

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/043588

発行日 平成17年3月10日 (2005.3.10)

(43) 国際公開日 平成15年5月30日 (2003.5.30)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A O 1 K 67/027
A 6 1 K 31/437
A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 37/04

A O 1 K 67/027
 A 6 1 K 31/437
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 31/12
 A 6 1 P 37/04

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 31 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-545269 (P2003-545269)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/012234		
(22) 国際出願日	平成14年11月22日 (2002.11.22)		
(31) 優先権主張番号	特願2001-358295 (P2001-358295)	(71) 出願人	501454566 審良 静男 大阪府高槻市辻子1丁目7-16
(32) 優先日	平成13年11月22日 (2001.11.22)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), CA, JP, US	(71) 出願人	000183370 住友製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
		(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
		(72) 発明者	審良 静男 日本国大阪府高槻市辻子一丁目7番16号

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物

(57) 【要約】

イミダゾキノリン系化合物等の免疫賦活化作用を有する合成化合物を認識する TLR7 をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した、合成化合物不応答性モデル非ヒト動物を提供するものである。マウス遺伝子ライブラリーから得られた TLR7 遺伝子の細胞内領域及び膜貫通領域を含む遺伝子部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリAシグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、TLR7 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって TLR7 ノックアウトマウスを作製する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫賦活化作用を有する合成化合物を認識する TLR7 をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 2】

非ヒト動物が齧歯目動物であることを特徴とする請求項 1 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 3】

齧歯目動物がマウスであることを特徴とする請求項 2 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物。 10

【請求項 4】

マウスが、マウス遺伝子ライブラリーからマウス EST クローン由来のプロープを用いてスクリーニングすることにより得られた TLR7 遺伝子の細胞内領域及び膜貫通領域を含む遺伝子部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、TLR7 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られる TLR7 ノックアウトマウスであることを特徴とする請求項 3 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物。 20

【請求項 5】

免疫賦活化作用を有する合成化合物が、イミダゾキノリン系化合物であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 6】

イミダゾキノリン系化合物が、R - 848 であることを特徴とする請求項 5 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と、被検物質と、免疫賦活化作用を有する合成化合物とを用いて、前記免疫細胞における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。 30

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物と、被検物質と、免疫賦活化作用を有する合成化合物とを用いて、前記非ヒト動物における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。 40

【請求項 9】

免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価するに際し、対照としての野生型非ヒト動物との比較・評価を行うことを特徴とする請求項 7 又は 8 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 10】

免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質が、ウイルス感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 7 ~ 9 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 11】

免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質が、T L R 7 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 7 ~ 9 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 1 2】

免疫賦活化作用を有する合成化合物が、イミダゾキノリン系化合物であることを特徴とする請求項 7 ~ 1 1 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 1 3】

イミダゾキノリン系化合物が、R - 8 4 8 であることを特徴とする請求項 1 2 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

10

【請求項 1 4】

請求項 7 ~ 1 3 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質。

【請求項 1 5】

免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質が、ウイルス感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 1 4 記載の合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質。

20

【請求項 1 6】

免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質が、T L R 7 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 1 4 記載の合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞における免疫賦活化作用を測定・評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物と被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物における免疫賦活化作用を測定・評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法。

30

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と、対照としての野生型非ヒト動物に由来する免疫細胞と、被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と野生型非ヒト動物に由来する免疫細胞における免疫賦活化作用を測定・比較評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物と、対照としての野生型非ヒト動物と、被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物と野生型非ヒト動物における免疫賦活化作用を測定・比較評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法。

40

【請求項 2 1】

イミキモド又は R - 8 4 8 をリード化合物とすることを特徴とする請求項 1 7 ~ 2 0 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法。

【請求項 2 2】

イミキモド又は R - 8 4 8 をリード化合物とする請求項 2 1 記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物。

50

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、イミダゾキノリン系化合物 R - 848 等の合成化合物を特異的に認識する TLR7 をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した、イミダゾキノリン系化合物 R - 848 等の合成化合物不応答性モデル非ヒト動物や、またこれらモデル非ヒト動物を用いたイミダゾキノリン系化合物 R - 848 等の合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法や、免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法等に関する。

背景技術

トール (Toll) 遺伝子は、ショウジョウバエの胚発生中の背腹軸の決定 (Cell 152, 269 - 279, 1988、Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393 - 416, 1996)、また成体における抗真菌性免疫応答に必要であることが知られている (Cell 86, 973 - 983, 1996)。かかる Toll は、細胞外領域にロイシンリッチリピート (LRR) を有する I 型膜貫通受容体であり、この細胞質内領域は、哺乳類インターロイキン - 1 受容体 (IL - 1R) の細胞質内領域と相溶性が高いことが明らかとなっている (Nature 351, 355 - 356, 1991、Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393 - 416, 1996、J. Leukoc. Biol. 63, 650 - 657, 1998)。

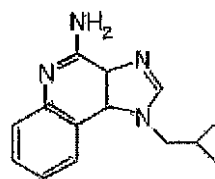
近年、Toll 様受容体 (Toll - like receptor; TLR) と呼ばれる Toll の哺乳類のホモログが同定され、TLR2、TLR3、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10 など現在までに 10 個のファミリーが報告されている (Nature 388, 394 - 397, 1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 588 - 593, 1998、Blood 91, 4020 - 4027, 1998、Gene 231, 59 - 65, 1999)。この TLR ファミリーは、上記 IL - 1R と同様にアダプタータンパク質である MyD88 を介し、IL - 1R 結合キナーゼ (IRAK) をリクルートし、続いて下流のミトジェン活性化タンパク質 (MAP) キナーゼ及び核因子である NF - B を活性化することが知られている (J. Exp. Med. 187, 2097 - 2101, 1998、Mol. Cell 12, 253 - 258, 1998、Immunity 11, 115 - 122, 1999)。また、哺乳類における TLR ファミリーの役割は、細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体 (PRR: pattern recognition receptor) として、先天的な免疫認識に関わっていると考えられている (Cell 91, 295 - 298, 1997)。

上記 PRR により認識される病原体会合分子パターン (PAMP: pathogen - associated molecular pattern) の一つは、グラム陰性菌の外膜の主成分であるリポ多糖 (LPS) であって (Cell 91, 295 - 298, 1997)、かかる LPS が宿主細胞を刺激して宿主細胞に TNF - 、IL - 1 及び IL - 6 等の各種炎症性サイトカインを産生させること (Adv. Immunol. 28, 293 - 450, 1979、Annu. Rev. Immunol. 13, 437 - 457, 1995) や、LPS 結合タンパク質 (LBP: LPS - binding protein) により捕獲された LPS が細胞表面上の CD14 に引き渡されることが知られている (Science 249, 1431 - 1433, 1990、Annu. Rev. Immunol. 13, 437 - 457, 1995)。本発明者らは、TLR4 のノックアウトマウスを作製し、TLR4 ノックアウトウスが上記グラム陰性菌の外膜の主成分である LPS に不応答性であること (J. Immunol. 162, 3749 - 3752, 1999) や、TLR2 ノックアウトマウスを作製し、TLR2 ノックアウトマウスのマクロファージがグラム陽性菌細胞壁やその構成成分であるペプチドグリカンに対する反応性が低下すること (Immunity, 11, 443 - 451, 1999) や、TLR2 及び MyD88 シグナル伝達経路を介して生体反応を引き起こしていること (J. Immunol. 164, 554 - 557, 2000) を報告している。

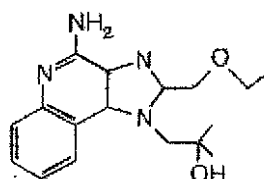
また、本発明者らは、TLR6ノックアウトマウスと野生型マウスとTLR2ノックアウトマウスとを比較・解析することにより、TLR6がマイコプラズマ由来リポタンパク/リポペプチドを特異的に認識する受容体タンパク質であることや、TLR9について完全長cDNAを見出し(GenBank登録番号AF245704)、TLR9が非メチル化CpG配列を有する細菌DNAを特異的に認識する受容体タンパク質であることを明らかにしている。その他、TLR7及びTLR8の新たな2つのメンバーがGenBankに登録されている(登録番号AF240467及びAF246971)。

他方、イミキモド(imiquimod)は、抗ヘルペスウイルス活性をスクリーニングする際に見い出された免疫応答修飾剤であり、モデル動物における抗ウイルス活性及び抗腫瘍活性を示す。種々の細胞タイプにおけるIFN- γ の二次誘導によるのと同様に、この薬剤は、IFN- γ 、IL-6、及びIL-12のようなサイトカインを誘導することにより抗ウイルス活性、抗増殖活性を示すこと(J. Leukoc. Biol. 58, 365-372, 1995、J. Interferon Res, 1989, S2115、Antimicrob. Agents Chemother. 38, 2059-2064, 1994、Am. J. Clin. Pathol. 102, 768-774, 1994)や、イミキモドがNF- κ B及びMAPキナーゼを刺激することも明らかにされている(J. Immunol. 165, 5552-5557, 2000、Mol. Cell Biol. 15, 2207-2218, 1995)。また、イミキモド及びその関連化合物は、タイプ2ヘルペスシンプレックスウイルス及びサイトメガロウイルスの複製を阻害することが知られている(J. Infect. Dis. 183, 844-849, 2001、Antimicrob. Agents Chemother. 32, 678-83, 1988)。そして、実際の治療において、イミキモドがヒトパピローマウイルスにより生じた外陰部疣贅(尖圭コンジローマ)の治療に対して有効であるとの報告(Sex. Transm. Infect. 76, 162-8, 2000)や、イミキモドの誘導體であるR-848と略称されるレジキモド(resiquimod)が生殖器ヘルペスの治療にも有効であるとの報告(JAMA 285, 2182-2183, 2001)がなされている。これらイミダゾキノリン(imidazoquinoline)系化合物であるイミキモドとR-848の構造式を以下に示す。

(化学式1)



イミキモド



R-848

TLRファミリーは、病原体の構成成分の認識に関わる受容体として知られており、上記のように、種々の細菌、真菌由来の構成成分がTLRファミリーによって認識されることが本発明者らにより明らかにされている。すなわち、本発明者らは既に、TLR2、TLR4、TLR6及びTLR9欠損マウスを作製し、TLR4はリポ多糖(LPS)に対して応答し、TLR2はグラム陽性菌由来のペプチドグリカン及びリポタンパク質に応答し、TLR2と同様に、TLR6はマイコプラズマのポリペプチドに応答し、TLR9は非メチル化CpG配列を有する細菌DNAに応答する受容体であることを明らかにした。しかしながら、TLR3、TLR7、TLR8、TLR10等のその他のTLRファミリーメンバーが、いかなる物質を認識するかは未だ知られていない。加えて、免疫賦活化作用を有する合成化合物を認識するタンパク質は知られていなかった。

本発明の課題は、インビボにおける免疫賦活化作用を有する合成化合物刺激によるシグナル伝達に対するTLRファミリー各メンバーの関係、特にTLR7のインビボにおける役

10

20

30

40

50

割を明らかにする上で有用な、免疫賦活化作用を有する合成化合物を認識する TLR7 をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した、合成化合物不応答性モデル非ヒト動物、特に TLR7 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、これらを用いた免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法や、免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法などを提供することにある。

本発明者らは MyD88 欠損マウスを作製し、MyD88 欠損マウスに由来するマクロファージがサイトカインを産出する際に、全ての TLR リガンドに応答しないことを既に報告している。MyD88 欠損マウスでは細胞における応答を確認することができないので、TLR を介して細胞を活性化していると思われる各種化合物について調べてみた。数多くの化合物についてスクリーニングを行い、単核白血球細胞又はマクロファージからサイトカインを誘導する過程を経て、体液性免疫及び細胞性免疫を誘導すると思われるイミダゾキノリン系化合物、すなわち種々の細胞に作用し IFN- γ 、IL-6、IL-12 などの炎症性サイトカインの産生を誘導する免疫賦活剤として知られているイミキモドや R-848 等のイミダゾキノリン系化合物を標的化合物とすることとした。一方、TLR7 はタンパク質の一次構造が、微生物 DNA を認識する TLR9 に極めて類似している。しかし、TLR7 欠損マウスは、TLR9 欠損マウスのように微生物 DNA に対する反応性の欠如は認められない。そこで、TLR ファミリーの TLR7 欠損マウスを作製し、TLR7 を標的としてそれが認識する物質についてもスクリーニングを重ねていた。

そして、偶々 TLR7 欠損マウスを R-848 で刺激したところ、マクロファージからの炎症性サイトカインの産生誘導や、B 細胞の増殖誘導や、樹状細胞の成熟誘導が全く認められなかったことを見出した。また、TLR7 欠損マウス由来のマクロファージでは、R-848 刺激による NF- κ B、JNK、IRAK などの細胞内シグナルの活性化が全く認められなかった。このことは、TLR7 が病原体構成成分だけでなく、合成化合物の認識にも関与していることを示している。TLR ファミリーシグナル伝達経路に必須の役割を果たすアダプター分子 MyD88 の欠損マウスでも、R-848 に対する反応性は完全に欠如していたことを加味すると、TLR7 がイミダゾキノリン系化合物 R-848 の認識に必須の受容体であることや、イミダゾキノリン系化合物 R-848 が TLR7-MyD88 を介したシグナル伝達経路により、免疫賦活化作用を発揮していると考えられた。イミダゾキノリン系化合物 R-848 は、強力な抗ウイルス作用や免疫細胞の賦活化作用を有しており、実際パピローマウイルスによるヒトの外陰部疣贅の治療に使用されていることから、TLR7 欠損マウスが、イミダゾキノリン系化合物の作用機序の解明に非常に有用なモデルマウスとなるばかりでなく、TLR7 を標的としてウイルス感染症の治療薬等の合成化合物の臨床応用に向けての非常に有用なモデルマウスとなると考えられた。本発明は、上記の知見に基づいて完成するに至ったものである。

発明の開示

すなわち本発明は、免疫賦活化作用を有する合成化合物を認識する TLR7 をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物（請求項 1）や、非ヒト動物が齧歯目動物であることを特徴とする請求項 1 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物（請求項 2）や、齧歯目動物がマウスであることを特徴とする請求項 2 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物（請求項 3）や、マウスが、マウス遺伝子ライブラリーからマウス EST クローン由来のプロンプを用いてスクリーニングすることにより得られた TLR7 遺伝子の細胞内領域及び膜貫通領域を含む遺伝子部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、TLR7 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られる TLR7 ノックアウトマウスであることを特徴とする請求項 3 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物（請求項 4）や、免疫賦活

10

20

30

40

50

化作用を有する合成化合物が、イミダゾキノリン系化合物であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物（請求項 5）や、イミダゾキノリン系化合物が、R - 848 であることを特徴とする請求項 5 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物（請求項 6）に関する。

また本発明は、請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と、被検物質と、免疫賦活化作用を有する合成化合物とを用いて、前記免疫細胞における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 7）や、請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物と、被検物質と、免疫賦活化作用を有する合成化合物とを用いて、前記非ヒト動物における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 8）や、免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価するに際し、対照としての野生型非ヒト動物との比較・評価を行うことを特徴とする請求項 7 又は 8 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 9）や、免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質が、ウイルス感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 7 ~ 9 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 10）や、免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質が、TLR7 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 7 ~ 9 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 11）や、免疫賦活化作用を有する合成化合物が、イミダゾキノリン系化合物であることを特徴とする請求項 7 ~ 11 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 12）や、イミダゾキノリン系化合物が、R - 848 であることを特徴とする請求項 12 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 13）に関する。

さらに本発明は、請求項 7 ~ 13 のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質（請求項 14）や、免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質が、ウイルス感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 14 記載の合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質（請求項 15）や、免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質が、TLR7 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 14 記載の合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質（請求項 16）に関する。

また本発明は、請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞における免疫賦活化作用を測定・評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法（請求項 17）や、請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物と被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物における免疫賦活化作用を測定・評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法（請求項 18）や、請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と、対照としての野生型非ヒト動物に由来する免疫細胞と、被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と野生型非ヒト動物に由来する免疫細胞における免疫賦活化作用を測定・比較評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法（請求項 19）や、請求項 1 ~ 6 記載の免疫賦活化作用を有する合成

10

20

30

40

50

化合物不応答性モデル非ヒト動物と、対照としての野生型非ヒト動物と、被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物と野生型非ヒト動物における免疫賦活化作用を測定・比較評価することを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法（請求項20）や、イミキモド又はR-848をリード化合物とすることを特徴とする請求項17～20のいずれか記載の免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法（請求項21）や、イミキモド又はR-848をリード化合物とする請求項21記載のスクリーニング方法により得られることを特徴とする免疫賦活化作用を有する合成化合物（請求項22）に関する。

発明を実施するための最良の形態

本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物としては、免疫賦活化作用を有する合成化合物を認識するTLR7をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物であれば特に制限されるものではなく、また、免疫賦活化作用を有する合成化合物としては、TLR7が認識することができる免疫賦活化作用を有する合成化合物であればどのような合成化合物でもよく、例えばイミダゾキノリン系化合物、より具体的には前述のイミキモドとR-848等を挙げるができる。

したがって、本発明における合成化合物不応答性モデル非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べて免疫賦活化作用を有する合成化合物による刺激に対する生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が特異的に低下しているか、あるいは失われている非ヒト動物、例えば、非メチル化CpG配列を有する細菌DNAによる刺激に対しては、正常に生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官において反応性を有するが、イミダゾキノリン系化合物等の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対しては、生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、あるいは失われているマウス、ラット、ウサギ等のヒト以外の動物をいい、具体的には、TLR7ノックアウトマウス等のTLR7遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を具体的に挙げるができる。また、上記免疫賦活化作用を有する合成化合物による刺激としては、免疫賦活化作用を有する合成化合物を生体に投与するインビボでの刺激や、生体から分離された細胞に免疫賦活化作用を有する合成化合物を接触させるインビトロでの刺激等を挙げるができる。

次に、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物の作製方法を、TLR7ノックアウトマウスを例にとって説明する。マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、TLR7をコードする遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされたTLR7をコードする遺伝子を、ウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このTLR7をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション（電気穿孔）法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型マウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウス(F1マウス：+/-)を得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明のTLR7ノックアウトマウスを作製することができる。また、TLR7ノックアウトマウスにおいてTLR7が生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスにおけるTLR7の発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

10

20

30

40

50

また、作出された TLR7 ノックアウトマウスが免疫賦活化作用を有する合成化合物に対して不応答性であることは、例えば、免疫賦活化作用を有する合成化合物を TLR7 ノックアウトマウスのマクロファージ、単核細胞、樹状細胞などの免疫細胞にインビトロ又はインビボで接触せしめ、かかる細胞における TNF- α 、IL-6、IL-12、IFN- γ 等の産生量や、脾臓 B 細胞の増殖応答や、脾臓 B 細胞表面での CD40、CD80、CD86、MHC クラス II 等の抗原の発現量や、NF- κ B、JNK、IRAK 等の TLR7 のシグナル伝達経路における分子の活性化を測定することにより確認することができる。そして、本発明の TLR7 ノックアウトマウスは、免疫賦活化作用を有する合成化合物の作用機序の解明や、ウイルス感染に対する治療戦略を考案する上で有用なモデルとすることができる。

10

ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、免疫賦活化作用を有する合成化合物を認識する TLR7 欠損型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、好ましくは免疫賦活化作用を有する合成化合物を認識する TLR7 をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物、さらには同腹の動物を、例えば以下に記載する本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニングに際して併用することが好ましい。

本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物や該モデル非ヒト動物由来のマクロファージ、脾臓細胞、樹状細胞等の免疫細胞は、免疫賦活化作用を有する合成化合物の作用機序の解明の他、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス等の各種ウイルスの感染による各種ウイルス感染症に対する抑制物質若しくは促進物質又は TLR7 に対するアゴニスト若しくはアンタゴニストなどの免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニング等に用いることができる。外陰部疣贅等のウイルス感染症に対する抑制物質若しくは促進物質又は TLR7 に対するアゴニスト若しくはアンタゴニストなどの免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニング方法を、以下に例を挙げて説明する。

20

本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法としては、免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物に由来するマクロファージ、脾臓細胞、樹状細胞等の免疫細胞と、被検物質と、免疫賦活化作用を有する合成化合物とを用いて、かかる免疫細胞における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法や、免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物と、被検物質と、免疫賦活化作用を有する合成化合物とを用いて、かかるモデル非ヒト動物における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法等を挙げることができる。

30

上記免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞を用いたスクリーニング方法としては、免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物から得られる免疫細胞と被検物質とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、かかる免疫細胞を免疫賦活化作用を有する合成化合物の存在下で培養し、該免疫細胞における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法や、免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物から得られる免疫細胞と免疫賦活化作用を有する合成化合物とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該免疫細胞を被検物質の存在下で培養し、該免疫細胞における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法を挙げることができる。

40

また、免疫賦活化作用方法を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られる免疫細胞を免疫賦活化作用を有する合成化合物の存在下で培養し、該免疫細胞における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法や、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物に免疫賦活化作用を有

50

する合成化合物を投与し、該非ヒト動物から得られる免疫細胞における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法を挙げることができる。

また、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物にあらかじめ免疫賦活化作用を有する合成化合物を投与した後、該非ヒト動物から得られる免疫細胞を被検物質の存在下で培養し、該免疫細胞における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法や、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物にあらかじめ免疫賦活化作用を有する合成化合物を投与した後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られる免疫細胞における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法を挙げることができる。

他方、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物と、被検物質と、免疫賦活化作用を有する合成化合物とを用いて、かかるモデル非ヒト動物における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法としては、免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該モデル非ヒト動物に免疫賦活化作用を有する合成化合物を投与し、該モデル非ヒト動物における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法や、免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物をあらかじめ免疫賦活化作用を有する合成化合物により感染させた後、該モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物における免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価する方法を挙げることができる。

本発明において免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の測定・評価とは、免疫賦活化作用を有する合成化合物と特異的に反応し、細胞内にシグナルを伝達する機能の測定・評価をいい、かかるシグナル伝達機能としては、TNF- α 、IL-6、IL-12、IFN- γ 等のサイトカインを産生する機能や、亜硝酸イオンを産生する機能や、細胞を増殖する機能や、細胞表面においてCD40、CD80、CD86、MHCクラスII等の抗原を発現する機能や、NF- κ B、JNK、IRAK等のTLR7のシグナル伝達経路における分子を活性化させる機能などを具体的に例示することができるが、これらに限定されるものではない。また前記したように、免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答を測定・評価するに際し、対照として野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することが個体差によるバラツキをなくすることができるので好ましい。

本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物や該モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞を用いると、免疫賦活化作用を有する合成化合物をスクリーニングすることができる。すなわち、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法としては、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞における免疫賦活化作用を測定・評価する方法や、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物と被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物における免疫賦活化作用を測定・評価する方法であれば特に制限されるものではない。

上記モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞を用いたスクリーニング方法としては、モデル非ヒト動物から得られるマクロファージ、脾臓細胞、樹状細胞等の免疫細胞と、被検合成化合物とをインビトロで接触せしめた後、かかる免疫細胞における免疫賦活化作用を測定・評価する方法や、モデル非ヒト動物に被検合成化合物を投与した後、モデル非ヒト動物から得られる免疫細胞における免疫賦活化作用を測定・評価する方法を挙げることができる。

上記モデル非ヒト動物を用いたスクリーニング方法としては、モデル非ヒト動物に被検合成化合物を投与した後、これらモデル非ヒト動物における免疫賦活化作用を測定・評価する方法を挙げることができる。

本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法における免疫賦活化作用の測定・評価とは、例えば、免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト

動物に由来する免疫細胞における、IFN-、TNF-、IL-6、IL-12、IFN-等のサイトカインを産生する機能や、亜硝酸イオンを産生する機能や、細胞を増殖する機能や、細胞表面においてCD40、CD80、CD86、MHCクラスII等の抗原を発現する機能や、NF- κ B、JNK、IRAK等のTLR7のシグナル伝達経路における分子を活性化させる機能などの程度を測定・評価することをいい、例えば、イミキモドやR-848をリード化合物とし、コンビナトリアルケミストリー等の手法を用いて、上記免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニングを行い、モデル非ヒト動物や該モデル非ヒト動物由来の免疫細胞における挙動が、リード化合物を用いたときの挙動と類似する場合、かかる被検合成化合物は、免疫賦活化作用を有する合成化合物の候補物質となる可能性が大きい。そして、イミキモドやR-848をリード化合物とするスクリーニング方法により得られる免疫賦活化作用を有する合成化合物も本発明に含まれる。

また、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物や該モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と、対照としての野生型非ヒト動物や野生型非ヒト動物に由来する免疫細胞を用いると、免疫賦活化作用を有する合成化合物をスクリーニングすることができる。すなわち、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法としては、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と、対照としての野生型非ヒト動物に由来する免疫細胞と、被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と野生型非ヒト動物に由来する免疫細胞における免疫賦活化作用を測定・比較評価する方法や、本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物と、対照としての野生型非ヒト動物と、被検合成化合物とを用いて、前記モデル非ヒト動物と野生型非ヒト動物における免疫賦活化作用を測定・比較評価する方法であれば特に制限されるものではない。

上記モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と対照としての野生型非ヒト動物に由来する免疫細胞とを用いたスクリーニング方法としては、モデル非ヒト動物や野生型非ヒト動物から得られるマクロファージ、脾臓細胞、樹状細胞等の免疫細胞と、被検合成化合物とをインビトロでそれぞれ接触せしめた後、かかる免疫細胞における免疫賦活化作用を測定・比較評価する方法や、モデル非ヒト動物や野生型非ヒト動物に被検合成化合物を投与した後、モデル非ヒト動物や野生型非ヒト動物からそれぞれ得られる免疫細胞における免疫賦活化作用を測定・比較評価する方法を挙げることができる。

上記モデル非ヒト動物と対照としての野生型非ヒト動物とを用いたスクリーニング方法としては、モデル非ヒト動物や野生型非ヒト動物に被検合成化合物をそれぞれ投与した後、これらモデル非ヒト動物や野生型非ヒト動物における免疫賦活化作用を測定・比較評価する方法を挙げることができる。

本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニング方法における免疫賦活化作用の測定・比較評価とは、例えば、IFN-、TNF-、IL-6、IL-12、IFN-等のサイトカインを産生する機能や、亜硝酸イオンを産生する機能や、細胞を増殖する機能や、細胞表面においてCD40、CD80、CD86、MHCクラスII等の抗原を発現する機能や、NF- κ B、JNK、IRAK等のTLR7のシグナル伝達経路における分子を活性化させる機能などの程度を、免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物や該モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と、対照としての野生型非ヒト動物や野生型非ヒト動物に由来する免疫細胞とでそれぞれ測定し、その機能の程度を比較・評価することをいい、例えば、野生型非ヒト動物においてはサイトカイン産生を誘導するが、モデル非ヒト動物においてはサイトカイン産生を誘導しない被検合成化合物は、免疫賦活化作用を有する合成化合物の候補物質となる可能性が大きい。また、イミキモドやR-848をリード化合物とし、コンビナトリアルケミストリー等の手法を用いて、上記免疫賦活化作用を有する合成化合物のスクリーニングを行い、モデル非ヒト動物や該モデル非ヒト動物由来の免疫細胞における挙動が、対照としての野生型非ヒト動物や野生型非ヒト動物に由来する免疫細胞における挙動と類似する場合、かかる被検合成化合物は、免疫賦活化作用を有する合成化合物の候補物質となる可能性が大きい。そして、イミキモドやR-848をリード化合物とするスクリーニング方法により得られる免疫賦活化

10

20

30

40

50

作用を有する合成化合物も本発明に含まれる。

本発明の免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する反応性を特異的に欠如したモデル非ヒト動物により、TLR7が免疫賦活化作用を有する合成化合物の認識に参与していることが明らかとなったことから、これらのモデル非ヒト動物は、免疫賦活化作用を有する合成化合物の作用機序の解明の他、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス等の各種ウイルスの感染による各種ウイルス感染症に対する治療戦略を考案する上で、非常に有用なモデル動物となることが考えられる。またTLR7のアゴニストやアンタゴニストは、上記各種ウイルス感染症に対する抑制物質又は促進物質や、TLR7活性の欠失又は異常に起因する疾病等の診断・治療に有用な物質となる可能性がある。以下に、実施例・参考例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれら実施例等により限定されるものではない。また、実施例における試薬等は以下のものを用いた。

10

大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のDNA及びマイクロコッカス・ディクテリカス (*Micrococcus deikticus*) 由来のDNAをSigma社から購入し、更にフェノール/クロロホルム抽出物を用いて精製した。サルモネラ・ミネソタ (*Salmonella minnesota Re-595*) 由来のLPSをSigma社から購入した。マイコプラズマリポペプチドMALP-2は、Peter F. Muhlradt博士 (Institute of Immunology, Philipps University, Germany) に供与されたものを用いた。使用するODN (oligodeoxynucleotide) は、全て北海道システム・サイエンスから購入した。また、CpG DNAの配列及びバックボーンは、以下の通りである。

20

ホスホロチオエート1688 : tccatgacgttcctgatgct (配列番号1)

D19 : ggTGCATCGATGCAGggggg (配列番号2)

ACC-30 : ACCGATAAACGTTGCCGGTGACGGCACCCAG (配列番号3)

ホスホジエステル1688 : TTCATGACGTTCCTGATGCT (配列番号4)

30

下線部は、典型的なCpGモチーフを示す。大文字及び小文字は、それぞれホスホジエステルバックボーン(天然バックボーン)及びホスホロチオエート修飾を示す。

参考例1 (MyD88ノックアウトマウスの作製)

MyD88遺伝子を129/SvJマウス遺伝子ライブラリー (Stratagene社製) からスクリーニングし、pBluescriptベクター (Stratagene社製) 中でサブクローンし、制限酵素マッピング及びDNAシーケンシングにより特定した。標的ベクターは、pMC1-neo (Stratagene社製) からのネオマイシン抵抗遺伝子で、1.0 kb 遺伝子断片を置換することにより構築された。置換された遺伝子断片は、IL-1RacP (受容体補助タンパク) の細胞質ドメインに似ているドメインをコードする2つのエクソンを含んでいた。ネオマイシン抵抗遺伝子は、1.1 kb の5' 遺伝子断片と5.2 kb の3' 遺伝子断片をフランキング配列として有していた。次いで、HSV-tkカセットを遺伝子断片の3' 端に導入した。線状化された標識ベクターでES細胞E14.1にトランスフェクションし、G418及びガンシクロヴィアで選択した。突然変異MyD88対立遺伝子を含むしていた標的ESクローンを、C57BL/6マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションした。得られたキメラマウスを、ヘテロ接合体マウスを作製するために、C57BL/6雌マウスと交尾させた。ヘテロ接合体マウスは、ホモ接合体マウスを得るためインタークロスし、MyD88欠損マウスを作製した。MyD88ノックアウトマウスは健康に育ち、20週の年齢まで異常を示さなかった。

40

50

参考例 2 (T L R 9 ノックアウトマウスの作製)

129/SvJマウス遺伝子ライブラリー(ストラタジーン社製)からマウスT L R 9 遺伝子(登録番号A F 2 4 5 7 0 4)由来のプロープを用いて、T L R 9 ゲノムD N A を単離し、p B l u e s c r i p t I I S K (+)ベクター(ストラタジーン社製)中でサブクローンし、制限酵素マッピング及びD N A 配列決定により特定した。ターゲッティングベクターは、L R R (ロイシンリッチリピート)領域の一部をコードする1.0 k b のフラグメントを、ネオマイシン耐性遺伝子カセット(p M C 1 - n e o ; ストラタジーン社製)に置換し、負の選択マーカーとして単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(H S V - T K)を挿入することにより構築した。このターゲッティングベクターを線状化し、胚幹細胞(E S 細胞)にエレクトポレーションし、G 4 1 8 及びガンシクロピアに抵抗性を示すクローンを選択した。突然変異T L R 9 対立遺伝子含有していた標的E S クローンを、C 5 7 B L / 6 マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製した。この雄のキメラマウスをC 5 7 B L / 6 雌マウスと交配させ、ヘテロ接合体F 1 マウスを作製し、かかるヘテロ接合体F 1 マウスをインタークロスすることによってホモ接合体マウス(T L R 9 ノックアウトマウス: T L R 9 - / -)を得た。T L R 9 ノックアウトマウスは健康に育ち、20週の年齢まで異常を示さなかった。

10

実施例 1 (T L R 7 ノックアウトマウスの作製)

129/SvJマウス遺伝子ライブラリー(ストラタジーン社製)から、ヒトT L R 7 遺伝子を含むヒトゲノムD N A 配列(登録番号A C 0 0 3 0 4 6)由来のプロープ(配列番号5)を用いて、T L R 7 のゲノムD N A をスクリーニングし、p B l u e s c r i p t I I S K (+)ベクター(ストラタジーン社製)中でサブクローンし、制限酵素マッピング及びD N A 配列決定により特定した。ターゲッティングベクターは、ロイシンリッチリピートの一部をコードしている1.8 k b のT L R 7 遺伝子フラグメントを、ネオマイシン耐性遺伝子カセット(p M C 1 - n e o ; ストラタジーン社製)に置換し、負の選択マーカーとして単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(H S V - T K)を挿入することにより構築した。マウスT L R 7 遺伝子座、ターゲッティングベクター及び変異導入による変異アレルを図1に示す。図1中の“ ”は、コーディングエクソンを示す。使用した制限酵素は、S c a I (S c)及びB a m H I (B)である。このターゲッティングベクターを線状化し、胎生14.1日目の胚幹細胞(E S 細胞)にエレクトポレーションし、G 4 1 8 及びガンシクロピアに抵抗性を示す340個のクローンを選択し、P C R 法及びサザンプロット法により6個のクローンをスクリーニングした。

20

30

突然変異T L R 7 対立遺伝子含有していた3個の標的E S クローンを、C 5 7 B L / 6 マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、変異対立遺伝子が生殖細胞系列を通じて伝達されたキメラマウスを作製した。この雄のキメラマウスをC 5 7 B L / 6 雌マウスと交配させて雌マウスが得られたが、得られた雌マウスは全てヘテロ接合体マウスであった。これはT L R 7 がX染色体にマップされ、全ての生殖細胞系列が伝達されていたためである。T L R 7 ノックアウトマウスを作製するために、得られたヘテロ接合体雌マウスをヘテロ接合体(F 1)とインタークロスすることによってホモ接合体マウス(T L R 7 ノックアウトマウス: T L R 7 - / -)を得た。なお、ホモ接合体マウスの確認は、マウスの尾から抽出した各ゲノムD N A をS c a I でダイジェストし、図1に示すプロープを用いるサザンプロット法により行った。図2に示される結果から、野生型雄マウス(+ / Y)では6 k b のシングルバンド、ヘミ接合の雄マウス(- / Y)では5 k b のバンド、ヘミ接合の雌マウス(+ / -)では両方のバンドを示した。本発明のT L R 7 ノックアウトマウス(T L R 7 - / -)はメンデルの法則に従い作製することができ、25週目までは顕著な異常を示さなかった。

40

実施例 2 (腹腔マクロファージの調製)

野生型マウス(w i l d - t y p e)、T L R 7 ノックアウトマウス(T L R 7 K O)、M y D 8 8 ノックアウトマウス(M y D 8 8 K O)及びT L R 9 ノックアウトマウス(T L R 9 K O)のそれぞれの腹腔内に4%のチオグリコール酸培地(D I F C O 社製)を2 m l ずつ注入し、3日後に各マウスの腹腔内から腹腔滲出細胞を単離し、これらの細胞を

50

10%のウシ胎仔血清(GIBCO社製)を添加したRPMI1640培地(GIBCO社製)中で37℃にて2時間培養し、氷温のハンス緩衝液(Hank's buffered salt solution: HBSS; GIBCO社製)で洗浄することにより非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹腔マクロファージとして以下の実験に使用した。野生型マウス(+ / Y)とTLR7ノックアウトマウス(TLR7KO)に由来するマクロファージから得られた全RNA(10 µg)を電気泳動し、ナイロン膜に移し、TLR7 cDNAの一部とハイブリダイズさせ、この膜をアクチンプローブでもって再びハイブリダイズさせた。かかるノーザンブロット法で調べた。図3に示す結果から、TLR7ノックアウトマウスではTLR7 mRNAの発現は見い出せなかった。

また、腹腔マクロファージから産出されたサイトカインの測定は、 2×10^5 / ウェル又は 5×10^4 / ウェルの腹腔マクロファージを、それぞれ96ウェルプレート内で培養し、前述の試薬を用いて24時間刺激した後、マニュアルに従い、ELISA法を用いてTNF- α 、IL-12p40、IL-6及びIFN- γ の濃度を測定した。

実施例3 (イミダゾキノリン系化合物による免疫細胞の活性化)

イミダゾキノリン系化合物であるイミキモド及びR-848に対するTLR7ノックアウトマウスの応答性を調べる前に、まず、所定濃度のイミキモド及びR-848をそれぞれBALB/cマウス(野生型)に経口投与し、2時間経過した時点での血清中におけるIFN- γ 、TNF- α 及びIL-12の濃度を測定した。結果を図4に示す。その結果、血清中のIFN- γ 、TNF- α 及びIL-12の濃度は、投与量依存的に上昇した。データは平均値+/-統計誤差S.D.(N=3)である。同様に、イミキモド及びR-848をそれぞれ用いて、これら化合物がTLRを介して免疫細胞を活性化する能力を調べた。実施例2により調製した野生型マウス及びMyD88ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージ(5×10^4 cells)を、30 U/mlのIFN- γ の存在下又は非存在下に、イミキモド又はR-848で刺激し、腹腔マクロファージから産出されるTNF- α 及びIL-12の濃度をELISA法により測定した。結果を図5に示す。その結果、野生型マウス由来のマクロファージは、TNF- α 及びIL-12等のサイトカインを多量に産出したが、MyD88ノックアウトマウス由来のマクロファージはサイトカインをほとんど産出しなかった。このことから、イミダゾキノリン系化合物に応答する腹腔マクロファージから産出されるサイトカインが、MyD88に完全に依存することがわかった。また、これらの結果から、イミキモド及びR-848はTLRを介して免疫細胞を活性化することがわかった。データは平均値+/-統計誤差S.D.(N=3)で示されている。

実施例4 (TLR7KOマウス由来マクロファージにおけるODN刺激)

次に、TLR7ノックアウトマウス(TLR7KO)、TLR9ノックアウトマウス(TLR9KO)及び野生型マウス由来の腹腔マクロファージ(5×10^4 cells)を、30 U/mlのIFN- γ の存在下(+)又は非存在下(-)に、所定濃度のCpG DNA1668(ホスホロチオエート1688)、D19、AAC30、天然1668(ホスホジエステル1688)、大腸菌由来のゲノムDNA又はミクロコッカス・ディクティカス由来のゲノムDNAで刺激し、24時間培養後の培養上清中に含まれる腹腔マクロファージ産出のIL-12p40濃度をELISA法により測定した。結果を図6に示す(図中*印は検出限界以下を示す。)。図6からわかるように、TLR7ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージは、各種ODN刺激によりIL-12p40の産生が野生型マウスと同様に認められたのに対して、TLR9ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージではIL-12p40の産生誘導は認められなかった。データは平均値+/-統計誤差(S.D.)である。独立して行なわれた3回の実験でも、類似の結果が得られた。実施例5 (TLR7KOマウス由来マクロファージにおけるイミダゾキノリン系化合物刺激)

続いて、TLR7ノックアウトマウス(TLR7KO)及び野生型マウス由来の腹腔マクロファージ(5×10^4 cells)を、30 U/mlのIFN- γ の存在下(+)又は非存在下(-)に、所定濃度のイミダゾキノリン系化合物R-848、LPS、ODN1

688 (ホスホロチオエート1688)で刺激し、24時間培養後の培養上清中に含まれる腹腔マクロファージ産出のTNF-濃度をELISA法により測定した。結果を図7に示す(図中*印は検出限界以下を示す。)。図7からわかるように、TLR7ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージは、LPSやODN1688刺激によりTNF-の産生が正常マウスと同様に認められたのに対して、イミダゾキノリン系化合物R-848によるTNF-の産生誘導は認められなかった。同様にして、24時間培養後の培養上清中に含まれる腹腔マクロファージ産出のIL-12p40濃度をELISA法により測定した。結果を図8に示す(図中*印は検出限界以下を示す。)。図8からわかるように、TLR7ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージは、LPSやODN1688刺激によりIL-12p40の産生が正常マウスと同様に認められたのに対して、イミダゾキノリン系化合物R-848によるIL-12p40の産生誘導は認められなかった。実施例6(TLR7KOマウス由来マクロファージにおけるイミダゾキノリン系化合物刺激)

10

20

本発明者らが既に作製している、TLR2ノックアウトマウス、TLR4ノックアウトマウス、TLR6ノックアウトマウス又はTLR9ノックアウトマウスは、イミダゾキノリン系化合物に対して応答性を示したことから、イミダゾキノリン系化合物を認識するのは、TLR2、TLR4、TLR6及びTLR9以外のTLRメンバーが関与していると考えられた。そこで、TLR7がイミダゾキノリン系化合物R-848を特異的に認識するかどうかについて、TLR7ノックアウトマウスのR-848に対する応答性について調べてみた。TLR7ノックアウトマウス(TLR7KO)及び野生型マウス由来の腹腔マクロファージ(5×10^4 cells)を、30U/mlのIFN-の存在下(+)又は非存在下(-)に、所定濃度のR-848とLPSで刺激し、24時間培養後の培養上清中に含まれる腹腔マクロファージが産出するTNF-、IL-6及びIL-12p40濃度をELISA法により測定した。結果を図9に示す(図中*印は検出限界以下を示す。)。図9からわかるように、TLR7ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージは、LPS刺激によりTNF-、IL-6及びIL-12p40の産生が野生型マウスと同様に認められたのに対して、R-848刺激ではTNF-、IL-6及びIL-12p40の産生誘導は認められなかった。

実施例7(TLR7KOマウス由来脾細胞におけるイミダゾキノリン系化合物刺激)

イミダゾキノリン系化合物でBリンパ球を刺激することにより、活性化したフェノタイプが増殖して発現することから、脾細胞の増殖性を調べた(Cell Immunol. 2003, 55-62, 2000, J. Immunol. 165, 5552-5557, 2000)。TLR7ノックアウトマウス(TLR7KO)及び野生型マウス由来の脾細胞(5×10^4 cells)を、所定濃度のR-848とCpG DNAで刺激し、48時間(最後の8時間は $[^3\text{H}]$ チミジンを加えて培養)培養し、シンチレーションカウンターを用いて、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取込量を調べた。結果を図10に示す。実験は3回行なったが、その中で代表的な実験で得られた平均値+/-測定誤差(+/-S.D.)を示す。図10からわかるように、野生型マウス由来の脾細胞は、R-848刺激及びCpG DNA刺激により、濃度依存的に増殖を示したが、TLR7ノックアウトマウス由来の脾細胞は、CpG DNA刺激に対しては濃度依存的に増殖したが、R-848刺激に対しては増殖を示さなかった。

30

40

実施例8(TLR7KOマウス由来樹状細胞におけるイミダゾキノリン系化合物刺激)

TLR7ノックアウトマウス(TLR7KO)及び野生型マウス由来の骨髄由来の樹状細胞(BMDC)におけるR-848に対する応答性を調べてみた。10%のウシ胎仔血清及び10ng/mlのGM-CSF(マウス顆粒白血球/マクロファージコロニー刺激因子)を補ったRPMI-1640培地中で、TLR7ノックアウトマウス及び野生型マウスから得た骨髄細胞を6日間培養した。得られたマウス未分化樹状細胞を、R-848又はCpG DNAを用いて24時間刺激して、CD40、CD80、及びCD86に対するビオチン化抗体を用いて細胞を染色し、フィコエリトリン(PE)結合ストレプトアビジンを検出し、自動細胞解析装置(ファクスキャリバー)で分析した。かかるフローサイ

50

トメトリ法によるCD40、CD80及びCD86分子が細胞表面に発現するようすを調べた結果を図11に示す。CpG DNAを用いた場合と同様に、R-848を用いて野生型マウス由来のBMDCを刺激した場合には、CD40、CD80及びCD86発現のアップレギュレーションが誘導された。これに対して、TLR7ノックアウトマウス(TLR7KO)由来のBMDCを、R-848を用いて刺激した場合には、これら細胞表面分子の発現が増強されなかった。

実施例9 (イミダゾキノリン系化合物刺激によるNF- κ B複合体の誘導)

次に、抗ウイルス免疫応答修飾剤に対する細胞内シグナルカスケードの活性化について調べた。チオグリコールで刺激したTLR7ノックアウトマウス(TLR7KO)及び野生型マウス由来の腹腔マクロファージ(各 2×10^6 cells)を、所定の時間100nMのR-848又は1.0 μ MのCpG DNA1668(CpG)で刺激し、核タンパク質抽出し、NF- κ B結合部位を含む特異的プローブと共に得られた抽出物をインキュベートし、電気泳動を行い、オートラジオグラフィにより視覚化し、NF- κ B活性をDNA結合タンパク質として電気泳動移動度シフト分析(EMSA)でもって調べた。結果を図12に示す。図12中、矢印は誘導されたNF- κ B複合体を示しており、矢頭はフリープローブを示している。図12からわかるように、野生型マウス由来のマクロファージの場合、イミダゾキノリン系化合物R-848又はCpG DNAを用いて刺激すると、増強されたNF- κ B転写のDNA結合活性、c-Jun N末端キナーゼ(JNK)の活性化、及びIRAKのリン酸化が誘導された。これに対して、MyD88ノックアウトマウス由来のマクロファージと同様に、TLR7ノックアウトマウス由来のマクロファージにおいても、これらすべてのシグナルイベントは完全に破壊されていた。

実施例10 (イミダゾキノリン系化合物刺激によるNF- κ Bレポーター遺伝子のトランス活性化)

R-848が誘導するNF- κ Bレポーター遺伝子のトランス活性化におけるTLR7の機能的役割を調べた。HEK293細胞をヒト由来のTLR7発現プラスミドとトランジェントにコトランスフェクションし、R-848で刺激する前後でルシフェラーゼ活性を測定した。チオグリコールで刺激したTLR7ノックアウトマウス(TLR7KO)及び野生型マウス由来の腹腔マクロファージを、100nMのR-848又は1.0 μ Mのホスホチオエート修飾CpG DNA1668(CpG)で刺激し、全細胞溶解物を調製し、抗JNK抗体で免疫沈降させ、GST-c-Jun融合タンパク質を基質として使用したインビトロキナーゼアッセイ法により、JNK活性を調べた。結果を図13(上段)に示す。抗JNK抗体を用いて同じ溶解物をプロットした。また、抗IRAKを用いて溶解物を免疫沈降させ、インビトロキナーゼアッセイ法でIRAKのキナーゼ活性を調べた。結果を図13(下段)に示す。抗IRAK抗体を用いて、同じ溶解物をプロットした。図13からわかるように、TLR7を用いてトランスフェクションしたことにより、R-848に対するNF- κ B依存プロモーター活性が増進した。TLR7-MyD88依存シグナル経路を活性化することは、インビトロでのイミダゾキノリンの効果に対して重要である。

実施例11 (インビボにおけるTLR7の関与)

R-848に対する応答にTLR7が関与しているかどうかをインビボで調べてみた。野生型マウス、MyD88ノックアウトマウス又はTLR7ノックアウトマウスの腹腔内に50nmolのR-848を注入し、所定時間後に血清を採取し、ELISA法によって血清中のIFN- γ 、TNF- α 及びIL12p40の濃度を調べた。結果を図14に示す。野生型マウスの腹腔中にR-848を注入すると、血清中のIFN- γ 、TNF- α 及びIL-12の濃度が著しく上昇した。他方、TLR7ノックアウトマウスにおいては、これらサイトカインの増加は見られなかった。同様にMyD88ノックアウトマウスは、R-848に対して全く応答性を示さなかった。

産業上の利用可能性

本発明のTLR7ノックアウトマウス等の免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物は、免疫賦活化作用を有する合成化合物に対して不応答性であるため、イ

ミダゾキノリン系化合物の作用機序の解明に非常に有用なモデルマウスとなるばかりでなく、TLR7を標的としてウイルス感染症の治療薬等の合成化合物剤の臨床応用に向けての非常に有用なモデルマウスとなる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION Akira, Shizuo Sumitomo Pharmaceuticals Corporation	10
<120> Model non-human animal unresponsive to synthetic compounds having immunostimulating activity	
<130> B02-01PCT	
<140>	
<141>	20
<150> JP P2001-358295	
<151> 2001-11-22	
<160> 5	
<170> PatentIn Ver. 2.1	
<210> 1	30
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Description of Artificial Sequence:phosphorothioate 1668	40
<400> 1 tccatgacgt tccatgatgct	20
<210> 2	
<211> 20	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:D19

<400> 2

ggigcatcga tgcagggggg

20

10

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:AAC-30

20

<400> 3

accgataacg ttgccggtga eggcaccacg

30

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:phosphodiester
1668

<400> 4

ttcatgacgt tccgatgct

20

40

<210> 5

<211> 430

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

gtaaaagagt ggcaagtaaa aaacatgggg ctctgattct cctglaattg igataaltaa 60
ataiacacac aatcatgaca ttgagaagaa ctgcatttct accctiaaaa agtactggta 120
ataacagaaa tagggliaaa aaaaactcaa gcctcticia tatgagacca aaalgacta 180
gagttagttt agtgaataaa aaaaccagtc agctggccgg gcaiggtggc tcaigcttgi 240
aatcccagca ctttgggagg ccgaggcagg tggatcacga ggtcaggagi ttgagaccag 300
tcitggccaac atggtgaaac cccgtcigia ctaaaaatac aaaaatiagc tgggcgtggt 360
ggitgggtgcc igtaatccca gctactiggg aggctgaggc aggagaatcg ctigaacccg 420
ggaggiggag                                     430

```

10

【図面の簡単な説明】

第1図は、マウスTLR7遺伝子座、ターゲティングベクター及び変異導入による変異アレルの遺伝子地図を示す図である。

20

第2図は、本発明のTLR7ノックアウトマウスのサザンブロット分析の結果を示す写真である。

第3図は、本発明のTLR7ノックアウトマウスにおけるノーザンブロット分析の結果を示す写真である。

第4図は、BALB/cマウス(野生型)におけるイミキモド及びR-848経口投与によるIFN- γ 、TNF- α 及びIL-12産生の結果を示す図である。

第5図は、野生型マウス及びMyD88ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージにおけるIFN- γ の存在下又は非存在下でのイミキモド又はR-848刺激によるTNF- α 及びIL-12産生の結果を示す図である。

第6図は、本発明のTLR7ノックアウトマウス及びTLR9ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージにおける各種ODN刺激によるIL-12 p40産生の結果を示す図である。

30

第7図は、本発明のTLR7ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージにおけるIFN- γ の存在下又は非存在下での化学合成物R-848、LPS、ODN1688刺激によるTNF- α 産生の結果を示す図である。

第8図は、本発明のTLR7ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージにおけるIFN- γ の存在下又は非存在下での化学合成物R-848、LPS、ODN1688刺激によるIL-12 p40産生の結果を示す図である。

第9図は、本発明のTLR7ノックアウトマウス由来の腹腔マクロファージにおけるIFN- γ の存在下又は非存在下でのR-848、LPS刺激によるTNF- α 、IL-6及びIL-12 p40産生の結果を示す図である。

40

第10図は、本発明のTLR7ノックアウトマウス由来の骨髄由来の樹状細胞におけるR-848、CpG DNA刺激による[3 H]チミジンの取込量の結果を示す図である。

第11図は、本発明のTLR7ノックアウトマウス由来の樹状細胞におけるR-848、CpG DNA刺激によるCD40、CD80及びCD86分子の細胞表面での発現の結果を示す図である。

第12図は、本発明のTLR7ノックアウトマウス由来のマクロファージにおけるR-848、CpG DNA刺激によるNF- κ Bの活性化の結果を示す写真である。

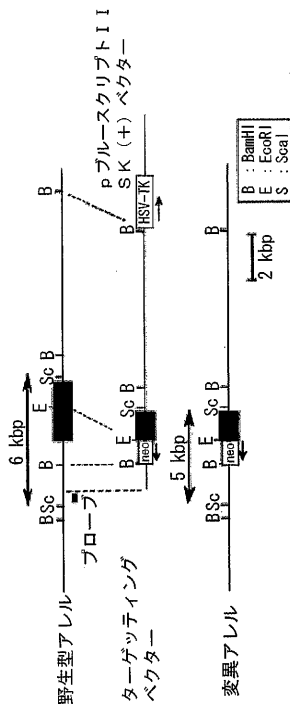
第13図は、本発明のTLR7ノックアウトマウス由来のマクロファージにおけるR-848が誘導するNF- κ Bレポーター遺伝子のトランス活性化の結果を示す写真である。

50

第 14 図は、本発明の TLR7 ノックアウトマウスにおける R - 848 に対するインビボでの応答結果を示す図である。

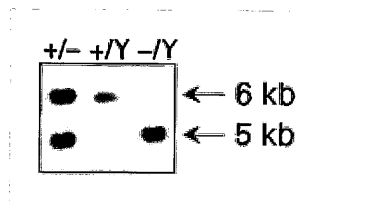
【 図 1 】

第 1 図



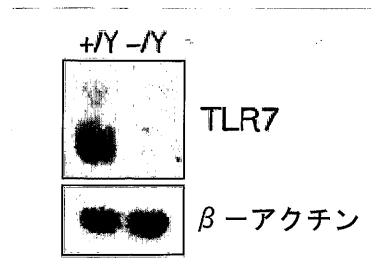
【 図 2 】

第 2 図



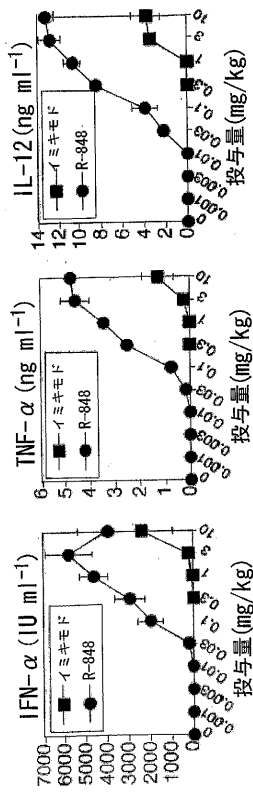
【 図 3 】

第 3 図



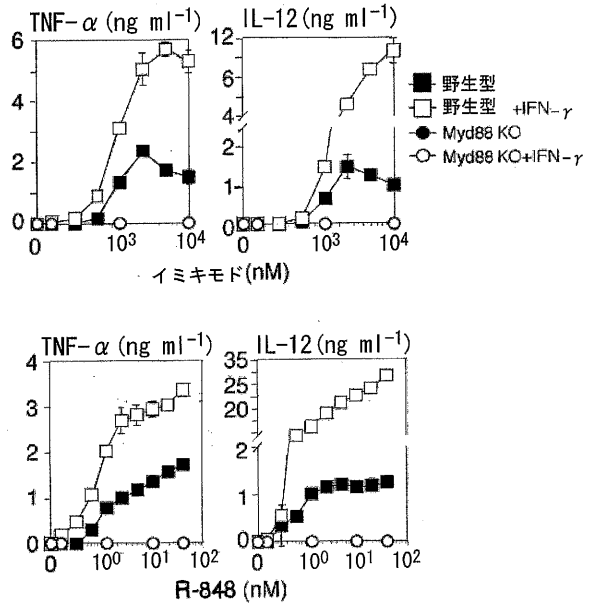
【 図 4 】

第 4 図



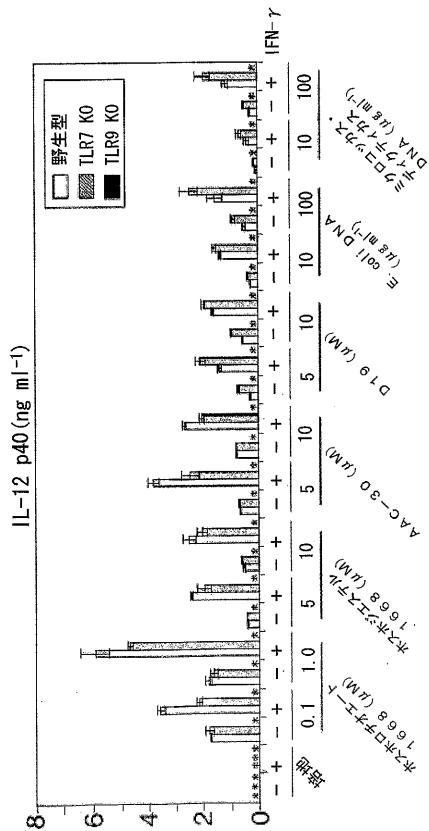
【 図 5 】

第 5 図



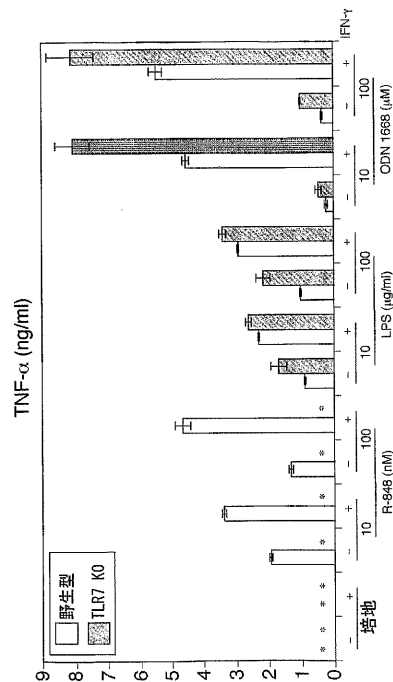
【 図 6 】

第 6 図



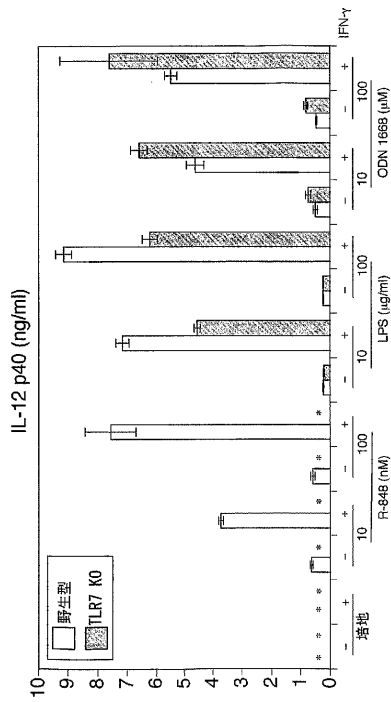
【 図 7 】

第 7 図



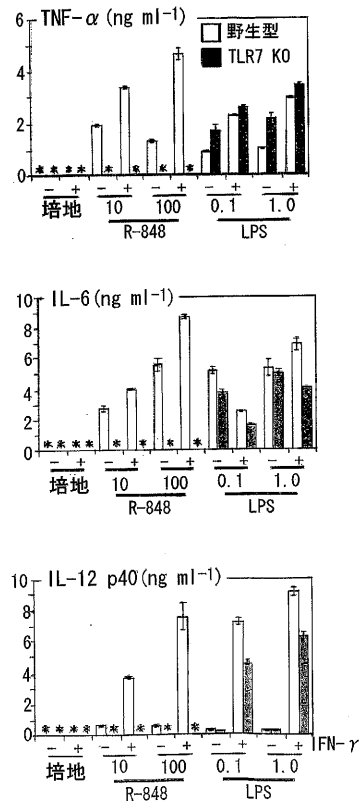
【 図 8 】

第 8 図



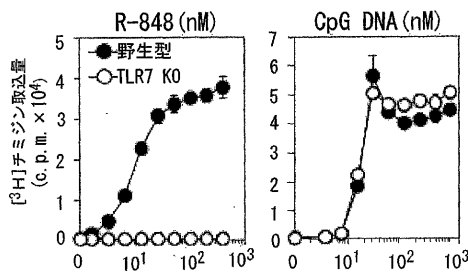
【 図 9 】

第 9 図



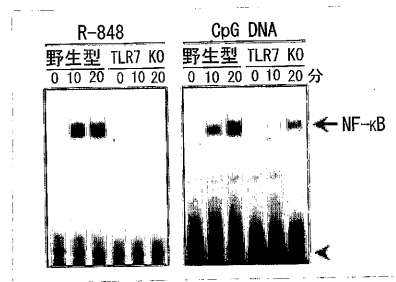
【 図 10 】

第 10 図



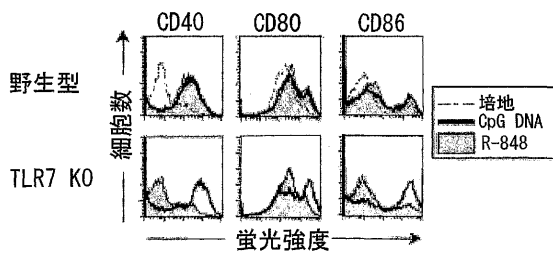
【 図 12 】

第 12 図



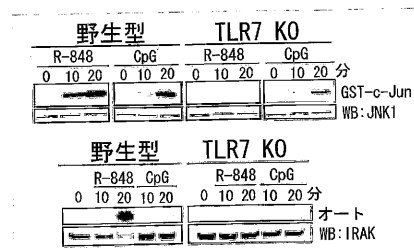
【 図 11 】

第 11 図



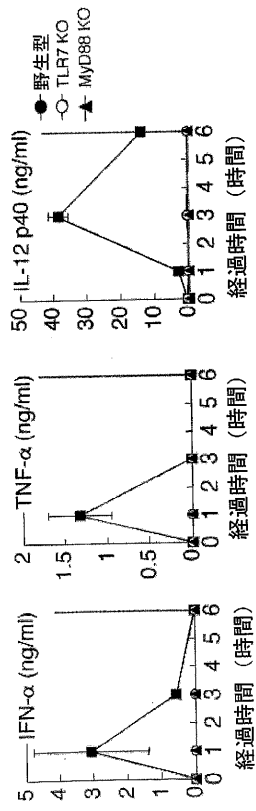
【 図 13 】

第 13 図



【 図 1 4 】

第 1 4 図



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/12234
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P37/04		
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) Int.Cl. ⁷ A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P37/04		
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) CAPLUS (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), GENBANK (STN), JICST-EPLUS (STN), TLR (W) 7, TOLL (W), LIKE (W), RECEPTOR (W) 7		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	CHUANG T-H, et al., Cloning and Characterization of a Sub-Family of Human Toll-like Receptors:hTLR7, hTLR8 and hTLR9. Eur. Cytokine Netw., 2000, Sep., Vol.11, No.3, pages 372 to 378	1-4,17-20 5,6,21
Y A	DU X. et al., Three Novel Mammalian Tool-like Receptors: Gene Structure, Expression, and Evolution. Eur.Cytokine Netw., 2000, Sep., Vol.11, No.3, pages 362 to 371	1-4,17-20 5,6,21
Y	TAKEUCHI O. et al., Cutting Edge: Preferentially The R-Stereoisomer of The Mycoplasmal Lipopeptide Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Activates Immune Cells through a Tool-Like Receptor 2- and MyD88-Dependent Signaling Pathway. J.Immunol.,2000, Jan., Vol.164, pages 554 to 557	1-4,17-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 February, 2003 (24.02.03)		Date of mailing of the international search report 11 March, 2003 (11.03.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/12234
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BISHOP G.A. et al., Molecular Mechanisms of B Lymphocyte Activation by The Immune Response Modifier R-848. J.Immunol., 2000, Vol.165, pages 5552 to 5557	22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/JP02/12234
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos: 7-16	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: Although claims 7 to 16 relate to a method of screening an inhibitor or a promoter of a response to an immunopotentiating synthetic compound and the inhibitor or the promoter obtained by the method, it is impossible to measure the inhibiting or promoting effect (continued to extra sheet)
3. <input type="checkbox"/> Claims Nos:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: The inventions as set forth in claims 1 to 13 and 17 to 21 relate to "a nonhuman model animal unresponsive to an immunopotentiating synthetic compound". The inventions as set forth in claims 14 to 16 relate to "an inhibitor or a promoter of an immunopotentiating synthetic compound". The invention as set forth in claim 22 relates to "an immunopotentiating synthetic compound".	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	
<input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/12234

Continuation of Box No.1-2 of continuation of first sheet (1)

on the response to the above synthetic compound since a nonhuman model animal not responding to the synthetic compound is employed therein.

国際調査報告		国際出願番号	PCT/JP02/12234
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P37/04			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P37/04			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語) CAPLUS (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), GENBANK (STN), JICST-EPLUS (STN) TLR (W)7, TOLL (W) LIKE (W) RECEPTOR (W)7			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y A	CHUANG T-H, et al., Cloning and Characterization of a Sub-Family of Human Toll-Like Receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. Eur. Cytokine Netw., 2000, Sep., Vol.11, No. 3, p.372-378	1-4, 17-20 5, 6, 21	
Y A	DU X., et al., Three Novel Mammalian Toll-Like Receptors: Gene Structure, Expression, and Evolution. Eur. Cytokine Netw., 2000, Sep., Vol.11, No. 3, p.362-371	1-4, 17-20 5, 6, 21	
Y	Takeuchi O., et al., Cutting Edge: Preferentially The R-Stereoisomer of The Mycoplasma Lipopeptide Macrophage-	1-4, 17-20	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する加載を参照。			
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 「T」 の日に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日	24. 02. 03	国際調査報告の発送日	11.03.03
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 佳代子	2B	9516
		電話番号	03-3581-1101 内線 6493

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP02/12234
C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Activating Lipopeptide-2 Activates Immune Cells through a Toll-Like Receptor 2- and MyD88-Dependent Signaling Pathway. J. Immunol., 2000, Jan., Vol.164, p.554-557 BISHOP G.A., et al., Molecular Mechanisms of B Lymphocyte Activation by The Immune Response Modifier R-848. J. Immunol., 2000, Vol.165, p.5552-5557	22

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JP02/12234
<p>第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)</p>	
<p>法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 7-16 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、 請求の範囲 7-16 は、免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する応答の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法、及び当該方法によって得られる抑制物質又は促進物質であるが、上記合成化合物に対して応答しないモデル非ヒト動物を使用するため、上記合成化合物に対する応答の抑制効果又は促進効果を測定することは不可能である。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)</p>	
<p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p>	
<p>請求の範囲 1-13、17-21は、「免疫賦活化作用を有する合成化合物不応答性モデル非ヒト動物」に関する発明である。 請求の範囲 14-16は、「免疫賦活化作用を有する合成化合物に対する抑制物質又は促進物質」に関する発明である。 請求の範囲 22は、「免疫賦活化作用を有する合成化合物」に関する発明である。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期限内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期限内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷		F I	
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z
// C 0 7 D 471/04		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 N 15/09		C 0 7 D 471/04	1 0 7 E

(72)発明者 富澤 秀行
日本国埼玉県川口市芝中田二丁目6番32号

(72)発明者 山岡 隆
日本国兵庫県三田市あかしあ台三丁目7番4号

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。