

(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2007-526747

(P2007-526747A)

(43) 公表日 平成19年9月20日(2007.9.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
CO7K 16/28 (2006.01)	CO7K 16/28	4B024
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B064
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 105	4C084
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-517621 (P2006-517621)	(71) 出願人	505102016 タノックス インコーポレーテッド アメリカ合衆国 テキサス州 77025 ヒューストン、ステラ リンク ロード 10301
(86) (22) 出願日	平成16年6月25日 (2004.6.25)	(74) 代理人	100088546 弁理士 谷川 英次郎
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月26日 (2006.2.26)	(72) 発明者	リ・カン アメリカ合衆国 テキサス州 77459 ミズーリ シティ、ブライトレイク ウ エイ 1719
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/020296	(72) 発明者	ワン・シェン・ウー アメリカ合衆国 テキサス州 77459 シュガーランド、シラー パーク レー ン 4711
(87) 国際公開番号	W02005/010152		
(87) 国際公開日	平成17年2月3日 (2005.2.3)		
(31) 優先権主張番号	60/483,360		
(32) 優先日	平成15年6月27日 (2003.6.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトマスト細胞発現膜タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、プリン受容体様ポリペプチドGPR91、マスト細胞中でのその発現、並びに、アレルギー性及び非アレルギー性喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、アレルギー性胃腸疾患、アトピー性皮膚炎、関節リウマチ、並びに他のアレルギー性、自己免疫性及び炎症性疾患を包含するマスト細胞媒介性疾患の診断及び/又は治療へのその使用に関する。本発明はまた、GPR91受容体のアゴニスト及び/又はアンタゴニストのスクリーニング方法を包含する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a. 配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むトランスフェクト細胞を調製し；
- b. GPR91受容体活性を変調する能力を測定することが求められている少なくとも 1 つの化合物にトランスフェクト細胞を接触させ；
- c. 該受容体の活性を変調する化合物について前記細胞をモニターすることを含み、GPR91受容体活性を変調する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 2】

前記細胞が安定的にトランスフェクトされる請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

前記細胞が一過的にトランスフェクトされる請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞がマスト細胞である請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記化合物がアゴニストである請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記化合物がアンタゴニストである請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

前記化合物が抗体である請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 8】

カルシウム流動の量がモニターされる請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記工程 (a) で用いられる細胞がレポータータンパク質をコードする DNA をさらに含み、前記 DNA が GPR91 応答性の転写要素と動作的に連結している請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

前記受容体タンパク質のシグナル伝達活性を阻害する能力を測定することが求められている漸増する濃度の少なくとも 1 つの化合物の存在下で前記工程 (b) が行なわれる請求項 8 記載の方法。

【請求項 11】

前記工程 (c) が、前記細胞中で前記化合物の濃度の関数としてレポータータンパク質の発現レベルをモニターすることにより、前記化合物のシグナル伝達活性を阻害する能力を示すことを含み、請求項 9 記載の方法。

30

【請求項 12】

前記 GPR91 応答性の転写要素が cAMP 応答性の転写要素である請求項 8 記載の方法。

【請求項 13】

(a) GPR91 受容体を発現する細胞を候補化合物と接触させ、(b) 細胞応答を分析し、及び (c) 該細胞応答を候補化合物の非存在下でもたらされる標準の細胞応答と比較することを含み、それによって、標準よりも増大した細胞応答により前記化合物がアゴニストであることが示され、標準よりも減少した細胞応答により前記化合物がアンタゴニストであることが示される、GPR91 活性のアゴニスト又はアンタゴニストをスクリーニングする方法。

40

【請求項 14】

請求項 1 又は請求項 13 の方法によって同定された化合物。

【請求項 15】

治療が必要な患者に対し、マスト細胞媒介性疾病を調節するのに十分な量の GPR91 受容体調節因子を投与することを含み、マスト細胞媒介性疾病の予防及び / 又は治療方法。

【請求項 16】

前記 GPR91 受容体調節因子が GPR91 アゴニストである請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

50

前記GPR91受容体調節因子がGPR91アンタゴニストである請求項15記載の方法。

【請求項18】

前記マスト細胞媒介性疾病がアレルギー性喘息である請求項15記載の方法。

【請求項19】

前記アゴニストが抗体である請求項15記載の方法。

【請求項20】

a. マスト細胞媒介性の疾患を有している疑いのある哺乳動物から試料を得て；

b. 前記試料を検出可能な量の抗GPR91抗体と共にインキュベートし；

c. 結合した抗体の量を測定し；

d. 疑いのある試料中の結合した抗体の量を健常なコントロールと比較する

10

ことを含む、哺乳動物におけるマスト細胞媒介性の疾患の診断方法。

【請求項21】

抗GPR91抗体を含む、GPR91に関連する疾病又は疾患の診断用キット。

【請求項22】

マスト細胞を殺傷するためのエフェクター機能を有する抗GPR91抗体を投与することを
含む、マスト細胞媒介性疾病の予防及び/又は治療方法。

【請求項23】

前記エフェクター機能が抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)である請求項22記載の
方法。

【請求項24】

マスト細胞中でアポトーシスを誘導するためのアポトーシス誘導成分と結合させた抗GP
R91抗体を投与することを含む、マスト細胞媒介性疾病の予防及び/又は治療方法。

20

【請求項25】

前記アポトーシス誘導成分がBax- , Bak, Bcl-X_s, Bad, Bid, Bik, Erk, 及びBokから
選ばれるBcl-2ファミリーのプロアポトーシスメンバーである請求項24記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

細胞外ヌクレオチドに対する多くのプリン受容体が報告されている。これらのP2プリン
受容体は、主にATP、ADP、UTP、及びUDPによって活性化されるGタンパク
質結合受容体に分類される。P2受容体は、2つのクラスに分類できる：P2X受容体（
イオンチャネル）及びP2Y受容体（Gタンパク質結合受容体）。P2Yファミリーのう
ちでは、5つの機能的なヒト受容体（P2Y1, 2, 4, 6及び11）が同定されている。さらに
、特異的な薬理学に基づき、多くの未クローン化プリン受容体が仮定されてきている。中
でも、近年P2Yファミリーに分類された、ヒト血小板上に見出されるP2T受容体は最
も良く知られている。タンパク質相同性に基づき、プリン様のオーファン受容体（P2Y5,
9及び10）も仮定されてはいるが、それらは今日まで広範囲のプリンリガンドに対して応
答性が見出されないままである。

30

【0002】

P2Y受容体は、328から379アミノ酸の大きさでグリコシル化後の分子量が41
から53kDである7-膜貫通タンパク質である。アミノ末端が細胞外環境に面し、カル
ボキシ末端が原形質膜の細胞質側上にある。

40

【0003】

プリン受容体は、神経伝達、ADP誘導性の血小板の形状変化及び凝集、肺粘膜線毛ク
リアランス並びに平滑筋の弛緩に関与することが知られている。プリン受容体はまた、心
臓血管系、胃腸(GI)管、免疫系及び内分泌系にも関与するものと考えられている。

【0004】

喘息は、炎症、反応性亢進、及び気道の再構築によって特徴付けられる疾病である。喘
息の治療のための主な治療薬は、2-アゴニスト（気道狭窄による症状を軽減する）及
びコルチコステロイド（肺における炎症過程を軽減し、肺機能のさらなる悪化を改善又は

50

減少させることを目的とする)である。これら及び他の治療形態にもかかわらず、喘息の罹患は上昇し世界中に蔓延している。

【0005】

ヒトマスト細胞は、サイトカイン、ケモカイン、プロテアーゼ及び低分子メディエーターの放出による喘息、アレルギー性及び炎症性疾患の進展において中心的な役割を果たしている (Nechushtan, H. and Razin, E. 1996 *Critical Review Oncology/Hematology* 23:131-150; Bradding, P. and Halgate, S. 1999 *Critical Review Oncology/Hematology* 31:119-133; Wedemeyer et al., 2000 *Cur. Opin. In Immunol.* 12:624-631; Hart, PH, 2000 *Immunol. Cell Biol.* 79:149-153; Lee, DM et al., 2002 *Science* 297:1689; Boyce, J. 2003 *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111:24-32)。例えば、喘息患者では、症状の悪化はマスト細胞からのサイトカイン及びケモカインの遺伝子活性化、デノボ合成及び放出を伴っていたが、これにより、気管支収縮の悪化が引き起こされ、ヒト気道平滑筋細胞の増殖並びに炎症細胞の補充及び活性化が誘導される。さらに、喘息性の気道平滑筋上に存在するマスト細胞の数は、非喘息性の気道平滑筋上に存在する数と比較して増加している。

10

【0006】

マスト細胞の活性化と喘息を引き起こす刺激 (例えばアレルギー誘導性のIgEの架橋) は、細胞内カルシウム濃度の上昇及びカルシウム媒介性のシグナル経路に関連しており、これによりサイトカイン、ケモカイン及びプロテアーゼの発現及びデノボ合成が促進される (Nature 1999, 402:B24; Immunity 2002, 16:441)。活性化T細胞の核因子 (NFAT) 及び活性化タンパク質1 (AP-1) は、マスト細胞の情報伝達カスケードにおいて重要な役割を果たす転写因子である (J. Biol. Chem. 1995, 270:16333; Annu. Rev. Immunol. 1997, 15:707; PNAS 2003, 100:1169)。従って、カルシウム媒介性の経路、転写因子 (NFAT及びAP-1) 並びに喘息に関連するサイトカイン、ケモカイン及びプロテアーゼ遺伝子の活性化は、マスト細胞における治療標的の同定の代用手法として用いられている。

20

【0007】

本発明は、(a)配列番号2のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むトランスフェクト細胞を調製し; (b)GPR91受容体活性を変調する能力を測定することが求められている少なくとも1つの化合物にトランスフェクト細胞を接触させ; 及び(c)前記細胞の受容体活性の変化をモニターすることを含む、GPR91受容体活性を変調する化合物をスクリーニングする方法に関する。

30

【0008】

細胞は安定に又は一過的にトランスフェクトされ得る。該細胞は、マスト細胞、GPR91ノックアウトマウス (GPR91⁻/GPR91⁻) から単離されたノックアウト細胞、CHO、COS-7、293細胞、HELA、又はマスト細胞若しくは白血病性マスト細胞から確立された細胞株であり得る。

【0009】

GPR91活性の変調は、細胞内のカルシウム流動の測定、NFAT-Lucレポータープラスミドのようなレポーター遺伝子の発現レベルの測定、サイトカイン発現レベルの測定、及び受容体の活性化又は阻害を測定する他の一般的な方法によってモニターされ得る。レポーター遺伝子は、NFAT (活性化T細胞の核因子) 結合モチーフ要素のようなGPR91応答性転写要素と動作可能な状態で連結し得る。

40

【0010】

本発明はまた、(a)GPR91受容体を発現する細胞を候補化合物と接触させ、(b)細胞の応答を分析し、及び(c)該細胞応答を、候補化合物が存在しない状態でなされる標準の細胞応答と比較することを含む、GPR91活性のアゴニスト又はアンタゴニストをスクリーニングする方法をも包含する。細胞応答の比較により、標準よりも細胞応答が増大していた場合には該化合物はアゴニストであり、また標準よりも細胞応答が低下していた場合には該化合物はアンタゴニストであることを示している。

50

【0011】

本発明はアゴニスト及びアンタゴニストに関する。該アゴニスト及びアンタゴニストは、喘息のようなアレルギー性疾患及び炎症性疾患を包含する免疫疾患の治療において、治療上の利点をもたらすものを包含する。1つの具体例において、アンタゴニストは、GPR91受容体の可溶性形態、及びGPR91受容体の細胞外ドメインから誘導されGPR91受容体に結合可能な可溶性ポリペプチドである。該アンタゴニストは、配列番号2の細胞外ドメイン又はそのアンタゴニスト断片から選ばれるペプチドであり得る。該ペプチドは、リガンドに結合し該リガンドがネイティブな受容体に結合するのを防ぐことにより、天然のリガンドのGPR91への結合を阻害する。

【0012】

本発明はGPR91に特異的に結合する抗体を包含する。該抗体は、アゴニスト抗体、アンタゴニスト抗体、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ; ADCC) のようなFc媒介性細胞傷害活性を有する抗体、抗体コンジュゲート (antibody conjugate)、及びGPR91への結合を阻害する抗体を包含する。該抗体は、中和抗体、アゴニスト、アンタゴニストであり得、又は診断目的のためGPR91に結合し得る。該抗体はポリクローナル又はモノクローナル及びその機能的な結合性断片であり得る。モノクローナル抗体は、ヒト化、ヒト、キメラ、二重特異性、又は複合体であり得る。本発明はまた一本鎖抗体も包含する。複合体としては、毒素、又はBax、Bak、Bcl-X_s、Bad、Bid、Bik、Erk、及びBokから選ばれるBcl-2ファミリーのプロアポトーシスメンバーのようなアポトーシス誘導成分を挙げることができる。抗体コンジュゲートは、マスト細胞の除去又はマスト細胞アポトーシスの誘導のために用いられ得る。

【0013】

本発明は、診断及び/又は治療に用いるためのこれらの抗GPR91抗体の組成物を包含する。組成物は、適切な担体、アジュバント、希釈剤、賦形剤及び/又は添加剤と組み合わせた抗体を含む。

【0014】

本発明は他の局面では、GPR91タンパク質の生物活性 (例えばリガンド) と結合し及び/又はそれを変調する、目的の物質を同定するためのスクリーニング方法に関する。GPR91タンパク質はマスト細胞中で発現されるので、該物質は、マスト細胞又は他の免疫細胞の成熟、遊走、活性化、又は他の細胞との連絡の変調に関与し得る。従って、GPR91タンパク質の生物活性と結合しそれを変調する物質は、喘息及び他のアレルギー性疾患、白血病のある種の症状を軽減するのに効果的であり得、又は炎症を軽減し得る。

【0015】

本発明はまた、抗GPR91抗体の使用による、マスト細胞媒介性の疾患及び疾患の診断方法を包含する。GPR91はマスト細胞に高度に特異的であり、従って、GPR91に対する抗体を用いて、組織生検のような任意の試料中のマスト細胞の存在や頻度を検出することができる。試料中のGPR91の相対的な増加は、例えば肺の平滑筋組織中のマスト細胞レベルが上昇している患者においては喘息の徴候であり得る。抗GPR91抗体はまた、GPR91を発現している細胞の存在又は増加/減少の検出に用いられ得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

定義

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

【0017】

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

10

20

30

40

50

【0018】

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

【0019】

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

【0020】

「変異体」という語は、ポリヌクレオチド配列を記述するために用いられた場合には、ネイティブの対応物(counterpart)と1以上のヌクレオチドが異なり、かつ、ネイティブの対応物と同一又は類似する生物学的機能を有するヌクレオチド配列を意味する。変異体には、ネイティブの対応物と比較した場合に少なくとも85%、又は少なくとも90~95%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列、並びにストリンジェント条件下においてネイティブの配列又はその相補物に結合するヌクレオチド配列が含まれる。変異体には、ネイティブの対応物と同一のアミノ酸配列をコードするが、遺伝暗号の縮重に基づいてのみネイティブのヌクレオチド配列と異なるヌクレオチド配列が含まれ得る。

【0021】

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

【0022】

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

10

20

30

40

50

最も好ましい断片は、ネイティブ配列の少なくとも50ないし100の連続するヌクレオチドから成るアミノ酸配列を有する。

【0023】

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

【0024】

「アゴニスト」という語は、GPR91受容体の正常な機能を直接又は間接的に高め、促進し又は刺激するあらゆる分子を意味する。アゴニストの1つのタイプは、そのリガンドと同様にGPR91受容体と相互作用する分子であり、抗体又は抗体断片を包含するが、これに限定されない。

10

【0025】

「アンタゴニスト」という語は、GPR91受容体の正常な機能をブロックし、妨害し、阻害し、又は中和するあらゆる分子を意味する。アンタゴニストの1つのタイプは、GPR91受容体とそのリガンドの間の相互作用を妨げる分子であり、抗体又は抗体断片を包含するが、これに限定されない。アンタゴニストの他のタイプは、ネイティブなGPR91受容体の適正な転写を阻害するアンチセンスヌクレオチド又はネイティブな転写物に結合するsiRNAである。

20

【0026】

「保存的アミノ酸置換」という語は、ポリペプチド中のアミノ酸が、類似の側鎖を有するアミノ酸で置換されていることを意味する。例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンは脂肪族側鎖を有し；セリン及びスレオニンは脂肪族ヒドロキシ側鎖を有し；アスパラギン及びグルタミンはアミド含有側鎖を有し；フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンは芳香族側鎖を有し；リジン、アルギニン及びヒスチジンは塩基性の側鎖を有し；システイン及びメチオニンはイオウ含有側鎖を有する。好ましい保存的アミノ酸置換は、バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、チロシン、リジン、アルギニン、アラニン、バリン、及びアスパラギン、グルタミンである。

【0027】

「ノックアウト」という語は、単一細胞、選択された複数の細胞又は哺乳動物の全細胞の内発性遺伝子（例えばGPR91受容体など）によりコードされるポリペプチドの少なくとも一部の発現を部分的に又は完全に減少させることを意味する。哺乳動物は、内発性遺伝子のうち1個の対立遺伝子が破壊された「ヘテロ接合ノックアウト」、又は内発性遺伝子の両方の対立遺伝子が破壊された「ホモ接合ノックアウト」であり得る。

30

【0028】

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

40

【0029】

遺伝暗号の縮重の故に、本発明のGPR91ポリペプチドをコードする多くのヌクレオチド配列を生産することができる。これらの配列のいくつかは、いずれかの公知の天然のヌクレオチド配列に高度に相同的であろうし、いくつかはこれらに最小限に相同的であろう。本発明は、可能なコドンの選択に基づく組合せを選択することにより作られるヌクレオチド配列を変異させることを意図する。これらの組合せは、天然のGPR91受容体をコードするヌクレオチド配列に適用される標準的なトリプレット遺伝暗号に従って作ることができ、全てのこのような変異は具体的に開示されているものと考えられる。

50

【0030】

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

【0031】

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

10

【0032】

本発明

本発明は、以下の発明の詳細な説明及び実施例を参照することにより容易に理解され得る。Gタンパク質結合受容体91 (GPR91) は、P2Yファミリーのプリン受容体及びシステイニルロイコトリエン受容体と有意な配列相同性を有している。GPR91は、他の細胞型と比べ、ヒト初代マスト細胞中では発現が異なっている。GPR91はまた、ヒト単球中에서도発現しており、肥満細胞腫から誘導されたヒト細胞株であるヒトマスト細胞1 (HMC-1) 細胞中で過剰発現させた場合には細胞内のカルシウム流動及びカルシニューリン媒介性のシグナル経路を活性化させる。それ故に、GPR91は、炎症性及びアレルギー性反応の間に哺乳動物の気道、及び/又は末梢若しくは結合組織中のマスト細胞活性を刺激するのに重要な役割を果たしていると言える。従って、GPR91は、アレルギー性及び非アレルギー性喘息、慢性閉塞性肺疾病 (COPD)、アレルギー性鼻炎、アナフィラキシー、アレルギー性胃腸疾病、アトピー性皮膚炎、関節リウマチ、並びに他のアレルギー性、自己免疫性及び炎症性疾患のようなマスト細胞媒介性疾患を治療するための治療標的として用いることができる。該治療のためのGPR91の活性化剤/阻害剤は、抗体、リガンドに対するペプチド類似体、低分子物質、アンチセンス又はRNAiであり得る。

20

【0033】

GPR91の同定

ヒトマスト細胞中では発現が異なる遺伝子は、はじめに、遺伝子マイクロアレイ技術を用いてマスト細胞 (臍帯血CD34+細胞から培養)、PBMC (末梢血単核細胞)、及びTHP-1 (急性単球性白血病; リンパ球) 間でmRNA発現レベルを比較することにより同定した (実施例を参照)。マスト細胞におけるGPR91の差次的発現は、種々の異なる細胞型及びヒト組織を用いた定量的RT-PCRによりさらに裏付けた。

30

【0034】

ジーンバンク公開データベースに対するBLAST配列類似性検索により、GPR91はP2Yプリン受容体及びシステイニルロイコトリエン受容体と有意な相同性を有することがわかった。対応するGタンパク質へのGPR91の結合特異性の予測により、G_q/11サブタイプとの相互作用に関わる可能性が高いことがわかった。この予測は、受容体-Gタンパク質の相互作用の特異性は受容体の細胞内ドメインに支配されているという知見に基づいて行なわれた。パターン発見と膜トポロジー予測を組み合わせたデータマイニングアプローチを用いて、特定の機能クラスのGタンパク質への結合に特異的な、GPCR配列の細胞内ドメイン中にあるアミノ酸残基のパターンを発見した。

40

【0035】

GPR91の機能を同定するため、野生型 (wt) のGPR91 (pGPR91) 又はタグ付加したGPR91 (pGPR91-V5及びpGPR91-20Flag) を発現するプラスミド構築物を用いて一過的トランスフェクション及びルシフェラーゼレポートアッセイを行なった。HMC-1細胞中では、wtのGPR91は、NFAT (活性化T細胞の核因子) プロモーターに結合させたルシフェラーゼレポートアッセイを約19.8倍に活性化し、また、AP-1プロモーターに結合させたルシフェラーゼレポートアッセイをも約5.3倍に活性化した。GPR91によるNFATプロモーターの活性化は、カルシウム流

50

入からNFAT活性化までの細胞内シグナル伝達を調節するカルシニューリンに対する特異的な阻害剤（シクロスポリンA）を適用することによりさらに検証した。GPR91によるNFAT活性化に対する促進作用はシクロスポリンAによりほぼ完全に阻害された。これらの結果は、GPR91が周知の細胞内シグナル経路を通じて転写因子NFATを活性化すること、すなわち、GPR91はGq/11（又はq/11様の）サブユニットに取り込まれ得て、Gタンパク質を活性化し、それにより次いでホスホリパーゼCを活性化して、NFAT及びAP1の活性化と共に細胞内カルシウム流動を引き起こすことを示している。

【0036】

さらに、構成的に活性な挿入変異体GPR91-20Flagによりプロモーターが活性化される遺伝子のグループを同定した。ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、マスト細胞から放出され、喘息の症状、アレルギー性及び炎症性疾患の悪化に關与しているサイトカイン、プロテアーゼ及びケモカインの例である（Annu. Rev. Immunol. 1999, 17:255; Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1996, 15: 473; J. Immunol. 2002, 168:2603; J. Immunol. 2002, 169:2662; J. Immunol. 2000, 165:7215; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89:8542; Eur. Respir. J. 2001, 34:50s) IL8、IL13、TNF、トリプターゼ1及びトリプターゼ2のプロモーター活性をGPR91-20Flagが促進することがわかった（実施例5）。

10

【0037】

カルシウム媒介性シグナル経路を経由した細胞内カルシウム流動は、マスト細胞の脱顆粒及びサイトカインの分泌を活性化するための極めて重要な条件の一つである、ということが既刊文献中で十分に立証されていることから、本願発明者の発見は、GPR91が喘息、アレルギー、及び他の炎症性疾患の進行において重要な役割を果たし得るということを示唆している。従って、GPR91は、喘息、アレルギー、自己免疫性疾患、及び他の炎症性疾患の治療のために、抗体を作製し、低分子物質及び/又はRNAiをスクリーニングするための治療標的として用いることができる。

20

【0038】

ポリペプチド

一つの局面において、本発明は、配列番号2；配列番号2の変異体；配列番号2の断片から成る群より選ばれるアミノ酸配列を有する単離されたポリペプチドを提供する。一つの具体例では、該単離されたポリペプチドは、関節炎、喘息、AIDSのような免疫不全疾患、白血病、関節リウマチ、肉芽腫性疾患、炎症性腸疾患、敗血症、座瘡、好中球減少、好中球増加、乾癬、T細胞媒介性細胞傷害のような過敏症；宿主対移植片及び移植片対宿主病のような移植臓器及び組織に対する免疫反応又は自己免疫性不妊症のような自己免疫疾患、レンズ組織傷害、脱髄、全身性エリテマトーデス、薬剤誘導性の溶血性貧血、関節リウマチ、シェーグレン病、及び強皮症を含む免疫傷害のための予防薬として有用であり得る。その上、該タンパク質は、他の血球の分化若しくは性質に影響する、又は造血性細胞を傷害部位に補充する分泌因子を代表し得る。従って、この遺伝子産物は種々の血液系列の幹細胞及び抗原感作前駆体の増殖、並びに種々の細胞型の分化及び/又は増殖に有用であり得る。

30

【0039】

GPR91受容体の可溶性形態は、サイトカイン産生、抗原提示、又は免疫応答を刺激する等のためのような他のプロセスを変調するのに有用であり得る。リンパ系起源の細胞中での発現は、本来の遺伝子産物が免疫機能に關与し得るということを示している。従って、それは関節炎、喘息、AIDSのような免疫不全症、白血病、関節リウマチ、肉芽腫症、炎症性腸疾患、敗血症、座瘡、好中球減少、好中球増加、乾癬、T細胞媒介性細胞傷害のような過敏症；宿主対移植片及び移植片対宿主病のような移植臓器及び組織に対する免疫反応、又は自己免疫性不妊症のような自己免疫疾患、レンズ組織傷害、脱髄、全身性エリテマトーデス、薬剤誘導性の溶血性貧血、関節リウマチ、シェーグレン病、及び強皮症を含む免疫傷害のための薬剤としても有用となり得る。

40

【0040】

アゴニスト及び/又はその断片を包含する本発明のポリペプチドには、種々の細胞、組

50

織、及び生体中の、好ましくはヒト組織中のシグナル伝達活性を変調することを含む用途がある。

【0041】

発現及び回収

本発明に基づき、単離及び精製されたGPR91受容体を、上記の組換え発現系によって生産することができる。該方法は、該ポリペプチドの発現を十分に促進し得る条件下にて、該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培養することを含む。該ポリペプチドは次いで、使用した発現系に応じて、培養液又は細胞抽出物から回収される。当業者に公知の通り、組換えポリペプチドを精製する方法は、用いられる宿主細胞のタイプ及び組換えポリペプチドが培養液中に分泌されるか否か等の要因に応じて異なってくる。組換えポリペプチドが分泌される発現系を用いる場合には、まずは培養液を濃縮することができる。この濃縮工程に次いで、該濃縮物をゲル濾過媒体のような精製マトリックスに施すことができる。あるいは、例えばペンダントジエチルアミノエチル(DEAE) 基を有するマトリックス又は基質のような、陰イオン交換樹脂を使用することができる。該マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、又はタンパク質精製に一般的に用いられるその他のタイプであり得る。また、陽イオン交換工程も用いることができる。適した陽イオン交換体としては、スルホプロピル基又はカルボキシメチル基を含む種々の不溶性マトリックスが挙げられる。さらに、疎水性の逆相高速液体クロマトグラフィー(RR-HPLC) 媒体(例えばペンダントメチル基若しくは他の脂肪族基を有するシリカゲル)、イオン交換HPLC(例えばペンダントDEAE基若しくはスルホプロピル(SP) 基を有するシリカゲル)、又は疎水性相互作用HPLC(例えばペンダントフェニル基、ブチル基若しくは他の疎水基を有するシリカゲル)を用いた、1以上のRR-HPLC工程を用いて、タンパク質をさらに精製することができる。種々の組合せにおける、前述の精製工程のいくつか又は全ては、この分野において周知であり、これらを利用して単離及び精製された組換えポリペプチドを提供することができる。

10

20

30

【0042】

細菌培養物中に生産された組換えポリペプチドは、通常はまず宿主細胞を破壊し、遠心し、不溶性ポリペプチドであれば細胞沈殿物から抽出し又は可溶性ポリペプチドであれば上清から抽出し、次いで1回以上の遠心、塩析、イオン交換、アフィニティー精製若しくはサイズ排除クロマトグラフィー工程を用いることで単離される。最後に、RP-HPLCを最終の精製工程として用いることができる。凍結融解サイクル、超音波破壊、機械的破壊又は細胞溶解試薬の使用を包含する、いずれの便利な方法を用いても、微生物細胞を破壊することができる。

【0043】

アゴニスト及びアンタゴニスト

本発明は、直接又は間接的にGPR91の発現又は作用を活性化又は阻害するアゴニスト及びアンタゴニストを提供する。アゴニスト及びアンタゴニストのタイプとしては、ポリペプチド、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖類、少糖類、ヌクレオチド、有機分子、生物有機分子、ペプチド模倣物、薬理的物質及びそれらの代謝物、並びに転写及び翻訳制御配列を包含するが、これらに限定されるものではない。

40

【0044】

一つの具体例では、アンタゴニストは、GPR91受容体の可溶性形態、及びGPR91受容体の細胞外ドメインから誘導されたGPR91受容体に結合し得る可溶性ポリペプチドである。該アンタゴニストは、配列番号2の細胞外ドメイン又はそのアンタゴニスト断片から選ばれるペプチドであり得る。これらのペプチドは、天然のリガンドに結合することによって該リガンドのGPR91への結合をブロックし、ネイティブな受容体への該リガンドの結合を妨げ得る。

【0045】

本発明のアゴニスト及びアンタゴニストは、GPR91に特異的に結合し、例えばサイトカインの産生を促進又は阻害するような、生物学的作用及び機能に影響を与える抗体をも包

50

含し得る。該抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであり得、またキメラ、ヒト、ヒト化、又は脱免疫化 (deimmunized) 抗体であり得る。

【0046】

アゴニスト抗体は、非疾病状態と比較して低いサイトカイン又は受容体の発現により特徴付けられる疾病の予防又は治療に用いられ得る。アンタゴニスト抗体は、非疾病状態と比較して高いサイトカイン又は受容体の発現により特徴付けられる疾病の予防又は治療に用いられ得る。

【0047】

該アゴニスト及びアンタゴニストは、これらに限定されるものではないが、喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び蕁麻疹などのアレルギー性疾病を包含する種々の免疫疾病；移植片拒絶及び移植片対宿主病を包含する移植関連疾病；水疱性皮膚疾病、多形性紅斑及び接触性皮膚炎、乾癬を包含する自己免疫性又は免疫介在性皮膚疾病；関節リウマチ、若年性慢性関節炎；炎症性腸疾病（すなわち、潰瘍性大腸炎、クローン病）；全身性エリテマトーデス；脊椎関節症；全身性硬化症（皮膚硬化症）；特発性炎症性筋疾病（皮膚筋炎、多発性筋炎）；シェーグレン症候群；全身性血管炎；サルコイドーシス；自己免疫性溶血性貧血（免疫性汎血球減少症、発作性夜間血色素尿症）、自己免疫性血小板減少症（特発性血小板減少性紫斑病、免疫性の血小板減少）；甲状腺炎（グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ球性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎）；糖尿病；免疫介在性腎疾病（糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎）；多発性硬化症、特発性脱髄性多発神経障害又はギラン バレー症候群、及び慢性炎症性脱髄性多発神経障害のような、中枢及び末梢神経系の脱髄疾病；感染性肝炎（A型、B型、C型、D型、E型肝炎及び他の非肝親和性ウイルス）、自己免疫性慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、肉芽腫性肝炎及び硬化性胆管炎のような肝胆汁性疾病；嚢胞性線維症、グルテン過敏性腸疾病及びウィップル病のような炎症性及び繊維性肺疾病；好酸球性肺炎、特発性肺線維症及び過敏性肺臓炎のような肺の免疫疾病の治療に用いられる。

【0048】

アゴニスト及びアンタゴニストのスクリーニング

他の局面において、本発明はGPR91受容体アゴニスト及びアンタゴニストを同定するためのスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法は、GPR91受容体をGPR91アゴニスト/GPR91アンタゴニスト候補に曝露し、アゴニスト/アンタゴニスト候補が受容体に結合するか否かを判定することを含む。もしアゴニスト/アンタゴニスト候補が受容体に結合するならば、該アゴニスト/アンタゴニスト候補が、インビボで患者に投与されネイティブなGPR91活性化受容体に曝露された際に、実際にアゴニスト又はアンタゴニストとして機能するものと強く推定される。該方法により同定された該GPR91アゴニスト及び該GPR91アンタゴニストは、サイトカインを生産できる細胞を該アゴニスト/アンタゴニストに曝露し、サイトカインの生産を非曝露細胞と比較して測定することにより、アゴニスト又はアンタゴニストとして特徴付けられ得る。アゴニストであればサイトカインの生産が増大する；アンタゴニストであればサイトカインの生産が減少する。他のスクリーニング方法は、GPR91のDNA結合配列を含むレポーター遺伝子構築物で細胞をトランスフェクトすることを含む。好ましくは、該アゴニスト/アンタゴニスト候補は、抗体を包含する有機化合物又はポリペプチドである。

【0049】

細胞に基づいた種々の機能分析では、正常な生理的環境におけるタンパク質の活性を評価するために細胞内カルシウム濃度の測定が利用される。GPR91受容体の刺激による細胞内カルシウム濃度の大幅かつ迅速な上昇は、生物発光タンパク質、エクオリン、及び改変緑色蛍光タンパク質 - カルモジュリンキメラ (Ungrin, M. D., Singh, L. M. R., Stocco, R., Sas, D. E., Abramovitz, M. (1999) An automated aequorin luminescence-based functional calcium assay for G-protein-coupled receptors. *Anal. Biochem.* 272, 34-42; Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J. D., and Herman, B. (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiological Reviews* 79, 1089-1125; Gonzalez,

J. E., Oades, K., Leychis, Y. Harootunian, A., and Negulescu, P. (1999) Fluorescent indicators for Ca^{1+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882-887; Creton, R., Kreiling, J. A., and Jaffe, L. F. (1999) Calcium imaging with chemiluminescence. *Microsc. Res. Tech.* 46, 390-397; Prasher, D., McCann, R. O., and Cormier, M. J. (1985) Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, A bioluminescent calcium-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126, 1259-1268) のような蛍光色素、カルシウム結合タンパク質を包含する、細胞内カルシウムに感受性のプローブによって検出することができる。

【0050】

スクリーニング技術の当業者は、蛍光又は発酵シグナルの測定に利用できる時間を延長する方法を用いてきた。例えば、一つの方法では、細胞のレポーター酵素反応の反応速度を変更又は低下させる試薬が添加された。この手法の例は、PACKARD社のLUCLITE(登録商標)ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイキット(米国特許第5,618,682号及び欧州特許出願94 102 080.2を参照)又はPROMEGA社のSTEADY-GLO(商標)ルシフェラーゼアッセイシステム(米国特許第5,283,179号を参照)のような、ルシフェラーゼに基づく閃光発光をグロー発光形式に変換する手法である。該スクリーニング方法は、疾病、特に非疾病状態と比較して低い又は高いサイトカイン産生によって特徴付けられる疾病を予防又は治療するための薬剤として機能し得る化合物を同定するために有用である。

10

【0051】

ハイスループットスクリーニング方法論は、特に、ここに記載されるGPR91の調節因子の検出に対して想定されるものである。そのようなハイスループットスクリーニング方法は、典型的には、多数の治療化合物(例えばリガンド又は調節因子化合物)候補を含むコンビナトリアル化学ライブラリー又はペプチドライブラリーの提供を含む。そのようなコンビナトリアル化学ライブラリー又はリガンドライブラリーは、次いで、所望の特徴的な活性を示すライブラリーメンバー(例えば特定の化学種又はサブクラス)を同定するために、1以上のアッセイでスクリーニングされる。そのようにして同定された化合物は、従来のリード化合物として役立つし、又はそれら自体が治療薬候補若しくは実際の治療薬として用いられ得る。

20

【0052】

コンビナトリアル化学ライブラリーは、多くの化学的成分(すなわちアミノ酸のような試薬)を組み合わせることにより、化学合成又は生物学的合成のいずれかによって生成された種々の化学物質の集合である。一例としては、例えばポリペプチド又はペプチドライブラリーなどの線形(linear)コンビナトリアルライブラリーは、任意の化合物の長さ(すなわちポリペプチド又はペプチド化合物中のアミノ酸数)について可能な全ての組み合わせで一連の化学的成分を組み合わせることにより形成される。そのような化学的成分の組み合わせの混合を経て、何百万もの化学物質が合成され得る。

30

【0053】

コンビナトリアル化学ライブラリーの調製及びスクリーニングは当業者に周知である。コンビナトリアルライブラリーとしてはペプチドライブラリー(例えば米国特許第5,010,175号; Furka, 1991, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37:487-493; 及び Houghton et al., 1991, *Nature*, 354:84-88)が挙げられるが、これに限定されない。他の化学を用いて科学的多様性ライブラリーを生成することもできる。化学的多様性ライブラリー化学の例としては、これらに限定されるものではないが、ペプチド(PCT公開W0 91/019735)、コードペプチド(PCT公開W0 93/20242)、ランダムバイオオリゴマー(PCT公開W0 92/00091)、ベンゾジアゼピン(米国特許第5,288,514号)、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン及びジペプチドのようなダイバーソマー(diversomer)(Hobbs et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6909-6913)、ビニル性のポリペプチド(Hagihara et al., 1992, *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:6568)、グルコースの足場を有する非ペプチド性のペプチド模倣物(Hirschmann et al., 1992, *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-9218)、低分子化合物ライブラリー(Chen et al., 1994, *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661)、オリゴカルバメート(Cho et al.

40

50

., 1993, Science, 261:1303)、及びノ又はペプチジルホスホネート(Campbell et al., 1994, J. Org. Chem., 59:658)の類似の有機合成、核酸ライブラリー(Ausubel, Berger 及び Sambrookを参照, 全て上記)、ペプチド核酸ライブラリー(米国特許第5,539,083号)、抗体ライブラリー(例えばVaughn et al., 1996, Nature Biotechnology, 14(3):309-314)及びPCT/US96/10287)、炭水化物ライブラリー(carbohydrate library)(例えばLiang et al., 1996, Science, 274-1520-1522)及び米国特許第5,593,853号)、低有機分子ライブラリー(例えばベンゾジアゼピン、Baum C&EN, Jan. 18, 1993, 33頁; 及び米国特許第5,288,514号; イソプレノイド、米国特許第5,569,588号; チアゾリジノン及びメタチアザノン, 米国特許第5,549,974号; ピロリジン, 米国特許第5,525,735号及び第5,519,134号; モルホリノ化合物, 米国特許第5,506,337号; など)が挙げられる。

10

【0054】

コンビナトリアルライブラリーの調製のための装置は市販されている(例えば357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, ケンタッキー州Louisville; Symphony, Rainin, Woburn, Mass.; 433A Applied Biosystems, カリフォルニア州Foster City; 9050 Plus, Millipore, マサチューセッツ州Bedford)。その上、多くのコンビナトリアルライブラリーが市販されている(例えばComGenex、ニュージャージー州Princeton; Asinex, ロシア国Moscow; Tripos, Inc., ミズーリ州St. Louis; ChemStar, Ltd., ロシア国Moscow; 3D Pharmaceuticals, ペンシルベニア州Exton; Martek Biosciences, メリーランド州Columbiaなど)。

【0055】

一つの具体例では、本発明は、イオンチャネルを発現する細胞又は組織が固相支持体に結合された、ハイスループット形式のインビトロアッセイに基づく固相を提供する。そのようなハイスループットアッセイでは、一日で数千もの異なる調節因子又はリガンドを選抜することが可能である。特に、マイクロタイタープレートの各ウェルは、選択された調節因子候補に対する別個のアッセイを行なうために用いることができ、又は、もし濃度若しくはインキュベーション時間の効果が観察される場合には、各5~10ウェルは単一の調節因子を試験し得る。こうして、単一の標準マイクロタイタープレートで約96の調節因子を分析することができる。1536ウェルのプレートを用いた場合には、単一のプレートで約100から約1500の異なる化合物を容易に分析することができる。一日につき数枚の異なるプレートを分析することができる; 従って、例えば、記載の集積システムを用いて、約6,000~20,000もの異なる化合物についてのアッセイスクリーン

20

30

【0056】

他の局面では、本発明は、特定のタンパク質、すなわちGPR91ポリペプチド又はペプチドに結合し得る低分子の検出又は同定を含む、スクリーニング及び低分子(例えば薬剤)検出アッセイを包含する。特に好ましくは、ハイスループットスクリーニング手法に適したアッセイである。

【0057】

そのような結合に基づく検出、同定、又はスクリーニングアッセイでは、機能分析は一般には要求されない。必要とされるのは、好ましくは実質的に精製された標的タンパク質、及び、該タンパク質標的への結合についてのスクリーニング又はアッセイの対象たる化合物(例えばリガンド、薬剤、低分子)又は生物学的実在のライブラリー又はパネルのみである。好ましくは、標的タンパク質に結合する大部分の低分子は、該タンパク質上の機能領域又は部位への優先的でより親和性の高い結合の故に、幾通りかの方法で活性を調節するだろう。

40

【0058】

そのようなアッセイの例の一つは、Pantolianoらに付与された米国特許第6,020,141号及び第6,036,920号に記載された、蛍光に基づいた温度シフトアッセイ(3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 3DP, Exton, ペンシルベニア州)である; J. Zimmerman, 2000, Gen. Eng. News, 20(8)も参照のこと)。該アッセイは、タンパク質-薬剤又はリガンド複合体の熱変性曲線を解析することによる結合親和性の決定に基づき、発現され好ましくは

50

精製されたイオンチャンネルポリペプチドに結合する低分子(例えば薬剤、st リガンド)の検出を可能にする。この手法により決定された薬剤又は結合分子は、もし所望であれば、該分子が該標的タンパク質の機能又は活性に影響し又は調節するか否かを決定するため、ここに記載されたような方法によってさらに分析され得る。

【0059】

GPR91ポリペプチド又はペプチドを精製し生物学的結合又はリガンド結合活性を測定するため、その供給源は、標準的なプロテアーゼ阻害剤存在下での連続的な凍結 - 融解サイクル(例えば1ないし3回)により調製することができる全細胞溶解液であり得る。GPR91ポリペプチドは、例えば下記の特異的抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーのような標準的なタンパク質精製法により、又は同じくここに記載された組換えGPR91ポリペプチド分子中に組み込まれたエピトープタグに対して特異的なりガンドにより、部分的に又は完全に精製され得る。結合親和性は次いで記載の通り測定され得る。

10

【0060】

ここで提供された方法に従って同定される、本発明のGPR91ポリペプチドの生物活性又は生理機能を変調又は制御する化合物は、本発明の好ましい一具体例である。ここに記載された方法によって同定された化合物を治療が必要な個体に対し治療効果のある量で投与することによる、GPR91ポリペプチドにより媒介される状態を治療するための処置及び治療方法において、そのような修飾的な化合物が用いられ得るということが予期される。

【0061】

さらに、本発明は、本発明のGPR91ポリペプチドにより媒介される疾病、疾患、又は状態の治療が必要な個体を治療するための方法であって、ここで提供される方法により同定されるGPR91調節化合物を該個体に対し治療効果のある量で投与することを含む方法を提供する。

20

【0062】

抗体及び抗体の生成

本発明の他の具体例としては、ポリペプチド、ポリペプチド断片、若しくは配列番号2の変異体、及び/又はGPR91のエピトープ、若しくはGPR91断片の細胞外ドメインに免疫特異的に結合する抗体が挙げられる。本発明の抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、一価、二重特異性、ヘテロ結合、多重特異性(multispecific)、ヒト、ヒト化、若しくはキメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリーにより生産される断片、抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば本発明の抗体に対する抗Id抗体が挙げられる)、及び上記いずれかのエピトープ結合性断片が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0063】

ここで用いられる「抗体」という語は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリンの免疫学的な有効成分、すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を言う。本発明の免疫グロブリン分子は、免疫グロブリン分子のいずれのタイプ(例えばIgG, IgE, IgM, IgD, IgA及びIgY)、クラス(例えばIgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1及びIgA2)、又はサブクラスであってもよい。さらに、「抗体」(Ab)又は「モノクローナル抗体」(Mab)という語は、無損の分子、並びに、タンパク質に特異的に結合し得る抗体断片(例えばFab及びF(ab')₂断片など)を包含することとする。Fab及びF(ab')₂断片は、無損の抗体のFc断片を欠失しており、無損の抗体よりも迅速に動物又は植物の循環から除去され、非特異的な組織結合が無損の抗体よりも起こりにくくあり得る(Wahl et al., J. Nucl. Med. 24:316-325 (1983))。従って、これらの断片は、FAB産物又は他の免疫グロブリン発現ライブラリー産物と同様に好ましい。さらに、本発明の抗体は、キメラ、一本鎖、及びヒト化抗体を包含する。

40

【0064】

該抗体は、本発明のヒト抗原結合性抗体断片であり得、Fab、F(ab')及びF(ab')₂、Fd、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)並びにVL又はVHドメインのいずれかを含む断片を包含するが、これらに限定されない。一本鎖抗体を包含する抗原結合性

50

抗体断片は、可変領域を単独で又は下記の全部又は一部分と組み合わせて含み得る：ヒンジ領域、CH1、CH2、及びCH3ドメイン。本発明にはまた、ヒンジ領域、CH1、CH2、及びCH3ドメインと可変領域の組み合わせのいずれかをも含む抗原結合性断片も包含される。本発明の抗体は、鳥類及び哺乳類を包含するいずれの動物起源であってもよい。好ましくは、該抗体は、ヒト、ネズミ(例えばマウス及びラット)、ロバ、シップラビット(ship rabbit)、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、又はニワトリのものである。ここで用いられる「ヒト」抗体とは、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を包含し、さらに、上記又は例えばKucherlapatiらによる米国特許第5,939,598号に記載された通り、ヒト免疫グロブリンライブラリーから又は1以上のヒト免疫グロブリンを導入された内生の免疫グロブリンを発現しない動物から単離された抗体を包含する。

10

【0065】

本発明の抗体は、単特異性、二重特異性、三重特異性又はそれ以上の多特異性を有し得る。多特異性抗体は、本発明のポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であり得、又は本発明のポリペプチド及び異種ポリペプチド若しくは固相物質のような異種エピトープの両方に対して特異的であり得る。例えば、PCT公開WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); 米国特許第 4,474,893号; 第4,714,681号; 第4,925,648号; 第5,573,920号; 第5,601,819号; Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照のこと。

【0066】

本発明の抗体は、該抗体が認識し又は特異的に結合する本発明のポリペプチドのエピトープ又は部位の観点から記載又は特定することができる。エピトープ又はポリペプチド部位は、例えばN末端及びC末端の位置、連続したアミノ酸残基のサイズにより、ここに記載されるように、又は表及び図に示されるように特定することができる。本発明のいずれかのエピトープ又はポリペプチドに特異的に結合する抗体を排除することもできる。従って、本発明は、本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体を包含し、また、それを排除する効果がある。

20

【0067】

本発明の抗体はまた、交差反応性の観点から記載又は特定することができる。本発明のポリペプチドのいかなる他の類似体、相同分子種、又は相同体とも結合しない抗体が包含される。本発明のポリペプチドと(この分野で公知のここに記載される方法によって算出されるように)少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、及び少なくとも50%の同一性を有するポリペプチドを結合する抗体もまた、本発明に包含される。

30

【0068】

ある特定の具体例では、本発明の抗体は、ヒトタンパク質及びそれと対応するエピトープのネズミ、ラット及び/又はウサギ相同物と交差反応する。本発明のポリペプチドと(この分野で公知のここに記載される方法によって算出されるように)95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、及び50%未満の同一性を有するポリペプチドを結合しない抗体もまた、本発明に包含される。ある特定の具体例では、上記した交差反応性は、ここに開示される単一の特異的な抗原性若しくは免疫原性ポリペプチド、又は2, 3, 4, 5、若しくはそれ以上の特異的な抗原性及び/若しくは免疫原性ポリペプチドの組み合わせについてのものである。本発明にはさらに、(ここに記載されるような)ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で本発明のポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを結合する抗体を包含する。本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドへの結合親和性の観点から記載又は特定することもできる。好ましい結合親和性としては、 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M,

40

50

10-13 M, 5×10^{-14} M, 10-14 M, 5×10^{-15} M, 又は10-15 M以下の解離定数又はKdを有するものが挙げられる。

【0069】

本発明はまた、例えばここに記載される免疫測定法などの競合的結合を測定するためのこの分野において公知のいかなる方法によっても測定されるような、本発明のエピトープへの抗体の結合を競合的に阻害する抗体も提供する。好ましい具体例では、該抗体は、該エピトープへの結合を競合的に少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、又は少なくとも50%阻害する。

【0070】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストとして働き得る。例えば、本発明は、本発明のポリペプチドとの受容体/リガンド相互作用を部分的に又は完全に妨害する抗体を包含する。好ましくは、本発明の抗体は、ここに開示される抗原性エピトープ、又はその一部分を拘束する。本発明は、受容体特異的な抗体及びリガンド特異的な抗体の両者を特色とする。本発明はまた、リガンド結合は妨げないが受容体の活性化を妨げる受容体特異的な抗体も特色とする。受容体活性化(すなわちシグナル伝達)は、ここに記載される又はこの分野において公知の他の手法によって測定され得る。例えば、受容体活性化は、例えばここに記載されるようなカルシウム流動を検出することによって測定することができる。ある特定の具体例では、リガンド活性又は受容体活性を、該抗体の非存在下の活性の少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、又は少なくとも50%阻害する抗体が提供される。

【0071】

本発明はまた、リガンド結合と受容体活性化の両者を妨げる受容体特異的な抗体、並びに、受容体-リガンド複合体を認識し、好ましくは非結合性の受容体又は非結合性のリガンドは特異的に認識しない抗体をも特色とする。同様に、本発明は、リガンドに結合し該リガンドの受容体への結合を妨げる中和抗体、及び、リガンドに結合することにより受容体活性化を妨げるが、該リガンドの該受容体への結合は妨げない抗体を包含する。さらに、本発明は、受容体を活性化する抗体を包含する。これらの抗体は受容体アゴニストとして働き得る、すなわち、例えば受容体のダイマー化を誘導することにより、該リガンドに媒介される受容体活性化の生物活性の全部又は一部を増強又は活性化し得る。該抗体は、ここに開示される本発明のペプチドの特異的な生物活性を包含する生物活性に対するアゴニスト、アンタゴニスト又はインバースアゴニストとして特定され得る。上記の抗体アゴニストは、この分野において公知の方法を用いて作製することができる。例えば、PCT公開WO 96/40281; 米国特許第5,811,097号; Deng'et al., Blood 92(6):1981-1988 (1998); Chen et al., Cancer Res. 58(16):3668-3678 (1998); Harrop et al., J. Immunol. 161(4):1786-1794 (1998); Zhu et al., Cancer Res. 58(15):3209-3214 (1998); Yoon et al., J. Immunol. 160(7):3170-3179 (1998); Prat et al., J. Cell. Sci. 11 (Pt2):237-247 (1998); Pitard et al., J. Immunol. Methods 205(2):177-190 (1997); Liautard et al., Cytokine 9(4):233-241 (1997); Carlson et al., J. Biol. Chem. ... 272(17):11295-11301 (1997); Taryman et al., Neuron 14(4):755-762 (1995); Muller et al., Structure 6(9):1153-1167 (1998); Bartunek et al., Cytokine 8(1):14-20 (1996) (引用によりいずれもその内容全てがここに組み入れられるものとする)を参照のこと。

【0072】

本発明の抗体は、例えば、インビトロ及びインビボの診断方法及び治療方法のいずれをも含め、GPR91を精製し、検出し、及び標的とするために用いられ得るが、これらに限定されない。例えば、該抗体には、生体試料中のGPR91レベルを定性的及び定量的に測定するための免疫測定法への用途がある。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) (引用によりその内容全てがここに組み入れられるものとする)を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0073】

他の具体例では、本発明の抗体は単独で又は他の組成物と組み合わせ用いられ得る。抗体は、組換え技術によって異種ポリペプチドのN末端若しくはC末端に融合させてもよく、又はポリペプチド若しくは他の組成物に化学的に結合(共有結合及び非共有結合を包含する)させてもよい。例えば、本発明の抗体は、検出アッセイにおける標識として有用な分子及び異種ポリペプチド、薬剤、放射性ヌクレオチド又は毒素のようなエフェクター分子と遺伝子組み換え技術により融合又は結合させることができる。例えば、PCT公開WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; 米国特許第5,314,995号; 及びEP396,387を参照のこと。

【0074】

本発明の抗体には、修飾された誘導体、すなわち、抗体が抗イディオタイプ応答を生じさせることが共有結合によって妨げられることがないようにして、いずれかのタイプの分子を該抗体に共有結合させることにより修飾された誘導体が包含される。例えば、これに限定されないが、該抗体誘導体としては、例えばグリコシル化、アセチル化、PEG化(pegylation)、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク分解的切断、細胞性リガンド又は他のタンパク質への結合等によって修飾された抗体が挙げられる。これらに限定されないが、特異的な化学分解、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的生合成等を包含する公知の手法により、多くの化学修飾のいずれをも行なうことができる。また、該誘導体は1以上の非古典的アミノ酸(non-classical amino acid)を含み得る。

【0075】

本発明の抗体は、この分野において公知のいずれの好適な方法によっても生成することができる。本発明の抗体はポリクローナル抗体を包含し得る。ポリクローナル抗体を調製する方法は当業者に公知である(Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988)、ここで引用されることによりその内容全てがここに組み入れられるものとする)。例えば1つの具体例では、該方法は、抗体を生産するための公知のプロトコールにおけるGPR91に結合する抗体を生産するための免疫原として、単離されたGPR91のエピトープを有するポリペプチド又はその抗原性断片を用いることを含む。他の具体例では、該方法は、抗原としての組換えGPR91を発現する宿主細胞を用いることを含む。さらなる具体例では、該方法は、GPR91遺伝子を含むDNA発現ベクターを用いて該受容体を抗原として発現させ、抗体を生産することを含む。

【0076】

この分野において周知の方法としては、インビボ免疫化、インビトロ免疫化、及びファージディスプレイ法が挙げられるが、これらに限定されない。例えばSutcliffe et al., supra; Wilson et al., supra, and Bittle et al., *J. Gen. Virol.*, 66:2347-2354 (1985)を参照のこと。インビボ免疫化を用いる場合には、動物はフリーのペプチドで免疫され得るが、抗ペプチド抗体価は、該ペプチドをキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)又は破傷風トキソイドのような高分子担体に結合させることにより高めることができる。例えば、システイン残基を含むペプチドは、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)のようなリンカーを用いて担体に結合させることができ、一方他のペプチドはグルタルアルデヒドのようなより一般的な架橋剤を用いて担体に結合させることができる。

【0077】

抗原に特異的なポリクローナル抗体を含む血清の生産を誘導するために、ウサギ、マウス、ラットなどを包含する種々の宿主動物に免疫原を投与することができるが、これらに限定されない。GPR91の免疫原性ポリペプチドの投与は1回以上の注射が必要とされ得、もし所望であれば、アジュバントを含み得る。本発明のために、GPR91をコードするポリペプチドとして「免疫剤」を定義することができ、断片、変異体、及び/又はその誘導体、さらには異種ポリペプチドとの融合体及びここに記載された他の形態のポリペプチドが

10

20

30

40

50

包含される。

【0078】

典型的には、該免疫剤及び/又はアジュバントは、複数回の皮下又は腹腔内注射により哺乳動物に注入されるが、筋肉内投与及び/又はIV)経由によっても与えることができる。該免疫剤としては、GPR91、GPR91の細胞外ドメイン、GPR91の融合タンパク質、又はそれらの変異体が挙げられる。ポリペプチドの性質(すなわち、パーセント疎水性、パーセント親水性、安定性、正味電荷、等電点など)によっては、免疫される哺乳動物において免疫原性があるということが知られているタンパク質と該免疫剤を結合させることが有用であり得る。そのような結合としては、共有結合が形成されるようになされる、本発明のポリペプチド及び免疫原性タンパク質の両者への誘導體化(derivitizing)活性化学官能基による化学的結合、又は融合タンパク質に基づいた方法若しくは当業者に公知の他の方法を通じた化学的結合のいずれかが挙げられる。そのような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、及びダイズトリプシン阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。宿主の種に応じて、フロインドのアジュバント(完全又は不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニック(pluronic)ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、並びにBCG(カルメット ゲラン杆菌)及びコリネバクテリウムパルブムのような有用であり得るヒトアジュバントを包含する種々のアジュバントを用いて免疫応答を増大させることができるが、これらに限定されない。利用し得るアジュバントのその他の例としては、MPL-TD Mアジュバント(モノホスノリル脂質A、合成トレハロースジコリノミコレート)が挙げられる。免疫化プロトコールは過度の実験をすることなく当業者により選択され得る。

【0079】

本発明の抗体はモノクローナル抗体を包含し得る。モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) 及び米国特許第4,376,110号、Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold spring Harbor Laboratory Press, 2.sup.nd ed. (1988)、並びにHammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N.Y., (1981))により記載されたようなハイブリドーマ法を用いて、又は当業者に公知の他の方法を用いて調製することができる。モノクローナル抗体の生産に利用し得る方法の他の例としては、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030)、及びEBVハイブリドーマ法(Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)が挙げられるが、これらに限定されない。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを包含するいずれの免疫グロブリンクラスのもの又はそのいずれのサブクラスのものでもあり得る。この発明のmAbを生産するハイブリドーマは、インビトロ又はインビボで培養することができる。インビボで高力価のmAbを生産することにより、これを目下の好ましい生産法とすることができる。

【0080】

ハイブリドーマ法では、マウス、ヒト化マウス、ヒト免疫系を具備するマウス、ハムスター、又は他の適当な宿主動物は、典型的には免疫剤で免疫され、該免疫剤と特異的に結合する抗体を生産する又は生産し得るリンパ球を誘起する。あるいは、該リンパ球をインビトロで免疫することもできる。

【0081】

一般に、ヒト由来の細胞が望まれる場合は末梢血リンパ球(「PBL」)が用いられ、又、非ヒト哺乳動物由来のものが望まれる場合は脾臓細胞若しくはリンパ節細胞が用いられる。リンパ球は次いで、例えばポリエチレングリコールのような適切な融合剤を用いて不死化セルラインと融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), pp 59-103)。不死化セルラインは、通常、癌化された哺乳動物細胞であり、特に齧歯動物、ウシ又はヒト由来のミエローマ細胞である。通常、ラット又はマウスのミエローマセルラインが用いられる。ハイ

ブリドーマ細胞は、融合しなかった不死化細胞の増殖又は生存を阻害する1つ以上の物質を好ましく含む、適切な培地中で培養することができる。例えば、親細胞がヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT又はHPRT）酵素を欠損している場合には、ハイブリドーマのための培地は典型的には、HGPRT欠損細胞の増殖を防止する物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む（HAT培地）であろう。

【0082】

好ましい不死化セルラインは、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高レベルの発現を支持し、HAT培地のような培地に感受性であるものである。より好ましい不死化セルラインは、例えば、カリフォルニア州San DiegoのSalk Institute Cell Distribution Center及びバージニア州ManassasのAmerican Type Culture Collectionから入手可能なマウスミエローマラインである。本明細書全体から推測されるとおり、ヒトモノクローナル抗体の生産に関しては、ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマセルラインも開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)。

10

【0083】

次いで、ハイブリドーマ細胞の培養に用いた培地中にGPR91受容体に対するモノクローナル抗体が存在するか否かを分析する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により生産されるモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降又は、例えば放射性免疫測定（RIA）若しくは酵素結合免疫吸着測定（ELISA）のようなインビトロの結合分析により測定する。このような技術は当業者に公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のScatchard解析により測定することができる。

20

【0084】

所望のハイブリドーマ細胞を同定した後、該クローンを限界希釈法によりサブクローンし、常法(Goding、上記)により増殖させることができる。この目的のための好ましい培地としては、例えばダルベッコの修飾イーグル培地及びRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物中で腹水として生体内で増殖させることもできる。

【0085】

サブクローンから分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーのような従来の免疫グロブリンの精製方法により培地又は腹水から単離又は精製することができる。

30

【0086】

当業者であれば、この分野においてはモノクローナル抗体の生産のための様々な方法が存在し、それ故に本発明がハイブリドーマを用いた生産のみに限定されないということを示認するであろう。例えば、モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567に記載されたような組換えDNA法によって生産することができる。この文脈において、「モノクローナル抗体」という語は、単一の原核生物、ファージ、又は真核生物クローンから誘導される抗体を意味する。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来法を用いて(例えばマウス抗体の重鎖及び軽鎖、又はヒト、ヒト化、若しくはその他に由来するそのような鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)容易に単離及び配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一旦単離すれば、DNAは、発現ベクター中にサブクローニングすることができ、次いで該発現ベクターはサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又はその他の免疫グロブリンタンパク質を生産しないミエローマ細胞のような宿主細胞中に形質転換され、該組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体が合成される。該DNAはまた、例えば、相同マウス配列に代えてヒトの重鎖及び軽鎖の定常領域をコードする配列で置換することにより(米国特許第4,816,567号; Morrison et al、

40

50

上記)、又は非免疫グロブリンポリペプチドをコードする配列の全て又は一部を該免疫グロブリンコード配列に共有結合することにより修飾することもできる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常領域を置換し、又は本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変領域を置換することで、キメラ二価抗体を創製することができる。

【0087】

該抗体は一価抗体であり得る。一価抗体の調製方法は、この分野で周知である。例えば、1つの方法では、免疫グロブリン軽鎖及び修飾重鎖の組換え発現が含まれる。重鎖は一般的に、Fc領域内のいかなる部位においても切断して重鎖の架橋を防止することができる。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基に置換するか又は削除することにより、架橋を防止することができる。

【0088】

インビトロの方法も一価抗体の調製に適している。この分野において公知のルーチンな技術を用いることにより、抗体を消化してその断片、特にFab断片を生産することができる。

【0089】

例えば、本発明の抗体はまた、この分野において公知の種々のファージディスプレイ法を用いて生成することもできる。ファージディスプレイ法では、機能的な抗体ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面上に該ドメインが表出される。特定の具体例の一つでは、そのようなファージはレパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えばヒト、ネズミ)から発現される抗原結合ドメインを表出させるために利用することができる。関心が持たれる抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、例えば標識抗原又は固体表面若しくはビーズに結合若しくは捕捉された抗原を用いて、抗原と共に選抜又は同定することができる。これらの方法で用いられるファージは、典型的には、ファージの遺伝子III又は遺伝子VIIIタンパク質のいずれかと組換え技術により融合されたFab、Fv又はジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを有するファージから発現される、fd及びM13結合ドメインを含む線維状ファージである。本発明の抗体を作製するために用いることができるファージディスプレイ法の例としては、以下において開示されたものが挙げられる。Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 187 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); PCT出願PCT/GB91/01134; PCT公開WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 並びに米国特許第5,698,426号; 第5,223,409号; 第5,403,484号; 第5,580,717号; 第5,427,908号; 第5,750,753号; 第5,821,047号; 第5,571,698号; 第5,427,908号; 第5,516,637号; 第5,780,225号; 第5,658,727号; 第5,733,743号及び第5,969,108号; ここでの引用によりこれらの内容のすべてがここに組み入れられるものとする。

【0090】

上記の引用文献に記載されているように、ファージの選抜後、該ファージ由来の抗体コード領域を単離することができ、ヒト抗体又はその他のいかなる所望の抗原結合性断片をも包含する抗体全体を生成するために該抗体コード領域を使用することができ、例えば下記に詳述するように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌を包含するいかなる所望の宿主中においても該コード領域を発現させることができる。例えば、組換え技術によりFab、Fab'及びF(ab')₂断片を生産する技術は、PCT公開WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); 及びSawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995); 及びBetter et al., *Science* 240:1041-1043 (1988) (前記文献は引用によりその内容のすべてが組み入れられるものとする)において開示されるような、この分野で公知の方法を用いて利用することもできる。一本鎖Fv及び抗体を生産するために用いることができる技術の例としては、米国特許第4,946,778号及び第5,258,498号; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); 並びにSkerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988)に記載されるものが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0091】

ヒトにおける抗体のインビボの用途及びインビトロ検出アッセイを包含するいくつかの用途のためには、キメラ、ヒト化、又はヒト抗体を用いることが好ましくあり得る。キメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体から誘導された可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有する抗体のような、抗体の異なる部位が異なる動物種から誘導される分子である。キメラ抗体を生産するための方法はこの分野において公知である。Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi et al., *BioTechniques* 4:214 (1986); Gillies et al., (1989) *J. Immunol. Methods* 125:191-202; 米国特許第5,807,715号; 第4,816,567号; 及び第4,816,397号を参照のこと。なお、これらの内容の全ては引用によりここに組み入れられるものとする。ヒト化抗体とは、非ヒト種由来の1以上の相補性決定領域(CDR)と、ヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを有し、所望の抗原と結合する、非ヒト種抗体由来の抗体分子である。しばしば、抗原の結合を改変し、好ましくは向上させるため、ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基はCDRドナー抗体由来の対応する残基と置換される。これらのフレームワーク置換は、この分野で周知の方法によって、例えば、CDRとフレームワーク残基との相互作用のモデリングにより抗原の結合に重要なフレームワーク残基を同定し、配列比較により特定の部位において通常とは異なるフレームワーク残基を同定することによって同定される(例えばQueen et al., 米国特許第5,585,089号; Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988)を参照のこと。引用によりこれらの内容の全てがここに組み入れられるものとする)。抗体は、例えば、CDR移植(EP239,400; PCT公開W0 91/09967; 米国特許第5,225,539号; 第5,530,101号; 及び第5,585,089号)、ベニヤリング(veneering)又は表面再建(resurfacing) (EP592,106; EP519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., *PNAS* 91:969-973 (1994))、及びチェインシャフリング(米国特許第5,565,332号)を包含するこの分野で公知の種々の技術を用いてヒト化することができる。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト由来の1以上のアミノ酸を有する。これら非ヒトアミノ酸残基はしばしば「インポート」残基と呼ばれ、典型的には「インポート」可変領域由来である。ヒト化は、基本的にはWinter及び共同実験者(Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988))の方法に倣って、げっ歯類のCDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列と置換することにより行なうことができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、無損のヒト可変領域よりも実質的に少ない部分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されているキメラ抗体である(米国特許第4,816,567号)。実際には、ヒト化抗体は典型的には、いくつかのCDR残基及びいくつかの置換可能なFR残基がげっ歯類抗体中の類似の部位由来の残基で置換されたヒト抗体である。

【0092】

一般に、ヒト化抗体は少なくとも1つ、典型的には2つの可変領域の実質的に全てを包含し、その中において全て又は実質的に全てのCDR領域は非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に相当し、全て又は実質的に全てのFR領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域となっている。ヒト化抗体は好ましくは、免疫グロブリン定常領域(Fc)の、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部分も含み得る(Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)1 and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992))。

【0093】

ヒト患者の治療上の処置のためには完全ヒト抗体が特に望ましい。ヒト抗体は、上記のファージディスプレイ法を包含するこの分野で公知の種々の方法により、ヒト免疫グロブリン配列から誘導された抗体ライブラリーを用いて作製することができる。米国特許第4,444,887号及び第4,716,111号; 並びにPCT公開W0 98/46645, W0 98/50433, W0 98/24893, W0 98/16654, W0 96/34096, W0 96/33735, 及びW0 91/10741も参照のこと; 引用によりこれらの内容の全てがここに組み入れられるものとする。coleら及びBoerderらの手法もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる(cole et al., *Monoclonal*

Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Riss, (1985); and Boerder et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95, (1991))。

【0094】

ヒト抗体はまた、機能的な内生の免疫グロブリンを発現することはできないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子が発現することができる遺伝子組み換えマウスを用いて生産することもできる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は、無作為に又は相同組換えによりマウス胚性幹細胞中に導入することができる。あるいは、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域、及び多様性のある領域(diversity region)をマウス胚性幹細胞中に導入することもできる。相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別個独立に又は導入と同時に、マウス重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子の機能を失わせることができる。特に、JH領域のホモ接合性欠失により、内生抗体の生産が妨げられる。修飾胚性幹細胞は、増幅及びマイクロインジェクションされて胚盤胞となり、キメラマウスを生み出す。キメラマウスは次いで繁殖され、ヒト抗体を発現するホモ接合の子孫が生産される。遺伝子組み換えマウスは、選抜された抗原で、例えば本発明のポリペプチドの全部又は一部分で、標準的な方法により免疫される。該抗原に対するモノクローナル抗体は、従来ハイブリドーマ技術を用いて、免疫された遺伝子組み換えマウスから得られる。遺伝子組み換えマウスが保有するヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再構成され、次いでクラススイッチ及び体細胞性変異を経る。従って、このような技術を用いれば、治療上有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体を生産することができる。ヒト抗体の生産のためのこの技術の概要に関しては、Lonberg and Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)を参照のこと。ヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体の生産のためのこの技術並びにこのような抗体を生産するためのプロトコールの詳細な考察に関しては、PCT公開WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; EP0 598 877; 米国特許第5,413,923号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; 第5,569,825号; 第5,661,016号; 第5,545,806号; 第5,814,318号; 第5,885,793号; 第5,916,771号; 及び第5,939,598号を参照のこと。なお、引用によりこれらの内容の全てがここに組み入れられるものとする。さらに、Abgenix, Inc. (カリフォルニア州Freemont), Genpharm (カリフォルニア州San Jose), 及びMedarex, Inc. (ニュージャージー州Princeton)のような企業は、上記の技術と類似した技術を用いて、選抜された抗原に対するヒト抗体を提供することができる。

10

20

30

【0095】

同様に、例えば内生の免疫グロブリン遺伝子が部分的に又は完全に不活化されているマウスのような遺伝子組み換え動物中にヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することによって、ヒト抗体を作製することができる。抗原投与により、ヒト抗体の生産が見られるようになる。この抗体は、遺伝子再構成、アセンブリ、及び抗体レパートリーの創出を包含する全ての点においてヒトのものと類似している。この方法は、例えば米国特許第5,545,807号; 第5,545,806号; 第5,569,825号; 第5,625,126号; 第5,633,425号; 第5,661,106号, 及び下記の科学論文: Marks et al., *Biotechnol.*, 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.*, 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.*, 14:826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995)。

40

【0096】

選抜されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「guided selection」と呼ばれる技術を用いて生成することができる。この方法では、選抜された例えばマウス抗体のような非ヒトモノクローナル抗体は、同一のエピトープを認識する完全ヒト抗体の選抜をガイドするために用いられる(Jespersen et al., *Bio/technology* 12:899-903 (1988))。

【0097】

さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体は、当業者に周知の技術を用いて、本発明のポリペプチドを「模倣」する抗イディオタイプ抗体を生成するために利用することもできる(例えばGreenspan & Bona, *FASEB J.* 7(5):437-444; (1989) and Nissinoff, *J. Imm*

50

unol. 147(8):2429-2438 (1991)を参照のこと)。例えば、ポリペプチドに結合しポリペプチドの多量体化及び/又は本発明のポリペプチドのリガンドへの結合を競合的に阻害する抗体は、ポリペプチドの多量体化及び/又は結合ドメインを「模倣」し、その結果、ポリペプチド及び/又はそのリガンドに結合してこれらを中和する抗イディオタイプ抗体を生成するために用いることができる。このような中和抗イディオタイプ抗体又はこのような抗イディオタイプ抗体のFab断片は、ポリペプチドリガンドを中和する治療措置において用いることができる。例えば、このような抗イディオタイプ抗体は、本発明のポリペプチドを拘束し及び/又はそのリガンド/受容体を拘束することによりその生物活性を阻害するために用いることができる。

【0098】

本発明の抗体は二重特異性抗体であり得る。二重特異性抗体とは、少なくとも2つの相異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナルの、好ましくはヒト又はヒト化抗体である。本発明では、結合特異性の1つは本発明のポリペプチドに対するものであり得、もう1つはいかなる他の抗原に対するものであってもよく、好ましくは細胞表面タンパク質、受容体、受容体サブユニット、組織特異的抗原、ウイルス誘導タンパク質、ウイルスにコードされたエンベロープタンパク質、細菌誘導タンパク質、又は細菌表面タンパク質等に対するものである。

【0099】

二重特異性抗体の作製方法はこの分野において公知である。慣例上、二重特異性抗体の組換え生産は、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖ペアの共発現に基づいており、その2つの重鎖は異なる特異性を有する(Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の無作為な組み合わせの故に、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の相異なる抗体分子を含み得る混合物を生産するが、妥当な二重特異的構造を有するのはそのうちのたった1つである。妥当な分子の精製は通常アフィニティークロマトグラフィー工程により行なわれる。同様な手法が1993年5月13日に公開されたWO 93/08829及びTraunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)中に開示されている。

【0100】

所望の結合特異性を有する抗体可変領域(抗体 抗原結合部位)は、免疫グロブリン定常領域配列に融合することができる。好ましくは、ヒンジ、CH2、及びCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常領域と融合される。少なくとも1つの融合体中に、軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が存在することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体、及び所望であれば免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別個の発現ベクター中に挿入され、適した宿主生物中に同時形質転換される。二重特異性抗体生成のより詳細に関しては、例えばSuresh et al., Meth. In Enzym., 121:210 (1986)を参照のこと。

【0101】

本発明ではヘテロ結合抗体も想定されている。ヘテロ結合抗体は共有結合した2つの抗体から成る。例えば、そのような抗体によって免疫系細胞に不所望の細胞を狙わせることや(米国特許第4,676,980号)、そのような抗体をHIV感染の治療に用いること((WO 91/00360; WO 92/20373; 及びEP03089)が提唱されている。架橋剤が関与する方法を包含する合成タンパク質化学における公知の方法を用いて、該抗体をインビトロで調製できるということが考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を用いるか又はチオエステル結合を形成させることにより、免疫毒素を構築することができる。この目的に適した試薬の例としては、イミノチオレート、メチル 4メルカプトブチルイミデート及び例えば米国特許第4,676,980号に記載されたものが挙げられる。

【0102】

抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明はさらに、本発明の抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド及びその断片を提供する。本発明はまた、好ましくは抗体をコードするポリペプチドであ

10

20

30

40

50

って、GPR91に特異的に結合する抗体、好ましくは配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する抗体をコードするポリペプチドに対し、例えば上記定義のようにストリンジェントな又はストリンジェンシーの低いハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドをも包含する。

【0103】

この分野において公知のいかなる方法によっても、該ポリヌクレオチドを得ることができ、また該ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定することができる。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知であれば、該抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学合成されたオリゴヌクレオチド(例えばKutmeier et al., *BioTechniques* 17:242 (1994)に記載の通り)から構築することができる。簡潔には、該方法は、抗体をコードする配列の一部を含む重複したオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニールング及びライゲーション、並びにライゲーションされたオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅を含む。

10

【0104】

あるいは、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適した供給源由来の核酸から生成することができる。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは利用できないが該抗体分子の配列は公知であるという場合には、免疫グロブリンをコードする核酸を化学合成することができるし、あるいは、例えば該抗体をコードするcDNAライブラリー由来のcDNAクローンのように、該配列の3'末及び5'末にハイブリダイズ可能な合成プライマーを用いたPCR増幅により、又は、特定の遺伝子配列に対し特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いてクローニングし同定することにより、適した供給源(例えば抗体cDNAライブラリー、あるいは、本発明の抗体を発現することで選抜されたハイブリドーマ細胞のような、該抗体を発現するいずれかの組織若しくは細胞から生成されたcDNAライブラリー、又はそのような組織若しくは細胞から単離された好ましくはポリA+ RNAのような核酸)から得ることができる。PCRにより生成された増幅核酸は、次いで、この分野において周知のいずれかの方法を用いて、複製可能なクローニングベクター中にクローニングされ得る。

20

【0105】

該抗体のヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列を一旦決定すれば、例えば組換えDNA技術、部位特異的変異誘発、PCR等のこの分野で周知のヌクレオチド配列の操作方法を用いて、該抗体の該ヌクレオチド配列を操作し、例えばアミノ酸置換、欠失、及び/又は挿入を創出して異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成することができる(例えばSambrook et al., 1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 及びAusubel et al., eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NYに記載された手法を参照のこと。これらの内容の全ては引用によりここに組み入れられるものとする)。

30

【0106】

ある特定の具体例では、重鎖及び/又は軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、例えば他の重鎖及び軽鎖可変領域の公知のアミノ酸配列と比較して配列超可変性の領域を決定するような、この分野で周知の方法によって詳細に調べられ、相補性決定領域(CDR)の配列が決定され得る。ルーチンな組換えDNA技術を用いて、1以上のCDRをフレームワーク領域内に挿入することができ、例えば上記したようにヒトフレームワーク領域中に挿入して非ヒト抗体をヒト化することができる。フレームワーク領域は天然に起こり得る又はコンセンサスなフレームワーク領域であってよく、好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る(ヒトフレームワーク領域の一覧については例えばChothia et al., *J. Mol. Biol.* 278: 457-479 (1998)を参照のこと)。好ましくは、フレームワーク領域とCDRとの組み合わせによって生成されるポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドを特異的に拘束する抗体をコードする。好ましくは、上述したように、フレームワーク領域内に1以上のアミノ酸置換を作製することができ、好ましくは、該アミノ酸置換は抗体のその抗原に対する結合を改善する。さらに、このような方法は、鎖内ジスルフィド結合に關与する1以上の可変領域システイン残基のアミノ酸置換又は欠失を作製して、1以上の鎖内ジスルフィド結合を欠

40

50

如した抗体分子を生成するために用いることができる。ポリペプチドのその他の改変が本発明及びこの分野の技術の範囲内に包含される。

【0107】

さらに、適切な抗原特異性を有するマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物活性を有するヒト抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の生産のために発達した技術(Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984); Takeda et al., Nature 314:452-454 (1985))を用いることができる。上記した通り、キメラ抗体とは、マウスmAbから誘導された可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有する抗体のような、異なる動物種から異なる部位が誘導された分子であり、例えばヒト化抗体が挙げられる。

10

【0108】

あるいは、一本鎖抗体の生産のために記載された技術(米国特許第4,946,778号; Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); 及びWard et al., Nature 334:544-54 (1989))を一本鎖抗体の生産に応用することができる。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を通してFv領域の重鎖及び軽鎖断片を連結し、一本鎖ポリペプチドとすることにより形成される。大腸菌中で機能的なFv断片をアセンブリするための技術も用いることができる(Skerra et al., Science 242:1038-1041 (1988))。

【0109】

ベクター

20

他の局面において、本発明は、本発明の抗GPR91抗体をコードするヌクレオチド配列を含むベクター及びそのようなベクターを含む宿主細胞を提供する。細菌の系では、発現される抗体分子の使用目的に応じて、多くの発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、抗体分子医薬組成物の生成のために大量のタンパク質を生産しなければならない場合には、容易に精製される融合タンパク質産物を高レベルに発現させるベクターが望ましい。そのようなベクターとしては、融合タンパク質を生産できるように抗体コード配列をLacZコード領域とインフレームで個別にベクター中にライゲーションすることができる大腸菌発現ベクター-pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2:1791 (1983)); pIN vectors (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); 等のようなものが挙げられるが、これらに限定されない。また、pGEXベクターを用いて外来のポリペプチドをグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)の融合タンパク質として発現することもできる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズのマトリックスに吸着及び結合させ、次いでフリーのグルタチオン存在下で溶出を行なうことにより、溶解細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターはトロンピン又はXa因子プロテアーゼ切断部位を有するように設計されており、クローニングされた標的遺伝子産物をGST部から切り離すことができるようになっている。

30

【0110】

昆虫の系では、外来遺伝子の発現にはベクターとしてオートグラフィア核多角体病ウイルス(AcNPV)が用いられる。該ウイルスはスポドプテラ・フルギベルダ(Spodoptera frugiperda)細胞中で増殖する。抗体コード配列は、ウイルスの必須ではない領域(例えばポリヘドリン遺伝子)中に個々にクローニングし、AcNPVプロモーター(例えばポリヘドリンプロモーター)の制御下に配置することができる。

40

【0111】

哺乳動物宿主細胞では、多くのウイルスベースの発現系が利用できる。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合には、目的の抗体コード配列は、例えば後期プロモーター及び三分節リーダー配列(tripartite leader sequence)のようなアデノウイルス転写/翻訳制御複合体にライゲーションされ得る。このキメラ遺伝子は次いで、インビトロ又はインビボの組換えによりアデノウイルスゲノム中に挿入され得る。ウイルスゲノムの必須ではない領域(例えばE1又はE3領域)中への挿入により、感染宿主中で生存可能で抗

50

体分子を発現できる組換えウイルスが生じる(Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 81:355-359 (1984)を参照のこと)。挿入された抗体コード配列の有効な翻訳のために、特異的な開始シグナルも必要となり得る。これらのシグナルには、ATG開始コドン及び隣接配列(adjacent sequence)が含まれる。さらに、全挿入断片の翻訳を確実にするため、開始コドンは所望のコード配列と読み枠を合わせなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、種々の天然物及び合成物に由来したものであり得る。適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター等を含ませることにより、発現効率を高めることができる(Bittner et al., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)を参照のこと)。

【0112】

持続的且つ高収量の組換えタンパク質の生産のためには、安定した発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定して発現するセルラインが作り出され得る。ウイルス複製開始点を含む発現ベクターを用いるよりもむしろ、適切な発現調節領域(例えばプロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)及び選択マーカーにより制御されるDNAで宿主細胞が形質転換される。外来DNAの導入後、改変された細胞は強化培地中で1 - 2日間増殖させてもよく、次いで選択培地に切り替える。組換えプラスミド中の選択マーカーにより選択に対する抵抗性が付与され、該プラスミドを細胞の染色体中に安定的に取り込ませて遺伝子座を形成させることができるようになる。次いで該細胞を純化し、セルラインへと展開させる。この方法は、抗体分子を発現するセルラインを作り出すために有利に用いることができる。

【0113】

ヘルペス単純ウイルスチミジンキナーゼ(Wigler et al., Cell 11:223 (1977))、ヒポキサンチンデアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992))、及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy et al., Cell 22:817 (1980))遺伝子をそれぞれtk-, hgpvt-又は apvt-細胞中で用いることができるように、多くの選択系を用いることができるが、これらに限定されない。さらに、以下の遺伝子については、選抜のために代謝拮抗物質抵抗性を利用することができる:メトトレキセートへの抵抗性を付与するdhfr(Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); ミコフェノール酸への抵抗性を付与するgpt(Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); アミノグリコシドG-418への抵抗性を付与するneo (Clinical Pharmacology 12:488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); 及び Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215); 及びハイグロマイシンへの抵抗性を付与するhygro (Santerre et al., Gene 30:147 (1984))。組かDNA技術分野で従来知られている方法は、所望の組換えクロノンの選択にルーチンに適用することができる。そのような方法は、例えばAusubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Krieglger, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981)に記載されている。これらの内容の全ては引用によりここに組み入れられるものとする。

【0114】

抗体分子の発現レベルはベクターの増幅により上昇し得る(概説はBebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)を参照のこと)。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能である場合には、宿主細胞培養物中に存在する阻害剤のレベルの上昇により、マーカー遺伝子のコピー数が増大するだろう。増幅される領域は抗体遺伝子と関連があるため、抗体の生産もまた増大

10

20

30

40

50

するだろう(Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983))。

【0115】

重鎖から誘導されたポリペプチドをコードする第一のベクターと、軽鎖から誘導されたポリペプチドをコードする第二のベクターの、本発明の2つの発現ベクターで宿主細胞を共トランスフェクトすることができる。該2つのベクターには同一の選択マーカータンパク質を含ませてもよく、そうすることで重鎖及び軽鎖ポリペプチドを等量発現させることが可能になる。あるいは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドをコードし両者を発現し得る単一のベクターを用いてもよい。そのような場合には、有毒なフリーの重鎖が過剰にならないように、重鎖の前に軽鎖を配置すべきである(Proudfoot, Nature 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980))。重鎖及び軽鎖のコード配列は、cDNA又はゲノムDNAを含み得る。 10

【0116】

さらに、天然にはGPR91とは関連のない適切なシグナルペプチドをコードする配列を発現ベクター中に組み込むことができる。例えば、シグナルペプチド(分泌リーダー)のヌクレオチド配列をポリペプチド配列にインフレームで融合し、抗GPR91抗体が初めにシグナルペプチドを含む融合タンパク質として翻訳されるようにすることができる。目的の宿主細胞中で機能するシグナルペプチドは、適正なポリペプチドの細胞外への分泌を促進する。該シグナルペプチドは、細胞からの分泌の際にペプチドから切断され得る。

【0117】

宿主細胞

20

GPR91及び抗GPR91ポリペプチドの発現に適した宿主細胞としては、原核生物、酵母、及び他の真核細胞が挙げられる。本発明の宿主細胞として有用な原核生物としては、大腸菌又は桿菌のようなグラム陰性又は陽性生物が挙げられる。原核宿主細胞においては、原核宿主細胞中での組換えポリペプチドの発現を促進するため、ポリペプチドにN末メチオニン残基を含ませることができる。N末のMetは発現された組換えGPR91受容体ポリペプチドから切断することができる。組換え原核宿主細胞発現ベクターに通常用いられるプロモーター配列としては、ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系が挙げられる。

【0118】

本発明の宿主細胞として有用な酵母としては、サッカロミセス(Saccharomyces)属、ピチア(Pichia)属、K. 放線菌類及びクルイベロミセス(Kluyveromyces)属が挙げられる。酵母ベクターは、しばしば2 µ酵母プラスミド由来の複製開始点配列、自己複製配列(ARS)、プロモーター領域、ポリアデニル化配列、転写終結配列、及び選択マーカータンパク質を含むだろう。酵母ベクターに適したプロモーター配列としては、とりわけ、メタロチオネイン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255:2073, (1980))、又は他の糖分解酵素のプロモーターが挙げられる。酵母及び酵母形質転換プロトコールに適したその他のプロモーター及びベクターは、この分野において周知である。 30

【0119】

この分野で周知の哺乳動物又は昆虫宿主細胞培養系もまた組換えGPR91の発現に利用することができる。例えば昆虫細胞で異種タンパク質を生産するためのバキュロウイルス系(Luckow and Summers, Bio/Technology 6:47 (1988))、又は哺乳動物での発現のためのNS0若しくはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を用いることができる。哺乳動物宿主細胞発現ベクターのための転写及び翻訳制御配列は、ウイルスゲノムから切り取ることができる。一般的に用いられるプロモーター配列及びエンハンサー配列は、ポリオーマウイルス、アデノウイルス2、シミアンウイルス40(SV40)、及びヒトサイトメガロウイルスから誘導される。 40

【0120】

さらに、宿主細胞系統は、挿入配列の発現を変調する又は所望の特異性によって遺伝子産物を修飾及びプロセッシングするものを選択できる。そのようなタンパク質産物の修飾(例えばグリコシル化)及びプロセッシング(例えば切断)は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。種々の宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産物の転写後のプロセッシング及び 50

修飾に関する特徴及び特異的機構を有する。発現される外来タンパク質の正確な修飾及びプロセッシングを確実にするために、適切なセルライン又は宿主系を選択することができる。この目的を達するために、遺伝子産物の初期の転写、グリコシル化、及びリン酸化の適正なプロセッシングのための細胞の機構を有する真核宿主細胞を用いることができる。そのような哺乳動物宿主細胞としては、CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38、特に、例えばBT483, Hs578T, HTB2, BT20及びT47Dのような乳癌セルライン、並びに例えばCRL7030及びHs578Bstのような正常な乳腺セルラインが挙げられるが、これらに限定されない。

【0121】

抗体の生産方法

本発明の抗体は、この分野で知られた抗体の生成又は合成のためのいかなる方法によっても生産することができ、特に、化学合成又は組換え発現技術によって生産することができる。

【0122】

本発明の抗体、又はその断片、誘導体若しくは類似体(例えば本発明の抗体の重鎖若しくは軽鎖又は本発明の一本鎖抗体)の組換え発現には、該抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築が含まれる。本発明の抗体分子又は抗体の重鎖若しくは軽鎖、あるいはその一部分(好ましくは重鎖又は軽鎖可変領域を含む)が一旦得られれば、この分野で周知の手法を用いた組換えDNA技術によって抗体分子を生産するためのベクターを生産することができる。従って、抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを発現させることによりタンパク質を調製する方法がここに記載される。当業者に周知の方法を用いて、抗体をコードする配列並びに適した転写及び翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、インピトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインピボ遺伝的組換えが挙げられる。従って、本発明は、本発明の抗体分子、又はその重鎖若しくは軽鎖、あるいは重鎖若しくは軽鎖可変領域をコードし、プロモーターと動作的に連結したヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。そのようなベクターは、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含んでもよく(例えばPCT公開WO 86/05807; PCT公開WO 89/01036; 及び米国特許第5,122,464号を参照のこと)、完全な重鎖及び軽鎖を発現するため、抗体の可変領域をそのようなベクター中にクローン化することができる。

【0123】

発現ベクターは従来法により宿主細胞に導入され、トランスフェクトされた細胞は次いで従来法により培養されて、本発明の抗体が生産される。従って、本発明は、本発明の抗体、又はその重鎖若しくは軽鎖、あるいは本発明の一本鎖抗体をコードし、異種プロモーターに動作的に連結したポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二本鎖抗体の発現のための好ましい具体例では、下記に詳述するように、完全な免疫グロブリン分子を発現するため、重鎖及び軽鎖の両者をコードするベクターを宿主細胞中で共発現させることができる。

【0124】

種々の宿主発現ベクター系を利用して本発明の抗体分子を発現させることができる。そのような宿主発現系は、目的のコード配列を生産し引き続いて精製できるようにするための媒体のみならず、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換又はトランスフェクトされた場合に原位置で本発明の抗体分子を発現し得る細胞を意味する。これらのものとしては、抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA若しくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば大腸菌、枯草菌)のような微生物; 抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えばサッカロミセス、ピチア); 抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えばバキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系; 抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えばカリフラワーモザイクウイルスCaMV; タバコモザイクウイルスTMV)を感染させた若しくは組換えプラスミド発現ベクター(例えばTiプラスミド)で形質転換した植物細胞

10

20

30

40

50

系；又は哺乳動物細胞のゲノムから（例えばメタロチオネインプロモーター）若しくは哺乳動物ウイルスから（例えばアデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）誘導されたプロモーターを含む組換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系（例えばCOS, CHO, BHK, 293, 3T3細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。組換え抗体分子の発現には、好ましくは大腸菌などの細菌細胞が用いられ、特に組換え抗体分子全体を発現する場合には真核細胞がより好ましく用いられる。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要な中間の初期遺伝子プロモーター要素のようなベクターと組み合わせた、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）のような哺乳動物細胞は、有効な抗体の発現システムである（Foecking et al., *Gene* 45:101 (1986); Cockett et al., *Bio/Technology* 8:2 (1990)）。

10

【0125】

一旦本発明の抗体分子が動物により生産され、化学合成され、又は組換えにより発現されれば、抗体分子は、例えばクロマトグラフィー（例えばイオン交換、アフィニティー、特にタンパク質Aの後の特異的抗原に対するアフィニティー、及びサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心、溶解度による分画(differential solubility)のようなこの分野で公知のいかなる免疫グロブリン分子精製方法によっても、又はいかなる他の標準的なタンパク質精製技術によっても精製することができる。さらに、本発明の抗体又はその断片は、精製を容易にするため、ここに記載された又はこの分野で公知のその他の異種ポリペプチド配列と融合させることができる。

【0126】

本発明は、融合タンパク質を精製するために本発明のポリペプチド（又はその一部、好ましくは該ポリペプチドのうち少なくとも10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 若しくは100アミノ酸）と組換え技術により融合させ又は化学的に結合（共有結合及び非共有結合の両者を包含する）させた抗体を包含する。該融合は必ずしも直接である必要はなく、リンカー配列を介して生じたものであってもよい。該抗体は、本発明のポリペプチド（又はその一部、好ましくは該ポリペプチドのうち少なくとも10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 若しくは100アミノ酸）以外の抗原に特異的であり得る。例えば、本発明のポリペプチドを特定の細胞表面受容体に特異的な抗体と融合又は結合させることにより、抗体を用いてインビトロ又はインビボのいずれかで本発明のポリペプチドに特定の細胞型を狙わせることができる。本発明のポリペプチドに融合又は結合させた抗体はまた、この分野

20

30

【0127】

本発明はさらに、可変領域以外の抗体ドメインに融合させ又は結合させた本発明のポリペプチドを含む組成物を包含する。例えば、本発明のポリペプチドは、抗体Fc領域又はその一部分に融合又は結合させることができる。本発明のポリペプチドに融合される抗体部分は、定常領域、ヒンジ領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメイン、又はドメイン全体若しくはその一部のいかなる組み合わせをも含み得る。該ポリペプチドはまた、上記抗体部分と融合又は結合され多量体を形成することもできる。例えば、本発明のポリペプチドと融合したFc部分は、Fc部分間のジスルフィド結合を介して二量体を形成することができる。高次多量体形態は、IgA及びIgMの一部と該ポリペプチドを融合させることにより作製できる。本発明のポリペプチドを抗体の構成部分に融合又は結合させる方法はこの分野において公知である。例えば、米国特許第5,336,603号；第5,622,929号；第5,359,046号；第5,349,053号；第5,447,851号；第5,112,946号；EP 307,434；EP 367,166；PCT公開WO 96/04388；WO 91/06570；Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. US A* 88:10535-10539 (1991)；Zheng et al., *J. Immunol.* 154:5590-5600 (1995)；及び Vill et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11337-11341(1992)を参照のこと（前記文献は

40

50

引用によりその内容の全てが組み入れられるものとする)。

【0128】

上述の通り、配列番号2のポリペプチド、ポリペプチド断片、又は変異体に相当するポリペプチドを上記の抗体構成部分に融合又は結合させて、該ポリペプチドのインピボでの半減期を増大させることができ、又はこの分野で公知の方法を用いた免疫測定法に用いることができる。さらに、配列番号2に相当するポリペプチドを上記抗体部分に融合又は結合させると精製が容易になり得る。報告された一例では、ヒトCD4ポリペプチドと、哺乳動物の免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖定常領域の種々のドメインとの第一の2つのドメインから成るキメラタンパク質が記載されている。(EP 394,827; Traunecker et al., *Nature* 331:84-86 (1988)。ジスルフィド結合で連結した二量体構造(IgGに起因)を有する抗体と融合又は結合した本発明のポリペプチドはまた、単独の単量体分泌タンパク質又はタンパク質断片よりも効果的に他の分子を結合し中和することができる。(Fountoulakis et al., *J. Biochem.* 270:3958-3964 (1995))。多くの場合、融合タンパク質のFc部は治療及び診断に役立ち、従ってその結果、例えば薬物速度論的特性を向上させることができる。(EP A 232,262)。あるいは、該融合タンパク質が発現、検出、及び精製された後にFc部を削除することが望ましい場合もある。例えば、該融合タンパク質が免疫化のための抗原として用いられる場合には、Fc部分は治療及び診断の妨げとなり得る。創薬においては、例えば、ハイスループットスクリーニングアッセイのためにhIL-5のようなヒトタンパク質がFc部分に融合され、hIL-5のアンタゴニストが同定される。(Bennett et al., *J. Molecular Recognition* 8:52-58 (1995); Johanson et al., *J. Biol. Chem.*... 270:9459-9471 (1995)を参照のこと。

【0129】

さらに、本発明の抗体又はその断片は、精製を容易にするためのペプチドのようなマーカ配列と融合させることができる。好ましい具体例では、該マーカアミノ酸配列は、数ある市販品の中でもとりわけ、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)中で提供されるタグのような6-ヒスチジンペプチドである。Gentz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824 (1989)に記載されているように、例えば、6-ヒスチジンは融合タンパク質の精製に都合のよいものである。精製に役立つその他のペプチドタグとしては、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質から誘導されたエピトープに対応する「HA」タグ(Wilson et al., *Cell* 37:767 (1984))及び「flag」タグが挙げられるが、これらに限定されない。

【0130】

本発明はさらに、診断又は治療薬に結合した抗体又はその断片を包含する。該抗体は、例えば、腫瘍の発生又は進行を監視するため、例えば与えられた治療計画の効果を測定するための臨床試験手順の一部として診断に用いることができる。該抗体を検出可能な物質に結合させることにより、検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々のポジトロン放出断層撮影を用いるポジトロン放出金属、及び非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。該検出可能な物質は、この分野で公知の技術を用いて、抗体(若しくはその断片)に直接、又は中間体(例えばこの分野において公知のリンカーなど)を介して間接的に連結又は結合させることができる。例えば、本発明に従って診断に用いるために抗体に結合させることができる金属イオンについては米国特許第4,741,900号を参照のこと。適した酵素の例としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペー タ ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適した補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが挙げられる；適した蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル又はフィコエリトリンが挙げられる；発光物質の例としてはルミノールが挙げられる；生物発光物質の例としてはルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられる；並びに適した放射性物質の例としては¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In又は⁹⁹Tcが挙げられ

る。

【0131】

さらに、抗体又はその断片は、例えば細胞増殖抑制剤又は殺細胞剤(cytocidal agent)のような細胞毒素、治療剤又は例えば²¹³Biのようなアルファ放射体といった放射性金属イオンのような治療成分に結合させることができる。細胞毒素又は細胞毒性薬には、細胞に有害ないかなる薬剤をも包含される。例としては、パクリタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド(tenoposide)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン(dihydroxy anthracin dione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びピューロマイシン並びにそれらの類似物又は相同物が挙げられる。治療剤としては、代謝拮抗物質(例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン(fluorouracil decarbazine)、アルキル化剤(例えばメクロレタミン、チオエパクロラムブシル(thioepa chlorambucil)、メルファラン、カルムスチン(BSNU)及びロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド(cyclophosphamide)、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、並びにcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えばダウノルピシン(旧名ダウノマイシン)及びドキシソルピシン)、抗生物質(例えばダクチノマイシン(旧名アクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、及びアンスラマイシン(anthracycline; AMC))、及び有糸分裂阻害剤(例えばピンクリスチン及びピンブラスチン)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0132】

本発明の結合体は、任意の生物学的反応を調節するために用いることができ、該治療剤又は薬剤成分は古典的な化学的治療剤に限定されるものとして解釈されるものではない。例えば、薬剤成分は、所望の生物活性を有するタンパク質又はポリペプチドであり得る。そのようなタンパク質としては、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、又はジフテリア毒素のような毒素；腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子、例えばTNF- α 、TNF- β 、AIM I (国際公開W0 97/33899を参照)AIM II (国際公開W0 97/34911を参照)、Fasリガンド (Takahashi et al., Int. Immunol., 6:1567-1574 (1994))、VEGF (国際公開W0 99/23105を参照)のようなアポトーシス剤、血栓症剤、又は例えばアンギオスタチン若しくはエンドスタチン(endostatin)のような抗血管形成剤といったタンパク質；あるいは、例えばリンフォカイン、インターロイキン 1(「IL-1」)、インターロイキン 2(「IL-2」)、インターロイキン 6(「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)、又は他の成長因子のような生物反応修飾物質が包含され得る。

【0133】

抗体はまた、固体支持体に付着させることができ、これは特に免疫測定法又は標的抗原の精製に有用である。そのような固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリプロピレンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0134】

そのような治療成分を抗体に結合させるための技術は周知である。例えばArnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications, Pin

chera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 及びThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. 62:119-58 (1982)を参照のこと。

【0135】

あるいは、抗体を第二の抗体に結合させ、Segalらによって米国特許第4,676,980号に記載されているような抗体ヘテロ結合体を形成させることができる。なお、引用によりその内容の全てがここに組み入れられるものとする。

【0136】

単独で又は細胞毒性因子及び/若しくはサイトカインと組み合わせて投与される、治療成分が結合している又はしていない抗体は、治療に用いることができる。

【0137】

本発明はまた、本発明のポリペプチドに対する合成抗体の創製をも包含する。合成抗体の一例はRadrizzani, M., et al., Medicina, (Aires), 59(6):753-8, (1999)に記載されている。近年では新しいクラスの合成抗体が記述されており、分子インプリント高分子(molecularly imprinted polymers; MIP) (Semorex, Inc.)と呼ばれている。抗体、ペプチド、及び酵素は、化学及び生物学的センサーにおいてしばしば分子認識要素として用いられる。しかしながら、それらの安定性及びシグナル伝達機構の欠失により、検出装置としての用途に限界が生じてしまう。分子インプリント高分子(MIP)は、生物学的受容体の機能を模倣することができるが、安定性の制約がより少ない。そのような高分子は、卓越した熱及び機械的安定性を維持しつつ高い感受性と選択性を示す。MIPは低分子並びに天然の抗体の力価と等しいか又はより強い力価を有する有機分子及びタンパク質のような標的分子に結合する能力を有する。これらの「超」MIPはその標的に対する親和性が高いので、有効な結合のために必要な濃度は低い。

【0138】

合成の間に、標的分子自体(例えばポリペプチド、抗体等)、又はよく似た構造を有する物質を「版」又は「鋳型」として用いることにより、選択された標的と相補する大きさ、形、電荷及び官能基を有するようにMIPがインプリントされる。MIPは抗体に提供されるのと同様な試薬で誘導体化され得る。例えば、高感度の分離若しくはアッセイに用いるために、又はタンパク質のハイスループットスクリーニングに用いるために、蛍光「超」MIPをビーズ上又はウェル上にコートすることができる。

【0139】

さらに、本発明のポリペプチドの構造に基づいたMIPは、本発明のポリペプチドに結合する化合物のスクリーニングに役立つ。そのようなMIPは、該ポリペプチドのネイティブな構造を模倣することにより、合成「受容体」の役割を果たし得る。実際に、MIPが合成受容体の役割を果たす能力は、エストロゲン受容体において既に証明されている(Ye, L., Yu, Y., Mosbach, K, Analyst., 126(6):760-5, (2001); Dickert, F, L., Hayden, O., Halikias, K, P, Analyst., 126(6):766-71, (2001))。合成受容体は、その全体を(例えば全タンパク質として)模倣することができるし、又は該タンパク質に対応する一連の短ペプチドとして模倣することもできる(Rachkov, A., Minoura, N, Biochim, Biophys, Acta., 1544(1-2):255-66, (2001))。そのような合成受容体MIPは、ここで別記された1以上のいかなるスクリーニング法においても用いることができる。

【0140】

MIPはまた、それが模倣する分子の存在を「検出」するのに役立つことも示されている(Cheng, Z., Wang, E., Yang, X, Biosens, Bioelectron., 16(3):179-85, (2001); Jenkins, A, L., Yin, R., Jensen, J. L, Analyst., 126(6):798-802, (2001); Jenkins, A, L., Yin, R., Jensen, J. L, Analyst., 126(6):798-802, (2001))。例えば、本発明のポリペプチドを用いて設計されたMIPは、試料中の前記ポリペプチドのレベルを同定し、場

10

20

30

40

50

合によっては定量するために計画されたアッセイに用いることができる。そのようなMIPは、ここで提供されたアッセイ又はキット(例えばELISA等)において記載されたいかなる構成物とも置き換えて用いることができる。

【0141】

特異的な受容体、リガンド、ポリペプチド、ペプチド、有機分子に対するMIPは、多くの方法を用いて創製することができる。数例の好ましい方法がEstebanらによってJ. Anal. Chem., 370(7):795-802, (2001)に記載されているので、その内容の全てはそこに引用されているいかなる文献とも共に、引用によりここに組み入れられることとする。さらなる方法がこの分野で知られており、それらは本発明に包含される。例えばHart, B, R., Shea, K, J. J. Am. Chem. Soc., 123(9):2072-3, (2001); and Quaglia, M., Chenon, K., Hall, A, J., De, Lorenzi, E., Sellergren, B, J. Am. Chem. Soc., 123(10):2146-54, (2001); 引用によりその内容の全てがここに組み入れられるものとする。

【0142】

GPR91に対する抗体のための用途

本発明の抗体には種々の有用性がある。例えば、そのような抗体は、試料中のGPR91の存在を検出又は定量する診断アッセイに用いることができる。そのような診断アッセイには少なくとも2つの工程が含まれ得る。第一の工程では、組織(例えばヒト、動物など)、体液(例えば血液、尿、痰、精液、羊水、唾液など)、生物抽出物(例えば組織又は細胞ホモジネートなど)、タンパク質マイクロチップ(例えばArenkov P, et al., Anal Biochem., 278(2):123-131 (2000)を参照のこと)、又はクロマトグラフィーカラム等の試料を該抗体に曝露する。第二の工程には、媒体に結合した抗体の精製が含まれる。あるいは、該方法はさらに、上記し又は他の部分に記載したとおり、共有結合、静電結合、又は可逆的結合のいずれかで該抗体を固体支持体に付着させる第一の工程、及び結合した抗体を試料に曝露する第二の工程を含み得る。

【0143】

競合結合アッセイ、直接又は間接サンドイッチアッセイ、及び不均質相又は均質相のいずれかで行なわれる免疫沈降アッセイ(Zola, Monoclonal antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., (1987), pp147-158)のように、種々の診断アッセイ技術がこの分野で知られている。診断アッセイで用いられる抗体は、検出可能な成分で標識することができる。標識可能な成分は、直接又は間接的に検出可能なシグナルを生産することができるものである必要がある。例えば、検出可能な成分は、²H, ¹⁴C, ³²P, 若しくは¹²⁵Iのような放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、若しくはルシフェリンのような蛍光若しくは化学発光化合物、又は、アルカリフォスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、若しくはセイヨウワサビペルオキシダーゼのような酵素であり得る。該抗体を検出可能な成分に結合させるためのこの分野で公知のいかなる方法も用いることができ、Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); Dafvid et al., Biochem., 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Metho., 40:219(1981); 及びNygren, J. Histochem. And Cytochem., 30:407 (1982)に記載された方法が挙げられる。

【0144】

GPR91に対する抗体は、組換え細胞培養物又は天然の供給源由来のGPR91ポリペプチドをアフィニティー精製するのに有用である。この工程では、この分野で周知の方法を用いて、特定のポリペプチドに対する抗体がセファデックス樹脂又はろ紙のような適当な支持体上に固定化される。固定化された抗体は次いで、精製すべきポリペプチドを含む試料と接触させ、その後該支持体を、固定化抗体に結合した所望のポリペプチド以外の、試料中の実質的に全ての物質を取り除く適当な溶媒で洗浄する。最後に、該支持体を他の適切な溶媒で洗浄し、該抗体から所望のポリペプチドを分離する。

【0145】

本発明はさらに、1以上の開示された疾病、疾患又は健康状態を治療するために患者に本発明の抗体を投与することを含む、抗体に基づく療法にも向けられている。本発明の治

療化合物としては、本発明の抗体(ここに記載されたようにその断片、類似体及び誘導体を含む)及び本発明の抗体をコードする核酸(ここに記載されたようにその断片、類似体及び誘導体並びに抗イディオタイプ抗体を含む)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体は、本発明のポリペプチドの異常な発現及び/又は活性に関連する疾病、疾患又は健康状態を治療、阻害又は予防するために用いることができ、その疾病等としてはここに記載された1以上のいずれかの疾病、疾患又は健康状態が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のポリペプチドの異常な発現及び/又は活性に関連する疾病、疾患又は健康状態の治療及び/又は予防としては、それらの疾病、疾患又は健康状態に関連する症状の軽減が挙げられるが、これに限定されない。本発明の抗体は、この分野で知られるように又はここに記載されるように、薬理的に許容される組成物中に供給され得る。

10

【0146】

本発明の抗体が治療上用いられ得る方法の概要には、本発明のポリヌクレオチド若しくはポリペプチドを体内で局所的若しくは全身的に結合させること、又は例えば補体によって(CDC)若しくはエフェクター細胞によって媒介される(ADCC)ように、該抗体の直接的な細胞毒性によることが包含される。これらのアプローチの一部についてはより詳細に後述する。ここに提供される教示によれば、当業者は過度の実験をすることなく、診断、監視又は治療目的で本発明の抗体を使用する方法を十分に理解するだろう。

【0147】

本発明の抗体は、例えば該抗体と相互作用するエフェクター細胞の数又は活性を増大させるように働く、他のモノクローナル若しくはキメラ抗体、又はリンフォカイン若しくは造血成長因子(例えばIL-2、IL-3及びIL-7)と組み合わせることで、有利に利用することができる。

20

【0148】

本発明の抗体は、単独で又は他のタイプの治療処置(例えば放射線療法、化学療法、ホルモン療法、免疫療法及び抗腫瘍剤)と組み合わせ投与することができる。一般に、患者のものと同じ種である種に由来する又は種反応性(抗体の場合)の産物を投与することが好ましい。従って、好ましい具体例の一つでは、治療又は予防のために、ヒトの抗体、断片誘導体、相同体、又は核酸がヒト患者に投与される。

【0149】

本発明のポリペプチド又はポリヌクレオチドに対する高親和性の及び/又はインビボ抑制能のある及び/又は中和抗体、その断片あるいは領域を、その断片を含む本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチドに関連する疾患に対する免疫測定法及びその疾患の治療の両方に用いることが好ましい。そのような抗体、断片、又は領域は、好ましくは、その断片を含む本発明のポリヌクレオチド又はポリペプチドに対する親和性を有するだろう。

30

【0150】

GPR91に対する抗体は、動物におけるアレルギー反応を抑制するのに有用である。例えば、治療上許容される用量の一つ若しくは複数の本発明の抗体、又は該抗体のカクテルを投与することによって、あるいは異なる供給源由来の他の抗体と組み合わせ投与することによって、動物は抗原に対しアレルギー反応を誘発しなくなり得る。

【0151】

同様に、生物中でアレルギー応答及び/又は免疫応答を誘発する可能性のある、GPR91に対する抗体をコードする遺伝子をクローニングし、該生物を前記抗体遺伝子で形質転換して、該生物中で(例えば恒常的に、誘導的に等)発現させることが想起され得る。従って、該生物は、そのような免疫/アレルギー反応性ポリペプチドの摂取又は存在に起因するアレルギー応答に対し、有効に抵抗性となるだろう。さらに、本発明の抗体のこのような使用は、自己免疫性の疾病及び/又は疾患を予防及び/又は寛解させる場合に特に実用的であり得る。なぜなら、そのような健康状態は、典型的には内生タンパク質に対する抗体に起因しているからである。例えば、本発明のポリペプチドが自己抗原に対する免疫応答の調節に関与している場合には、ここに開示される又はこの分野において公知のその他のプロモーターであって、さらに、本発明のポリペプチドに対する抗体をコードするポリヌ

40

50

クレオチドに対するプロモーターである、いずれかのプロモーターを含む構築物で生物及び/又は個体を形質転換することにより、該生物の免疫系が自己抗原に対して免疫応答を誘発することを効果的に防ぐことができる。本発明の治療及び/又は遺伝子治療への応用についての詳細な説明は、この中の他の場所に記載される。

【0152】

抗GPR91抗体を用いた診断方法

GPR91に特異的に結合する標識抗体、並びにその誘導体及び類似体は、本発明のポリペプチドの異常な発現及び/又は活性に関連する疾病、疾患、及び/又は健康状態を検出、診断、又は監視する診断目的で用いることができる。本発明は、(a) GPR91に特異的な1以上の抗体を用いて、個体の細胞又は体液中のGPR91の発現を分析し、(b) 該遺伝子発現レベルを基準の遺伝子発現レベルと比較することにより、基準発現レベルと比較した場合のGPR91遺伝子発現レベルの上昇又は低下を異常な発現の指標とすることを含み、GPR91の異常な発現の検出を提供する。

10

【0153】

本発明は、(a) GPR91に特異的な1以上の抗体を用いて、個体の細胞又は体液中のGPR91の発現を分析し、(b) 該遺伝子発現レベルを基準の遺伝子発現レベルと比較することにより、基準発現レベルと比較した場合の分析されるポリペプチド遺伝子発現レベルの上昇又は低下を特定の疾患の指標とすることを含み、疾患を診断するための診断アッセイを提供する。癌に関しては、個体由来の生検組織における比較的多い量の転写物の存在が、該疾病の発達の疾病素質を表し得るし、又は実際の臨床症状の出現に先立って該疾病を検出するための手段を提供し得る。このタイプのより確実な診断によって、医療従事者が早期に予防措置又は積極的治療を行うことが可能となり得、従って癌の発達やさらなる進行を防止することが可能となり得る。

20

【0154】

本発明の抗体は、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を用いて、生物試料中のタンパク質レベルを分析するために用いることができる(例えばJalkanen, et al., J. Cell Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell Biol. 105:3087-3096 (1987)を参照のこと)。タンパク質遺伝子発現を検出するのに有用な、抗体に基づいた他の方法としては、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)及び放射性免疫測定法(RIA)のような免疫測定法が挙げられる。適当な抗体アッセイ標識はこの分野で公知であり、グルコースオキシダーゼのような酵素標識; ヨウ素(125I、121I)、炭素(14C)、硫黄(35S)、トリチウム(3H)、インジウム(112In)、及びテクネチウム(99Tc)のような放射性同位体; ルミノールのような発光標識; 並びにフルオレセイン及びローダミンのような蛍光標識、並びにビオチンが挙げられる。

30

【0155】

本発明の1つの局面は、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトにおける、GPR91の異常な発現に関連する疾病又は疾患の検出及び診断である。1つの具体例では、診断は: a) GPR91に特異的に結合する有効量の標識分子を被験者に投与(例えば非経口的、皮下、又は腹腔内)し; b) 標識分子が、被験者内で該ポリペプチドが発現する部位に優先的に集中するように(及び結合しなかった標識分子がバックグラウンドレベルまで取り除かれるように)、投与後に時間をおき; c) バックグラウンドレベルを測定し; 並びにd) 被験者における標識抗体を検出し、バックグラウンドレベルを超える標識抗体を検出することにより、被験者がマスト細胞に関連する特定の疾病又は疾患を有することの指標とすることを含み。バックグラウンドレベルは、検出された標識分子の量を特定の系に対して事前に決定した基準値と比較することを包含する、種々の方法によって決定することができる。

40

【0156】

この分野においては、被験者の大きさ及び用いられるイメージング系が診断的画像を製作するために必要なイメージング成分の量を決定するということが理解されるだろう。放射性同位体成分の場合、ヒト被験者に対して注入される放射能の量は、通常、99mTcにし

50

て約5から20ミリキュリーの範囲だろう。該標識抗体又は抗体断片は、次いで、特定のタンパク質を含む細胞の所在部位に優先的に蓄積するだろう。インビボ腫瘍イメージングは、S. W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel and B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)に記載されている。

【0157】

用いられる標識のタイプ及び投与方法を包含するいくつかの可変要因に依存して、被験者内で標識分子が優先的に部位に集中し、且つ結合しなかった標識分子がバックグラウンドレベルまで取り除かれるようにするために投与後におく時間間隔は、6ないし48時間、又は6ないし24時間、あるいは6ないし12時間である。他の具体例では、投与後におく時間間隔は5ないし20日間又は5ないし10日間である。

10

【0158】

ある具体例では、疾病又は疾患のモニターは、例えば、最初の診断から1月後、最初の診断から6月後、最初の診断から1年後等のように、疾病又は疾患の診断のための方法を繰り返すことによって行なわれる。

【0159】

標識分子の存在は、患者において、生体内スキャンニングに関してこの分野で知られる方法を用いて検出することができる。これらの方法は用いられる標識のタイプに依存する。当業者であれば、特定の標識を検出するために適した方法を決定することができるだろう。本発明の診断方法において用いられ得る方法及び装置としては、コンピュータ断層撮影法(CT)、ポジシオン放出断層撮影(PET)、磁気共鳴画像法(MRI)、及び断層撮影のような全身走査が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0160】

ある特定の具体例では、該分子は放射性同位体で標識され、放射線応答性の外科用器具(Thurston et al., 米国特許第5,441,050号)を用いて患者中で検出される。他の具体例では、該分子は蛍光化合物で標識され、蛍光応答性の走査器具を用いて患者中で検出される。他の具体例では、該分子はポジトロン放出金属で標識され、ポジトロン放出断層撮影を用いて患者中で検出される。さらなる他の具体例では、該分子は常磁性標識で標識され、磁気共鳴画像法を用いて患者中で検出される。

30

【0161】

他の局面では、本発明は、サイトカインの無秩序な発現によって引き起こされる疾病を発達させる患者の疾病素質を診断するための方法を提供する。本発明は、ある患者の細胞、組織、又は体液中のGPR91受容体の存在又は量の増加が、該患者がある免疫疾病にかかりやすいということを示しているという知見に基づいている。1つの具体例では、該方法は、あるとしてもごく少量のGPR91受容体を含むことが知られている細胞、組織、又は体液試料を患者から採取し、該組織中のGPR91受容体の存在について該組織又は体液を分析し、及び該組織又は体液中のGPR91受容体の発現レベルに基づいてある免疫疾病に対する該患者の疾病素質を予測することを含む。他の具体例では、該方法は、規定されたレベルのGPR91受容体を含むことが知られている細胞、組織又は体液試料を患者から採取し、該組織中のGPR91受容体の量について該組織又は体液を分析し、及び正常な細胞、組織又は体液において確立された規定され又は測定されたレベルと比較した、該組織または体液中のGPR91受容体の量の変化に基づいて、ある免疫疾病に対する患者の疾病素質を予測することを含む。GPR91受容体の規定されたレベルは、文献値に基づいた公知の量か、又は正常な細胞、組織若しくは体液中の量を測定することにより前もって定めた量であり得る。特に、ある組織又は体液中のGPR91受容体レベルを測定することで、患者の免疫疾病を特異的かつ早期に、好ましくは疾病が起きる前に発見できる。該方法を用いて診断できる免疫疾病は、ここに記載された免疫疾病を包含するが、これらに限定されるものではない。好ましい具体例では、該組織又は体液は、末梢血、末梢血白血球、肺又は皮膚生検のような生検組織、及び滑液又は滑膜組織である。

40

50

【0162】

受容体発現の調節

さらなる他の局面では、本発明は、GPR91活性化受容体をコードするDNA又はRNAポリヌクレオチドの転写又は翻訳に干渉することにより、細胞のGPR91受容体の発現をブロック又は調節する方法を提供する。該方法は、GPR91受容体を発現し得る細胞を、GPR91活性化受容体をコードするDNA又はRNAポリヌクレオチドの適正な転写又は翻訳に干渉する分子に曝露することを含む。該分子は、有機分子、生物有機分子、アンチセンスヌクレオチド、RNAiヌクレオチド、又はリボザイムであり得る。

【0163】

好ましい具体例の一つでは、該方法は、GPR91活性化受容体をコードするDNA又はGPR91活性化受容体をコードするDNAの発現を制御するDNAにアンチセンスな又はこれらと三重らせん体を形成するポリヌクレオチドに細胞を曝露することにより、細胞のGPR91受容体の発現をブロック又は変調することを含む。該細胞は、GPR91活性化受容体の発現を阻害又は制御するのに十分な量のアンチセンスポリヌクレオチド又は三重らせん体形成ポリヌクレオチドに曝露される。また、本発明は、GPR91活性化受容体をコードするDNA又はGPR91活性化受容体をコードするDNAの発現を制御するDNAにアンチセンスな又はこれらと三重らせん体を形成するポリヌクレオチドを動物に投与することにより、該動物においてGPR91受容体の発現をブロック又は変調する方法を提供する。該動物は、該動物中でGPR91受容体の発現を阻害又は制御するのに十分な量のアンチセンスポリヌクレオチド又は三重らせん体形成ポリヌクレオチドを投与される。好ましくは、該アンチセンスポリヌクレオチド又は三重らせん体形成ポリヌクレオチドは、DNA又はRNAポリヌクレオチドである。

【0164】

細胞をアンチセンスポリヌクレオチドに曝露する方法及び動物にアンチセンスポリヌクレオチドを投与する方法は、この分野において周知である。好ましい方法では、該ポリヌクレオチドは、公知の方法を用いて細胞ゲノム中に組み込まれ、該細胞内で発現されるようになる。発現されたアンチセンスポリヌクレオチドは、GPR91受容体をコードするポリヌクレオチドに結合し、それらの転写又は翻訳に干渉する。

【0165】

該方法は、例えば好中球又はマスト細胞のような種々のタイプの細胞に関する研究を行なう際に、サイトカイン及び受容体の発現を阻害するのに有用であり、また、非疾病状態と比較して過剰なサイトカイン生産により特徴付けられる動物疾病を予防又は治療するのに有用である。

【0166】

疾病の予防及び治療

他の局面では、本発明は、哺乳動物においてGPR91タンパク質に媒介される疾病を予防又は治療するための方法を提供する。該方法は、疾病を予防又は治療する量のGPR91受容体アゴニスト又はアンタゴニストを哺乳動物に投与することを含む。該アゴニスト又はアンタゴニストは、GPR91受容体に結合し、サイトカイン及び細胞受容体の発現を制御して非疾病状態に典型的なサイトカインレベルを生じさせる。好ましくは、該疾病は、アレルギー、喘息、自己免疫性、又は他の炎症性疾病である。最も好ましくは、該疾病はアレルギー又は喘息である。

【0167】

GPR91受容体アゴニスト又はアンタゴニストの投与量は、年齢、大きさ、並びに特定の哺乳動物及び疾病の特性に応じて変動する。当業者であれば、これらの要因に基づいて投与量を決定することができる。該アゴニスト又はアンタゴニストは、疾病に合致した治療計画で投与することができ、例えば、病状を寛解するため1ないし数日間にわたって1回又は少数回、あるいはアレルギー又は喘息を予防するため延長した期間にわたって周期的に投与することができる。

【0168】

該アゴニスト及びアンタゴニストは、経口投与、注射、インプラントの使用、肺中への

エアロゾルの使用等を含む、いかなる許容可能な方法によっても哺乳動物に投与することができる。注射及びインプラントの場合は、投与のタイミングと投与量のレベルを正確に制御することができる。該アゴニスト及びアンタゴニストは非経口的に投与することもできる。ここで用いる非経口投与は、静脈内、筋肉内若しくは腹腔内注射、又は皮下埋込みを意味する。

【0169】

注射により投与する場合、該アゴニスト及びアンタゴニストは、種々の賦形剤、アジュバント、添加剤及び希釈剤のような、いかなる生体適合性の物質並びにアゴニスト及びアンタゴニスト適合性の担体をも含む注射可能な剤形で哺乳動物に投与することができる。不揮発性発熱物質を含まない水、滅菌水及び静菌水のような水性賦形剤もまた、注射可能な溶液を形成するのに適している。これらの形態の水に加えて、数種類の他の水性賦形剤も用いることができる。これらは、塩化ナトリウム、リンゲル液、デキストロース、デキストロースと塩化ナトリウム、及び乳酸加リンゲル液のような、滅菌可能な等張性注射組成物を包含する。綿実油、ゴマ油又は落花生油のような非水性賦形剤、及びミリスチン酸イソプロピルのようなエステルもまた、該組成物のための溶媒系として用いることができる。加えて、抗菌性保存剤、酸化防止剤、キレート化剤および緩衝剤を包含する、該組成物の安定性、無菌性及び等張性を高める種々の添加物を加えることができる。しかしながら、使用するいかなる賦形剤、希釈剤又は添加物も、生体適合性並びに本発明のアゴニスト及びアンタゴニストとの適合性を有していなければならない。

10

【0170】

治療及び予防活性

本発明の化合物又は医薬組成物は、好ましくは、ヒトにおいて用いられる前に、所望の治療又は予防活性があるかどうかをインビトロで、次いでインビボで検査される。例えば、化合物又は医薬組成物の治療又は予防の効用を実証するためのインビトロアッセイには、セルライン又は患者の組織試料に及ぼす化合物の効果が包含される。セルライン及び/又は組織試料に及ぼす該化合物又は組成物の効果は、これらに限定されないが、ロゼット形成アッセイ及び細胞溶解アッセイを包含する当業者に公知の技術を利用して測定することができる。本発明に従い、特異的な化合物の投与が必要であるかどうかを決定するために用いられ得るインビトロアッセイとしては、患者の組織試料を培地中で増殖し、化合物に曝露し又は他の方法で化合物を投与して、そのような化合物が組織試料に及ぼす効果を観察する、インビトロ細胞培養アッセイが挙げられる。

20

30

【0171】

治療的/予防的投与及び組成物

本発明は、有効な量の本発明の化合物又は医薬組成物、好ましくは本発明の抗体又はsiRNAを被験者に投与することによる、治療、抑制及び予防方法を提供する。好ましい局面では、該化合物は実質的に精製される(例えば、その効果を制限する又は不所望の副作用を引き起こす物質が実質的に除去される)。該被験者は好ましくはウシ、ブタ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ等を包含する動物であり、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトであるが、これらに限定されない。

【0172】

該化合物が核酸又は免疫グロブリンを含む場合の、用いられ得る剤形及び投与方法は上記されている;さらなる適当な剤形及び投与経路は、ここで後述されるものから選択可能である。

40

【0173】

種々の送達系が公知であって、本発明の化合物を投与するのに用いることができ、例えば、リポソーム内封入、微粒子、マイクロカプセル、該化合物を発現し得る組換え細胞、受容体媒介性エンドサイトーシス(Wu and Wu, J. Biol. Chem., 262:4429-4432 (1987)を参照のこと)、レトロウイルス又は他のベクターの一部としての核酸の構築等が挙げられる。

【0174】

50

導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、及び経口経路が挙げられるが、これらに限定されない。該化合物又は組成物は、例えば注入又はボラス注入、上皮又は粘膜皮膚内壁(例えば口腔粘膜、直腸及び腸管粘膜等)経路の吸収のような、いかなる簡便な経路によっても投与することができ、また、他の生物活性物質と共に投与することができる。投与は全身的又は局所的にすることができる。さらに、本発明の医薬化合物又は組成物を、適した経路によって中枢神経系に導入することも望ましくあり得、該適した経路としては脳室内及び髄腔内注射が挙げられる；脳室内注射は、例えばオマヤレザパーのようなレザパーに取り付けられた脳室内カテーテルによって容易にすることができる。経肺投与はまた、例えば吸入器又は噴霧器、及びエアロゾル化剤を用いた製剤の使用により行なうことができる。

10

【0175】

ある特定の具体例では、本発明の医薬化合物又は組成物を、治療が必要な部位に局所的に投与することが望ましくあり得る；これは、例えば、手術時における局所注入、例えば術後の創傷被覆材との併用のような局所適用、注射、カテーテル手段、坐剤手段、又はインプラント手段によって達成することができ、前記インプラントは多孔質、非多孔質、又はゼラチン質物質のものであって、sialastic膜又は線維のような膜を包含するが、これらに限定されるものではない。好ましくは、抗体を含む本発明のタンパク質を投与する場合には、該タンパク質が吸収されない物質を用いることに注意を払わなければならない。

【0176】

他の具体例では、該化合物又は組成物は、小胞、特にリポソーム中に送達することができる(Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, 同書, pp. 317-327を参照のこと；広く同書を参照のこと)。

20

【0177】

さらに他の具体例では、該化合物又は組成物は、放出制御系中で送達することができる。1つの具体例ではポンプが用いられ得る(Langer, 上記；Sefton, CRC Crit. Ref. Biom. ed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)を参照のこと)。他の具体例では高分子材料が用いられ得る(Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); see also Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)を参照のこと)。さらに他の具体例では、放出制御系は治療標的、すなわち脳の近くに設置することもでき、従ってごく少量の全身投与量で済ませることができる(例えばGoodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照のこと)。

30

【0178】

その他の放出制御系についてはLangerらのレビューの中で論じられている(Science 249:1527-1533 (1990))。

40

【0179】

本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である場合のある特定の具体例では、例えばレトロウイルスベクターを用いて(米国特許第4,980,286号を参照のこと)、又は直接注入法によって、又は微粒子照射(例えば遺伝子銃；Biolistic, Dupont)を用いて、又は脂質若しくは細胞表面受容体若しくはトランスフェクト試薬で被覆することによって、又は核内に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドに該核酸を連結させて投与する(例えばJoliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991)を参照のこと)ことによって等、該核酸を適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、それが細胞内のものとなるようにそれを投与することにより、該核酸を投与して該核酸がコードする

50

タンパク質の発現をインピボで促進させることができる。あるいは、核酸は、発現させるために、細胞内に導入し相同組換えによって宿主細胞DNA内に組み込むことができる。

【0180】

本発明はまた医薬組成物を提供する。そのような組成物は、治療上有効な量の化合物、及び薬剤的に許容される担体を含む。ある特定の具体例では、「薬剤的に許容される」という語は、連邦若しくは州政府の規制当局に承認され、又は、動物、とりわけヒトへの使用について米国薬局方若しくは一般に認められる他の薬局方に列記されているということの意味する。「担体」という語は、治療薬が共に投与される希釈剤、アジュバント、結合剤(excipient)、又は賦形剤(vehicle)を言う。そのような医薬担体は、水及び油脂のような無菌の液体であり得、落花生油、大豆油、ミネラルオイル、胡麻油などのような、石油、動物、植物又は合成物由来のものが包含される。該医薬組成物が静脈内投与される場合には、水が好ましい担体である。食塩水、デキストロース水、及びグリセロール溶液もまた、特に注射剤のために液体担体として用いられ得る。適当な医薬品賦形剤(結合剤)としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。所望であれば、該組成物には、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤を含ませることができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、徐放性製剤などのような形態とすることができる。該組成物は、トリグリセリドのような従来結合剤及び担体と合わせて坐剤として製剤することができる。経口製剤には、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等のような標準的な担体を含ませることができる。適当な医薬担体の例は、E. W. Martinによる "Remington's Pharmaceutical Sciences" に記載されている。このような組成物は、患者に適当に投与するための形態を付与するために適した量の担体と合わせて、好ましくは精製された形態の、治療効果のある量の化合物を含む。剤形は投与形態に適当でなければならない。

10

20

【0181】

好ましい具体例の一つでは、該組成物は、ルーチンな手法に従って、ヒトに静脈内投与するのに適合させた医薬組成物として製剤される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液に溶解した溶液である。必要に応じ、該組成物には、可溶化剤及び注入部位の痛みを緩和するためにリグノカインのような局所麻酔薬を含ませることもできる。一般に、該成分は別々に又は単位用量形態中に混合させて供給され、例えば、凍結乾燥粉末又は非含水濃縮物として、活性作用物質の量を表示したアンプル又は小袋のような密封容器中に供給される。該組成物を注入によって投与する場合、無菌の製薬等級純水又は食塩水を含む注入瓶を用いて調剤することができる。該組成物を注射によって投与する場合、投与前に成分を混合できるように、注射のための滅菌水又は食塩水のアンプルを提供することができる。

30

【0182】

本発明の化合物は、中性又は塩の形態で製剤することができる。薬剤的に許容される塩としては、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されたようなアニオンと共に形成されるもの、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのようなカチオンと共に形成されるものが挙げられる。

40

【0183】

本発明のポリペプチドの異常な発現及び/又は活性に関連する疾病又は疾患の治療、抑制及び予防に有効である本発明の化合物の量は、標準的な臨床技術によって決定することができる。さらに、最適な投与量の範囲を同定し易くするため、任意でインピトロアッセイを行なうこともできる。製剤において用いられるべき正確な用量は、投与経路及び疾病又は疾患の重症度にも依存し、医療従事者の判断及び各患者の状況に基づいて決定すべきである。有効量は、インピトロ又は動物モデル実験系から得られる用量反応曲線から推定

50

することができる。

【0184】

抗体の場合、患者に投与される薬量は、典型的には患者の体重に対し0.1 mg/kgないし100 mg/kgである。好ましくは、患者に投与される薬量は、患者の体重に対し0.1 mg/kg から20 mg/kgの間、より好ましくは患者の体重に対し1 mg/kgないし10 mg/kgである。一般に、外来ポリペプチドに対する免疫応答に起因して、ヒト抗体はヒト体内では他種由来の抗体よりも半減期が長い。従って、ヒト抗体の場合はしばしば、投与量を低くし、かつ投与頻度を減らすことができる。さらに、例えば脂質化(lipidation)のような修飾により、該抗体の(例えば脳中への)取り込み及び組織透過性を促進させることで、本発明の抗体の投与量及び投与頻度を減らすことができる。

10

【0185】

本発明はまた、本発明の医薬組成物の1以上の成分が入った1以上の容器を含む医薬品の包装又はキットを提供する。そのような容器には、任意で、医薬品又は生物学的商品の製造、使用又は販売を規制する行政機関によって定められた形式の注意書きであって、該機関によるヒトへの投与のための製造、使用又は販売の承認を示す注意書きを添付することができる。

【0186】

抗体に基づく遺伝子治療

GPR91の異常な発現及び/又は活性に関連する疾病又は疾患を治療、抑制又は予防するために、遺伝子治療として、抗体又はその機能的な誘導体をコードする配列を含む核酸を投与することができる。遺伝子治療とは、被験者に対し発現された又は発現しうる核酸を投与することにより行われる治療のことである。本発明のこの具体例では、該核酸は治療効果を媒介するコードタンパク質を生産する。

20

【0187】

本発明に従い、この分野で利用できる遺伝子治療のためのいかなる方法も用いることができる。典型的な方法については後述する。

【0188】

遺伝子治療の方法の一般的な概要については、Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu and Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); and Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIBTECH* 11(5):155-215 (1993). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); and Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)を参照のこと。

30

【0189】

好ましい局面の一つでは、化合物は抗体をコードする核酸配列を含み、前記核酸配列は、適当な宿主中において該抗体又はその断片若しくはキメラタンパク質若しくは重鎖若しくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部となっている。特に、このような核酸配列は、抗体コード領域と動作的に連結したプロモーターを有し、前記プロモーターは誘導的又は恒常的であって、任意で組織特異的である。他の特定の具体例では核酸分子が用いられ、この場合では抗体コード配列及び他所望の配列がゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域と隣接しており、従って抗体コード核酸の染色体内発現が引き起こされる(Koller and Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989)。ある特定の具体例では、発現される抗体分子は一本鎖抗体であり;あるいは、該核酸配列は、該抗体の重鎖及び軽鎖の両者、又はその断片をコードする配列を含む。

40

【0190】

患者への核酸の送達は、直接的又は間接的に行なうことができ、直接的に行なう場合では患者は該核酸又は核酸含有ベクターに直接曝露され、間接的に行なう場合では、初めに

50

細胞がインビトロにおいて該核酸配列で形質転換され、次いで患者中に移植される。これらの二通りの方法は、それぞれ生体内又は生体外遺伝子治療として知られている。

【0191】

ある特定の具体例では、核酸配列は直接生体内に投与され、そこで核酸が発現してコードする産物を生産する。これはこの分野で知られた多くの方法のいずれによっても達成することができ、例えば、欠損若しくは弱毒レトロウイルス又はその他のウイルスベクターを用いた感染によって(米国特許第4,980,286号を参照のこと)、又は裸のDNAの直接注入によって、又は微粒子照射(例えば遺伝子銃; Biolistic, Dupont)を用いて、又は脂質若しくは細胞表面受容体若しくはトランスフェクト試薬で被覆すること、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル中へ封入することによって、又は核内に入ることが知られているペプチドに連結させて投与することによって、受容体媒介性エンドサイトーシスを受けやすいリガンドに連結させて投与することによって(例えばWu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)を参照のこと)(該受容体を特異的に発現するタイプの標的細胞に対して用いることができる)等、それらを適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、それらが細胞内のものとなるようにそれを投与することによって達成することができる。他の具体例では、核酸リガンド複合体が形成され、この場合では該リガンドはエンドソームを崩壊させるために融合性ウイルスペプチドを含み、該核酸がリソソームの分解を回避できるようにになっている。さらに他の具体例では、該核酸は、特異的受容体を標的とすることにより、生体内で細胞特異的な取り込み及び発現の標的とされ得る(PCT公開WO 92/06180; WO 92/22635; WO92/20316; WO93/14188, WO 93/20221を参照のこと)。あるいは、該核酸は、発現させるために細胞内に導入され、相同組換えにより宿主細胞DNA中に組み込まれ得る(Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989))。

10

20

【0192】

ある特定の具体例では、本発明の抗体をコードする核酸配列を含むウイルスベクターが用いられる。例えば、レトロウイルスベクターが用いられ得る(Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)を参照のこと)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正しいパッケージング及び宿主細胞DNA中への組み込みに必要な成分を含む。遺伝子治療に用いられるべき抗体をコードする核酸配列は、患者体内への該遺伝子の送達を容易にする1以上のベクター中にクローン化される。レトロウイルスに関する詳細はBoesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994)中にあり、これには、レトロウイルスベクターを用いてmdr1遺伝子を造血幹細胞に送達させ、該幹細胞を化学療法に対しより抵抗性にすることが記載されている。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を例示する他の文献は: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); 及びGrossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993)である。

30

【0193】

遺伝子治療で用いることができる他のウイルスベクターとしてはアデノウイルスがある。アデノウイルスは、気道上皮に遺伝子を送達させる手段として特に魅力的である。アデノウイルスは天然には気道上皮に感染し、そこで軽度の疾病を引き起こす。アデノウイルスをベースとした送達系の他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、及び筋肉である。アデノウイルスには、非分裂細胞に感染可能であるという利点がある。Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993)には、アデノウイルスに基づく遺伝子治療の概要が述べられている。Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994)には、アデノウイルスベクターを用いてアカゲザルの気道上皮に遺伝子を伝達することが示されている。遺伝子治療においてアデノウイルスを用いるその他の例は、Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); PCT 公開 W094/12649; 及びWang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995)にも見出すことができる。

40

50

好ましい具体例の一つでは、アデノウイルスベクターが用いられている。

【0194】

アデノ随伴ウイルス(AAV)も遺伝子治療への使用が提唱されている(Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); 米国特許第5,436,146号)。

【0195】

遺伝子治療の他のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを介するトランスフェクション、又はウイルス感染のような方法によって、遺伝子を組織培養における細胞に伝達することを包含する。通常、伝達方法には、細胞への選択マーカーの伝達が含まれる。該細胞は次いで選択に晒され、伝達された遺伝子を取り込んで発現している細胞が同定される。それらの細胞は次いで患者に送達される。

10

【0196】

この具体例では、得られる組み換え細胞を生体内に投与する前に、核酸が細胞中に導入される。このような導入はこの分野で公知のいずれの方法によっても行なうことができ、その方法としてはトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、該核酸配列を含むウイルス又はバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体による遺伝子導入、微小核体による遺伝子導入、スフェロプラスト融合などが挙げられるが、これらに限定されない。細胞中への外来遺伝子の導入については、多くの技術がこの分野において知られており(例えばLoeffler and Behr, Meth. Enzymol. 217:599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217:618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92m (1985)を参照のこと)、レシピエント細胞の発達及び生理的機能が乱され

20

【0197】

得られる組み換え細胞は、この分野で公知の種々の方法によって患者に送達することができる。組み換え血液細胞(例えば造血幹又は前駆細胞)は、好ましくは静脈内投与される。使用に想定される細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者によって決定され得る。

【0198】

遺伝子治療の目的で核酸が導入され得る細胞は、いかなる所望の、利用可能な細胞タイプをも包含し、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞; Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球のような血液細胞; 種々の幹細胞又は前駆細胞、特に例えば骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓から得られる造血幹又は前駆細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0199】

好ましい具体例の一つでは、遺伝子治療に用いられる細胞は患者の自家性のものである。遺伝子治療に組み換え細胞が用いられる具体例の一つでは、抗体をコードする核酸配列が細胞又はその後代によって発現されるように細胞中に導入され、次いで治療効果のために生体内に該組み換え細胞が投与される。ある特定の具体例では、幹細胞又は前駆細胞が用いられる。本発明のこの具体例に従い、インビトロで単離及び維持することができるい

40

【0200】

ある特定の具体例では、遺伝子治療目的で導入されるべき核酸は、コード領域と動作的に連結した誘導性プロモーターを含み、適当な転写誘導剤の有無を制御することにより該核酸の発現を制御できるようになっている。

【0201】

GPR91に対するsiRNAを用いた治療処置

50

本発明はさらに、RNA干渉(RNAi)に基づく療法であって、開示された1以上の疾病、疾患、又は健康状態を治療するために、本発明の短いRNA(siRNA)又はsiRNAを発現するDNA構築物を動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトである患者に投与することを含む療法(Nature 2001, 411:494; Target 2003, 2:42; FEBS 2002, 527:274)を対象とする。本発明の治療化合物としては、本発明のsiRNA(ここに記載されるようにその断片、類似体及び誘導体も包含する)及び本発明のsiRNAに相同な核酸(ここに記載されるようにその断片、類似体及び誘導体並びに抗イディオタイプ抗体も包含する)が挙げられるが、これらに限定されない。本発明のsiRNAは、本発明のポリペプチドの異常な発現及び/又は活性に関連する疾病、疾患又は健康状態を治療、抑制又は予防するために用いることができ、該疾病等はここに記載される1以上のいかなる疾病、疾患、又は健康状態をも包含するが、これらに限定されない。本発明のポリペプチドの異常な発現及び/又は活性に関連する疾病、疾患、又は健康状態の治療及び/又は予防としては、それらの疾病、疾患又は健康状態に伴う症状を軽減することが挙げられるが、これに限定されない。本発明の抗体は、ここに記載される通り又はこの分野において公知の通り、薬剤的に許容される組成物中に提供され得る。

10

【0202】

本発明のsiRNAが治療上用いられ得る方法の概要には、本発明のポリヌクレオチドを体内で局所的若しくは全身的に結合させること、又は例えば補体によって(CDC)又はエフェクター細胞によって媒介される(ADCC)ように、該siRNAの直接的な細胞毒性によることが包含される。これらのアプローチの一部についてはより詳細に後述する。ここに提供される教示によれば、当業者は過度の実験をすることなく、診断、監視又は治療目的で本発明のsiRNAを使用する方法を十分に理解するだろう。

20

【0203】

本発明のsiRNAは、他のモノクローナル抗体若しくはキメラ抗体、又は、例えば該抗体と相互作用するエフェクター細胞の数若しくは活性を増大する働きをするリンフォカイン若しくは造血成長因子(例えばIL-2, IL-3及びIL-7)と組み合わせることで、有利に利用し得る。

【0204】

本発明のsiRNAは、単独又は他のタイプの治療処置(例えば放射線療法、化学療法、ホルモン療法、免疫療法及び抗腫瘍剤)と組み合わせて投与することができる。一般に、患者のものと同じ種である種に由来する又は種反応性(siRNAの場合)の産物を投与することが好ましい。従って、好ましい具体例の一つでは、治療又は予防のために、ヒトの抗体、断片誘導体、相同体、又は核酸がヒト患者に投与される。

30

【0205】

本発明のポリペプチドに対するsiRNAは、動物におけるアレルギー反応を抑制するのに有用である。例えば、治療上許容される用量の一つ若しくは複数の本発明のsiRNA、又は該siRNAのカクテルを投与することによって、あるいは異なる供給源由来の他のsiRNAと組み合わせて投与することによって、動物は抗原に対しアレルギー反応を誘発しなくなり得る。

【0206】

同様に、本発明のポリペプチドであって、生物中でアレルギー応答及び/又は免疫応答を誘発する可能性のあるポリペプチドに対するsiRNAをコードする遺伝子をクローニングし、該生物を前記siRNA遺伝子で形質転換して、該生物中で(例えば恒常的に、誘導的に等)発現させることが想起され得る。従って、該生物は、そのような免疫/アレルギー反応性ポリペプチドの摂取又は存在に起因するアレルギー応答に対し、有効に抵抗性となるだろう。さらに、本発明のsiRNAのこのような使用は、自己免疫性の疾病及び/又は疾患を予防及び/又は寛解させる場合に特に実用的であり得る。なぜなら、そのような健康状態は典型的には内生タンパク質に対するsiRNAに起因しているからである。例えば、本発明のポリペプチドが自己抗原に対する免疫応答の調節に関与している場合には、ここに開示される又はこの分野において公知のその他のプロモーターであって、さらに、本発明のポ

40

50

リペプチドに対するsiRNAをコードするポリヌクレオチドに対するプロモーターである、いずれかのプロモーターを含む構築物で生物及び/又は個体を形質転換することにより、該生物の免疫系が自己抗原に対して免疫応答を誘発することを効果的に防ぐことができる。本発明の治療及び/又は遺伝子治療への応用についての詳細な説明は、この中の他の場所に記載される。

【0207】

siRNAに基づく遺伝子治療

ある特定の具体例では、本発明のポリペプチドの異常な発現及び/又は活性に関連する疾病又は疾患を治療、抑制又は予防するために、遺伝子治療として、siRNA又はその機能的な誘導体をコードする配列を含む核酸が投与される。遺伝子治療とは、被験者に対し発現された又は発現しうる核酸を投与することにより行われる治療のことである。本発明のこの具体例では、該核酸は治療効果を媒介するコードタンパク質を生産する。

10

【0208】

本発明に従い、この分野で利用できる遺伝子治療のためのいかなる方法も用いることができる。典型的な方法については後述する。

【0209】

遺伝子治療の方法の一般的な概要については、Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12:488-505 (1993); Wu and Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); and Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); May, *TIBTECH* 11(5):15 5-215 (1993). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); 及びKriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)を参照のこと。

20

【0210】

好ましい局面の一つでは、化合物はsiRNAをコードする核酸配列を含み、前記核酸配列は、適当な宿主中において該抗体又はその断片若しくはキメラタンパク質若しくは重鎖若しくは軽鎖を発現する発現ベクターの一部となっている。特に、このような核酸配列は、抗体コード領域と動作的に連結したプロモーターを有し、前記プロモーターは誘導的又は恒常的であって、任意で組織特異的である。他の特定の具体例では核酸分子が用いられ、この場合では抗体コード配列及びその他所望の配列がゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域と隣接しており、従って抗体コード核酸の染色体内発現が引き起こされる(Koller and Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342:435-438 (1989)。ある特定の具体例では、発現される抗体分子は一本鎖抗体であり;あるいは、該核酸配列は、該抗体の重鎖及び軽鎖の両者、又はその断片をコードする配列を含む。

30

【0211】

患者への核酸の送達は、直接的又は間接的に行なうことができ、直接的に行なう場合には患者は該核酸又は核酸含有ベクターに直接曝露され、間接的に行なう場合には、初めに細胞がインビトロにおいて該核酸配列で形質転換され、次いで患者中に移植される。これらの二通りの方法は、それぞれ生体内又は生体外遺伝子治療として知られている。

40

【0212】

ある特定の具体例では、核酸配列は直接生体内に投与され、そこで核酸が発現してコードする産物を生産する。これはこの分野で知られた多くの方法のいずれによっても達成ことができ、例えば、欠損若しくは弱毒レトロウイルス又はその他のウイルスベクターを用いた感染によって(米国特許第4,980,286号を参照のこと)、又は裸のDNAの直接注入によって、又は微粒子照射(例えば遺伝子銃; Biolistic, Dupont)を用いて、又は脂質若しくは細胞表面受容体若しくはトランスフェクト試薬で被覆すること、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル中へ封入することによって、又は核内に入ることが知られているペプチドに連結させて投与することによって、受容体媒介性エンドサイトーシスを受けやすい

50

リガンドに連結させて投与することによって(例えばWu and Wu, J. Biol. Chem ... 262: 4429-4432 (1987)を参照のこと)(該受容体を特異的に発現するタイプの標的細胞に対して用いることができる)等、それらを適当な核酸発現ベクターの一部として構築し、それらが細胞内のものとなるようにそれを投与することによって達成することができる。他の具体例では、核酸 リガンド複合体が形成され、この場合では該リガンドはエンドソームを崩壊させるために融合性ウイルスペプチドを含み、該核酸がリソソームの分解を回避できるようにになっている。さらに他の具体例では、該核酸は、特異的受容体を標的とすることにより、生体内で細胞特異的な取り込み及び発現の標的とされ得る(PCT公開W0 92/06180; W0 92/22635; W092/20316; W093/14188, W0 93/20221を参照のこと)。あるいは、該核酸は、発現させるために細胞内に導入され、相同組換えにより宿主細胞DNA中に組み込まれ得る(Koller and Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); Zijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989))。 10

【0213】

ある特定の具体例では、本発明のsiRNAをコードする核酸配列を含むウイルスベクターが用いられる。例えば、レトロウイルスベクターが用いられ得る(Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)を参照のこと)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの正しいパッケージング及び宿主細胞DNA中への組み込みに必要な成分を含む。遺伝子治療に用いられるべき抗体をコードする核酸配列は、患者体内への該遺伝子の送達を容易にする1以上のベクター中にクローン化される。レトロウイルスに関する詳細はBoesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994)中に見出すことができ、これには、レトロウイルスベクターを用いてmdrl遺伝子を造血幹細胞に送達させ、該幹細胞を化学療法に対しより抵抗性にすることが記載されている。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を例示する他の文献は: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); 及びGrossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114 (1993)である。 20

【0214】

遺伝子治療で用いることができる他のウイルスベクターとしてはアデノウイルスがある。アデノウイルスは、気道上皮に遺伝子を送達させる手段として特に魅力的である。アデノウイルスは天然には気道上皮に感染し、そこで軽度の疾病を引き起こす。アデノウイルスをベースとした送達系の他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、及び筋肉である。アデノウイルスには、非分裂細胞に感染可能であるという利点がある。Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993)には、アデノウイルスに基づく遺伝子治療の概要が述べられている。Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994)には、アデノウイルスベクターを用いてアカゲザルの気道上皮に遺伝子を伝達することが示されている。遺伝子治療においてアデノウイルスを用いるその他の例は、Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); PCT公開W094/12649; 及びWang, et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995)にも見出すことができる。好ましい具体例の一つでは、アデノウイルスベクターが用いられている。 30 40

【0215】

アデノ随伴ウイルス(AAV)も遺伝子治療への使用が提唱されている(Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); 米国特許第5,436,146号)。

【0216】

遺伝子治療の他のアプローチは、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを介するトランスフェクション、又はウイルス感染のような方法によって、遺伝子を組織培養における細胞に伝達することを包含する。通常、伝達方法には、細胞への選択マーカーの伝達が含まれる。該細胞は次いで選択に晒され、伝達された遺伝子を取り込んで発現している細胞が同定される。それらの細胞は次いで患者に送達される。

【0217】

この具体例では、得られる組み換え細胞を生体内に投与する前に、核酸が細胞中に導入される。このような導入はこの分野で公知のいずれの方法によっても行なうことができ、その方法としてはトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、該核酸配列を含むウイルス又はバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体による遺伝子導入、微小核体による遺伝子導入、スフェロプラスト融合などが挙げられるが、これらに限定されない。細胞中への外来遺伝子の導入については、多くの技術がこの分野において知られており(例えばLoeffler and Behr, Meth. Enzymol. 217:599-618 (1993); Cohen et al., Meth. Enzymol. 217:618-644 (1993); Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92m (1985)を参照のこと)、レシピエント細胞の発達及び生理的機能が乱されない限りにおいて、本発明に従い、該技術を用いることができる。該核酸が細胞によって発現可能となり、好ましくは遺伝性でその細胞後代によっても発現可能となるように、該技術は細胞への核酸の安定した伝達をもたらすものであるべきである。

10

【0218】

得られる組み換え細胞は、この分野で公知の種々の方法によって患者に送達することができる。組み換え血液細胞(例えば造血幹又は前駆細胞)は、好ましくは静脈内投与される。使用に想定される細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者によって決定され得る。

【0219】

遺伝子治療の目的で核酸が導入され得る細胞は、いかなる所望の、利用可能な細胞タイプをも包含し、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞；Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球のような血液細胞；種々の幹細胞又は前駆細胞、特に例えば骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓から得られる造血幹又は前駆細胞などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0220】

好ましい具体例の一つでは、遺伝子治療に用いられる細胞は患者の自家性のものである。遺伝子治療に組み換え細胞が用いられる具体例の一つでは、siRNAをコードする核酸配列が細胞又はその後代によって発現されるように細胞中に導入され、次いで治療効果のために生体内に該組み換え細胞が投与される。ある特定の具体例では、幹細胞又は前駆細胞が用いられる。本発明のこの具体例に従い、インビトロで単離及び維持することができるいかなる幹細胞及び/又は前駆細胞をも用いることができる可能性がある(例えばPCT公開WO 94/08598; Stemple and Anderson, Cell 71:973-985 (1992); Rheinwald, Meth. Cell Bio. 21A:229 (1980); 及びPittelkow and Scott, Mayo Clinic Proc. 61:771 (1986)を参照のこと)。

30

【0221】

ノックアウト動物

他の局面では、本発明は、内生のGPR91受容体タンパク質にヘテロ接合又はホモ接合の破損を有するゲノムを含み、生物学的に機能的なGPR91受容体タンパク質の発現が抑制又は妨害されているノックアウト動物を提供する。好ましくは、本発明のノックアウト動物は、内生のGPR91受容体遺伝子中にホモ接合の破損を有する。好ましくは、本発明のノックアウト動物はマウスである。該ノックアウト動物は、当業者に公知の技術を用いて容易に作製することができる。遺伝子破壊は、ポリペプチドコード配列のいずれかの部分中に停止コドンを導入して生物学的に不活性のポリペプチドを生じさせること、プロモーター又は他の制御配列中に変異を導入してポリペプチドの発現を抑制又は妨害すること、外来配列を該遺伝子中に挿入し該遺伝子を不活化させること、及び該遺伝子から配列を欠失させることを包含する幾通りかの方法で達成することができる。

40

【0222】

哺乳動物生殖系列中に特異的なDNA配列を導入し、各後代へのこれらの配列(導入遺伝子)の安定した伝達を達成するための幾通りかの技術が利用可能である。最も一般的に用いられる技術は、受精卵母細胞の前核中へのDNAの直接的なマイクロインジェクションである。これらの卵母細胞に由来するマウス又は他の動物は約10ないし20%の頻度でトラ

50

ンスジェニック創始者となり、該創始者は育種を経て異なるトランスジェニックマウス系統を生じる。特にマウスのような動物で、胚操作及びマイクロインジェクションを経てトランスジェニック動物を産生する方法は、例えば米国特許第4,736,866号、第4,870,009号、及び第4,873,191号並びにHogan, B., Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)にあるように、この分野で常法となってきた。他のトランスジェニック動物の産生のために、同様な方法が用いられる。

【0223】

胚性幹細胞(「ES細胞」)技術を用いて、特異的に欠失した遺伝子を有するノックアウトマウス(及び他の動物)を作り出すことができる。インビトロで培養し遺伝子改変することができる全能性の胚性幹細胞は、マウス胚と凝集され又はマウス胚中に注入され、子孫に該遺伝的改変を伝達することができるキメラマウスを生み出す。定方向の育種を経て、この遺伝子を欠失したマウスを得ることができる。幾通りかの他の方法を利用して遺伝子改変動物を産生することもでき、例えば、細胞質内精子注入法(ICSI)を用いてトランスジェニックマウスを産生することができる。この方法では、未受精の卵母細胞の細胞質中に精母細胞の頭部をマイクロインジェクションし、卵母細胞の受精及び次いで起こる着床前胚の適切な卵割の活性化を誘発することが必要とされる。このようにして得られたマウス胚は、偽妊娠した受容雌に移植される。該雌は同腹のマウスを産むだろう。トランスジェニックマウス産生に適用されるICSIでは、精子又は精母細胞の頭部懸濁液が所望のDNA分子(導入遺伝子)を含む溶液と共にインキュベートされる。これらは、ひとたびマイクロインジェクションされれば外来DNAの担体媒体として働く精子と相互作用する。いったん卵母細胞の内部に入れば、該DNAはゲノム中に組み込まれ、トランスジェニックマウスを生じる。この方法は、従来の前核マイクロインジェクションプロトコルを用いて今まで得られた収率よりもトランスジェニックマウスの収率が高い(80%以上)。

【実施例】

【0224】

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

【0225】

実施例1

マスト細胞差次的に発現されるGPR91の同定

マイクロアレイ技術を用いて、マスト細胞、THP1及びPBMC間で遺伝子発現の定量的比較を行ない、THP1及びPBMCと比較してマスト細胞中で優先的に発現(>2.5倍)している遺伝子を同定した。

【0226】

20% FBS (Sigma-Aldrich, ミズーリ州St. Louis)、2 mM L-グルタミン、50 μ M 2-ME、100 U/mlペニシリン、100 μ g/mlストレプトマイシン、1 μ g/ml ゲンタマイシン、80 ng/ml SCF、50 ng/ml IL-6及び5 ng/ml IL-10を添加したRPMI1640 (Invitrogen) からなる培地中で、ヒト臍帯血CD34⁺細胞(Bio-Whittaker, メリーランド州Walkersville)を9週まで培養した。細胞懸濁液を5 \times 10⁵個/mlの濃度で接種し、サイトカイン添加培地を週1回交換した。組み換えヒトIgEを用いてIgE架橋実験を行なった。他の細胞株はATCCの推奨に従って培養した。

【0227】

CD14及びCD15発現細胞に対し免疫磁気ビーズ(Dynal)を用いて細胞を枯渇させ、8週目に残存する細胞を収集した。PBMC細胞は、アマシャムのFicoll-Paqueリンパ球単離方法に基づき、勾配遠心分離によって健全ドナー血から単離した。ヒトTHP1細胞は10% FBSを含むRPMI1640培地中で培養した。製造者の指示書に従い、Qiagen Total RNA isolation kitを用いてこれらの細胞タイプのそれぞれからRNAを単離した。

【0228】

10

20

30

40

50

Affymetrixの発現アッセイサービスを用いて、GeneChip発現解析を行なった。Affymetrixのスタンダードアレイ(GeneChip Human Genome U133セット)は、33,000個のヒト遺伝子よりも多い39,000個以上の転写変異体を網羅する、100万個以上のユニークなオリゴヌクレオチドを含む2つのマイクロアレイからなる。

【0229】

マスト細胞、THP-1、及びPBMC培養物のそれぞれから得られた高品位の全RNAを用いてピオチン標識cRNAを得た。該全RNA試料中に存在するポリ(A)RNAを用いて逆転写により一本鎖cDNAを合成し、次いで二本鎖cDNAに変換した。ピオチン化UTP及びCTPの存在下でインビトロ転写反応を行ない、ピオチン標識cRNAを生産した。次いで熱及びMg²⁺の存在下でcRNAを断片化した。標的品位及び標識効率を評価するため、各細胞タイプ由来の断片化cRNAをテストアレイにハイブリダイズした。次いで該テストアレイを洗浄し、ストレプトアビジン フィコエリトリンで染色し、GeneArrayスキャナーを用いて走査した。ハウスキーピング遺伝子の3'/5'比、スパイクコントロールcRNA配列、ノイズ(Q値)、スケールングファクターなどのようなクオリティーコントロールパラメータを用いて画像を解析した。評価後、cRNAを45℃にて16時間、U133スタンダードアレイにハイブリダイズした。次いで該アレイを洗浄し、ストレプトアビジン フィコエリトリンで染色し、GeneArrayスキャナーを用いて走査した。Affymetrix MAS 5.0ソフトウェアを用いて黑白画像から得られた発現データを抽出し、アレイ上の各転写物について、統計的アルゴリズムを用いて量的な値(シグナル強度)及び質的な値(存在するか否か)を算出した。

【0230】

マスト細胞、PBMC及びTHP-1細胞間でのヒトGeneChipマイクロアレイデータの比較分析により、機能未知のGタンパク質結合受容体(GPCR)がインビトロ培養された初代マスト細胞中で高発現しているが、PBMC及びTHP-1細胞中では低レベルでしか発現していないということが示された。

【0231】

データベース比較により、このGPCR(GenBank accession no. NM 348078, BC030948, AF348078, AC068647 及び他の相同配列)が GPR91と名付けられたことが明らかになった。

【0232】

公共のGenBankデータベースに対するBLAST配列相同性検索により、GPR91はP2Yプリン受容体、GPR80(GPR99)、及びシステニルロイコトリエン受容体に対する有意な相同性を有することが明らかとなった。例えば、コンピュータアルゴリズムDNAStarを用いたペアワイズ比較により、GPR91はGPR80に対し37.3%のアミノ酸配列同一性を、P2Y受容体ファミリーの6つの公知のメンバーに対し29.9%ないし35.7%のアミノ酸配列同一性を、そしてシステニルロイコトリエン受容体CysLT1及びCysLT2に対しても29.3%ないし31.6%の配列同一性を有していることが示された。Gタンパク質に対するGPR91の結合特異性予測により、それはG_{q/11}サブタイプとの相互作用に關与する可能性が最も高いことが示された。この予測は、受容体 Gタンパク質相互作用の特異性が受容体の細胞内ドメインによって制御されているという知見に基づいた。特定の機能クラスのGタンパク質との結合に關し特異的なGPCR配列の細胞内ドメイン中のアミノ酸残基のパターンを発見するため、パターン発見と膜トポロジー予測を組み合わせたデータマイニングアプローチを用いた。

【0233】

実施例 2

GPR91 mRNA発現のリアルタイム定量PCR解析

Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Inc.)を用いた選択に従い、GPR91ヌクレオチド配列から2つのオリゴヌクレオチドプライマー:

5'TACTGCTCTGCCCTTGAAAA-3' (配列番号4) 及び

5'ACCACTGCCATGATGACCAA-3' (配列番号5),

を合成し、次いでこれを用いてGPR91の発現をモニターした。

【0234】

リアルタイム定量PCRは、製造者の指示書に従い、CYBRグリーン試薬を用いてABI Pr

10

20

30

40

50

ism 7900 (Applied Biosystems, Inc.)により行なった。全RNAを単離し、以下に挙げる細胞中のGPR91 mRNAレベルを測定した：Daudi (パーキットリンパ腫由来のBリンパ芽球細胞株、ATCC No. CCL-213), THP-1 (単球性白血病細胞株、ATCC No. TIB202), HMC-1, (マスト細胞株); 末梢血単核球 (PBMC); 初代単球; 初代B細胞; 初代好中球; 第8 - 9週のインビトロ培養マスト細胞。脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓、胸腺及び気管由来の第一鎖cDNAはDB Bioscience Clontech (Palo Alto, CA)から得た。

【0235】

上記した細胞由来のRNAそれぞれの等量を逆転写反応に用いて第一鎖cDNAを生成し、これを定量PCR反応の鋳型として用いて閾値増幅サイクル(C_t)を得た。該 C_t は18S RNA由来のコントロール C_t を用いて標準化し、 C_t を得た。異なる細胞及び組織におけるGPR91の遺伝子発現の相対レベルを比較するため、最も低い発現レベルをベースとして用いることにより C_t 値を算出し、次いでこれを相対的な発現の差の値に変換した。定量RT-PCR解析により、GPR91 mRNAはヒトマスト細胞中で最も高いレベルで発現しており、腎臓、脾臓、THP-1、及びPBMC中では中程度のレベルで発現していることが示された(表1)。

【0236】

【表1】

定量RT-PCRによって評価したGPR91 mRNAの発現プロファイル		
組織/細胞	Ct	相対発現
脳	30.5	119.2
心臓	29.1	318.9
腎臓	24.3	8321.1
肝臓	29.9	167.1
肺	31.4	63.2
脾臓	27.1	1144.8
胸腺	30.3	130.4
気管	29.4	250.1
HPB-A11	33.4	24.7
単球	33.9	14.0
単球 (6/20/02)	33.0	38.4
PBMC (9/28/01)	29.2	409.4
PBMC (5/9/02)	29.6	306.1
好中球 (5/9/02)	30.5	170.1
好中球 (6/20/02)	31.1	138.3
マスト細胞1898 (6/10/02)	22.9	32690.5
マスト細胞 2128 (5/9/02)	23.1	27220.5
THP-1	25.9	3835.2
Daudi	31.3	91.2
HMC-1	37.9	1.0

【0237】

実施例3

GPR91の発現構築物

PCRによりマスト細胞RNAからGPR91のコード配列(配列番号1)を増幅し、pcDNA3.1TOPO (Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad)中にクローン化した。GPR91発現構築物の配列はNM_348078, BC030948, AF348078, 及びAC068647 (GenBank Accession Number)と同一であることが検証された。多くの変異GPR91発現構築物は、コード領域の種々の部位にエピトプタグを挿入することにより構築した。挿入変異体のうちの一つGPR91-20Flag(配列番号3)は、GPR91 ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて野生型GPR91よりも非常

に強い活性を示した(表2)。この恒常的活性変異体は、下流のシグナル伝達及び遺伝子活性化を解明するのに有用であることが証明された。該構築物GPR91-20FlagはPCR S0Eing (Ho et al., 1989 Gene 77:51-59; Horton et al., 1990 Biotechniques 8:528-535)によって生成されたものであり、最初の20アミノ酸残基の後ろに挿入されたFlagタグ配列を含む(配列番号3及び配列2)。

【0238】

【表2】

Lucレポータープラスミドと共にトランスフェクトされた野生型及びタグ付きGPR91発現構築物のルシフェラーゼアッセイ						
ルシフェラーゼレポーター	pcDNA3.1		GPR91		GPR91-20Flag	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
TA-Luc	0.414	0.307	0.903	0.421	1.667	0.096
NFAT-Luc	3.501	2.621	90.303	20.012	435.213	23.351

10

【0239】

実施例4

GPR91によるNFAT及びAP1シグナル経路の活性化

ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、GPR91により活性化される細胞内シグナル経路を調べた。一過的トランスフェクションは、リポフェクタミン2000システム(Invitrogen, カリフォルニア州Carlsbad)を用いて行なった。ウエスタンブロット解析のため、100mm組織培養皿中で20マイクログラムのプラスミドDNAを293T細胞中にトランスフェクトした; 40時間後、該細胞をPBSベースの酵素フリー細胞解離バッファー(Invitrogen)中で収集し、以下の項に記載する通り処理した。ルシフェラーゼレポーターアッセイのため、Mercury Pathway Profilingレポータープラスミドと共に、又はマスト細胞活性化をモニターするためにルシフェラーゼレポータープラスミド(DB BioScience Clontech, カリフォルニア州Palo Alto)及びコントロールルシフェラーゼプラスミドpRL-SChAと共に、GPR91発現構築物をHMC-1細胞中に共トランスフェクトした。該細胞は40時間後に収集し、製造者のプロトコールに従いデュアルルシフェラーゼアッセイキット(Promega, ウィスコンシン州Madison)を用いてルシフェラーゼ活性を分析した。

20

30

【0240】

マスト細胞の活性化をモニターするためのホタルルシフェラーゼレポーター構築物は、ヒトIL8, IL13, TNF- α , トリプターゼ 1, トリプターゼ 2, Fc γ RI 由来のPCR増幅プロモーター配列及び遺伝子を、プロモーターを持たないルシフェラーゼレポータープラスミドベクターTA-Luc (DB Bioscience Clontech)中に挿入することによって生成した。該プロモーターは、免疫応答において重要な役割を果たしていることを理由に選択した。

【0241】

分析に用いたMercury Pathway Profiling ルシフェラーゼレポーター (DB BioScience Clontech)のうち、ルシフェラーゼレポーターNFAT-Luc及びAP1-Lucは、独立した二回の実験においてGPR91野生型によりそれぞれ約20倍及び約5倍に活性化されていた(表3)。挿入変異構築物GPR91-20Flagでは、NFAT-Lucの非常に強い活性化が認められ、GPR91の3倍を超える高い活性を示していた(表2)。これらの結果は、ヒトマスト細胞、HMC-1の安定なラインにおけるGPR91の発現が、転写因子NFAT及びAP1を経て媒介される細胞内シグナル経路を活性化するというを示している。GPR91が、細胞内カルシウム流動を経て媒介される、カルシニューリン及びGPR91の活性化へ続くシグナル経路を活性化することを確認するため、周知のカルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンAがGPR91によるNFAT活性化を阻害し得るか否かを調べた。表4に示されるとおり、NFAT-Lucレポーターに対するGPR91の刺激作用は、マイクロモル濃度又はマイクロモル濃度未満のシクロスポリンAにより82 - 87%減少した。これらのことより、GPR91は細胞内カルシウム流動及びカルシ

40

50

ニューリン活性化を経て転写因子NFATを活性化するということがいえる。該プロセスはGPR91がG_q/11 (又はq/11様の)サブユニットを取り込むことで開始し得、次いでこれによりGタンパク質及びホスホリパーゼC_βが活性化されて細胞内カルシウム流動が引き起こされる。

【0242】

【表3】

		ルシフェラーゼレポータープラスミド						
		TA-Luc	NFκB	NFAT	GAS	STAT3	AP1	Myc
pcDNA3.1	平均	0.59	2.89	4.98	25.59	16.32	3.23	10.23
	標準偏差	0.39	0.25	3.42	7.71	4.98	0.41	6.35
GPR91野生型	平均	1.21	5.28	100.5	30.37	14.27	16.99	9.09
	標準偏差	0.36	0.45	6.65	5.7	0.27	1.31	3.89

10

【0243】

【表4】

シクロスポリンAによるGPR91活性の阻害					
シクロスポリンA		GPR91 + NFAT-Luc,			pcDNA3.1+ NFAT-Luc
		0 uM	0.5 uM	1 uM	
平均	99.98	20.29	23.85	22.08	8.09
標準偏差	15.45	0.90	4.35	6.33	1.07

20

【0244】

実施例5

GPR91はサイトカイン及びトリプターゼプロモーター活性を高める

サイトカインの分泌及びトリプターゼの放出はマスト細胞の活性化を証明するものであり、該放出されたタンパク質のデノボ合成の増大により生じる。GPR91がトリプターゼ及びサイトカインのデノボ合成及びプロモーター活性化に及ぼす影響を調べるため、トリプターゼ₁、トリプターゼ₂、IL8、IL13、TNF_α、FcγRI₁及びプロモーターを含むホタルルシフェラーゼレポーターを用いて、HMC-1細胞中で一過的トランスフェクションルシフェラーゼアッセイを行なった。その結果(表5)、GPR91-20Flagで共トランスフェクトした場合には、ベクターpcDNA3.1と共トランスフェクトした場合と比べて、IL8及びIL13ルシフェラーゼレポーター活性は最大6.5ないし7.2倍まで増大し、TNF_α、トリプターゼ₁及び₂ルシフェラーゼレポーター活性は最大2.5ないし3.5倍まで増大することが示された(表5)。

30

40

【0245】

【表 5】

GPR91-20Flagによるトリプターゼ及びサイトカイン遺伝子プロモーターの活性化についてのルシフェラーゼレポーターアッセイ				
ルシフェラーゼレポーター	pcDNA3.1		GPR91-20Flag	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差
TA-Luc	0.805	0.021	1.662	0.163
Fc ϵ R1 α	5.407	2.144	5.863	0.287
TRP β 1	32.144	8.839	83.755	18.584
TRP β 2	9.062	0.834	26.555	1.474
IL8	9.751	4.130	64.308	15.806
IL-13	3.603	26.043	26.043	8.409
TNF α	18.622	5.783	64.352	12.258

10

20

【0246】

実施例 6 : GPR91リガンドをスクリーニング及び同定するための方法

GPR91に対するリガンドをスクリーニングする又は同定するために用いられ得る多くの方法がある。これらの方法は、リガンドのGPR91への結合により引き起こされる細胞内カルシウム流動又はG サブユニットへのGTPの結合のいずれかを測定する方法に基づいている。これらの方法について以下に簡潔に記載する：

【0247】

A . GPCRへのリガンド結合についてのカルシウムイメージングアッセイ

細胞(例えばCHO、293T及びNIH3T3)を候補GPCRで一過的又は安定的にトランスフェクトし、ハイスループット細胞培養プレート(96又は384ウェル)中に播種した。次いで、4-(6-アセトキシメトキシ-2,7-ジクロロ-3-オキソ-9-キサントニル)-4'-メチル-2,2'-(エチレンジオキシ)ジアニリン-N,N,N',N'-四酢酸テトラキス(アセトキシメチル)エステル (Fluo 3-AM)又はフラ-2ペンタキス(アセトキシメチル)エステル(Fura 2-AM)のようなカルシウム感受性の蛍光色素指示薬を細胞に与えた。細胞培養ウェルに化合物を加えた後、蛍光イメージングプレートリーダー(FLIPR)又は他の蛍光シグナル検出装置により蛍光シグナルを測定することができた(参考文献：J. Biol. Chem. 2001, 276: 8608-8615; J. Biomol. Screening 2002, 7: 233-246)。

30

【0248】

B . GPCRへのリガンド結合についての黒色素胞アッセイ

黒色素胞とは色素顆粒(メラノソーム)を含むアフリカツメガエル細胞であり、細胞質中のその移動はGPCR活性並びにcAMP及びジアシルグリセロールのセカンドメッセンジャーレベルにより影響を受ける。GPCRがリガンドによって活性化されると、Gq又はGsが活性化され得、それによりメラノソームの細胞全体への迅速な拡散が引き起こされ細胞が暗く見えるようになる。アフリカツメガエルのメラノソームは、GPR91でトランスフェクトし、アゴニスト化合物処理に付すことができる。メラノソームの移動及び細胞の色変化は、マイクロプレートリーダー又はビデオイメージングシステムによって検出することができる(参考文献：J. Biol. Chem. 1993, 268: 5957-5964; J. Biol. Chem. 1999, 274: 8597-8603)。このスクリーニング技術はPCT W092/01810中に記載されており、引用によって組み込まれる。

40

【0249】

50

C. GPR91へのリガンド結合についてのエクオリンアッセイ

細胞(例えばCHO、293T及びNIH3T3)をGPR91及びエクオリン発現プラスミドで一過的に又は安定的に共トランスフェクトし、エクオリンの補因子であってアポエクオリンと相互作用してエクオリンを形成するセレンテラジンと共にインキュベートする。トランスフェクト細胞がアゴニスト化合物で刺激されると、細胞内カルシウムレベルの増大に応答してエクオリンが光を放出するので、これをルミノメータで検出することができる(参考文献: Cell Calcium 1993, 14: 663-671; Analytical Biochem. 1993, 209: 343-347;)

【0250】

D. GPR91へのリガンド結合についてのグアニンヌクレオチド交換アッセイ

GDPと結合した不活性状態のGタンパク質のサブユニットは、原形質膜を標的とするサブユニットと強固に会合する。GPR91へのリガンドの結合は、グアニンヌクレオチド交換により、サブユニットをGPR91に取り込まれるGTP結合状態へと変換して、ヘテロ三量体のGタンパク質の活性化を引き起こす。該反応は、GPR91及びリガンドの相互作用を評価するために用いられて十分に実証された。簡潔には、特異的なGPCRでトランスフェクトした細胞の膜画分を単離し、35S-GTP S(グアノシン5'-3-O-(チオ)三リン酸)又はEu-GTP (PerkinElmer Life Science)のような標識GTPと共にインキュベートした。洗浄後、膜画分中のGPCRに結合したGTPは、フィルター結合アッセイにより測定し、放射活性シンチレーションカウンター又は蛍光プレートリーダーにより検出した(参考文献: J. Biol. Chem. 2002, 277: 31459-31465; J. Biol. Chem. 1990, 265: 18707-18712)。

【0251】

E. GPCRへのリガンド結合についての転写因子(NFAT)に基づくレポーターアッセイ

T細胞中の活性化の核因子(NFAT)は、GPR91へのアゴニストの結合及びそれに続くカルシウム流動によって活性化され得る(参考文献: Cell 2002, 109: S67-S79; Ann. Rev. Immunol. 1997, 15: 707-747)。NFATがルシフェラーゼ(DB BioSciences Clontech, カリフォルニア州Palo Alto)、 β -ラクタマーゼ又は緑色蛍光タンパク質(DB BioSciences Clontech, カリフォルニア州Palo Alto)のようなレポーター系に連動していれば、この特徴を利用してリガンド又はアゴニスト化合物のスクリーニングをすることができる(参考文献: Yang J. et al. 2003, J. Biol. Chem. 278, 印刷中)。

【0252】

F. GPR91へのリガンド結合についてのカリウム依存電流アッセイ

アフリカツメガエル卵母細胞(又は哺乳動物筋細胞)は、GPCR及びカリウムチャンネル(Kir3.1-3.4)をコードするRNAをマイクロインジェクションすることができる。リガンドが卵母細胞表面上で発現されるGPCRと結合する場合、GPCRは活性化され、その結果、ヘテロ三量体Gタンパク質からのGサブユニットの放出及びそれに続きカリウムチャンネルの活性化が引き起こされる。電流は静電記録器により記録することができる(参考文献: Nature 2001, 409: 202-205; J. Biol. Chem. 2000, 275: 30531-30536; J. Biol. Chem. 1995, 270: 29059-29062)。

【0253】

G. タイトル

他の方法は、GU15(Wilkie T. M. et al Proc Natl Acad Sci USA 1991 88: 10049-10053)、GU16(Amatruda T. T. et al Proc Natl Acad Sci USA 1991 8: 5587-5591、並びにGgi5, Gqs5, 及びGgo5と呼ばれる3種のキメラGタンパク質(Conklin B R et al Nature 1993 363: 274-276, Conklin B. R. et al Mol Pharmacol 1996 50: 885-890)をコードする哺乳動物発現プラスミドcDNAを含む混合物と共に、GPR91をコードする哺乳動物発現プラスミドでHEK-293細胞を共トランスフェクトすることを含む。24時間インキュベート後、トランスフェクトHEK-293細胞をポリ-D-リジン被覆96ウェル黒色/透明プレート(Becton Dickinson, Bedford, Mass.)中に平板培養させる。

【0254】

該細胞は、被検リガンド添加後のカルシウム動員応答について、FLIPR (Fluorescent Imaging Plate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.)上で分析される。任意の

10

20

30

40

50

GPR及びGタンパク質混合物を発現するHEK-293細胞中のカルシウム動員を刺激するリガンドの同定に基づき、機能的な応答のために必要とされるGタンパク質があるならばそれを測定するためにその後の実験を行なう。次いで、HEK-293細胞をGPR91でトランスフェクトし、又はGPR91及びG015, GD16, GqiS, Gqs5, 若しくはGqo5で共トランスフェクトする。GPR91がHEK-293細胞中で機能的に発現するためにGタンパク質のうちの一つの存在を必要とする場合は、最も良好な応答を与えるGタンパク質で共トランスフェクトされたHEK-293細胞を用いて、その後の全ての実験を行なう。あるいは、付加的なGタンパク質を用いずに、例えばRBL-2H3のような異なる細胞株中で該受容体を発現させることもできる。

【0255】

実施例7：GPR91を通じたマスト細胞中でのコハク酸塩刺激カルシウム流動

10

近年、GPR91をトランスフェクトされた293細胞はコハク酸塩によって活性化され得る事が証明された(He, W. et al. 2004, Nature 429:188-193)。従って、コハク酸塩をリガンドとして用いて、GPR91を通じたマスト細胞の活性化を調べた。この実験には、3つのタイプのヒトマスト細胞HMC-1、LAD2()、及びCBMC(臍帯血由来マスト細胞)を用いた。表6に示されるとおり、半定量的なゲルベースのRT-PCRアッセイを用いたところ、GPR91はLAD2及びCBMC細胞中で発現が高かったが、HMC-1細胞中では高くなかった。

【0256】

【表6】

マスト細胞におけるGPR91 mRNAレベルのRT-PCR解析	
マスト細胞	GPR91発現
HMC-1	—
LAD2	++++
CBMC	+++++

20

【0257】

カルシウム流動アッセイは、市販のCalcium 3 Assay kit及びFlexStation II(Molecular Devices, カリフォルニア州Sunnyvale)を用いて行なった。その結果、コハク酸塩がLAD2細胞中で濃度依存的にカルシウム流動を刺激することが示され、50%活性化レベル(EC50)の有効濃度は約180 μ Mと算定された(表7)。同様に、コハク酸塩はCBMC中でカルシウム流動を誘導した(データ示さず)。対照的に、コハク酸塩はHMC-1細胞中ではいかなるカルシウム流動も生じさせず(表7)、これは該細胞中でGPR91の発現が欠失しているためであると考えられた。これらの知見は、コハク酸塩はマスト細胞中でGPR91に媒介されるシグナル経路を経てカルシウム流動を活性化するというを示している。

30

【0258】

LAD2及びHMC-1細胞におけるコハク酸塩処理に応答したカルシウム流動ピーク値		
コハク酸塩、 μM	LAD2	HMC-1
0	5339	332
1	4510	296
3	5456	269
10	6387	241
30	11505	199
100	19445	390
300	36679	444
1000	49451	264
3000	51626	210

10

20

【配列表】

2007526747000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成18年3月20日(2006.3.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体を含むGPR91受容体の調節因子。

【請求項2】

GPR91の活性を変調し、a. 配列番号2、又はb. 配列番号2と少なくとも70%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドと特異的に結合する抗体。

【請求項3】

前記抗体がGPR91のアゴニストである請求項2記載の抗体。

【請求項4】

前記抗体がGPR91のアンタゴニストである請求項2記載の抗体。

【請求項5】

前記抗体がポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、ヒト、二重特異性、又はヘテロ結合抗体である請求項2記載の抗体。

【請求項6】

請求項2記載の抗体と、1又は2以上の薬剤的に許容されるアジュバント、担体、賦形剤、及び希釈剤とを含む、マスト細胞に関連する疾病の予防及び治療に有用な組成物。

【請求項7】

GPR91とそのリガンドとの結合を妨害し得る配列番号2又はその断片を含むGPR91受容体

の調節因子。

【請求項 8】

GPR91のアゴニストである請求項 7 記載の調節因子。

【請求項 9】

前記抗体がGPR91のアンタゴニストである請求項 7 記載の調節因子。

【請求項 10】

請求項 7 記載のペプチドと、1又は2以上の薬剤的に許容されるアジュバント、担体、賦形剤、及び希釈剤とを含む、マスト細胞に関連する疾病の予防及び治療に有用な組成物。

【請求項 11】

GPR91の発現を変調し得るSiRNAを含むGPR91受容体の調節因子。

【請求項 12】

GPR91のアゴニストである請求項 11 記載の調節因子。

【請求項 13】

GPR91のアンタゴニストである請求項 11 記載の調節因子。

【請求項 14】

GPR91受容体調節因子を含有するマスト細胞媒介性疾病の予防及び/又は治療剤。

【請求項 15】

前記GPR91受容体調節因子がGPR91アゴニストである請求項 14 記載の予防及び/又は治療剤。

【請求項 16】

前記GPR91受容体調節因子がGPR91アンタゴニストである請求項 14 記載の予防及び/又は治療剤。

【請求項 17】

前記マスト細胞媒介性疾病がアレルギー性喘息である請求項 14 記載の予防及び/又は治療剤。

【請求項 18】

前記調節因子が抗体、ペプチド又はSiRNAである請求項 14 記載の予防及び/又は治療剤。

【請求項 19】

マスト細胞を殺傷するためのエフェクター機能を含む抗GPR91受容体抗体を含有する、マスト細胞媒介性疾病の予防及び/又は治療剤。

【請求項 20】

前記エフェクター機能が抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)である請求項 19 記載の予防及び/又は治療剤。

【請求項 21】

マスト細胞中でアポトーシスを誘導するためのアポトーシス誘導成分と結合させた抗GPR91受容体抗体を含有する、マスト細胞媒介性疾病の予防及び/又は治療剤。

【請求項 22】

前記アポトーシス誘導成分がBax、Bak、Bcl-X_s、Bad、Bid、Bik、Erk、及びBokから選ばれるBcl-2ファミリーのプロアポトーシスメンバーである請求項 21 記載の予防及び/又は治療剤。

【請求項 23】

a. 配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含むトランスフェクト細胞を調製し；

b. GPR91受容体活性を変調する能力を測定することが求められている少なくとも1つの化合物にトランスフェクト細胞を接触させ；

c. 該受容体の活性を変調する化合物について前記細胞をモニターすることを含む、GPR91受容体活性を変調する化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 24】

前記細胞が安定的にトランスフェクトされる請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

前記細胞が一過的にトランスフェクトされる請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 6】

前記細胞がマスト細胞である請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 7】

前記化合物がアゴニストである請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 8】

前記化合物がアンタゴニストである請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 9】

前記化合物が抗体である請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 3 0】

カルシウム流入の量がモニターされる請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 3 1】

前記工程 (a) で用いられる細胞がレポータータンパク質をコードするDNAをさらに含み、前記DNAがGPR91応答性の転写要素と動作的に連結している請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 3 2】

前記受容体タンパク質のシグナル伝達活性を阻害する能力を測定することが求められている漸増する濃度の少なくとも1つの化合物の存在下で前記工程 (b) が行なわれる請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 3】

前記工程 (c) が、前記細胞中で前記化合物の濃度の関数としてレポータータンパク質の発現レベルをモニターすることにより、前記化合物のシグナル伝達活性を阻害する能力を示すことを含む、請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 4】

前記GPR91応答性の転写要素がcAMP応答性の転写要素である請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 5】

(a) GPR91受容体を発現する細胞を候補化合物と接触させ、(b) 細胞応答を分析し、及び(c) 該細胞応答を候補化合物の非存在下でもたらされる標準の細胞応答と比較することを含む方法であって、それによって、標準よりも増大した細胞応答により前記化合物がアゴニストであることが示され、標準よりも減少した細胞応答により前記化合物がアンタゴニストであることが示される、GPR91活性のアゴニスト又はアンタゴニストをスクリーニングする方法。

【請求項 3 6】

請求項 2 3 又は請求項 3 5 の方法によって同定された化合物。

【請求項 3 7】

a. マスト細胞媒介性の疾患を有している疑いのある哺乳動物から分離された試料を、検出可能な量の抗GPR91抗体と共にインキュベートし；

b. 結合した抗体の量を測定し；

c. 疑いのある試料中の結合した抗体の量を健常なコントロールと比較することを含む、哺乳動物におけるマスト細胞媒介性の疾患の検出方法。

【請求項 3 8】

抗GPR91抗体を含む、GPR91に関連する疾病又は疾患の診断用キット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 2 5 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 2 5 8】

【表 7】

LAD2及びHMC-1細胞におけるコハク酸塩処理に反応したカルシウム流動ピーク値		
コハク酸塩、 μM	LAD2	HMC-1
0	5339	332
1	4510	296
3	5456	269
10	6387	241
30	11505	199
100	19445	390
300	36679	444
1000	49451	264
3000	51626	210

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/20296
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 38/00, 39/395; G01N 33/567 US CL : 424/143.1; 435/7.21; 514/2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/143.1; 435/7.21; 514/2 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/0086822 A1 (ROSEN et al.) 04 June 2002 (04.06.2002), SEQ ID NO:45, paragraphs 0217, 0224-0227, 0290, 0385, 0388 and 1329.	1-25
X	WO 00/31258 A2 (ARENA PHARMACEUTICALS, INC.) 02 June 2000 (02.06.2000), SEQ ID NO:36, residues 5 to 334, pages 8 to 16.	1-13
Y	WITTENBERGER et al. An Expressed Sequence Tag (EST) Data Mining Strategy Succeeding in the Discovery of New G-Protein Coupled Receptors. Journal of Molecular Biology. 2001, Vol. 307, pages 799-813, see especially pages 803 to 806.	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> Sec patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 03 February 2005 (03.02.2005)		Date of mailing of the international search report 02 MAR 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer John D. Olm Telephone No. 571-272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/20296

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b 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. type of material

a sequence listing

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

in written format

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

contained in the international application as filed

filed together with the international application in computer readable form

furnished subsequently to this Authority for the purposes 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/US04/20296

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
Geneseq, PIR-79, UniProt, Issued Patents, Published Applications.
Searched for: SEQ ID NO:2

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 17/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/10	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 17/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/04	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	C 1 2 P 21/08	
	C 0 7 K 19/00	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, M

A, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 フ・グアンファイ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19428 コンショホケン、ナンバー49、バトラー パイク 1801

(72)発明者 ヤオ・ツェンビン

アメリカ合衆国 テキサス州 77479 シュガーランド、ウェザーストーン サークル 5230

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA40 DA36

4B024 AA01 AA11 BA63 CA02 CA11 CA20 EA04 GA13 HA17

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ53 QQ89 QR77 QR80 QS25 QS36
QX02

4B064 AG27 CA20 CC24

4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 MA13 MA16

MA22 MA23 MA24 MA31 MA34 MA35 MA37 MA38 MA43 MA52

MA56 MA60 MA66 NA14 ZA022 ZA332 ZA342 ZA362 ZA512 ZA532

ZA552 ZA592 ZA662 ZA682 ZA752 ZA812 ZA892 ZA962 ZB052 ZB072

ZB082 ZB112 ZB132 ZB152 ZB212 ZB262 ZB272 ZB332 ZC062 ZC552

4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41

BB43 BB44 CC02 CC04 CC05 CC13 CC22 CC23 FF02 FF03

FF17 FF20 FF24 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08

GG10

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA02 ZA33 ZA34 ZA36

ZA51 ZA53 ZA55 ZA59 ZA66 ZA68 ZA75 ZA81 ZA89 ZA96

ZB05 ZB07 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB21 ZB26 ZB27 ZB33

ZC06 ZC55

4H045 AA11 AA40 DA75 EA20 EA50

专利名称(译)	人肥大细胞表达膜蛋白		
公开(公告)号	JP2007526747A	公开(公告)日	2007-09-20
申请号	JP2006517621	申请日	2004-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	唐纳士公司		
申请(专利权)人(译)	Tanokkusu公司		
[标]发明人	リカン ワンシェンウー フグアンファイ ヤオツエンビン		
发明人	リ・カン ワン・シェン・ウー フ・グアンファイ ヤオ・ツエンビン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12Q1/02 C12Q1/68 A61P43/00 A61K38/00 A61K48/00 A61K31/7105 A61K39/395 A61P37/08 A61P11/06 A61P29/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P1/04 A61P17/00 A61P19/02 A61P37/06 A61P37/02 A61P17/06 A61P35/00 A61P7/06 A61P7/04 A61P5/14 A61P3/10 A61P13/12 A61P1/16 A61P31/14 A61P31/20 A61P31/18 A61P35/02 A61P17/10 A61P15/08 A61P31/04 A61P27/02 A61P7/00 A61K39/39 A61P17/04 A61P9/00 A61P25/00 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 C12P21/08 C07K19/00 C07K14/705 C12N G01N33/567		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/10 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 C07K14/705		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12Q1/02 C12Q1/68.A A61P43/00.105 A61K37/02 A61K48/00 A61K31/7105 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P37/08 A61P11/06 A61P29/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P1/04 A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P37/06 A61P37/02 A61P17/06 A61P35/00 A61P7/06 A61P7/04 A61P5/14 A61P3/10 A61P13/12 A61P1/16 A61P31/14 A61P31/20 A61P31/18 A61P35/02 A61P17/10 A61P15/08 A61P31/04 A61P27/02 A61P7/00 A61K39/39 A61P17/04 A61P9/00 A61P25/00 G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/15.Z C12P21/08 C07K19/00		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ89 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA31 4C084/MA34 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA38 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084/ZA362 4C084/ZA512 4C084/ZA532 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB052 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZC062 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/CC13 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/FF02 4C085/FF03 4C085/FF17 4C085/FF20 4C085/FF24 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA33 4C086/ZA34 4C086/ZA36 4C086/ZA51 4C086/ZA53 4C086/ZA55 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA68 4C086/ZA75 4C086/ZA81 4C086		

/ZA89 4C086/ZA96 4C086/ZB05 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB15
4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZB33 4C086/ZC06 4C086/ZC55 4H045/AA11 4H045
/AA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50

代理人(译) 谷川荣次郎

优先权 60/483360 2003-06-27 US

外部链接 Espacenet

摘要(译)

本发明中，嘌呤受体样多肽GPR91，它表达在肥大细胞，以及过敏性和非过敏性哮喘，慢性阻塞性肺病（COPD），过敏性鼻炎，过敏症，过敏性胃肠道病症，特应性皮炎，类风湿性关节炎，以及其在诊断和/或治疗肥大细胞介导的疾病中的用途，包括其他过敏性，自身免疫性和炎性疾病。本发明还包括用于筛选GPR91受体的激动剂和/或拮抗剂的方法。发明背景无

【表 1】

定量RT-PCRによって評価したGPR91 mRNAの発現プロファイル		
組織／細胞	Cr	相対発現
脳	30.5	119.2
心臓	29.1	318.9
腎臓	24.3	8321.1
肝臓	29.9	167.1
肺	31.4	63.2
脾臓	27.1	1144.8
胸腺	30.3	130.4
気管	29.4	250.1
HPB-A11	33.4	24.7
単球	33.9	14.0
単球 (6/20/02)	33.0	38.4
PBMC (9/28/01)	29.2	409.4
PBMC (6/9/02)	29.6	306.1
好中球 (5/9/02)	30.5	170.1
好中球 (6/20/02)	31.1	138.3
マスト細胞1898 (6/10/02)	22.9	32690.5
マスト細胞 2128 (5/9/02)	23.1	27220.5
THP-1	25.9	3835.2
Daudi	31.3	91.2
HMC-1	37.9	1.0