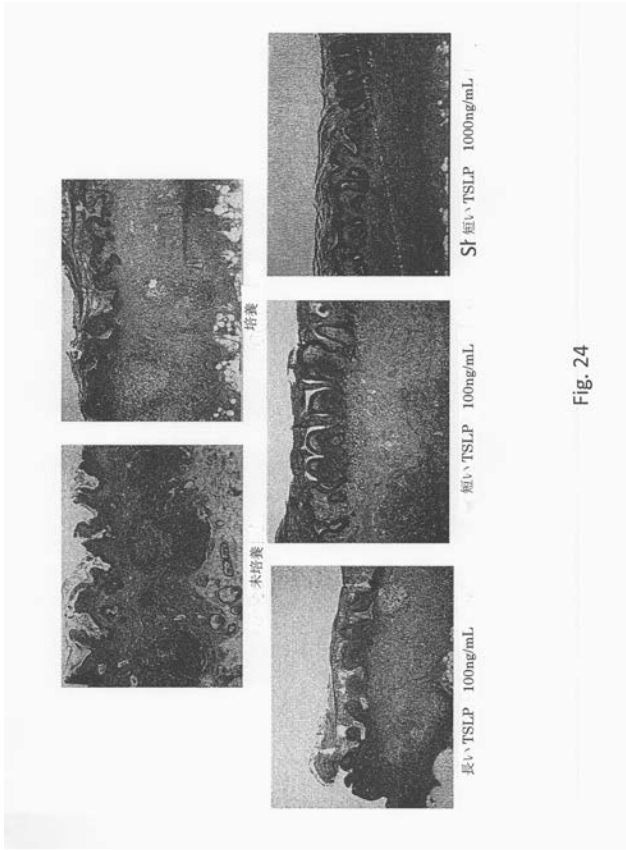


Fig. 24

【 配 列 表 】

2016522165000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2014/056878

**Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/EP2014/056878**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- 1, 10, 29, 30(completely); 7-9, 13-15, 17, 18, 21-24, 32, 33(partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/056878

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K38/19 A61K39/395 G01N33/50 ADD.		
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) A61K G01N		
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) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/29581 A1 (IMMUNEX CORP [US]; SIMS JOHN [US]; LYMAN STEWART [US]; MCKENNA HILARY) 25 May 2000 (2000-05-25)  page 7, line 10 - page 17, line 28; claims 13,4,9,12,13,16-23; sequence 2 page 41, paragraph 4 - page 43, paragraph 1  ----- -/--	1,7-10, 13-15, 17,18, 21-24, 29,30, 32,33
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 3 July 2014		Date of mailing of the international search report 09/10/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-9016		Authorized officer Greif, Gabriela

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/056878

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2011/051657 A1 (ST GEORGE S HOSPITAL MEDICAL SCHOOL [GB]; SHATTOCK ROBIN J [GB]) 5 May 2011 (2011-05-05)</p> <p>page 8, lines 6-15; claims 1-27; sequence 4</p> <p>-----</p>	<p>1,7,9, 10, 13-15, 17,18, 21-24, 29,30, 32,33</p>
X	<p>EP 2 213 682 A1 (INST CURIE [FR]) 4 August 2010 (2010-08-04) sequence 2</p> <p>-----</p>	1
X	<p>HARADA MICHISHIGE ET AL: "Functional Analysis of the Thymic Stromal Lymphopoietin Variants in Human Bronchial Epithelial Cells", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, AMERICAN LUNG ASSOCIATION, NEW YORK, NY, US, vol. 40, no. 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 368-374, XP009119165, ISSN: 1044-1549, DOI: 10.1165/RCMB.2008-00410C the whole document</p> <p>-----</p>	1
X	<p>ROAN FLORENCE ET AL: "The multiple facets of thymic stromal lymphopoietin (TSLP) during allergic inflammation and beyond", JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY,, vol. 91, no. 6, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 877-886, XP008152989, ISSN: 1938-3673 the whole document</p> <p>-----</p>	1
A	<p>the whole document</p> <p>-----</p>	32,33
X	<p>HOMEY ET AL: "Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation", JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 118, no. 1, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 178-189, XP005610118, ISSN: 0091-6749, DOI: 10.1016/J.JACI.2006.03.047 the whole document</p> <p>-----</p>	1

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/056878

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0029581	A1	25-05-2000	AT 362534 T 15-06-2007
			AU 755562 B2 12-12-2002
			CA 2349762 A1 25-05-2000
			DE 69936105 T2 24-01-2008
			DK 1129190 T3 24-09-2007
			EP 1129190 A1 05-09-2001
			ES 2288036 T3 16-12-2007
			IL 143034 A 20-07-2009
			IL 195812 A 30-04-2012
			JP 4454859 B2 21-04-2010
			JP 2002530079 A 17-09-2002
			JP 2010088445 A 22-04-2010
			JP 2013078331 A 02-05-2013
			NZ 512105 A 30-04-2004
			PT 1129190 E 08-08-2007
			US 2002146819 A1 10-10-2002
			US 2003181360 A1 25-09-2003
			US 2006223754 A1 05-10-2006
			US 2009017034 A1 15-01-2009
			US 2010266601 A1 21-10-2010
			US 2012014961 A1 19-01-2012
			US 2013225490 A1 29-08-2013
			WO 0029581 A1 25-05-2000
-----			
WO 2011051657	A1	05-05-2011	NONE
-----			
EP 2213682	A1	04-08-2010	CA 2750988 A1 05-08-2010
			EP 2213682 A1 04-08-2010
			EP 2391649 A1 07-12-2011
			JP 2012516310 A 19-07-2012
			US 2012114596 A1 10-05-2012
			WO 2010086445 A1 05-08-2010
-----			

International Application No. PCT/ EP2014/ 056878

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1, 10, 29, 30(completely); 7-9, 13-15, 17, 18, 21-24, 32, 33(partially)

A compound selected from the group consisting of a) a polypeptide being a fragment of the C-terminus amino acid sequence of the human Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) long isoform I(SEQ ID NO:2), or a fragment of the corresponding sequence encoded by a TSLP orthologous or homologous gene, functional mutants, recombinant or synthetic derivatives, fragments or analogues thereof, b) a polynucleotide coding for said polypeptide; c) a vector comprising said polynucleotide; d) a host cell genetically engineered expressing said polypeptide, also for medical use in the treatment and /or prevention of a disorder or pathology characterized by an inflammatory response, or a pharmaceutical composition thereof, or a kit.

---

2. claims: 2-6(completely); 7-9, 12-16, 18, 21-24, 32, 33(partially)

A compound consisting of the amino acid sequence of the TSLP short isoform (SEQ ID NO:1) or an amino acid sequence of the corresponding region encoded from a TSLP orthologous or homologous gene, functional mutants, recombinant or synthetic derivatives, fragments or analogues thereof, also for medical use in the treatment and /or prevention of a disorder or pathology characterized by an inflammatory response, or a pharmaceutical composition thereof, or a kit.

---

3. claims: 9, 11-18, 21, 22, 24, 32, 33(all partially)

A compound selected from the group consisting of a) a polypeptide being a fragment of the C-terminus amino acid sequence of the human Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) long isoform (SEQ ID NO:2), or a fragment of the corresponding sequence encoded by a TSLP orthologous or homologous gene, functional mutants, recombinant or synthetic derivatives, fragments or analogues thereof, b) a polynucleotide coding for said polypeptide; c) a vector comprising said polynucleotide; d) a host cell genetically engineered expressing said polypeptide, for use in a method for the diagnosis and/or prognosis of a disorder or pathology characterized by an inflammatory response and/or for the monitoring and/or for monitoring the efficacy of a therapeutic treatment or for the screening of a therapeutic treatment of a disorder or pathology characterized by an inflammatory response.

---

4. claims: 9, 12-18, 21, 22, 24, 32, 33(all partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 056878

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

A compound consisting of the amino acid sequence of the TSLP short isoform (SEQ ID NO:1) or an amino acid sequence of the corresponding region encoded from a TSLP orthologous or homologous gene, functional mutants, recombinant or synthetic derivatives, fragments or analogues thereof, for use in a method for the diagnosis and/or prognosis of a disorder or pathology characterized by an inflammatory response and/or for the monitoring and/or for monitoring the efficacy of a therapeutic treatment or for the screening of a therapeutic treatment of a disorder or pathology characterized by an inflammatory response.

---

5. claims: 11-18, 20, 32-34(all partially)

A compound selected from an antibody or fragment thereof capable of binding selectively to at least one of a polypeptide being a fragment of the C-terminus amino acid sequence of the human Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) long isoform (SEQ ID NO:2), or a fragment of the corresponding sequence encoded by a TSLP orthologous or homologous gene, functional mutants, recombinant or synthetic derivatives, fragments or analogues thereof, and a primer or a probe specific for a polynucleotide encoding said polypeptide, fur is in a method for the diagnosis and/or prognosis, or for the monitoring a disorder or pathology, and/or for monitoring the efficacy of a therapeutic treatment and/or for the screening of a therapeutic treatment of a disorder or pathology characterized by an inflammatory response, and an antibody or antigen-binding fragment there of having binding specificity for the human TSLP long isoform.

---

6. claims: 19, 31(completely); 20-24, 32-34(partially)

A compound being a TSLP long isoform (SEQ ID NO:2) antagonist wherein said antagonist is an antibody or antibody fragment capable of binding selectively to the TSLP long isoform (SEQ ID NO:2) or to fragments thereof and of neutralizing the activity of the TSLP long isoform, an antibody or antibody fragment capable of binding selectively to the TSLP long isoform (SEQ ID NO:2) receptor, or an isolated TSLP long isoform receptor, for use in the treatment and/or prevention of a disorder or pathology characterized by an inflammatory response.

---

7. claims: 25-28

A method for the diagnosis and/or prognosis and/or monitoring and/or monitoring the efficacy of a therapeutic treatment and/or for the screening of a therapeutic treatment of a disorder or pathology characterized by an

International Application No. PCT/ EP2014/ 056878

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

inflammatory response, comprising the steps of measuring the amount of at least one polypeptide consisting of the C-terminus amino acid sequence of the human Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) long isoform I (SEQ ID NO:2), or the corresponding sequence encoded by a TSLP orthologous or homologous gene, functional mutants, recombinant or synthetic derivatives, fragments or analogues thereof, in an isolated sample obtained from a subject and comparing the same with a value from a control sample, or a kit for said means.

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 C 0 8 7
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 8
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	4 H 0 4 5
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00		
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 P	15/00		
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02		
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	35/74	(2015.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	36/06	(2006.01)	A 6 1 K	35/12		
A 6 1 K	35/64	(2015.01)	A 6 1 K	35/74	A	
A 6 1 K	36/185	(2006.01)	A 6 1 K	36/06	Z	
A 6 1 K	36/88	(2006.01)	A 6 1 K	35/64		
A 6 1 K	36/00	(2006.01)	A 6 1 K	36/185		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	36/88		
			A 6 1 K	36/00		
			G 0 1 N	33/53	D	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 マリア・レスチグノ

イタリア・ミラノ・I - 2 0 1 2 1・ミラノ・ヴィア・フィロドランマティチ・1 0・イエオ - イ  
ステイトウト・エウロペオ・ディ・オンコロジア・エッセ・エツレ・エツレ内

(72) 発明者 ジュゼッペ・ベンナ

イタリア・ミラノ・I - 2 0 1 2 1・ミラノ・ヴィア・フィロドランマティチ・1 0・イエオ - イ  
ステイトウト・エウロペオ・ディ・オンコロジア・エッセ・エツレ・エツレ内

(72) 発明者 カテリーナ・ツィリンギリ

イタリア・ミラノ・I - 2 0 1 2 1 ・ミラノ・ヴィア・フィロドランマティチ・1 0 ・イエオ - イ  
 スティトゥート・エウロペオ・ディ・オンコロジア・エッセ・エッレ・エッレ内

(72)発明者 ジュリア・フォルナーサ

イタリア・ミラノ・I - 2 0 1 2 1 ・ミラノ・ヴィア・フィロドランマティチ・1 0 ・イエオ - イ  
 スティトゥート・エウロペオ・ディ・オンコロジア・エッセ・エッレ・エッレ内

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA56 CA04 CA09 CA20 DA02 DA06 EA04  
 HA03 HA12  
 4B063 QA01 QA19 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25 QS39  
 QX02  
 4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA95X AB01 AC14 BA02 BB12 BB25  
 BB37 BC11 CA24 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA19 BA44 DA01 DA45 MA02 MA52  
 MA55 MA60 NA05 NA14 ZA021 ZA661 ZA811 ZA891 ZB071 ZB072  
 ZB081 ZB111 ZB131 ZB211 ZB261 ZB351 ZC411  
 4C085 AA13 AA14 AA15 CC23 DD62 EE01 EE03 GG01 GG02 GG03  
 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10  
 4C087 AA01 BB21 BB63 BC01 BC30 BC83 CA12 MA02 NA05 NA14  
 ZA02 ZA66 ZA81 ZA89 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13 ZB21 ZB26  
 ZB35 ZC41  
 4C088 AA11 AA12 AA17 AA18 AB01 AB12 AB71 BA06 MA02 MA52  
 MA55 MA60 NA05 NA14 ZA02 ZA66 ZA81 ZA89 ZB07 ZB08  
 ZB11 ZB13 ZB21 ZB26 ZB35 ZC41  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA01 DA75 DA76 EA20 EA50  
 FA34 GA25

专利名称(译)	胸腺基质淋巴细胞生成因子片段及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016522165A</a>	公开(公告)日	2016-07-28
申请号	JP2016505852	申请日	2014-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	イ工呜呜葡萄酒トエウロベオディオオンコロジアエッセエツレエツレ鸚鵡		
申请(专利权)人(译)	IEO - 因诺琴蒂基金会欧洲人ニOnkorolja - 爱喜-ERRE-ERRE		
[标]发明人	マリアレスチグノ ジュゼッペペンナ カテリーナヅィリンギリ ジュリアフォルナーサ		
发明人	マリア・レスチグノ ジュゼッペ・ペンナ カテリーナ・ヅィリンギリ ジュリア・フォルナーサ		
IPC分类号	C07K14/47 C12N15/09 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/68 A61P37/02 A61P29/00 A61P43/00 A61P1/04 A61P35/00 A61P17/06 A61P37/08 A61P17/00 A61P31/04 A61P25/00 A61P37/06 A61P31/00 A61P15/00 A61K39/395 A61K35/76 A61K38/00 A61K48/00 A61K45/00 A61K35/12 A61K35/74 A61K36/06 A61K35/64 A61K36/185 A61K36/88 A61K36/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/19 A61P1/04 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/06 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K14/52 C07K14/5418 C07K16/244 C07K2317/76 G01N2333/52 G01N2800/7095 A61K38/00 C07K16/24 C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/158		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C12N15/00.A C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/68.A A61P37/02 A61P29/00 A61P43/00.111 A61P1/04 A61P35/00 A61P17/06 A61P37/08 A61P17/00 A61P31/04 A61P43/00.105 A61P25/00 A61P37/06 A61P31/00 A61P15/00 A61K39/395.N A61K39/395.D A61K35/76 A61K37/02 A61K48/00 A61K45/00 A61K35/12 A61K35/74.A A61K36/06.Z A61K35/64 A61K36/185 A61K36/88 A61K36/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA56 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/HA03 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS39 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB12 4B065/BB25 4B065/BB37 4B065/BC11 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA44 4C084/DA01 4C084/DA45 4C084/MA02 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA60 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA661 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZB351 4C084/ZC411 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4C087/AA01 4C087/BB21 4C087/BB63 4C087/BC01 4C087/BC30 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA02 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA66 4C087/ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4C087/ZB35 4C087/ZC41 4C088/AA11 4C088/AA12 4C088/AA17 4C088/AA18 4C088/AB01 4C088/AB12 4C088/AB71 4C088/BA06 4C088/MA02 4C088/MA52 4C088/MA55 4C088/MA60 4C088/NA05 4C088/NA14 4C088/ZA02 4C088/ZA66 4C088/ZA81 4C088/ZA89 4C088/ZB07 4C088/ZB08 4C088/ZB11 4C088/ZB13 4C088/ZB21 4C088/ZB26 4C088/ZB35 4C088/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/GA25		
代理人(译)	村山彦		

优先权 2013162326 2013-04-04 EP

外部链接 [Espacenet](http://Espacenet)

摘要(译)

本发明提供用于治疗或/和预防和/或诊断和/或监测以炎症反应为特征的疾病或病理的用途：a) 长胸腺间质性淋巴细胞生成因子 (TSLP) 长同工型。形式 (SEQ ID NO : 2)，C末端氨基酸序列，包含其衍生物或片段的多肽，b) 编码该多肽的多核苷酸，d) 包含该多核苷酸的载体，c) 表达该多肽的基因。经工程改造的宿主细胞，或d) 选自TSLP长同种型 (SEQ ID NO : 2) 拮抗剂的化合物。

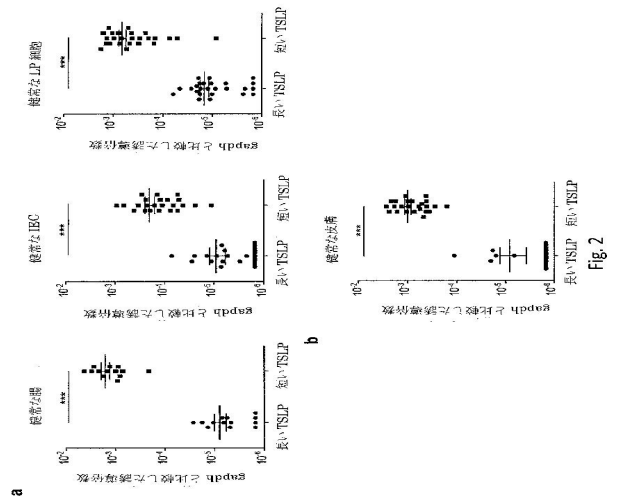


Fig. 2