

(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2007-500132  
(P2007-500132A)

(43) 公表日 平成19年1月11日(2007.1.11)

(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 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 1	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 H	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 102 頁) 最終頁に続く

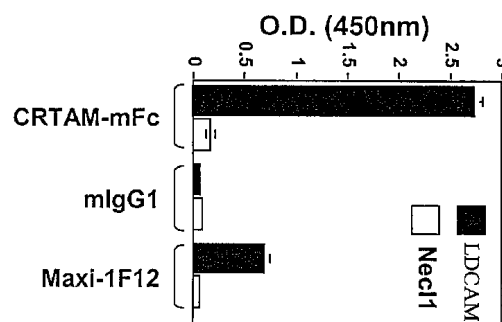
(21) 出願番号 特願2006-521282 (P2006-521282)	(71) 出願人 500203709 アムジェン インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 913 20, サウザンド オークス, ワン アムジェン センター ドライブ
(86) (22) 出願日 平成16年7月23日 (2004. 7. 23)	
(85) 翻訳文提出日 平成18年3月17日 (2006. 3. 17)	
(86) 国際出願番号 PCT/US2004/023822	
(87) 国際公開番号 W02005/012530	
(87) 国際公開日 平成17年2月10日 (2005. 2. 10)	(74) 代理人 100089705 弁理士 社本 一夫
(31) 優先権主張番号 60/490, 027	(74) 代理人 100140109 弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日 平成15年7月25日 (2003. 7. 25)	(74) 代理人 100075270 弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100080137 弁理士 千葉 昭男
	(74) 代理人 100096013 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L D C A M のアンタゴニストおよびアゴニスト、並びにその使用法

(57) 【要約】

本発明は、L D C A M のアゴニストおよびアンタゴニスト、並びに1以上のL D C A M アンタゴニストまたはアゴニストを投与することによって、疾患および感染を治療する方法に関する。この要約は、読者が技術的開示の主題を迅速に確かめる単一の目的のために提供され、そして請求項の範囲または意味を解釈するかまたは制限するのに用いられることは意図されない。37CFR 1.72(b)。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 2 の可変重鎖アミノ酸配列を含む、単離 L D C A M 特異的結合剤。

## 【請求項 2】

配列番号 1 3 の可変軽鎖アミノ酸配列を含む、単離 L D C A M 特異的結合剤。

## 【請求項 3】

配列番号 1 2 の可変重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 3 の可変軽鎖アミノ酸配列を含む、単離 L D C A M 特異的結合剤。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 記載の結合剤のいずれか 1 つおよび薬学的に許容しうるキャリアー、希釈剤または賦形剤を含む、薬剤組成物。 10

## 【請求項 5】

L D C A M および C R T A M の結合に拮抗する方法であって、可溶性 L D C A M ポリペプチドが L D C A M および C R T A M 間の結合を遮断するように、L D C A M を発現する細胞または C R T A M を発現する細胞を可溶性 L D C A M ポリペプチドに曝露することを含む、前記方法。

## 【請求項 6】

L D C A M および C R T A M の結合に拮抗する方法であって、L D C A M 特異的抗体が L D C A M および C R T A M 間の結合を遮断するように、L D C A M を発現する細胞を L D C A M 特異的抗体に曝露することを含む、前記方法。 20

## 【請求項 7】

L D C A M 結合性 C R T A M の生物学的効果をアゴナイズする方法であって、C R T A M 特異的抗体が C R T A M に結合し、そして C R T A M 受容体を活性化するように、C R T A M を発現する細胞を C R T A M 特異的抗体に曝露することを含む、前記方法。

## 【請求項 8】

L D C A M および C R T A M の結合に拮抗する方法であって、L D C A M 特異的抗体が L D C A M および C R T A M 間の結合を遮断するように、L D C A M を発現する細胞を L D C A M 特異的抗体に曝露することを含む、ここで L D C A M 特異的抗体が請求項 3 記載の抗体である、前記方法。

## 【請求項 9】

C D 1 1 c +、C D 1 3 +、B D C A 3 + および L D C A M + 樹状細胞表現型を含む、単離ヒト樹状細胞集団。 30

## 【請求項 10】

請求項 9 の樹状細胞集団を *i n v i v o* で生成する方法であって、有効量の F l t 3 リガンドを被験者に投与することを含む、前記方法。

## 【請求項 11】

請求項 9 の樹状細胞集団を *e x v i v o* で生成する方法であって、有効量の F l t 3 リガンドを、造血幹細胞および前駆細胞の培養物に投与することを含む、前記方法。

## 【請求項 12】

請求項 9 の樹状細胞集団を単離する方法であって： 40

( a ) 被験者から樹状細胞を得て；

( b ) 樹状細胞を L D C A M 特異的抗体に曝露し、ここで該抗体は選択される樹状細胞表面上の L D C A M に結合する；そして

( c ) L D C A M 特異的抗体が結合した樹状細胞を、L D C A M 特異的抗体を介して捕捉することによって、該細胞を単離することを含む、前記方法。

## 【請求項 13】

被験者を抗原に曝露する方法であって：

( a ) C D 1 1 c +、C D 1 3 +、B D C A 3 + および L D C A M + 樹状細胞表現型を含む樹状細胞を被験者から単離し；

(b)(a)の樹状細胞を *ex vivo* で抗原に曝露し；そして

(c)(b)の樹状細胞を被験者に投与しなおす

ことを含む、前記方法。

【請求項14】

抗原が癌抗原である、請求項13の方法。

【請求項15】

癌抗原が可溶性ポリペプチドである、請求項14の方法。

【請求項16】

癌抗原がペプチドである、請求項14の方法。

【請求項17】

癌抗原が被験者由来のアポトーシス性癌細胞の型である、請求項14の方法。

10

【請求項18】

抗原がウイルス抗原である、請求項13の方法。

【請求項19】

抗原が細菌抗原である、請求項13の方法。

【請求項20】

抗原が単細胞生物由来である、請求項13の方法。

【請求項21】

LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストに関してスクリーニングする方法であって、(a)単離LDCAMポリペプチドと試験化合物を合わせることを含む、前記方法。

20

【請求項22】

LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストに関してスクリーニングする方法であって

(a)LDCAMポリペプチドを発現する細胞と試験化合物を合わせ；

(b)単離CRTAMポリペプチドを添加し；そして

(c)試験化合物の存在下および非存在下で、LDCAMポリペプチドを発現する細胞およびCRTAMポリペプチド間の相対的結合を決定することを含む、前記方法。

【請求項23】

LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストに関してスクリーニングする方法であって

(a)LDCAMポリペプチドを発現する細胞と試験化合物を合わせ；

(b)CRTAMポリペプチドを発現する細胞を添加し；そして

(c)試験化合物の存在下および非存在下で、LDCAMポリペプチドを発現する細胞およびCRTAMポリペプチドを発現する細胞間の相対的結合を決定することを含む、前記方法。

30

【請求項24】

LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストに関してスクリーニングする方法であって

(a)単離LDCAMポリペプチドと試験化合物を合わせ；

(b)CRTAMポリペプチドを発現する細胞を添加し；そして

(c)試験化合物の存在下および非存在下で、LDCAMポリペプチド、およびCRTAMポリペプチドを発現する細胞間の相対的結合を決定することを含む、前記方法。

40

【請求項25】

LDCAMアゴニストに関してスクリーニングする方法であって

(a)単離CRTAMポリペプチドと試験化合物を合わせ；そして

(b)試験化合物およびCRTAMポリペプチド間の相対的結合を決定する

ことを含む、前記方法。

【請求項26】

LDCAMアゴニストに関してスクリーニングする方法であって

(a)CRTAMポリペプチドを発現する細胞を合わせ；そして

(b)CRTAMポリペプチドを発現する細胞および試験化合物間の相対的結合または

50

生物学的効果を決定することを含む、前記方法。

【請求項 27】

可溶性 L D C A M ポリペプチドを含む L D C A M アンタゴニストであって、該 L D C A M ポリペプチドが C R T A M 受容体に結合するが該受容体を活性化しない、前記 L D C A M アンタゴニスト。

【請求項 28】

配列番号 2 のアミノ酸 39 ~ 374 を含む、請求項 27 の L D C A M アンタゴニスト。

【請求項 29】

C R T A M ポリペプチドに結合する、配列番号 2 のアミノ酸 39 ~ 374 の断片を含む、請求項 28 の L D C A M アンタゴニスト。 10

【請求項 30】

T 細胞表面上の C R T A M 受容体に結合し、該受容体を架橋し、そして活性化する L D C A M - F c 融合タンパク質を含む、L D C A M アゴニスト。

【請求項 31】

T 細胞表面上の C R T A M 受容体に結合し、そして該受容体を活性化する抗体を含む、L D C A M アゴニスト。

【請求項 32】

炎症誘発性サイトカイン産生を減少させる必要がある被験者において、炎症誘発性サイトカイン産生を減少させる方法であって、L D C A M アゴニストを投与することを含む、前記方法。 20

【請求項 33】

炎症誘発性サイトカインが、インターフェロン - ガンマおよび I L - 2 からなるリストから選択される、請求項 32 記載の方法。

【請求項 34】

L D C A M アゴニストが、F c ドメインに連結された、配列番号 2 のアミノ酸 39 ~ 374 を含む、請求項 32 の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

関連出願に対するクロスリファレンス

本出願は、35 U.S.C. § 119 に基づいて、米国仮出願第 60 / 490, 027 号、2003 年 7 月 25 日出願の優先権を主張する。

【0002】

背景

1. 発明の分野

本発明の態様は、一般的に、L D C A M のアゴニストおよびアンタゴニストとともに、1 以上の L D C A M アンタゴニストまたはアゴニストを投与することによって疾患を治療する方法に関する。

【背景技術】

40

【0003】

2. 関連技術の説明

L D C A M は、同種親和性細胞接着分子であり、1 以上の T 細胞表面分子と相互作用し、それにより細胞シグナル伝達の改変を引き起こすことによって、T 細胞機能を調節することが示されている。L D C A M は、自己会合して、ホモ二量体を形成し、そして B 7 L - 1 に結合することが示された。L D C A M はまた、ナチュラルキラー細胞集団の増加を生じること示された。米国特許出願第 09 / 778, 187 号、2001 年 2 月 6 日出願は、L D C A M を記載し、そして本明細書に完全に援用される。

【0004】

L D C A M はまた、当該技術分野において、I g s f 4、T S L C 1、S y n C A M お 50

よびネクチン様2とも称され、そして免疫グロブリン様細胞表面受容体のネクチン様ファミリーのメンバーであり、そして3つのC2 Ig様ドメインを有すると性質決定されてきている。ネクチン様受容体の細胞質テールは、バンド-4.1タンパク質結合部位およびPDZタンパク質結合部位を有する。LDCAMは、非小細胞肺癌で欠失し、そしてNCAMに相同性を有する、腫瘍抑制遺伝子と同定されてきている(Gomyoら Genomics 62:139-146(1999)およびKuramochiら Nat Genet 27(4):427-30(2001) Masudaら J Biol Chem. 277(34):31014-9(2002))。

#### 【0005】

本明細書に記載するように、LDCAMがCRTAMに結合することが発見されてきている。CRTAMは、細胞表面マーカーファミリーのメンバーと記載されてきており、T細胞において、拘束された発現パターンを有することから、初めはクラスI拘束T細胞会合分子(CRTAM)と称された(米国特許第5,686,257号)。cDNAライブラリー・サブトラクション技術によって、ナチュラルキラーT(NKT)細胞のサブセットである、活性化マウス・アルファベータTCR+ CD4-CD8-(ダブルネガティブ)T細胞が、mRNA転写物を発現することが示された。ヒトCRTAMもまた同定されてきており、そして該分子は、マウス分子と同じ発現パターンを共有する。LPTNおよびCRTAMが、T細胞において、同じ発現パターンを示すことから、クラスI-MHC拘束T細胞に共通の遺伝子発現プログラムが存在することが示唆される(Kennedyら, J Leuk Bio 67,725(2000))。

10

20

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

##### 発明の概要

本発明の態様は、LDCAMのアнтаゴニストおよびアゴニストを提供する。1つの態様において、LDCAMアゴニストおよびLDCAMアンタゴニストはLDCAMに結合する。別の態様において、LDCAMアゴニストおよびLDCAMアンタゴニストは、限定されるわけではないが、LDCAM、CRTAMおよびB7L-1を含む、LDCAMの結合パートナーの1つと結合可能である。LDCAMアゴニストおよびアンタゴニストには、可溶性LDCAMポリペプチドとともに、その生物学的活性断片および変異体、融合タンパク質、誘導体等が含まれる。LDCAMアゴニストおよびアンタゴニストにはまた、LDCAMまたはその結合パートナーに対して向けられる、抗体、ペプチボディおよび細胞内抗体(intrabodies)のすべての型も含まれる。

30

#### 【0007】

本発明の側面は、マウスCD8<sup>+</sup>樹状細胞のヒト対応物である、ヒト樹状細胞の新規サブセット(BDCA3<sup>+</sup>)の発見に関する。この樹状細胞サブセットは、これらが抗原交差提示、交差プライミング、そしてまた交差寛容の原因である点で、ユニークな免疫制御抗原提示細胞に相当する。

#### 【0008】

1つの特定の態様は、図6に提供する配列を有する抗体を含む。LDCAM特異的scfvは、以下により詳細に記載するように、多様な態様の形を取ることも可能であり、これには、scfv-Fc融合タンパク質が含まれる。

40

#### 【0009】

LDCAMの別の結合パートナーが発見されてきている。LDCAMは、活性化T細胞、NK細胞およびNK-T細胞上に高レベルで発現される、CRTAMに結合する。したがって、本発明の態様には、LDCAMおよびCRTAMの相互作用または結合のアゴニストおよびアンタゴニストが含まれる。

#### 【0010】

さらなる態様を以下に詳細に記載する。

##### 発明の詳細な説明

50

## 1. 定義

LDCAMを以下のセクションに定義し、そして記載する。

CRTAMは、本明細書に完全に援用される、米国特許第5,686,257号に定義され、そして記載される。

### 【0011】

「LDCAM結合パートナー」または「LDCAM同族体(cognate)」は、LDCAMの同族体であり、そして限定されるわけではないが、LDCAM(ホモタイプ凝集または会合-シスおよび/またはトランスによる)、CRTAM、B7L-1(Nec1-1)およびB7L-4(ネクチン-3)が含まれる。

### 【0012】

用語「生物学的活性」は、LDCAMに関する場合、LDCAMが以下の活性の1以上を実行可能であることを意味する：LDCAMとLDCAMの結合(ホモタイプ会合-シスおよび/またはトランスによるなど)；CRTAMへの結合；B7L-1への結合；B7L-4(ネクチン-3)への結合；活性化および増殖の防止などの、T細胞活性の調節；限定されるわけではないが、インターフェロン-ガンマおよびIL-2などの炎症誘発性サイトカインの放出の減少；活性化刺激へのT細胞応答の調節；CD3刺激/活性化へのT細胞応答の調節；マイトジェン刺激/活性化へのT細胞応答の調節；NK-T細胞活性の調節；NK細胞活性の調節；B細胞活性の調節；限定されるわけではないが、IL-2、INF-ガンマおよび他の炎症誘発性サイトカインなどの、免疫細胞によるサイトカイン発現の調節；抗原提示細胞およびT細胞間の活性の調節；樹状細胞およびT細胞間の活性の調節；BDCA3+樹状細胞およびT細胞間の活性の調節；抗原提示細胞およびNK-T細胞間の活性の調節；樹状細胞およびNK-T細胞間の活性の調節；BDCA3+樹状細胞およびNK-T細胞間の活性の調節；抗原提示細胞およびNK細胞間の活性の調節；樹状細胞およびNK細胞間の活性の調節；BDCA3+樹状細胞およびNK細胞間の活性の調節；ニューロンおよびT細胞間の活性の調節；ニューロンおよびNK-T細胞間の活性の調節；並びにニューロンおよびNK細胞間の活性の調節。

### 【0013】

受容体を活性化する、または受容体の活性化は、本明細書において、限定されるわけではないが、受容体：リガンド相互作用などの膜結合受容体への分子結合に反応した、1以上の細胞内シグナル伝達経路(単数または複数)および細胞内シグナルの伝達(すなわちシグナル伝達)の関与と定義される。

### 【0014】

「シグナル伝達」は、本明細書において、1つの物理的型または化学的型から別のものへの変換によるシグナルのリレーである。細胞生物学においては、細胞が細胞外シグナルを反応に変換するプロセスである。

### 【0015】

「ペプチボディ」は、一般的に、免疫グロブリンFcドメインの少なくとも一部および少なくとも1つのペプチドを含む分子を指す。こうしたペプチボディは、その多量体または二量体または断片であることも可能であり、そしてこれらは誘導体化されていることも可能である。ペプチボディは、当該技術分野に知られ、そして本明細書に完全に援用されるWO 99/25044およびWO 00/24782により詳細に記載される。ペプチドは、LDCAM B7L-1またはCRTAMのアミノ酸配列由来であることも可能である。

### 【0016】

「ペプチド」は、本明細書において、1~100アミノ酸の分子を指す。別の態様は、5~20アミノ酸の分子を含む。典型的なペプチドは、LDCAM、B7L-1またはCRTAMの天然存在分子の細胞外ドメインの一部を含むか、あるいはこれらのランダム化配列を含む。

### 【0017】

用語「ランダム化」は、ペプチド配列を指す場合、完全ランダム配列(例えばファージ

10

20

30

40

50

ディスプレイ法またはRNA-ペプチドスクリーニングによって選択されるもの)、および天然存在分子の1以上の残基が天然存在分子のその位に現れないアミノ酸残基で置換された配列を指す。ペプチド配列を同定する典型的な方法には、ファージディスプレイ、大腸菌(E. coli)ディスプレイ、リボソームディスプレイ、RNA-ペプチドスクリーニング、化学薬品スクリーニング等が含まれる。

**【0018】**

用語「Fcドメイン」は、天然FcおよびFc変異体分子および以下に定義する配列を含む。Fc変異体および天然Fcの場合、用語「Fcドメイン」には、完全抗体から消化されたかまたは他の手段によって産生された、単量体型または多量体型の分子が含まれる。

10

**【0019】**

用語「天然Fc」は、完全抗体の消化から生じる、非抗原結合断片の配列を含む、単量体型または多量体型いずれかの分子または配列を指す。天然Fcの元来の免疫グロブリン供給源は、好ましくは、ヒト起源であり、そして免疫グロブリンのいずれであることも可能であるが、IgG1およびIgG2が好ましい。天然Fcは、単量体ポリペプチドで構成され、共有結合(すなわちジスルフィド結合)および非共有結合によって連結されて、二量体型または多量体型になることも可能である。天然Fc分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス(例えばIgG、IgA、IgE)またはサブクラス(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgA1、IgGA2)に応じて1~4の範囲である。天然Fcの一例は、IgGのパパイン消化から生じるジスルフィド結合二量体である(Elisonら(1982), Nucleic Acids Res. 10:4071-9を参照されたい)。用語「天然Fc」は、本明細書において、単量体型、二量体型、および多量体型の総称である。

20

**【0020】**

用語「Fc変異体」は、天然Fcから修飾されているが、サルベージ受容体、FcRnの結合部位をなお含む、分子または配列を指す。国際出願WO 97/34631(1997年9月25日公表)およびWO 96/32478は、典型的なFc変異体とともに、サルベージ受容体との相互作用を記載し、そして本明細書に完全に援用される。したがって、用語「Fc変異体」は、非ヒト天然Fcからヒト化された分子または配列を含む。さらに、天然Fcは、本発明の融合分子に必要なでない構造的特徴または生物学的活性を提供するために取り除くことも可能な部位を含む。したがって、用語「Fc変異体」は、(1)ジスルフィド結合形成、(2)選択される宿主細胞との不適合、(3)選択される宿主細胞における発現に際する、N末端不均一性、(4)グリコシル化、(5)補体との相互作用、(6)サルベージ受容体以外のFc受容体への結合、または(7)抗体依存性細胞傷害性(ADCC)に影響を及ぼすか、または関与する、1以上の天然Fc部位または残基を欠く分子または配列を含む。Fc変異体を、これ以降、より詳細に記載する。

30

**【0021】**

「ペプチド擬似体(peptidomimetic)」は、原型天然ペプチドより好ましい薬理学的特性、例えばa)代謝安定性、b)優れた生物学的利用能、c)高い受容体親和性および受容体選択性、並びにd)最小限の副作用を示すペプチド類似体(analog)である。ペプチド擬似体を設計し、そして該擬似体を産生する方法は、当該技術分野に知られる(例えばU.S.P.N. 6,407,059および6,420,118を参照されたい)。ペプチド擬似体は、LDCAM、B7L-1またはCRTAMの細胞外ドメインの結合部位に由来することも可能である。別の態様において、ペプチド擬似体は、LDCAM、B7L-1またはCRTAM由来のペプチドと同じ三次元構造を有する非ペプチド化合物、あるいは上に列挙する分子由来のペプチドの一部が、同じ三次元構造を有する非ペプチド部分で置換されている化合物を含む。

40

**【0022】**

「ミモトープ(mimotope)」は、本明細書において、タンパク質上の結合部位を模倣するペプチド配列と定義される(Partidos, CDら, Combina

50

t o r i a l C h e m & H i g h T h r o u g h p u t S c r e e n i n g ,  
2 0 0 2 5 : 1 5 - 2 7 を参照されたい)。ミモトープは、タンパク質のコンホメーションに依存する結合部位を模倣する能力を有することも可能である。これらのミモトープの配列は、連続する直鎖天然配列を同定しないか、または必ずしも天然存在タンパク質で生じない。ミモトープおよび産生法は、U . S . P . N . 5 , 8 7 7 , 1 5 5 および U . S . P . N . 5 , 9 9 8 , 5 7 7 に解説され、これらは本明細書に完全に援用される。

【 0 0 2 3 】

用語「酸性残基」は、酸性基を含む側鎖を有する D 型または L 型のアミノ酸残基を指す。典型的な酸性残基には D および E が含まれる。

用語「アミド残基」は、酸性基のアミド誘導体を含む側鎖を有する D 型または L 型のアミノ酸残基を指す。典型的な残基には N および Q が含まれる。

10

【 0 0 2 4 】

用語「芳香族残基」は、芳香族基を含む側鎖を有する D 型または L 型のアミノ酸残基を指す。典型的な芳香族残基には F、Y、および W が含まれる。

用語「塩基性残基」は、塩基性基を含む側鎖を有する D 型または L 型のアミノ酸残基を指す。典型的な塩基性残基には H、K、および R が含まれる。

【 0 0 2 5 】

用語「親水性残基」は、極性基を含む側鎖を有する D 型または L 型のアミノ酸残基を指す。典型的な親水性残基には C、S、T、N、および Q が含まれる。

用語「非官能性残基」は、酸性基、塩基性基、または芳香族基を欠く側鎖を有する D 型または L 型のアミノ酸残基を指す。典型的な非官能性アミノ酸残基には M、G、A、V、I、L および ノルロイシン ( N l e ) が含まれる。

20

【 0 0 2 6 】

用語「中性疎水性残基」は、塩基性基、酸性基、または極性基を欠く側鎖を有する D 型または L 型のアミノ酸残基を指す。典型的な中性疎水性アミノ酸残基には A、V、L、I、P、W、M、および F が含まれる。

【 0 0 2 7 】

用語「極性疎水性残基」は、極性基を含む側鎖を有する D 型または L 型のアミノ酸残基を指す。典型的な極性疎水性アミノ酸残基には T、G、S、Y、C、Q、および N が含まれる。

30

【 0 0 2 8 】

用語「疎水性残基」は、塩基性基または酸性基を欠く側鎖を有する D 型または L 型のアミノ酸残基を指す。典型的な疎水性アミノ酸残基には A、V、L、I、P、W、M、F、T、G、S、Y、C、Q、および N が含まれる。

【 0 0 2 9 】

用語「被験者」は、本明細書において、哺乳動物を指す。例えば、本発明に意図される哺乳動物には、ヒト；霊長類；イヌ、ネコなどのすべての種類のペット；ヒツジ、ウシ、ヤギ、ブタ、ウマ等の家畜動物；マウス、ラット、ウサギ、モルモットなどの一般的な実験動物；それとともに、動物園におけるような捕獲された動物または自由な野生動物が含まれる。本明細書全体を通じて、用語、宿主は、被験者と交換可能に用いられる。

40

【 0 0 3 0 】

「単離された」は、L D C A M、L D C A M アンタゴニストまたは L D C A M アゴニストが、他のタンパク質またはポリペプチドと会合していないことを意味し、例えば組換え宿主細胞培養物の精製産物のようなものまたは精製抽出物のようなものである。

【 0 0 3 1 】

本明細書において、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈が明らかに単数形を指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって例えば、「免疫 ( a n i m m u n i z a t i o n ) 」には、複数のこうした免疫が含まれ、そして「細胞 ( t h e c e l l ) 」への言及には、1 以上の細胞および当業者に知られるその同等物への言及が含まれるなどである。本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、明らかに異

50



なって示されない限り、本発明が属する当該技術分野の一般的な当業者に、一般的に理解されるのと同様の意味を有する。

【0032】

明確にするため、用語を説明の適切な文脈に維持するために、他の定義は明細書全体に提供される。

本発明の多様な態様は、記載される特定の技術的方法論、プロトコル、細胞株、動物種または属、構築物、および試薬に限定されず、これはこうしたものが多様であることも可能であるためである。本明細書に用いる専門用語は、特定の態様を説明する目的のみのものであり、そして本発明の範囲を限定することを意図せず、本発明の範囲は、付随する請求項のみによって限定されるであろう。

10

【0033】

2. LDCAMのアゴニストおよびアンタゴニスト

「アンタゴニスト」は、本明細書において、2つの同族体の結合を部分的にまたは完全に遮断し、それによって同族体の相互作用の下流生物学的効果を阻害する分子である。例えば、アンタゴニストは、受容体へのリガンドの結合を遮断することも可能であり、次に、その受容体の活性化を介する細胞内シグナル伝達を減少させ、そして/または防止し、次に、その受容体の活性化の下流生物学的効果、例えば限定されるわけではないが、細胞活性化、増殖、分化、サイトカイン放出、遺伝子の上方制御、タンパク質の細胞表面発現等を減少させるかまたは防止する。もちろん、アンタゴニストは、接着分子などの他の型の同族体の相互作用を遮断することも可能である。

20

【0034】

したがって、「LDCAMアンタゴニスト」は、1以上のLDCAM生物学的活性に拮抗する分子である。LDCAMアンタゴニストには、限定されるわけではないが：1以上のLDCAM結合パートナー（限定されるわけではないが、LDCAM、CRTAM、B7L-4、および/またはB7L-1など）へのLDCAMの結合を部分的にまたは完全に遮断する、LDCAM特異的抗体、LDCAM特異的ペプチボディ、またはLDCAMに結合する可溶性ポリペプチド（LDCAM、CRTAM、B7L-4、およびB7L-1ポリペプチドなど）である。LDCAMおよびCRTAM間の結合を遮断するLDCAMアンタゴニストは、CRTAMに結合し、そしてCRTAM受容体を架橋するなどによって、CRTAMを活性化することがない。さらなる例には：CRTAM特異的抗体、CRTAM特異的ペプチボディ、またはLDCAMに結合して、そしてLDCAMおよびCRTAM間の結合を部分的にまたは完全に遮断する、CRTAM可溶性ポリペプチド；B7L-1特異的抗体、B7L-1特異的ペプチボディ、またはLDCAMに結合して、そしてLDCAMおよびB7L-1もしくはCRTAMなどの他のLDCAM結合パートナー間の結合を部分的にまたは完全に遮断する、B7L-1可溶性ポリペプチド；B7L-4特異的抗体、B7L-4特異的ペプチボディ、またはLDCAMに結合して、そしてLDCAMおよびB7L-4もしくはCRTAMなどの他のLDCAM結合パートナー間の結合を部分的にまたは完全に遮断する、B7L-4可溶性ポリペプチドが含まれる。本明細書に提示するアンタゴニストは、以下：LDCAM、B7L-1、B7L-4またはCRTAMの1以上に対して向けられる、単離、可溶性ポリペプチド、抗体、融合タンパク質およびペプチボディを含む。本明細書に提示するアンタゴニストは、LDCAM、B7L-1、B7L-4、またはCRTAM間の相互作用に拮抗する、ペプチド擬似体およびミモトープなどの小分子をさらに含む。さらなるアンタゴニストは、LDCAM、B7L-1、B7L-4、またはCRTAMのmRNAを特異的にターゲティングし、そしてこれらにハイブリダイズして、それによってそれぞれのタンパク質の遺伝子翻訳を防止する、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。さらなる態様は、LDCAM、B7L-1、B7L-4、またはCRTAMの発現を静めるように調整されたRNA干渉分子による遺伝子サイレンシングを含む。特定のアンタゴニストのより具体的な定義および例を以下のセクションに提供する。

30

40

【0035】

50

「アゴニスト」は、本明細書において、同族体相互作用の下流生物学的効果を活性化  
 する分子である。例えば、アゴニストは、受容体へのリガンドの結合を模倣することも可能  
 であり、これが受容体の活性化を介して細胞内シグナル伝達を引き起こし、次に、その受  
 容体の活性化の下流生物学的効果、例えば限定されるわけではないが、細胞活性化、増殖  
 、分化、サイトカイン放出、遺伝子の上方制御、タンパク質の細胞表面発現等を達成する  
 。あるいは、アゴニストは、同族体のそれぞれの結合部位のいずれかに隣接する部位に結  
 合し、そしてその細胞タンパク質のコンホメーション変化を誘導し、それによってその生  
 物学的活性を増進することも可能である。例えば、アゴニストは、LDCAMに結合する  
 が、LDCAM/LDCAM間またはLDCAM/CRTAM間またはLDCAM/B7  
 L-1間の結合を遮断せず、そしてLDCAM/LDCAM間またはLDCAM/CRT  
 AM間またはLDCAM/B7L-1間の結合が、例えば結合対間の親和性またはアピ  
 ティー増加によるなどで増進されるように、LDCAMのコンホメーション変化を引き  
 起こすことも可能である。

10

#### 【0036】

したがって、「LDCAMアゴニスト」は、1以上のLDCAM生物学的活性をアゴナ  
 イズする分子である。LDCAMアゴニストには、限定されるわけではないが：1以上の  
 LDCAM結合パートナー（限定されるわけではないが、LDCAM、CRTAM、B7  
 L4、および/またはB7L-1など）へのLDCAMの結合の下流生物学的効果を達成  
 する、LDCAM特異的抗体、LDCAM特異的ペプチボディ、またはLDCAMに結合  
 する可溶性ポリペプチドが含まれる。さらなる例には：CRTAM特異的抗体、細胞表面  
 上のCRTAMを架橋することが可能であり、そして該受容体を活性化するCRTAM特  
 異的抗体；LDCAMなどの1以上のCRTAM結合パートナーへのCRTAM結合の下  
 流生物学的効果を達成する、CRTAM特異的ペプチボディまたはCRTAMに結合する  
 可溶性ポリペプチド（LDCAMなど）が含まれる。LDCAMアゴニストの別の態様に  
 は、限定されるわけではないがFcドメインに連結されたLDCAMの細胞外ドメイン（  
 以下に記載するとおり）などの可溶性LDCAM融合タンパク質が含まれる。さらなる態  
 様には、CRTAMに結合し、そして細胞表面上のCRTAM受容体を架橋して、そして  
 該受容体を活性化する能力を有するLDCAMアゴニストが含まれる。こうしたLDCA  
 Mアゴニストには、CRTAM受容体を架橋し、そして活性化することが可能な、CRT  
 AM特異的抗体およびペプチボディ、並びにLDCAM-Fc融合タンパク質が含まれる  
 。さらなる態様には、CRTAMに結合し、そして細胞表面上のCRTAM受容体を架橋  
 し、そして活性化する能力を有する多量体LDCAMポリペプチドが含まれる。本明細書  
 に提示するアゴニストは、以下：LDCAM、B7L-1、またはCRTAMの1以上  
 に対して向けられる、単離、可溶性ポリペプチド、抗体、融合タンパク質およびペプ  
 チボディを含む。本明細書に提示するアゴニストは、さらに、LDCAM、B7L-1、または  
 CRTAM間の相互作用をアゴナイズする、ペプチド擬似体およびミモトープなどの小分  
 子をさらに含む。さらなるアゴニストは、LDCAM、B7L-1、またはCRTAMの  
 mRNAを特異的にターゲティングし、そしてこれらにハイブリダイズして、それによ  
 ってそれぞれのタンパク質の遺伝子翻訳を防止する、アンチセンスオリゴヌクレオチドを含  
 む。さらなる態様は、LDCAM、B7L-1、またはCRTAMの発現を静めるように  
 調整されたRNA干渉分子による遺伝子サイレンシングを含む。特定のアゴニストのより  
 具体的な定義および例を以下のセクションに提供する。

20

30

40

#### 【0037】

こうしたものとして、LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストを用いて、以下：L  
 DCAMとLDCAMの結合（ホモタイプ凝集によるなど）；CRTAMへのLDCAM  
 結合；B7L-1へのLDCAM結合；活性化および増殖などの、T細胞活性；活性化刺  
 激へのT細胞応答；CD3刺激/活性化へのT細胞応答；マイトジェン刺激/活性化への  
 T細胞応答；NK-T細胞活性；NK細胞活性；B細胞活性；限定されるわけではないが  
 、IL-2、INF-ガンマおよび他の炎症誘発性サイトカインなどの、免疫細胞による  
 サイトカイン発現；抗原提示細胞およびT細胞間の活性；樹状細胞およびT細胞間の活性

50

; B D C A 3 + 樹状細胞および T 細胞間の活性; 抗原提示細胞および N K - T 細胞間の活性; 樹状細胞および N K - T 細胞間の活性; B D C A 3 + 樹状細胞および N K - T 細胞間の活性; 抗原提示細胞および N K 細胞間の活性; 樹状細胞および N K 細胞間の活性; B D C A 3 + 樹状細胞および N K 細胞間の活性; ニューロンおよび T 細胞間の活性; ニューロンおよび N K - T 細胞間の活性; 並びにニューロンおよび N K 細胞間の活性の 1 以上に拮抗するか、またはこれらをアゴナイズすることも可能である。

【0038】

#### 2.1 L D C A M、C R T A M または B 7 L - 1 に対する抗体

L D C A M、C R T A M または B 7 L - 1 と免疫反応性である抗体を、L D C A M アンタゴニストまたはアゴニストとして用いることも可能である。1つの特定の態様は、1 F 1 2 と称される、L D C A M 特異的 s c f v 抗体を含む。1 F 1 2 s c f v 配列を図 6 に示す。別の態様は、1 F 1 2 s c f v - F c 融合タンパク質(ときに 1 F 1 2 マキシボディ(maxibody)と称される)である。1 F 1 2 s c f v 抗体を用いて、マウス C D 8 + 樹状細胞のヒト対応物である、ヒト樹状細胞の新規サブセットを単離した。この樹状細胞サブセットは、B D C A 3 + 樹状細胞と称される。

【0039】

樹状細胞(DC)は、T細胞プライミングおよび寛容を調節するプロフェッショナル抗原提示細胞の異種集団を構成する。マウスでは、C D 4 および C D 8 抗原の表面発現にしたがって、脾臓 DC を、少なくとも 3 つの別個の機能的サブセットに細分することも可能である。他のマウス DC サブセットと異なり、C D 8 + DC は、アポトーシス小体を飲み込むユニークな能力を示し、そしてしたがって、抗原交差提示に非常に重要な役割を果たすと考えられる。我々は、本明細書において、ヒト血液 DC サブセット上に特異的に発現される新規表面抗原をターゲティングし、そして同定する、パニング/ファージディスプレイアプローチを記載する。我々は、抗体(1 F 1 2)が、B D C A 3 + ヒト血液 DC、並びに脾臓およびリンパ節の T 細胞領域中の H L A - D R +、C D 1 3 + 細胞の両方に存在する表面抗原をターゲティングすることを示す。これらの細胞は、同じヒト DC 下位集団の地理的に異なる提示である可能性もある。マウスでは、1 F 1 2 は、血液白血球のまれなサブセットとともに、脾臓 C D 8 + DC を特異的に標識する。1 F 1 2 は、1 0 0 k D a の表面タンパク質を免疫沈降し、該タンパク質は、質量分析によって、L D C A M と認識された。マウスおよびヒト L D C A M + DC は、C D 1 1 c を発現するが、C D 1 1 b を発現しない。これらはまた、共通する 1 0 の特定の遺伝子団も発現し、したがって、これらが同等の細胞集団に相当するという見方が強まる。最後に、他のヒト DC サブセットいずれとも異なり、L D C A M + ヒト DC は、アポトーシス小体を効率的に内部移行させることも可能である。我々は、L D C A M 発現が、表現型特性、組織学的特性、および機能特性を共有する、マウスおよびヒトにおける DC のユニークな集団を定義すると結論付ける。

【0040】

単離されそして表現型決定された DC サブセット(図 1 を参照されたい)は、i n v i v o で病原体に反応した I L - 1 2 産生の主な供給源であり; C D 8 + T 細胞への抗原の i n v i v o 交差提示の原因であり; i n v i v o でアポトーシス小体を貪食することが可能であり; そして安定状態(炎症の非存在下など)における寛容の誘導の原因であることを含む、重要な免疫学的役割を有する。

【0041】

B D C A 3 + DC に対する抗体を、多様な研究、臨床および療法セッティングで用いることも可能であり、これらには、限定されるわけではないが、免疫応答の結果に影響を及ぼす B D C A 3 + DC 機能の調節が含まれ、例えば抗原に連結された 1 F 1 2 抗体を用いて B D C A 3 + DC をターゲティングし、そしてそれによって、B D C A 3 + DC 集団に抗原を特異的に搬送することなどが含まれる。このプロセスは、被験者にその抗原に対する免疫寛容を与えることも可能である。あるいは、炎症シグナルの存在下で、ターゲティングされた抗原は、その抗原に対する抗原特異的免疫応答を増大させるであろう

。1F12抗体および他の抗LDCAM抗体を予後目的に用いることも可能であり、例えば正常組織および病的組織における比較または相対的BDCA3+ DC定量化がある。1F12抗体および他の抗LDCAM抗体を用いて、多様な体液、臓器および組織からBDCA3+ DCを精製するかまたは単離することも可能である。次いで、*ex vivo*で細胞を操作し、そして操作した細胞を被験者に再注入しなおすことによって、細胞に基づく多様な免疫療法において、BDCA3+ DCを用いることも可能である。1F12抗体および他の抗LDCAM抗体を用いて、*in vivo*でBDCA3+ DCを枯渇させるか、または限定されるわけではないが、T細胞プライミング、DCホーミング、T細胞、特にCD8+ T細胞への抗原の交差提示などの、BDCA3+ DCの免疫学的機能に干渉することも可能である。抗原の交差提示および抗原への交差寛容は、多くの自己免疫疾患、移植および癌に重要な細胞機構であるため、1F12抗体および他の抗LDCAM抗体を用いて、BDCA3+ DCを通じた免疫応答を調節することによって、これらの障害を治療することも可能である。

10

## 【0042】

さらに、1F12抗体および他の抗LDCAM抗体を*ex vivo*細胞療法に用いることも可能である。1F12抗体および他の抗LDCAM抗体を用いて、BDCA3+ DCを単離し、そして*ex vivo*で操作し、そして患者に再導入して疾患を治療することも可能である。例示目的のみのため、単離BDCA3+ DCを癌抗原(限定されるわけではないが、以下の表2に提示するようなもの)に曝露して、そしてBDCA3+ DC/プロセシングされた癌抗原を患者に注入しなおすことによって、癌に対する免疫寛容を断つことも可能である。癌抗原は患者由来であることも可能であるし、そして癌細胞の形であることも可能である。BDCA3+ DCが、アポトーシス細胞を貪食することが可能であり、そして癌特異的CTLエフェクターを生成するため、こうした外因性抗原をCD8+ T細胞に提示するようであることも示されてきている。

20

## 【0043】

## 表2

## 【0044】

【表 1 - 1】

抗原カテゴリー	代表的な抗原のいくつかの特定の例
ウイルス	ロタウイルス；口蹄疫；インフルエンザAおよびBを含むインフルエンザ；パラインフルエンザ；ヘルペス属種（単純疱疹、エプスタインバーウイルス、水痘、偽狂犬病、サイトメガロウイルス）；狂犬病；ポリオ；A型肝炎；B型肝炎；C型肝炎；E型肝炎；麻疹；ジステンパー；ベネズエラ・ウマ脊髄脳炎；ネコ白血病ウイルス；レオウイルス；呼吸器合胞体ウイルス；ウシ呼吸器合胞体ウイルス；ラッサ熱ウイルス；ポリオマ腫瘍ウイルス；パルボウイルス；イス・パルボウイルス；パピローマウイルス；ダニ媒介脳炎；牛疫；ヒト・ライノウイルス種；エンテロウイルス種；メングウイルス；パラミクソウイルス；鳥感染性気管支炎ウイルス；HTLV1；HIV-1；HIV-2；LCMV（リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス）；アデノウイルス；トガウイルス（風疹、黄熱、デング熱）；コロナウイルス
細菌	百日咳菌 ( <i>Bordetella pertussis</i> )；ウシ流産菌 ( <i>Brucella abortis</i> )；大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> )；チフス菌 ( <i>Salmonella typhi</i> ) を含むサルモネラ属 ( <i>Salmonella</i> ) 種；連鎖球菌；ビブリオ属 ( <i>Vibrio</i> ) 種（コレラ菌 ( <i>V. cholera</i> )、腸炎ビブリオ菌 ( <i>V. parahaemolyticus</i> )）；赤痢菌属 ( <i>Shigella</i> ) 種；シュードモナス属 ( <i>Pseudomonas</i> ) 種；ブルセラ属 ( <i>Brucella</i> ) 種；マイコバクテリウム属 ( <i>Mycobacteria</i> ) 種（ヒト型結核菌 ( <i>M. tuberculosis</i> )、鳥型結核菌 ( <i>M. avium</i> )、BCG、ハンセン病）；肺炎球菌；ブドウ球菌；エンテロバクター属 ( <i>Enterobacter</i> ) 種；ロシヤリマア・ヘンセラ ( <i>Rochalimaia henselae</i> )；パストツレラ属 ( <i>Pasteurella</i> ) 種（溶血性肺炎菌 ( <i>P. haemolytica</i> )、パストツレラ・マルトシダ ( <i>P. multocida</i> )）；クラミジア属 ( <i>Chlamydia</i> ) 種（トラコーマ・クラミジア ( <i>C. trachomatis</i> )、オウム病クラミジア ( <i>C. psittaci</i> )、鼠径リンパ肉芽腫症 ( <i>Lymphogranuloma venereum</i> )）；梅毒 ( <i>Syphilis</i> )（梅毒トレポネーマ ( <i>Treponema pallidum</i> )）；ヘモフィルス属 ( <i>Haemophilus</i> ) 種；マイコプラズマ属 ( <i>Mycoplasma</i> ) 種；ライム病 (ライム病菌 ( <i>Borrelia burgdorferi</i> ))；レジオネラ病；ボツリヌス中毒症 (ボツリヌス菌 ( <i>Clostridium botulinum</i> ))；ジフテリア菌 ( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> )；エルシニア・エンテロコリチカ ( <i>Yersinia enterocolitica</i> )
リケッチア感染	ロッキー山紅斑熱；チフス；エーリキア属 ( <i>Ehrlichia</i> ) 種
寄生虫および原生動物	マラリア (熱帯熱マラリア原虫 ( <i>Plasmodium falciparum</i> )、三日熱マラリア原虫 ( <i>P. vivax</i> )、四日熱マラリア原虫 ( <i>P. malariae</i> ))；住血吸虫；トリパノソーム；リーシュマニア属 ( <i>Leishmania</i> ) 種；フィラリア線虫；トリコモナス症 ( <i>trichomoniasis</i> )；住肉胞子虫症；条虫属 ( <i>Taenia</i> ) 種（無鉤条虫 ( <i>T. saginata</i> )、有鉤条虫 ( <i>T. solium</i> ))；トキソプラズマ原虫 ( <i>Toxoplasma gondii</i> )；旋毛虫症 ( <i>trichinelosis</i> )（センモウチュウ ( <i>Trichinella spiralis</i> ))；コクシジウム症 (アイメリア属 ( <i>Eimeria</i> ) 種)
真菌	クリプトコッカス・ネオフォルマンズ ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )；鶯口瘡カンジダ ( <i>Candida albicans</i> )；煙色コウジ菌 ( <i>Apergillus fumigatus</i> )；コク

10

20

30

40

【表 1 - 2】

	シジオイデス症	
組換えタンパク質	単純疱疹; エプスタインバーウイルス; B型肝炎; 偽狂犬病; フラビウイルス (デング熱、黄熱); 淋菌 ( <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ); マラリア: スポロゾイト周囲タンパク質、分裂小体タンパク質; トリパノソーム表面抗原タンパク質; 百日咳; アルファウイルス; アデノウイルス	
タンパク質	ジフテリア毒素; 破傷風毒素; 髄膜炎菌外膜タンパク質 (OMP); 連鎖球菌Mタンパク質; B型肝炎; インフルエンザ赤血球凝集素; 癌抗原; 腫瘍抗原; 毒素; 外毒素; 神経毒; サイトカインおよびサイトカイン受容体; モノカインおよびモノカイン受容体	
合成ペプチド	マラリア; インフルエンザ; 口蹄疫ウイルス; B型肝炎; C型肝炎	
多糖	肺炎球菌多糖; インフルエンザ菌 ( <i>Haemophilis influenza</i> ) ポリリボシルーリビトールリン酸 (PRP); 髄膜炎菌 ( <i>Neisseria meningitides</i> ); 緑膿菌 ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ); 肺炎桿菌 ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	
オリゴ糖	肺炎球菌	
アレルゲン	植物花粉; 動物のフケ; チリダニ、プラテラ属 ( <i>Blattella</i> ) 種抗原 (Bla g 1、2または5)、ゴキブリ属 ( <i>Periplaneta</i> ) 種抗原 (Per a 1)	
ヒト癌抗原	CD8+リンパ球に認識されるクラスI 拘束抗原: 黒色腫-メラニン形成細胞分化抗原 (MART-1/Melan A; gp100/pm1-17; チロシナーゼ; チロシナーゼ関連タンパク質-1; チロシナーゼ関連タンパク質-2; メラニン形成細胞刺激ホルモン受容体); 癌精巢抗原 (MAGE-1; MAGE-2; MAGE-3; MAGE-12、BAGE; CAGE、NYESO-1); 突然変異抗原 ( $\beta$ -カテニン; MUM-1; CDK-4; カスパーゼ-8; KIA 0205; HLA-A2-R1701); および癌上で過剰発現される非突然変異共有抗原 ( $\alpha$ -フェトプロテイン; テロメラゼ触媒タンパク質; G-250; MUC-1; 癌胎児性抗原; p53; Her-2/neu)  CD4+リンパ球に認識されるクラスII 拘束抗原 非突然変異タンパク質由来のエピトープ (gp100; MAGE-1; MAGE-3; チロシナーゼ; NY-ESO-1) および突然変異タンパク質由来のエピトープ (トリオースリン酸イソメラーゼ; CDC-27; LDLR-FUT)	20  30
癌抗原としての感染性病原体	細菌: ピロリ菌 ( <i>Helicobacter pylori</i> ) (胃癌およびリンパ腫) ウイルス: ヒト・パピローマウイルス (子宮頸癌および肛門癌); B型肝炎およびC型肝炎ウイルス (肝癌); HIV (カポジ肉腫、非ホジキンリンパ腫); ヒトB型ヘルペスウイルス (カポジ肉腫); エプスタインバーウイルス (リンパ腫); ヒトT細胞リンパ球向性ウイルス (成人T細胞白血病) 寄生虫: 住血吸虫 (膀胱癌); 肝吸虫 (肝内胆管癌)	40

## 【0046】

別の態様において、1F12抗体および他の抗LDCAM抗体を用いて、BDC A3 + DCに薬剤または毒素を搬送することも可能であり、これは次に、下流免疫応答に影響を及ぼすであろう。

## 【0047】

別の態様には、LDCAMポリペプチド、LDCAMポリペプチド断片、LDCAMポリペプチド変異体などに結合し、そして生物学的活性の定義に記載する生物学的活性を調節する、アゴニストまたはアンタゴニストである、抗体が含まれる。LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストの別の態様には、CRTAMポリペプチド、CRTAMポリペ

10

20

30

40

50

チド断片、CRTAMポリペプチド変異体などに結合し、そして生物学的活性の定義に記載する生物学的活性を調節する、抗体が含まれる。こうした抗体は、(非特異的結合とは対照的に)抗体の抗原結合部位を介してポリペプチドに特異的に結合する。例えば、LDCAM特異的抗体は、LDCAMポリペプチド、相同体、および変異体を特異的に認識し、そしてこれらに結合するが、他の分子とは結合しないであろうものである。1つの好ましい態様において、抗体は、本発明のポリペプチドに特異的であり、そして他のポリペプチドと交差反応しない。この方式で、LDCAMポリペプチド、断片、変異体、融合ポリペプチド等は、上述のように、免疫反応性である抗体を産生する際の「免疫原」として使用可能である。

**【0048】**

より具体的には、ポリペプチド、断片、変異体、融合ポリペプチド等は、抗体の形成を誘発する、抗原決定基またはエピトープを含有する。これらの抗原決定基またはエピトープは、直鎖またはコンホメーション的(conformational)(断続的)のどちらであることも可能である。直鎖エピトープは、該ポリペプチドのアミノ酸の単一の部分で構成されるが、コンホメーションのエピトープまたは断続的エピトープは、ポリペプチドフォールディングに際してごく近接する、ポリペプチド鎖の異なる領域由来のアミノ酸部分で構成される(JanewayおよびTravers, *Immunology* 3:9 (Garland Publishing Inc., 第2版, 1996))。フォールディングしたポリペプチドは複雑な表面を有するため、利用可能なエピトープの数は非常に多い;が、ポリペプチドのコンホメーションおよび立体障害のため、実際にエピトープに結合する抗体の数は、利用可能なエピトープの数より少ない(JanewayおよびTravers, *Immunology* 2:14 (Garland Publishing Inc., 第2版, 1996))。エピトープは、当該技術分野に知られるいかなる方法によって同定されることも可能である。したがって、本発明の1つの側面は、本発明のポリペプチドの抗原性エピトープに関する。こうしたエピトープは、以下にさらに詳細に記載するように、抗体、特にモノクローナル抗体を作成するのに有用である。さらに、本発明のポリペプチドに由来するエピトープは、アッセイにおいて研究試薬として、そしてポリクローナル血清または培養ハイブリドーマの上清などの物質から、特異的に結合する抗体を精製するために、使用可能である。こうしたエピトープまたはその変異体は、固相合成、ポリペプチドの化学的切断または酵素的切断、あるいは組換えDNA技術の使用など、当該技術分野に周知の技術を用いて、産生可能である。

**【0049】**

本発明のポリペプチドのエピトープによって誘発可能な抗体に関しては、エピトープが単離されていてもまたはポリペプチドの一部のままであっても、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のどちらも、慣用的技術によって調製可能である。例えば、*Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennetら(監修), Plenum Press, ニューヨーク(1980);および*Antibodies: A Laboratory Manual*, HarlowおよびLand(監修), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー(1988);KohlerおよびMilstein(米国特許第4,376,110号);ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら, 1984, *J. Immunol.* 133:3001-3005; Coleら, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030);およびEBVハイブリドーマ技術(Coleら, 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96)を参照されたい。本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本明細書に意図される。こうしたハイブリドーマを、慣用的技術によって産生

10

20

30

40

50

しそして同定することも可能である。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、*in vitro*または*in vivo*で培養可能である。*in vivo*では高力価でmAbが産生されるため、これが現在好ましい産生法である。こうしたハイブリドーマ細胞株を産生するための1つの方法は、動物をポリペプチドで免疫し；免疫された動物から脾臓細胞を採取し；前記脾臓細胞を骨髄腫細胞株に融合させ、それによってハイブリドーマ細胞を生成し；そしてポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を同定することを含む。抗体を産生するため、1以上の以下を注射することによって、多様な宿主動物を免疫することも可能である：LDCAMポリペプチド、LDCAMポリペプチドの断片、LDCAMポリペプチドの機能する同等物、LDCAMの変異体型またはLDCAMポリペプチドの突然変異型；CRTAMポリペプチド、CRTAMポリペプチドの断片、CRTAMポリペプチドの機能する同等物、またはCRTAMポリペプチドの突然変異型。こうした宿主動物には、限定されるわけではないが、ウサギ、モルモット、マウス、およびラットが含まれる。宿主種に応じて、多様なアジュバントを用いて、免疫学的応答を増加させることも可能であり、こうしたアジュバントには、限定されるわけではないが、フロイント（完全および不完全）、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオンなどの界面活性物質、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペット（keyhole limpet）ヘモシアニン、ジニトロフェノール、並びにBCG（カルメット・ゲラン桿菌（*Baccille Calmette - Guerin*））および坐瘡プロピオンバクテリウム（*Corynebacterium parvum*）などの潜在的に有用なヒトアジュバントが含まれる。モノクローナル抗体は、慣用的技術によって回収可能である。こうしたモノクローナル抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD、およびそのいかなるサブクラスも含む、いかなる免疫グロブリンクラスのものであることも可能である。

#### 【0050】

さらに、LDCAMまたはCRTAM「キメラ抗体」の産生のために開発された技術（Takedaら、1985、*Nature*、314：452-454；Morrisonら、1984、*Proc Natl Acad Sci USA* 81：6851-6855；Boulianneら、1984、*Nature* 312：643-646；Neubergerら、1985、*Nature* 314：268-270）が使用可能であり、これは適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と、適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子とともにスプライシングすることによる。キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子であり、ブタmAbに由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなどである。本発明のモノクローナル抗体にはまた、ネズミモノクローナル抗体のヒト化型も含まれる。こうしたヒト化抗体は、既知の技術によって調製可能であり、そして抗体をヒトに投与した際、減少した免疫原性という利点を提供する。1つの態様において、ヒト化モノクローナル抗体は、ネズミ抗体の可変領域（またはその抗原結合部位のみ）およびヒト抗体由来の定常領域を含む。あるいは、ヒト化抗体断片は、ネズミモノクローナル抗体の抗原結合部位およびヒト抗体由来の可変領域断片（抗原結合部位を欠く）を含むことも可能である。キメラおよびさらなる操作モノクローナル抗体の産生法には、Riechmannら（*Nature* 332：323、1988）、Liuら（*PNAS* 84：3439、1987）、Larrickら（*Bio/Technology* 7：934、1989）、並びにWinterおよびHarris（*TIPS* 14：139、*Can*、1993）に記載されるものが含まれる。抗体をヒト化するのに有用な技術は、米国特許6,054,297にも論じられる。トランスジェニック的に抗体を生成する方法は、GB 2,272,440、米国特許第5,569,825号および第5,545,806号、並びに関連特許に見出すことも可能である。好ましくは、ヒトで使用するため、抗体はヒト抗体またはヒト化抗体であり；こうしたヒト抗体またはヒト化抗体を生成する技術もまた周知であり、そして例えばMedarex Inc.（ニュージャージー州プリンストン）およびAbgenix Inc.（カリフォルニア州フレモント）から商業的に入手可能である



。

## 【0051】

別の態様において、ファージディスプレイ法 (Vaughanら, 1998, Nat Biotechnol. 16(6):535-539; および米国特許第5,969,108号)、リボソームディスプレイ法 (Schaffitzelら, 1999, J Immunol Methods 231(1-2):119-135)、または mRNAディスプレイ法 (Wilsonら, 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98(7):3750-3755) いずれかを用いて、ヒト抗体可変ドメインのライブラリーをスクリーニングすることによって、ヒトで使用するための完全ヒト抗体を産生する。ファージディスプレイ法によって産生される抗LDCAM scfv抗体の例を実施例18に記載する。 10

## 【0052】

特異的エピトープを認識する抗原結合抗体断片は、既知の技術によって生成可能である。例えば、こうした断片には、限定されるわけではないが：抗体分子のペプシン消化によって産生可能なF(ab')<sub>2</sub>断片、および(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を還元することによって産生可能なFab断片が含まれる。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築し (Huseら, 1989, Science, 246:1275-1281)、所望の特異性を持つモノクローナルFab断片の迅速でそして容易な同定を可能にすることも可能である。一本鎖抗体の産生に関して記載される技術 (米国特許第4,946,778号; Bird, 1988, Science 242:423-426; H 20  
ustonら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; およびWardら, 1989, Nature 334:544-546) を適応させ、LDCAM遺伝子産物に対する一本鎖抗体を産生することもまた可能である。一本鎖抗体は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重鎖および軽鎖断片を連結して一本鎖ポリペプチドを生じることによって形成される。こうした一本鎖抗体はまた、例えばHIV感染における遺伝子治療に関して、Marascoら (J. Immunol. Methods 231:223-238, 1999) に記載されるように、細胞内でもまた (すなわち「細胞内抗体」として) 有用である可能性もある。さらに、当業者に周知の技術を用いて、今度はLDCAMポリペプチドに対する抗体を利用して、LDCAMポリペプチドを「模倣」し、そしてLDCAMポリペプチドの結合パートナ 30  
ーに結合可能な抗イディオタイプ抗体を生成することも可能である (例えばGreenspan & Bona, 1993, FASEB J 7(5):437-444; およびNissinoff, 1991, J. Immunol. 147(8):2429-2438を参照されたい)。

## 【0053】

本発明のポリペプチドと免疫反応性である抗体には、二重特異性抗体 (すなわち第一の抗原結合ドメインを介して本発明のポリペプチドと免疫反応性であり、そしてまた、第二の抗原結合ドメインを介して異なるポリペプチドとも免疫反応性である抗体) が含まれる。多様な二重特異性抗体が調製され、そしてin vitroおよびin vivo両方で有用であることが見出されてきている (例えば米国特許5,807,706; 並びにC 40  
aoおよびSuresh, 1998, Bioconjugate Chem 9:635-644を参照されたい)。二重特異性抗体を調製する多くの方法が当該技術分野に知られ、これらには、2つの異なるハイブリドーマを融合させることによって形成するクアドローマ (quadroma)、およびハイブリドーマをリンパ球と融合させることによって形成するトリオーマなどのハイブリッド-ハイブリドーマの使用が含まれる (MilsteinおよびCuello, 1983, Nature 305:537-540; 米国特許4,474,893; および米国特許6,106,833)。米国特許6,060,285は、二重特異性抗体の産生法を開示し、この方法において、少なくとも、第一の特異性を有する抗体の軽鎖の遺伝子および重鎖可変部分の遺伝子を、第二の特異性を有する抗体を分泌するハイブリドーマ細胞にトランスフェクションする。抗体断片の化 50

学的カップリングもまた、2つの異なる抗原に対する特異性を有する抗原結合分子を調製するのに用いられてきている (Brennanら, 1985, Science 229: 81-83; Glennieら, J. Immunol., 1987, 139: 2367-2375; および米国特許6, 010, 902)。二重特異性抗体はまた、例えばKostelnyら (J. Immunol. 148: 1547-4553; 1992) に記載されるように、FosおよびJunタンパク質 (優先的にヘテロ二量体を形成する) 由来のロイシンジッパー部分を用いることによって、組換え手段を介しても産生可能である。米国特許5, 582, 996は、二重特異性抗体産生において、ヘテロ二量体形成を促進するための相補的相互作用ドメイン (ロイシンジッパー部分または他の錠および鍵相互作用ドメイン構造など) の使用を開示する。四価二重特異性分子は、米国特許5, 959, 083に記載されるように、抗体のF(ab')<sub>2</sub>断片の重鎖をコードするDNAを、第二のF(ab')<sub>2</sub>分子の重鎖をコードするDNA (CH1ドメインがCH3ドメインと交換されている)、または抗体の一本鎖FV断片をコードするDNAいずれかと融合させることによって調製可能である。生じた融合遺伝子の哺乳動物細胞における発現は、対応する軽鎖の遺伝子とともに、選択される抗原に対して特異性を有する、四価二重特異性分子を生じる。二重特異性抗体はまた、米国特許5, 807, 706に記載されるようにも産生可能である。一般的に、該方法は、第一のポリペプチドの界面で、隆起 (小さいアミノ酸側鎖をより大きい側鎖と交換することによって構築する) を、そして第二のポリペプチドの界面で、対応する空洞 (大きいアミノ酸側鎖をより小さいものと交換することによって調製する) を導入することを伴う。さらに、一本鎖可変断片 (sFv) は、2つの可変ドメインを共有結合することによって調製され; 生じた抗体断片は、2つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーの長さに応じて、二量体または三量体を形成可能である (Korttら, 1997, Protein Engineering 10: 423-433)。

10

20

30

40

50

#### 【0054】

こうした抗体を同定可能なスクリーニング法が周知であり、そして例えば免疫アフィニティークロマトグラフィーを伴うことも可能である。抗体は、アゴニスト (すなわちリガンド模倣) 特性に関してスクリーニング可能である。こうした抗体は、LDCAMポリペプチドの細胞表面部分への結合に際して、LDCAM結合パートナーがLDCAMポリペプチドに結合すると誘導される生物学的効果と類似の生物学的効果 (例えば生物学的シグナルの伝達) を誘導する。アゴニスト性抗体を用いて、LDCAMが仲介する細胞刺激経路または細胞間コミュニケーションを誘導可能である。二重特異性抗体は、2つの別個のアッセイを用いるか、または二重特異性抗体が、第一の抗原および第二の抗原 (後者は検出可能部分にカップリングされている) 間の架橋として働くアッセイを用いてスクリーニングすることによって、同定可能である。第一の抗原結合ドメインを介して、本発明のLDCAMポリペプチドに結合する二重特異性抗体は、以下により詳細に記載するように、診断適用に、そして自己免疫、炎症および癌を治療するのに、有用であろう。

#### 【0055】

本発明のLDCAMポリペプチドが、限定されるわけではないがLDCAM (ホモタイプ凝集)、B7L-1およびCRTAMなどのLDCAM結合パートナーに結合するのを遮断可能な抗体を用いて、こうした結合から生じる、LDCAM、B7L-1および/またはCRTAMが仲介する細胞結合、細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激を、阻害することも可能である。こうした遮断抗体は、限定されるわけではないがLDCAM (ホモタイプ凝集)、B7L-1およびCRTAMなどの特定の結合パートナーへの、LDCAMの結合を阻害する能力に関して、抗体を試験することによるなど、いかなる適切なアッセイ法を用いて同定することも可能である。実施例に記載するもののよう、LDCAM結合パートナーが仲介する細胞刺激経路を阻害する能力に関して、抗体をアッセイすることも可能である。こうした抗体を*in vitro*法で使用するか、または*in vivo*で投与して、抗体を生成した実体に仲介される生物学的活性を阻害することも可能である。このように、限定されるわけではないがLDCAM (ホモタイプ凝集)、B7L-

1 および CRTAM などの細胞表面結合パートナーと LDCAM の相互作用によって（直接または間接的に）引き起こされるかまたは悪化される障害を治療することも可能である。療法は、LDCAM 結合パートナーが仲介する生物学的活性を阻害するのに有効な量の遮断抗体を、哺乳動物に *in vivo* 投与することを伴う。一般的に、こうした療法の使用には、モノクローナル抗体が好ましい。1つの態様において、実施例に記載する scfv-Fc 抗体などの抗原結合抗体断片を使用する。LDCAM に対して向けられる抗体、および生理学的に許容しうる希釈剤、賦形剤、またはキャリアーを含む組成物を、本明細書に提供する。LDCAM ポリペプチドを含有する組成物に関して、こうした組成物の適切な構成要素を以下に記載する。

【0056】

本明細書にやはり提供するのには、LDCAM 特異的抗体に付着した検出可能（例えば診断用）剤または療法剤を含むコンジュゲートである。こうした剤の例を上に表示する。該コンジュゲートは、*in vitro* 法または *in vivo* 法に使用を見出す。本発明の抗体はまた、*in vitro* または *in vivo* いずれかの、本発明のポリペプチドまたは断片の存在を検出するアッセイにおいても使用可能である。抗体はまた、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって、本発明のポリペプチドまたは断片を精製する際にも使用可能である。

【0057】

アゴニスト性抗体またはアンタゴニスト性抗体をスクリーニングするのに使用可能なアッセイの例を以下に記載する。

【0058】

2.2 LDCAM、CRTAM、B7L-4、またはB7L-1に対するペプチボディ

LDCAM アンタゴニストまたはアゴニストは、LDCAM、CRTAM、B7L-4 または B7L-1 に対して向けられるペプチボディの形であることも可能である。さらなる LDCAM アゴニスト態様には、細胞表面上の CRTAM に結合し、そして該分子を活性化する能力を有する CRTAM に向けられるペプチボディが含まれ、こうした能力には、限定されるわけではないが細胞表面上の CRTAM の架橋が含まれる。ペプチボディは当該技術分野に知られる。例示目的のため、ペプチボディは、本明細書に完全に援用される WO 99/25044 および WO 00/24782 により詳細に定義され、そして記載される。ペプチボディを生成するのに用いられるペプチドは、LDCAM B7L-1 または CRTAM のアミノ酸配列由来であることも可能である。配列番号 12 および 13 に提供する抗ヒト LDCAM scfv 配列を、ペプチボディに取り込むことも可能である。

【0059】

2.3 LDCAM および CRTAM ポリペプチドと相互作用する化合物の合理的設計

合理的薬剤設計の目的は、生物学的に活性である目的のポリペプチドまたはそれらが相互作用する小分子、例えば阻害剤、アゴニスト、アンタゴニスト等の構造的類似体を産生することである。これらの例いづれかを用いて、該ポリペプチドの、より活性であるかまたは安定な型である薬剤、あるいは *in vivo* でポリペプチドの機能を増進するかまたは該機能に干渉する薬剤を形作ることも可能である（Hodgson J (1991)

Bio technology 9:19-21)。1つのアプローチにおいて、X線結晶学によって、核磁気共鳴によって、またはコンピュータ相同性モデリングによって、あるいは最も典型的には、これらのアプローチの組み合わせによって、目的のポリペプチドの三次元構造またはポリペプチド-阻害剤複合体の三次元構造を決定する。構造を解明し、そして分子の活性部位（単数または複数）を決定するため、ポリペプチドの形状および荷電両方を確定しなければならない。より頻繁でないが、相同ポリペプチドの構造に基づいてモデリングすることによって、ポリペプチドの構造に関する有用な情報が得られる可能性もある。どちらの場合も、適切な構造情報を用いて、LDCAM および CRTAM ポリペプチドに類似の分子を設計するか、有効な阻害剤を同定するか、あるいは LDCAM

10

20

30

40

50

またはC R T A Mポリペプチドに結合する小分子を同定する。合理的薬剤設計の有用な例には、Braxton SおよびWells J A (1992 Biochemistry 31:7796-7801)に示すように、改善された活性または安定性を有する分子、あるいはAthauda S Bら(1993 J Biochem 113:742-746)に示すように、天然ペプチドの阻害剤、アゴニスト、またはアンタゴニストとして作用する分子が含まれる。阻害剤設計および阻害剤-L D C A MまたはC R T A Mポリペプチド相互作用研究を補助するための、分子モデリングソフトウェア系における、L D C A MおよびC R T A Mポリペプチド構造情報の使用もまた、本発明に含まれる。本発明の特定の方法は、基質のありうる結合部位に関して、L D C A MおよびC R T A Mポリペプチドの三次元構造を解析し、予測される反応部位を取り込んだ新規分子を合成し、そして本明細書にさらに記載するように、新規分子をアッセイすることを含む。 10

#### 【0060】

本明細書にさらに記載するような、機能アッセイによって選択される、ターゲット特異的抗体を単離し、そして次いで、結晶構造を解析することもまた可能である。このアプローチによって、原則として、続く薬剤設計の基礎とすることも可能なファーマコア(pharmacore)を得る。機能する薬理学的活性抗体に対する抗イディオタイプ抗体(anti id)を生成することによって、ポリペプチド結晶学を完全に回避することが可能である。鏡像の鏡像として、anti idの結合部位は、元来の抗原の類似体であると予測されるであろう。次いで、anti idを用いて、化学的または生物学的に産生したペプチドのバンクからペプチドを同定し、そして単離することも可能である。次いで、単離ペプチドは、ファーマコアとして働くであろう。 20

#### 【0061】

##### 2.4 核酸に基づくL D C A Mアンタゴニストおよびアゴニスト

別の態様において、核酸に基づく免疫療法を設計して、例えば、L D C A M、C R T A Mおよび/またはB 7 L - 1 mRNA転写物の翻訳を阻害するかまたは防止するアンチセンスまたはリボザイムアプローチ; L D C A M、C R T A Mおよび/またはB 7 L - 1遺伝子の転写を阻害する、三重らせんアプローチ;あるいはL D C A M、C R T A Mおよび/またはB 7 L - 1遺伝子またはその内因性プロモーターを不活性化するかまたは「ノックアウト」する、ターゲティング相同組換えを用いて、内因性L D C A M、C R T A Mおよび/またはB 7 L - 1遺伝子発現のレベルを減少させることも可能である。 30

#### 【0062】

アンチセンスRNAおよびDNA分子は、ターゲティングされたmRNAにハイブリダイズし、そしてポリペプチド翻訳を妨げることによって、mRNAの翻訳を直接遮断するよう作用する。アンチセンスアプローチは、L D C A M、C R T A Mおよび/またはB 7 L - 1ポリヌクレオチド配列を有するmRNAに相補的なオリゴヌクレオチド(DNAまたはRNAいずれか)の設計を伴う。絶対の相補性は、好ましいが、必要ではない。本明細書において、RNAの一部に「相補的な」配列は、RNAとハイブリダイズし、それによって安定な二重鎖を形成することが可能であるのに十分な相補性を有する配列を意味する。メッセージの5'端、例えば、AUG開始コドンまでおよび該開始コドンを含む、5'非翻訳配列に相補的なオリゴヌクレオチドは、翻訳を阻害する際に最も有効に働くはずである。しかし、L D C A M、C R T A Mおよび/またはB 7 L - 1遺伝子転写物の5'または3'非翻訳、非コード領域いずれかに相補的なオリゴヌクレオチドをアンチセンスアプローチで使用して、内因性L D C A M、C R T A Mおよび/またはB 7 L - 1の翻訳を阻害することも可能である。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドは、AUG開始コドンの相補体を含まなければならない。アンチセンス核酸は、少なくとも長さ6ヌクレオチドでなければならず、そして好ましくは、長さ6~約50ヌクレオチドの範囲のオリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖のDNAまたはRNAまたはキメラ混合物またはその誘導体または修飾型であることも可能である。オリゴヌクレオチドを、塩基部分、糖部分、またはリン酸主鎖で修飾して、例えば分子の安定性、ハイブリダイゼーション等を改善することも可能である。オリゴヌクレオ 40 50

チドは、ペプチド（例えば宿主細胞受容体を *in vivo* でターゲティングするため）、または細胞膜を横切る輸送を促進する剤（例えば Letsinger ら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaître ら, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT 公報第 WO88/09810 号、1988 年 12 月 15 日を参照されたい）、あるいはハイブリダイゼーション誘発切断剤または挿入剤（*intercalating agent*）（例えば Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549 を参照されたい）などの他の付随する基を含むことも可能である。

#### 【0063】

例えば、アンチセンス分子を組織または細胞由来部位に直接注入することによって、LDCAM、CRTAM および / または B7L-1 ポリヌクレオチド配列を有する転写物を *in vivo* で発現する細胞に、アンチセンス分子を搬送するか、あるいは所望の細胞をターゲティングするよう設計された、修飾アンチセンス分子（例えばターゲット細胞表面上に発現される受容体または抗原に特異的に結合するペプチドまたは抗体に連結したアンチセンス）を、全身投与することも可能である。別のアプローチは、アンチセンスオリゴヌクレオチドが、強い *pol III* または *pol II* プロモーターの調節下に置かれた、組換え DNA 構築物を利用する。被験者において、ターゲット細胞をトランスフェクションするため、こうした構築物を使用すると、一本鎖 RNA の十分な量の転写が生じ、該一本鎖 RNA が、内因性 LDCAM、CRTAM および / または B7L-1 転写物と相補的塩基対を形成して、そしてそれによって、IL-17 mRNA の翻訳を妨げるであろう。例えば、ベクターが細胞に取り込まれ、そしてアンチセンス RNA の転写を指示するように、ベクターを *in vivo* で導入することも可能である。こうしたベクターは、転写されて、所望のアンチセンス RNA を産生可能でありさえすれば、エピソームにとどまることも、また染色体に組み込まれることも可能である。ベクターは、哺乳動物細胞における複製および発現で用いられる、プラスミド、ウイルス、または当該技術分野に知られる他のものであることも可能である。

#### 【0064】

LDCAM、CRTAM および / または B7L-1 ポリヌクレオチド配列を有する mRNA 転写物を触媒的に切断するよう設計されたリボザイム分子が、LDCAM、CRTAM および / または B7L-1 mRNA の翻訳を防止する（例えば、PCT 国際公報 WO90/11364、1990 年 10 月 4 日公表；米国特許第 5,824,519 号を参照されたい）。リボザイムは、DNA 制限エンドヌクレアーゼに類似の方式で、他の一本鎖 RNA を特異的に切断する能力を所持する RNA 分子である。このアプローチの主な利点は、配列特異的であるため、特定の配列を持つ mRNA のみが不活性化される点である。2 つの基本的な型のリボザイムがあり、すなわち、テトラヒメナ型（Hasseloff, Nature, 334:585-591, 1988）および「ハンマーヘッド」型である。テトラヒメナ型リボザイムは、長さ 4 塩基である配列を認識し、一方、「ハンマーヘッド」型リボザイムは、長さ 11~18 塩基の塩基配列を認識する。認識配列がより長ければ、ターゲット mRNA 種中で配列が独占的に生じる可能性がより高くなる。その結果、ハンマーヘッド型リボザイムは、テトラヒメナ型リボザイムより好ましい。

#### 【0065】

アンチセンスアプローチにおけるように、リボザイムは、修飾オリゴヌクレオチドで構成されることも可能である（例えば改善された安定性、ターゲティングなどのため）。搬送の典型的な方法は、トランスフェクションされた細胞が、十分な量のリボザイムを産生し、内因性 LDCAM、CRTAM および / または B7L-1 メッセージを破壊し、そして翻訳を阻害するであろうように、強い恒常的 *pol III* または *pol II* プロモーターの調節下にあるリボザイム「コード」DNA 構築物を用いることを伴う。リボザイムは、アンチセンス分子と異なり、触媒性であるため、有効であるために、より低い細胞内濃度しか必要とされない。

10

20

30

40

50

## 【0066】

あるいは、ターゲット遺伝子の制御領域（すなわちターゲット遺伝子プロモーターおよび/またはエンハンサー）に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列をターゲットイングして、ターゲットLDCAM、CRTAMおよび/またはB7L-1遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成することによって、内因性LDCAM、CRTAMおよび/またはB7L-1発現を減少させることも可能である（一般的には、Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.*, 6(6), 569-584; Heleneら, 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660, 27-36; およびMaher, 1992, *Bioassays* 14(12), 807-815を参照されたい）。

10

## 【0067】

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA、リボザイム、並びに三重らせん分子は、DNAおよびRNA分子合成のための、当該技術分野に知られる方法いずれかによって、調製可能であり、そしてこれらの方法には、例えば自動化DNA合成装置（Biosearch、Applied Biosystemsなどから商業的に入手可能なものなど）の使用による、例えば固相ホスホロアミダイト化学合成などの、オリゴデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成する技術が含まれる。例えば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Steinら, 1988, *Nucl. Acids Res.* 16:3209の方法によって、合成可能である。メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御孔ガラスポリマー支持体（Sarinら, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:7448-7451）の使用によって、調製可能である。あるいは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列の*in vitro*および*in vivo*転写によって、生成可能である。こうしたDNA配列を、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適切なRNAポリメラーゼプロモーターを取り込んだ、非常に多様なベクターに取り込むことも可能である。あるいは、用いるプロモーターに応じて、恒常的にまたは誘導性にアンチセンスRNAを合成する、アンチセンスcDNA構築物を、細胞株に安定して導入することも可能である。

20

## 【0068】

別の態様において、翻訳後遺伝子サイレンシングによって、例えばRNA干渉（RNAi）としても知られる二本鎖RNA誘導性遺伝子サイレンシングによって、LDCAM、CRTAMおよび/またはB7L-1発現を遮断することも可能である。LDCAM、CRTAMおよび/またはB7L-1のRNA配列を修飾して、療法使用のため、二本鎖配列または短いヘアピンRNAを提供することも可能である。

30

## 【0069】

3. LDCAM

LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストは、生物学的活性を示す、本明細書記載のLDCAMの適切な型すべてを含む。LDCAMは、限定されるわけではないが、樹状細胞、そして特にリンパ系由来樹状細胞を含む多様な細胞上に発現される接着分子に、限定された相同性を有する、細胞表面タンパク質である。実施例3に記載するように単離されたヒトLDCAMをコードするヌクレオチド配列を配列番号1に示し、そして該配列がコードするアミノ酸配列を配列番号2に示す。配列番号2に記載する、コードされるヒトLDCAMアミノ酸配列は、38アミノ酸のリーダー配列1~38を含む374アミノ酸の予測される細胞外ドメイン（したがってリーダー配列を欠く細胞外ドメインは、アミノ酸39~374の範囲である）；21アミノ酸の膜貫通ドメイン（375~395）および47アミノ酸の細胞質ドメイン（396~442）を有する。LDCAMの可溶性型は、選択的スプライシングによって天然に形成される。LDCAMのさらなる例を以下のセクションに提供し、これらには、限定されるわけではないが、変異体、生物学的活性断片、断片、変異体の生物学的活性断片および断片、融合タンパク質、ペプチボディ、ミモトープ（mimetopes）、誘導體等が含まれる。

40

50

## 【0070】

B7L-1は、本明細書に完全に援用される、米国特許出願第09/778,187号、2001年2月6日出願に記載されるように、B7-1に配列類似性を有し、LDCAMの結合パートナーである。B7L-1はLDCAM結合性タンパク質であり、そしてB7L-1およびLDCAMはバンド4.1およびPDZファミリーメンバーの潜在的な結合部位を含む細胞内ドメイン内で相同性を示し、そして多くの同じ細胞種上で発現されるため、これらの細胞結合型は、結合された際、類似のシグナルを搬送する可能性もある。したがって、これらは、共受容体または対構造と称される。ヒトB7L-1の長い細胞外型および短い細胞外型をコードするヌクレオチド配列を、それぞれ、配列番号7および配列番号9に示す。配列番号7および配列番号9のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列を、それぞれ、配列番号8および配列番号10に開示する。

10

## 【0071】

B7L-1が結合する細胞株を同定するため、そして続いてB7L-1が結合するタンパク質を単離するため、実施例1に記載するようにB7L-1/Fc融合タンパク質を調製し、そして実施例2に記載する結合研究を行った。実施例3は、B7L-1が結合する細胞株であるWi-26から調製したcDNAライブラリーのスクリーニング、および全長LDCAMヒト・クローンの同定を記載する。実施例3に記載するように単離したヒトLDCAMをコードするヌクレオチド配列を配列番号1に示し、そして該配列がコードするアミノ酸配列を配列番号2に示す。配列番号2に記載する、コードされるヒトLDCAMアミノ酸配列は、38アミノ酸のリーダー配列1~38を含む374アミノ酸の予測される細胞外ドメイン；21アミノ酸の膜貫通ドメイン(375~395)および47アミノ酸の細胞質ドメイン(396~442)を有する。

20

## 【0072】

実施例5および6は、ヒトLDCAM/Fcの作成およびヒトLDCAMが結合する細胞株を同定する結合研究におけるその使用を記載する。陽性に同定された細胞株の中に、S49.1細胞、並びにFlt3-L処置マウスの脾臓およびリンパ節由来のリンパ系樹状細胞がある。実施例7は、ネズミLDCAMクローンを同定する発現ライブラリープールのスクリーニングを記載する。単離されたネズミLDCAM DNA配列を配列番号3に開示する。配列番号3のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列を配列番号4に開示する。コードされるネズミLDCAMアミノ酸配列(配列番号4)は、356アミノ酸の予測される細胞外ドメイン(残基1~356)；21アミノ酸の膜貫通ドメイン(357~377)；およびアミノ酸残基378~423を含む細胞質ドメインが含まれる。配列番号3および配列番号4は、全長成熟ネズミLDCAM配列を記載する。ヒトLDCAM配列に比較すると、シグナル配列は完全には記載されていない。

30

## 【0073】

本明細書に記載する精製哺乳動物LDCAM分子は、B7-1および他の細胞接着分子に、限定される全体の相同性を有するI型膜貫通タンパク質である。LDCAMはB7L-1の細胞質領域に高い相同性を有する。下の実施例6に記載するように、LDCAMタンパク質は広範囲の発現を示す。特に、ヒトLDCAM mRNAは、乳房、網膜、胎児肝臓、脾臓、胎児心臓、肺、筋肉、胎盤、甲状腺、および肺癌に見られる。LDCAMメッセージを有する細胞株にはWi-26が含まれる。マウスLDCAM mRNAは、全胚、精巢、三重ネガティブ細胞、ネズミ脾臓およびリンパ節CD8<sup>+</sup>、S49.1および樹状細胞上に見られる。

40

## 【0074】

配列番号1および3に開示するDNA配列の発見によって、ヒトおよびマウスLDCAMタンパク質をコードするDNAを含む発現ベクター；該発現ベクターでトランスフェクションまたは形質転換された宿主細胞；均質なタンパク質としての生物学的活性LDCAM；並びにLDCAMと免疫反応性である抗体の構築が可能になる。

## 【0075】

B7L-1と同様、LDCAMは、ポリオウイルス受容体、デルタ・オポイド(o p o

50

i d) 結合性タンパク質および接着分子に、限定された相同性を有する。さらに、実施例 13 に記載するように、LDCAM は、ConA および PHA に引き起こされる T 細胞増殖を遮断し、これによって LDCAM が T 細胞仲介性免疫応答を調節するのに有用であることが示唆される。LDCAM は TCR mAb 誘導性 T 細胞増殖を阻害せず、これによってマイトジェン誘導性 T 細胞増殖に対する LDCAM の阻害効果が、サイトカイン分泌、例えば IL-2 の阻害のためであるか、または LDCAM 結合パートナーの活性化および発現増加後の T 細胞の下流応答の制御のためであることが示唆される。こうしたものに限定されるわけではないが、LDCAM 分子の特定の使用を以下に記載する。

**【0076】**

本明細書において、用語 LDCAM は、配列番号 2 のアミノ酸配列 1 ~ 442 および配列番号 4 のアミノ酸配列 1 ~ 423 を有するポリペプチドを含む。さらに、LDCAM は、配列番号 2 のアミノ酸配列、配列番号 4 のアミノ酸配列と高い度合いの類似性または高い度合いの同一性を有し、そして生物学的に活性であるポリペプチドを含む。

10

**【0077】**

用語「LDCAM」は、少なくとも部分的に、それ自体と結合し、そして複合体形成し、B7L-1 および CRTAM と結合し、そして抗原およびマイトジェンに反応した T 細胞活性化シグナルを改変する、ポリペプチド属を指す。

**【0078】**

用語「ネズミ LDCAM」は、配列番号 3 の DNA の生物学的活性遺伝子産物を指し、そして用語「ヒト LDCAM」は、配列番号 1 の DNA の生物学的活性遺伝子産物を指す。用語「LDCAM」にさらに含まれるのは、該タンパク質の主に B7L-1 共結合部分を含み、生物学的活性を保持し、そして分泌可能である、可溶性または一部切除 (truncated) タンパク質である。こうした可溶性タンパク質の特定の例は、配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 374 の配列を含むものおよび配列番号 4 のアミノ酸 1 ~ 356 の配列を含むものである。あるいは、こうした可溶性タンパク質は、リーダー配列を除外し、そしてしたがって、配列番号 2 のアミノ酸 39 ~ 374 を含むことも可能である。

20

**【0079】**

実施例 9 は、LDCAM 結合研究、LDCAM アンタゴニストおよび/またはアゴニストのスクリーニングアッセイ、および分子の機能特性を調べることに向けられる研究で利用可能な、新規 LDCAM/Fc 融合タンパク質の構築を記載する。他の抗体 Fc 領域を、実施例に記載するヒト IgG1 Fc 領域と置換することも可能である。他の適切な Fc 領域は、プロテイン A またはプロテイン G に高親和性で結合可能であるもの、あるいはヒトまたはネズミ IgG1 Fc 領域の断片を含むもの、例えば鎖間ジスルフィド結合が形成されるように、少なくともヒンジ領域を含む断片を含むものである。LDCAM 融合タンパク質は、容易に精製されるという利点を提供する。さらに、2つの別個の融合タンパク質鎖の Fc 領域間にジスルフィド結合が形成され、二量体が生成される。

30

**【0080】**

上述のように、本発明の側面は、可溶性 LDCAM ポリペプチドである。可溶性 LDCAM ポリペプチドは、天然 LDCAM の細胞外ドメインのすべてまたは一部を含むが、ポリペプチドを細胞膜上に保持するシグナルを欠く。可溶性 LDCAM ポリペプチドは、最初に合成される際は、好適に、分泌を促進する天然 (または異種) シグナルペプチドを含むが、シグナルペプチドは、細胞から LDCAM が分泌される際に切断される。本発明に含まれる可溶性 LDCAM ポリペプチドは、B7L-1 に結合する能力、またはそれ自体に結合する能力を保持する。あるいは、本発明の可溶性 LDCAM ポリペプチドは、T 細胞応答を改変する能力を保持する。可溶性 LDCAM は、可溶性 LDCAM タンパク質が分泌可能である限り、シグナルの一部、あるいは細胞質ドメインまたは他の配列の一部を含むことも可能である。

40

**【0081】**

可溶性 LDCAM は、培地から、例えば遠心分離によって、所望のタンパク質を発現する、損なわれていない細胞を分離し、そして所望のタンパク質の存在に関して培地または

50



上清をアッセイすることによって、同定（そして非可溶性膜結合対応物から区別）可能である。培地中にLDCA Mが存在すれば、該タンパク質が細胞から分泌され、そしてしたがって、所望のタンパク質の可溶性型であることの指標となる。

【0082】

LDCA Mの可溶性型は、天然結合LDCA Mタンパク質に勝る多くの利点を所持する。可溶性タンパク質は細胞から分泌されるため、組換え宿主細胞からのタンパク質の精製が可能である。さらに、可溶性タンパク質は、一般的に、静脈内投与に、より適している。

【0083】

可溶性LDCA Mポリペプチドの例には、天然LDCA Mタンパク質の細胞外ドメインの実質的な部分を含むものが含まれる。例えば、可溶性ヒトLDCA Mタンパク質は配列番号2のアミノ酸38～374または1～374を含み、そして可溶性ネズミLDCA Mは配列番号4のアミノ酸1～356を含む。さらに、全細胞外ドメインより少ないものを含む一部切除可溶性LDCA Mタンパク質が本発明に含まれる。宿主細胞で最初に発現される際、可溶性LDCA Mは、以下に記載する、使用する宿主細胞内で機能する異種シグナルペプチドの1つを含むことも可能である。あるいは、該タンパク質は天然シグナルペプチドを含むことも可能である。本発明の1つの態様において、可溶性LDCA Mは（N末端からC末端に）、酵母因子シグナルペプチド、以下に記載され、そして米国特許第5,011,912号に記載されるFLAG（登録商標）ペプチド、および配列番号2のアミノ酸39～374または配列番号4のアミノ酸21～356からなる可溶性LDCA Mを含む融合タンパク質として発現可能である。この組換え融合タンパク質は、酵母細胞で発現され、そして該細胞から分泌される。FLAG（登録商標）ペプチドは、タンパク質の精製を容易にし、そして続いて、ウシ粘膜エンテロキナーゼを用いて可溶性LDCA Mから切断されることも可能である。可溶性LDCA Mタンパク質をコードする単離DNA配列が、本発明に含まれる。

【0084】

いくつかの慣用的技術いずれによって、可溶性ポリペプチドを含む一部切除LDCA Mを調製することも可能である。それ自体知られる技術を用いて、所望のDNA配列を化学的に合成することも可能である。クローニングされた全長DNA配列を制限エンドヌクレアーゼ消化して、そしてアガロースゲル上の電気泳動により単離することによって、DNA断片を産生することも可能である。制限エンドヌクレアーゼ切断部位（単数または複数）を含有するリンカーを使用して、所望のDNA断片を発現ベクターに挿入することも可能であるし、また天然に存在する切断部位で断片を消化することも可能である。周知のポリメラーゼ連鎖反応法を使用して、所望のタンパク質断片をコードするDNA配列を増幅することもまた可能である。さらなる代替法として、既知の突然変異誘発技術を使用して、所望の点、例えば受容体結合ドメインの最後のアミノ酸コドンの直後に停止コドン挿入することも可能である。

【0085】

上述のように、本発明は、組換えおよび非組換え両方の単離または均質LDCA Mポリペプチドを提供する。さらに、本発明の範囲内にあるのは、所望の生物学的活性を保持する天然LDCA Mタンパク質の変異体および誘導体である。こうした活性には、LDCA Mがそれ自体に結合する能力、またはB7L-1に結合する能力、またはT細胞シグナル伝達を改変する能力が含まれる。天然LDCA Mポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を突然変異させることによって、LDCA M変異体および誘導体を得ることも可能である。いくつかの慣用法のいずれによって、天然アミノ酸配列の改変を達成することも可能である。天然配列の断片への連結を可能にする制限部位を隣接させた、突然変異体配列を含有するオリゴヌクレオチドを合成することによって、突然変異を特定の遺伝子座に導入することも可能である。連結後、生じた再構築配列は、所望のアミノ酸挿入、置換、または欠失を有する類似体をコードする。

【0086】

あるいは、オリゴヌクレオチドが指示する部位特異的突然変異誘発法を使用して、あらかじめ決定されたコドンが、置換、欠失、または挿入によって改変されていることも可能である、改変された遺伝子を提供することも可能である。上述の改変を作製する典型的な方法がWalderら(Gene 42:133, 1986); Bauerら(Gene 37:73, 1985); Craik(BioTechniques, January 1985, 12-19); Smithら(Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488, 1985); Kunkelら(Methods in Enzymol. 154:367, 1987);並びに米国特許第4,518,584号および第4,737,462号に開示されており、これらはすべて本明細書に援用される。

【0087】

LDCAM変異体をアンタゴニストまたはアゴニストとして用いることも可能であるし、あるいは抗体、ペプチボディおよびミモトープ(mimetoopes)などのLDCAMアンタゴニストまたはアゴニストを進展させるのに使用することも可能である。「LDCAM変異体」は、本明細書において、天然LDCAMと実質的に相同であるが、1以上の欠失、挿入または置換のため、天然LDCAM(ヒト、ネズミまたは他の哺乳動物種)と異なるアミノ酸配列を有する、ポリペプチドを意味する。実質的に相同な、は、上に開示するような天然アミノ酸配列に、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である変異体アミノ酸配列を意味する。2つのアミノ酸または2つの核酸配列の同一性パーセントは、視覚的検査および数学的計算によって決定可能であるし、またはより好ましくは、コンピュータプログラムを用いて配列情報を比較することによって、比較を行う。典型的な好ましいコンピュータプログラムは、遺伝学コンピュータグループ(GCG; ウィスコンシン州マディソン)ウィスコンシンパッケージ、バージョン10.0プログラム、「GAP」(Devereuxら, 1984, Nucl. Acids Res. 12:387)である。「GAP」プログラムの好ましいデフォルトパラメータには:(1)ヌクレオチドに関する単一(unary)比較マトリックス(同一に対し1および非同一に対し0の値を含む)、並びにSchwartzおよびDayhoff監修, Atlas of Polypeptide Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp.353-358, 1979に記載されるような、GribnikovおよびBurgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986の加重アミノ酸比較マトリックス;または他の匹敵する比較マトリックス;(2)アミノ酸配列の各ギャップに対する30のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに1のペナルティ、またはヌクレオチド配列の各ギャップに対する50のペナルティおよび各ギャップ中の各記号に対しさらに3のペナルティ;(3)末端ギャップに対するペナルティなし;および(4)長いギャップに対する最大ペナルティなし、が含まれる。配列比較の当業者に使用される他のプログラム、例えばNational Library of Medicineウェブサイトwww.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgiを介しての使用に利用可能なBLASTNプログラム、バージョン2.0.9、またはUW-BLAST 2.0アルゴリズムなどもまた、使用可能である。UW-BLAST 2.0の標準的デフォルトパラメータ設定は、以下のインターネットサイト:sapiens.wustl.edu/blast/blast/#Featuresに記載される。さらに、該BLASTアルゴリズムは、BLOSUM62アミノ酸スコア化マトリックスを用い、そして使用可能な所望によるパラメータは、以下のとおりである:(A)組成上の複雑さが低いクエリー配列のセグメント(WoottonおよびFederhen(Computers and Chemistry, 1993)のSEGプログラムによって決定されるようなもの;また、WoottonおよびFederhen, 1996, A

analysis of compositionally biased regions in sequence databases, Methods Enzymol. 266:554-71も参照されたい)、または短い周期の内部反復からなるセグメント(ClaverieおよびStates (Computers and Chemistry, 1993)のXNUプログラムによって決定されるようなもの)をマスクするフィルターの包含、および(B)データベース配列に対するマッチを報告する、統計的有意性の閾値、またはEスコア(KarlinおよびAltschul(1990)の確率論モデルにしたがった、マッチが単なる偶然によって見出されると予期される確率; マッチに割り当てられた統計的有意性がこのEスコア閾値より高ければ、該マッチは報告されないであろう); 好ましいEスコア閾値は0.5であり、または優先性を増加させるため、0.25、0.1、0.05、0.01、0.001、0.0001、1e-5、1e-10、1e-15、1e-20、1e-25、1e-30、1e-40、1e-50、1e-75、または1e-100である。

10

## 【0088】

こうした変異体には、天然LDCAMに実質的に相同であるが、1以上の欠失、挿入または置換のため、天然IL-17受容体のものとは異なるアミノ酸配列を有する、ポリペプチドが含まれる。特定の態様には、限定されるわけではないが、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を含むLDCAMポリペプチドが含まれる。別の態様は、天然配列に比較して、1~10のアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を含む、LDCAMポリペプチドを含む。本発明のLDCAMをコードするポリヌクレオチドには、1以上の欠失、挿入または置換のため、LDCAMポリヌクレオチド配列と異なるが、生物学的活性ポリペプチドをコードする変異体が含まれる。LDCAMポリペプチドの変異体として含まれるのは、アレル型および選択的スプライシング型とともに、LDCAMポリペプチドのアミノ酸配列またはLDCAMポリペプチドをコードする核酸のヌクレオチド配列を修飾することによって構築された変異体である。

20

## 【0089】

上述のように、LDCAM変異体は、少なくとも1つの保存的置換アミノ酸を有する配列を含むことも可能であり、すなわち、既定のアミノ酸残基が、類似の物理化学的特性を有する残基で交換されることも可能である。別の態様は、1~10、1~20、または1~30の間の保存的置換配列を含む、LDCAM変異体を含む。一般的に、天然ポリペプチドに存在する1以上のアミノ酸の置換は、保存的に行うべきである。保存的置換の例には、活性ドメイン(単数または複数)外部のアミノ酸の置換、およびLDCAMの二次構造および/または三次構造を改変しないアミノ酸置換が含まれる。保存的置換の例には、Ile、Val、Leu、またはAlaを互いに置換するなどの、1つの脂肪族残基の別のものとの置換、あるいはLysおよびArg間; GluおよびAsp間; またはGlnおよびAsn間などの、1つの極性残基の別のものとの置換が含まれる。他のこうした保存的置換、例えば、類似の疎水性特性を有する領域全体の置換が周知である。天然存在変異体もまた、本発明に含まれる。こうした変異体の例は、選択的mRNAスプライシング事象から生じるタンパク質、または天然タンパク質のタンパク質分解切断から生じるタンパク質であり、こうしたタンパク質では、天然生物学的特性が保持されている。

30

40

## 【0090】

例えば「保存的アミノ酸置換」は、その位で、アミノ酸残基の極性または荷電にほとんどまたはまったく影響がないように、非天然残基で天然アミノ酸残基を置換することを伴うことも可能である。さらに、「アラニン・スキャンニング突然変異誘発」に関して先に記載されているように(例えばアラニン・スキャンニング突然変異誘発を論じる、MacLennanら, 1998, Acta Physiol. Scand. Suppl. 643:55-67; Sasakira, 1998, Adv. Biophys. 35:1-24を参照されたい)、ポリペプチド中のいかなる天然残基をアラニンで置換することもまた可能である。

## 【0091】

50

所望のアミノ酸置換は（保存的であってもまたは非保存的であっても）、こうした置換が所望であるときに、当業者によって決定可能である。例えばアミノ酸置換を用いて、ペプチド配列の重要な残基を同定可能であるし、あるいは本明細書記載のペプチドまたはビヒクル-ペプチド分子の親和性（前述の式を参照されたい）を増加させるかまたは減少させることも可能である。典型的なアミノ酸置換を表1に示す。

【0092】

表1 - アミノ酸置換

【0093】

【表2】

元来の残基	典型的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4ジアミノ-酪酸, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

30

40

【0094】

特定の態様において、保存的アミノ酸置換はまた、典型的には、生物学的系における合成によるよりも、化学的ペプチド合成によって取り込まれる、非天然存在アミノ酸残基もまた含む。

【0095】

50

上述のように、天然存在残基は、配列の修飾に有用である可能性もある、共通の側鎖特性に基づいて、クラスに分類可能である。例えば、非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを、別のクラス由来のメンバーと交換することを伴うことも可能である。こうした置換残基を、非ヒトオルソログと相同であるペプチドの領域に、または分子の非相同領域に導入することも可能である。さらに、鎖配向に影響を及ぼすため、PまたはGを用いた修飾も行うことも可能である。

【0096】

こうした修飾を作製する際、アミノ酸のヒドロパシー指数を考慮することも可能である。各アミノ酸には、疎水性および荷電特性に基づいて、ヒドロパシー指数が割り当てられてきており、これらは：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)である。

【0097】

相互作用的な生物学的機能をタンパク質に与える際に、ヒドロパシーアミノ酸指数が重要であることが、当該技術分野において理解されている(Kyteら, J. Mol. Biol., 157:105-131(1982))。類似のヒドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸を、特定のアミノ酸で置換して、そしてなお類似の生物学的活性を保持しうることが知られる。ヒドロパシー指数に基づいて変化を作製する際、ヒドロパシー指数が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、そして±0.5以内であるものがさらにより特に好ましい。

【0098】

当該技術分野において、同様のアミノ酸の置換は、親水性に基づいて有効に行うことが可能であることもまた、理解されている。隣接するアミノ酸の親水性によって規定されるような、タンパク質の最大局所平均親水性は、その免疫原性および抗原性、すなわちタンパク質の生物学的特性と相関する。

【0099】

以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン(+3.0)；リジン(+3.0)；アスパラギン酸(+3.0±1)；グルタミン酸(+3.0±1)；セリン(+0.3)；アスパラギン(+0.2)；グルタミン(+0.2)；グリシン(0)；スレオニン(-0.4)；プロリン(-0.5±1)；アラニン(-0.5)；ヒスチジン(-0.5)；システイン(-1.0)；メチオニン(-1.3)；バリン(-1.5)；ロイシン(-1.8)；イソロイシン(-1.8)；チロシン(-2.3)；フェニルアラニン(-2.5)；トリプトファン(-3.4)。類似の親水性値に基づいて変化を作製する際、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、そして±0.5以内であるものがさらにより特に好ましい。また、親水性に基づいて、一次アミノ酸配列からエピトープを同定することも可能である。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」とも称される。

【0100】

当業者は、周知の技術を用いて、前述の配列に示すようなポリペプチドの適切な変異体を決定することが可能であろう。活性を破壊することなく変化させることも可能な分子の適切な領域を同定するため、当業者は、活性に重要でないと考えられる領域をターゲティングすることも可能である。例えば、同一種由来のまたは他の種由来の類似の活性を持つ類似のポリペプチドが知られている場合、当業者は、ペプチドのアミノ酸配列を類似のペプチドに比較することも可能である。こうした比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存されている分子の残基および部分を同定することも可能である。こうした類似のペプチドに比較して保存されていないペプチド領域における変化は、ペプチドの生物学的活性お

10

20

30

40

50

よび/または構造に不都合な影響を与える可能性がより低いと認識されるであろう。当業者はまた、比較的保存されている領域であっても、活性を保持しながら、天然に存在する残基を、化学的に類似のアミノ酸で置換することも可能であることも知っているであろう（保存的アミノ酸残基置換）。したがって、生物学的活性または構造に重要でありうる領域であっても、生物学的活性を破壊することなく、またはペプチド構造に不都合に影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供することも可能である。

#### 【0101】

さらに、当業者は、活性または構造に重要な、類似のペプチドにおける残基を同定する、構造-機能研究を再検討することも可能である。こうした比較を考慮して、類似のペプチドにおける、活性または構造に重要なアミノ酸残基に対応する、ペプチド中のアミノ酸残基の重要性を予測可能である。当業者は、ペプチドのこうした予測される重要なアミノ酸残基に対する、化学的に類似のアミノ酸置換を選ぶことも可能である。

10

#### 【0102】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける構造に関連して、三次元構造およびアミノ酸配列を解析することも可能である。この情報を考慮して、当業者が、三次元構造に関して、ペプチドのアミノ酸残基の配置構造を予測することも可能である。タンパク質表面上にあると予測されるアミノ酸残基は、他の分子との重要な相互作用に関与する可能性もあるため、当業者は、こうした残基に根本的な変化を与えないように、選択することも可能である。さらに、当業者は、所望のアミノ酸残基各々の位で、単一のアミノ酸置換を含有する試験変異体を生成することも可能である。その後、当業者に知られる活性アッセイを用いて、変異体をスクリーニングすることも可能である。こうしたデータを用いて、適切な変異体に関する情報を集めることも可能である。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が、破壊された活性、望ましくなく減少した活性、または不適切な活性を生じることが発見された場合、こうした変化を持つ変異体は回避されるであろう。言い換えると、こうした日常的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、単独の、または他の突然変異と組み合わせた、さらなる置換を回避すべきであるアミノ酸を容易に決定可能である。

20

#### 【0103】

いくつかの科学的刊行物が二次構造の予測に充てられている。Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4): 422-427 (1996); Chouら, Biochemistry, 13(2): 222-245 (1974); Chouら, Biochemistry, 113(2): 211-222 (1974); Chouら, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47: 45-148 (1978); Chouら, Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276 および Chouら, Biophys. J., 26: 367-384 (1979) を参照されたい。さらに、二次構造を予測するのを補助するコンピュータプログラムが現在利用可能である。二次構造を予測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%を越える配列同一性、または40%を越える類似性を有する、2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造的トポロジーを有する。近年、タンパク質構造データベース(PDB)が大きくなり、二次構造の予測可能性が増進してきており、これには、ポリペプチド構造またはタンパク質構造内でのフォールディングの潜在的な数が含まれる。Holmら, Nucl. Acid. Res., 27(1): 244-247 (1999) を参照されたい。既定のポリペプチドまたはタンパク質には、限定される数のフォールディングしかなく、そして決定的な数の構造が解明されたなら、構造予測は劇的に正確性を得るであろうことが示唆されている(Brennerら, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3): 369-376 (1997))。

30

40

#### 【0104】

二次構造を予測するさらなる方法には、「スレッディング(threading)」(Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3): 377-87 (1997); Sipplら, Structure, 4(1):

50

15-9(1996))、「プロフィール解析」(Bowien, Science, 253:164-170(1991); Gribskov, Meth. Enzym., 183:146-159(1990); Gribskov, Proc. Natl. Acad. Sci., 84(13):4355-8(1987))、および「進化連関(evolutionary linkage)」(Holm、上記およびBrenner、上記を参照されたい)が含まれる。

#### 【0105】

当業者は、既知の技術を用いて、LDCAMポリペプチドまたはLDCAMポリヌクレオチド配列中にさらなる修飾を施すことも可能である。ポリペプチド配列中の目的の修飾には、選択したアミノ酸の改変、置換、交換、挿入、または欠失が含まれることも可能である。例えば、1以上のシステイン残基を欠失させるかまたは別のアミノ酸と交換して、分子のコンホメーションを改変することも可能であり、この改変は、フォールディングまたは再生に際して、正しくない分子内ジスルフィド架橋の形成を防ぐことを伴いうる。こうした改変、置換、交換、挿入または欠失のための技術は、当業者に周知である(例えば米国特許第4,518,584号を参照されたい)。別の例として、LDCAM細胞外ドメインのN-グリコシル化部位を修飾して、グリコシル化を妨げることも可能であり、これによって哺乳動物および酵母発現系における炭水化物減少類似体の発現が可能になる。LDCAM細胞外ドメインのN-グリコシル化部位を修飾して、グリコシル化を妨げることも可能であり、これによって哺乳動物および酵母発現系における炭水化物減少類似体の発現が可能になる。真核ポリペプチドのN-グリコシル化部位はアミノ酸トリプレットAsn-X-Yにより特徴付けられ、ここでXはPro以外のアミノ酸いずれかであり、そしてYはSerまたはThrである。配列番号2のヒトLDCAMポリペプチドには、アミノ酸67~69、101~103、113~115、165~167、304~306、および308~310に6つのこうしたトリプレットが含まれる。同様に、配列番号4のネズミLDCAMポリペプチドには、アミノ酸49~51、83~85、95~97、147~149、286~288、および290~292に6つのこうしたトリプレットが含まれる。これらのトリプレットをコードするヌクレオチド配列に対する適切な置換、付加または欠失の結果、Asn側鎖での炭水化物残基の付着が防止されるであろう。例えば、Asnが異なるアミノ酸によって交換されるように選択される、単一のヌクレオチドの改変は、N-グリコシル化部位を不活性化するのに十分である。タンパク質のN-グリコシル化部位を不活性化するための既知の方法には、本明細書に援用される米国特許第5,071,972号およびEP 276,846に記載されるものが含まれる。

#### 【0106】

本発明の範囲内のさらなる変異体には、グリコシル基、脂質、リン酸、アセチル基等の他の化学部分と共有コンジュゲートまたは凝集コンジュゲートを形成することによって修飾され、誘導体を生成しうるLDCAMポリペプチドが含まれる。共有誘導体は、アミノ酸側鎖上の官能基に、あるいはポリペプチドのN末端またはC末端に、化学部分を連結することによって、調製可能である。好ましくは、こうした改変、置換、交換、挿入または欠失は、LDCAMの生物学的活性を減少させない。1つの例は、天然型と本質的に同一の結合親和性で結合する変異体である。結合親和性は、例えば米国特許第5,512,457号に記載されるように、そして本明細書に示すように、慣用法によって測定可能である。さらに、限定されるわけではないが、ポリエチレングリコールなどの1以上の水溶性ポリマーを付加することによってLDCAM分子を修飾して、生物学的利用能および/または薬物動態学的半減期を増加させることも可能である。

#### 【0107】

生物学的利用能および/または薬物動態学的半減期を増加させるのに有用な化学部分を付着させる多様な手段が現在利用可能であり、例えば本明細書に完全に援用される、特許協力条約(「PCT」)国際公報第WO 96/11953号、表題「N末端が化学的に修飾されたタンパク質組成物および方法」を参照されたい。このPCT公報は、とりわけ、タンパク質のN末端への水溶性ポリマーの選択的付着を開示する。

10

20

30

40

50

## 【0108】

別のポリマービヒクルは、ポリエチレングリコール（PEG）である。PEG基は、いかなる好適な分子量のものであることも可能であり、そして直鎖であることもまたは分枝鎖であることも可能である。PEGの平均分子量は、好ましくは約2キロダルトン（kD）～約100kD、より好ましくは約5kD～約50kD、最も好ましくは約5kD～約10kDの範囲であろう。PEG基は、一般的に、アシル化または還元性アルキル化を介し、PEG部分上の反応基（例えばアルデヒド基、アミノ基、チオール基、またはエステル基）を通じて、本発明の化合物上の反応基（例えばアルデヒド基、アミノ基、またはエステル基）に付着されるであろう。

## 【0109】

合成ペプチドのPEG化に有用な戦略は、溶液中でコンジュゲート連結を形成することを通じて、相互に、互いに対して反応性である特別の官能性を各々所持するペプチドおよびPEG部分を合わせることからなる。ペプチドは、慣用的固相合成で容易に調製可能である。ペプチドを、特定の部位で、適切な官能基で「プレ活性化」する。前駆体を精製し、そしてPEG部分と反応させる前に完全に性質決定する。ペプチドとPEGの連結は、通常、水性相で行われ、そして逆相分析用HPLCによって、容易に監視可能である。分取用HPLCによってPEG化ペプチドを容易に精製し、そして分析用HPLC、アミノ酸解析、およびレーザー脱離質量分析によって性質決定することも可能である。

## 【0110】

多糖ポリマーが、タンパク質修飾に使用可能な水溶性ポリマーの別の種類である。デキストランは、主に1-6連結によって連結された個々のグルコース・サブユニットで構成される、多糖ポリマーである。デキストラン自体は、多くの分子量範囲で入手可能であり、そして約1kD～約70kDの分子量で容易に入手可能である。デキストランは、単独で、または別のビヒクル（例えばFc）と併用して、ビヒクルとして、本発明で使用するのに適した水溶性ポリマーである。例えば、WO 96/11953およびWO 96/05309を参照されたい。療法免疫グロブリンまたは診断用免疫グロブリンにコンジュゲート化されたデキストランの使用が報告されている；例えば本明細書に完全に援用される欧州特許公報第0 315 456号を参照されたい。デキストランを本発明にしたがったビヒクルとして用いる場合、約1kD～約20kDのデキストランが好ましい。

## 【0111】

さらなるLDCAM誘導体には、N末端またはC末端融合体としての組換え培養における合成によるなどの、他のポリペプチドまたはポリペプチドと該ポリペプチドの共有コンジュゲートまたは凝集コンジュゲートが含まれる。融合ポリペプチドの例を、オリゴマーと関連して以下に論じる。さらに、融合ポリペプチドは、精製および同定を容易にするため付加するペプチドを含むことも可能である。こうしたペプチドには、例えば、ポリ-Hisまたは米国特許第5,011,912号およびHoppら, Bio/Technology 6:1204, 1988に記載される抗原性同定ペプチドが含まれる。こうしたペプチドの1つはFLAG（登録商標）オクタペプチド（配列番号31）であり、該ペプチドは抗原性が高く、そして特異的なモノクローナル抗体が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現した組換えポリペプチドの迅速なアッセイおよび容易な精製を可能にする。4E11と称されるネズミハイブリドーマは、米国特許第5,011,912号に記載されるように、特定の二価金属陽イオンの存在下でFLAG（登録商標）ペプチドに結合するモノクローナル抗体を産生する。4E11ハイブリドーマ細胞株は、寄託番号第HB9259号でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されている。FLAG（登録商標）ペプチドに結合するモノクローナル抗体は、Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division、コネティカット州ニューヘブンより入手可能である。

## 【0112】

本明細書に記載する方法で使用可能なLDCAMのさらなる態様には、LDCAMポリペプチド、LDCAMの1以上の断片、あるいは本明細書に開示するとともに、上に列挙

10

20

30

40

50



する米国特許に開示されるような、LDCAMの誘導体または変異体型いずれかを含有する、オリゴマーまたは融合ポリペプチドが含まれる。特定の態様において、オリゴマーは可溶性LDCAMポリペプチドを含む。オリゴマーは、二量体、三量体、またはより高次のオリゴマーを含む、共有結合または非共有結合多量体型であることも可能である。別の態様において、LDCAMオリゴマーは、多数のLDCAMポリペプチドを含み、こうしたポリペプチドは、ポリペプチドに融合された、オリゴマー化を促進する特性を有するペプチド部分間の共有または非共有相互作用を介して連結されている。以下により詳細に記載するように、付着するポリペプチドのオリゴマー化を促進可能なペプチドの中に、ロイシンジッパーおよび抗体由来の特定のポリペプチドがある。

#### 【0113】

グリコシル基、脂質、リン酸基、アセチル基などの他の化学部分と共有コンジュゲートまたは凝集コンジュゲートを形成することによって、LDCAMを修飾してLDCAM誘導体を生成することも可能である。LDCAMアミノ酸側鎖上の官能基に、あるいはLDCAMポリペプチドのN末端またはC末端、あるいはその細胞外ドメインに、化学部分を連結することによって、LDCAMの共有誘導体を調製することも可能である。本発明の範囲内にあるLDCAMの他の誘導体には、N末端またはC末端融合体としての組換え培養における合成によるなどの、他のタンパク質またはポリペプチドとLDCAMまたはその断片の共有コンジュゲートまたは凝集コンジュゲートが含まれる。例えば、コンジュゲートは、LDCAMポリペプチドのN末端にシグナルまたはリーダーポリペプチド配列（例えばサッカロミセス属（*Saccharomyces*）の因子リーダー）を含むこと

10

20

#### 【0114】

LDCAMポリペプチド融合体は、LDCAMの精製および同定を容易にするため付加するペプチドを含むことも可能である。こうしたペプチドには、例えば、ポリ-Hisまたは米国特許第5,011,912号およびHoppら, *Bio/Technology* 6:1204, 1988に記載される抗原性同定ペプチドが含まれる。

#### 【0115】

アミノ酸残基または配列の多様な付加または置換、あるいは生物学的活性または結合に必要なでない末端または内部残基または配列の欠失をコードする、同等のDNA構築物が本発明に含まれる。例えば、LDCAM細胞外ドメインのN-グリコシル化部位を修飾して、グリコシル化を妨げることも可能であり、これによって哺乳動物および酵母発現系における炭水化物減少類似体の発現が可能になる。真核ポリペプチドのN-グリコシル化部位はアミノ酸トリプレットAsn-X-Yにより特徴付けられ、ここでXはPro以外のアミノ酸いずれかであり、そしてYはSerまたはThrである。配列番号2のヒトLDCAMポリペプチドには、アミノ酸67~69、101~103、113~115、165~167、304~306、および308~310に6つのこうしたトリプレットが含まれる。同様に、配列番号4のネズミLDCAMポリペプチドには、アミノ酸49~51、83~85、95~97、147~149、286~288、および290~292に6

30

40

#### 【0116】

別の例において、生物学的活性に必須でないCys残基をコードする配列を改変して、Cys残基が欠失されるかまたは他のアミノ酸で置換されるようにして、再生に際して、

50

誤った分子内ジスルフィド架橋の形成を防止することも可能である。他の同等物は、K E X 2 プロテアーゼ活性が存在する酵母系における発現を増進するように、隣接する二塩基性アミノ酸残基を修飾することによって調製される。E P 212, 914 は、タンパク質における K E X 2 プロテアーゼプロセッシング部位を不活性化するための部位特異的突然変異誘発の使用を開示する。A r g - A r g 対、A r g - L y s 対、および L y s - A r g 対を改変するように、残基を欠失させ、付加し、または置換することによって、K E X 2 プロテアーゼプロセッシング部位を不活性化して、これらの隣接する塩基性残基の発生を排除する。L y s - L y s 対合は、K E X 2 切断に大幅により感受性でなく、そして A r g - L y s または L y s - A r g の L y s - L y s への変換は、K E X 2 部位を不活性化し、保存的でそして好ましいアプローチに相当する。

10

## 【0117】

本発明の範囲内の核酸配列には、中程度または非常にストリンジェントな条件下で、本明細書に開示する L D C A M ヌクレオチド配列にハイブリダイズし、そして生物学的活性 L D C A M をコードする、単離 D N A および R N A 配列が含まれる。S a m b r o o k r a M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l , 第2版, V o l . 1 , p p . 1 0 1 - 1 0 4 , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , ( 1 9 8 9 ) に定義されるような、中程度にストリンジェントな条件は、5 x S S C、0.5% S D S、1.0 mM E D T A ( p H 8 . 0 ) の前洗浄溶液、および約 5 5 ° C、5 x S S C、一晚のハイブリダイゼーション条件の使用を含む。非常にストリンジェントな条件は、より高いハイブリダイゼーション温度および洗浄温度を含む。当業者は、核酸分子の長さなどの要因にしたがって、必要に応じて温度および洗浄溶液塩濃度を調整可能であることを認識するであろう。

20

## 【0118】

1 より多いコドンが同一のアミノ酸をコード可能である、遺伝暗号の既知の縮重のため、D N A 配列が配列番号 1 および 3 に示す配列と異なり、そしてなお、それぞれ配列番号 2 および配列番号 4 のアミノ酸配列を有する L D C A M タンパク質をコードすることも可能である。こうした変異体 D N A 配列は、サイレント突然変異（例えば P C R 増幅中に起こるもの）から生じることにも可能であるし、または天然配列の意図的な突然変異誘発の産物であることも可能である。

## 【0119】

本発明は：( a ) 配列番号 1 および配列番号 3 に示すヌクレオチド配列を含む c D N A ; ( b ) 中程度にストリンジェントな条件下で、( a ) の D N A にハイブリダイズ可能であり、そして生物学的活性 L D C A M をコードする D N A ; および ( c ) ( a ) または ( b ) に定義する D N A に、遺伝暗号の結果、縮重しており、そして生物学的活性 L D C A M をコードする D N A から選択される、生物学的活性 L D C A M をコードする、同等の単離 D N A 配列を提供する。こうした D N A 同等配列にコードされる L D C A M タンパク質が本発明に含まれる。

30

## 【0120】

配列番号 1 および配列番号 3 の D N A 配列に同等な D N A は、配列番号 2 および配列番号 4 を含むポリペプチドをコードする D N A 配列に、中程度および非常にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするであろう。こうした D N A にコードされる L D C A M の例には、限定されるわけではないが、上述のような、L D C A M 断片（可溶性断片を含む）、および不活性化 N グリコシル部位（単数または複数）、不活性化 K E X 2 プロテアーゼプロセッシング部位（単数または複数）、または保存的アミノ酸置換（単数または複数）を含む L D C A M タンパク質が含まれる。他の哺乳動物種由来の D N A にコードされ、該 D N A が配列番号 1 または配列番号 3 の c D N A にハイブリダイズするであろう L D C A M タンパク質もまた、本発明に含まれる。

40

## 【0121】

適切なアッセイいづれかによって、B 7 L - 1 に結合する能力を所持する変異体を同定することも可能である。例えば、B 7 L - 1 の結合ドメインへの結合に対する競合（すな

50

わち競合的結合アッセイ)によって、LDCA Mの生物学的活性を決定することも可能である。

【0122】

LDCA Mポリペプチドの競合的結合アッセイの1つの種類は、放射標識可溶性LDCA M、およびB7L-1を発現する、損なわれていない細胞を用いる。損なわれていない細胞の代わりに、可溶性B7L-1/Fc融合タンパク質、例えば、プロテインA、プロテインG、またはB7L-1もしくは分子のFc部分に対する抗体と、融合タンパク質のFc領域との相互作用を通じて、固相に結合されている、B7L-1/Fcを代用することも可能である。別の種類の競合的結合アッセイは、放射標識可溶性LDCA M受容体、およびLDCA Mを発現する、損なわれていない細胞を利用する。

10

【0123】

慣用的方法論にしたがって、競合的結合アッセイを行うことも可能である。例えば、放射標識LDCA Mを用いて、推定上のLDCA M相同体と競合させて、B7L-1または表面結合LDCA M受容体に対する結合活性に関して、アッセイすることも可能である。競合的オートラジオグラフ・プレート結合アッセイによって定性的結果を得ることも可能であるし、またはスキャッチャードプロットを利用して、定量的結果を生じることも可能である。

【0124】

あるいは、B7L-1および抗LDCA M抗体などのLDCA M結合性タンパク質を、カラムクロマトグラフィーマトリックス、あるいは表面上にLDCA Mを発現する細胞を同定するか、分離するか、または精製するのに適した類似の支持体などの固相に結合させることも可能である。いずれかの手段によって、例えばB7L-1/Fc融合タンパク質を構築し、そしてプロテインAまたはプロテインGの相互作用を通じて該融合タンパク質を固相に結合させることによって、固相接触表面へのLDCA M結合性タンパク質の結合を達成することも可能である。固相にタンパク質を固定する多様な他の手段が当該技術分野に周知であり、そして本発明での使用に適している。例えば、磁気微小球体を、B7L-1でコーディングし、そして磁場を通じてインキュベーション容器中に保持することも可能である。LDCA M発現細胞を含有する細胞混合物の懸濁物を、B7L-1ポリペプチドを有する固相と接触させる。表面上にLDCA Mを有する細胞が、固定B7L-1に結合し、そして次いで、非結合細胞が洗い流される。このアフィニティー結合法は、溶液から、こうしたLDCA M発現細胞を精製するか、スクリーニングするか、または分離するのに有用である。陽性に選択された細胞を固相から遊離させる方法が当該技術分野に知られ、そしてこうした方法は、例えば、酵素の使用を含む。こうした酵素は、好ましくは細胞に対して非毒性および非傷害性であり、そして好ましくは細胞表面結合パートナーを切断するよう指示される。B7L-1:LDCA M相互作用の場合、酵素は、好ましくは、LDCA M成分から、生じた細胞懸濁物を取り除く。次いで、特に精製細胞集団が胎児組織から得られた場合、該集団を用いて、成熟(成体)組織に再移入(repopulate)することも可能である。

20

30

【0125】

あるいは、LDCA M<sup>+</sup>細胞を含有すると推測される細胞混合物をまず、ビオチン化B7L-1とインキュベーションすることも可能である。インキュベーション期間は、LDCA Mへの十分な結合を確実にするため、典型的には少なくとも連続1時間である。次いで、アビジンでコーティングしたビーズを充填したカラムに、生じた混合物を通過させると、アビジンに対するビオチンの高い親和性によって、該ビーズに細胞が結合する。アビジンでコーティングしたビーズの使用が当該技術分野に知られる。Berensonら、*J. Cell. Biochem.*, 10D: 239 (1986)を参照されたい。慣用法を用いて、非結合成分を洗浄し、そして結合細胞を遊離させる。

40

【0126】

上述のように、B7L-1を用いて、LDCA Mを発現する細胞を分離することも可能である。別の方法において、LDCA Mまたは細胞外ドメインまたはその断片を<sup>1 2 5</sup>I

50

などの検出可能部分にコンジュゲート化して、B7L-1発現細胞を検出することも可能である。高い比活性で標識された、機能する<sup>1 2 5</sup>I-LDCAM分子を生じるいくつかの標準的方法論いずれによって、<sup>1 2 5</sup>Iでの放射標識を行うことも可能である。あるいは分子のB7L-1領域またはFc領域に対するヨード化抗体またはビオチン化抗体を用いることも可能である。比色反応または蛍光定量反応を触媒可能な酵素、ビオチンまたはアビジンなどの別の検出可能部分を用いることも可能である。B7L-1発現に関して試験しようとする細胞を、標識したLDCAMと接触させることも可能である。インキュベーション後、非結合標識LDCAMを取り除き、そして検出可能部分を用いて、結合を測定する。

**【0127】**

上述のものに類似の競合アッセイにおいて、コンジュゲート化可溶性LDCAM/Fc（例えば<sup>1 2 5</sup>I-LDCAM/Fc）を用いて、LDCAM（変異体を含む）の結合特性を決定することもまた可能である。しかし、この場合、固相に結合し、LDCAM/Fcを発現する、損なわれていない細胞を用いて、LDCAM変異体を含有すると推定される試料が、LDCAMのコンジュゲート化可溶性結合パートナーとの結合に関して競合する度合いを測定する。

**【0128】**

LDCAMに関してアッセイする他の手段には、抗LDCAM抗体、LDCAMに反応して増殖する細胞株、またはLDCAMの存在下で増殖する組換え細胞株の使用が含まれる。

**【0129】**

本明細書に開示するLDCAMタンパク質を使用して、LDCAMへの結合親和性に関して、B7L-1または他のLDCAM結合性タンパク質の生物学的活性を測定することも可能である。一例として、B7L-1の修飾（例えば化学的修飾、一部切除、突然変異など）後、生物学的活性が保持されるかどうかを決定する際に、LDCAMを用いることも可能である。こうして、研究、または場合によっては臨床に使用する前に、B7L-1タンパク質の生物学的活性を確かめることも可能である。

**【0130】**

LDCAMタンパク質は、例えば異なる条件下でのB7L-1または他のLDCAM結合性タンパク質の貯蔵寿命および安定性を監視するための、「品質保証」研究を行うものによって、使用可能な試薬としての使用を見出す。例えば、LDCAMは、異なる温度で保管されているか、または異なる細胞種で産生されたB7L-1タンパク質の生物学的活性を測定する、結合親和性研究に使用可能である。LDCAMに対する修飾B7L-1タンパク質の結合親和性を、非修飾B7L-1タンパク質のものと比較して、B7L-1の生物学的活性に対する該修飾のいかなる不利な影響も検出する。同様に、B7L-1を用いて、LDCAMタンパク質の生物学的活性を評価することも可能である。

**【0131】**

LDCAMポリペプチドはまた、付着する剤を、T細胞、あるいはB7L-1、LDCAMおよび/またはCRTAMを所持する他の細胞に搬送するためのキャリアーとしての使用も見出す。LDCAMタンパク質を用いて、*in vitro*法または*in vivo*法において、診断用剤または療法剤をこれらの細胞に搬送することも可能である。実施例5に記載するように、LDCAMは、EBV形質転換細胞株であるPAE81BM細胞株上に見られる。したがって、こうしたキャリアー使用の1つの例は、この細胞株を療法剤/LDCAMコンジュゲートに曝露して、該剤がEBV癌いずれかに対して細胞傷害性を示すかどうかを評価することである。さらに、LDCAMは、抗原提示に重要である樹状細胞およびCD40L活性化B細胞上に発現されるため、LDCAMは、これらの細胞をターゲットとし、同定し、そして精製するのに有用なキャリアーである。また、LDCAM/診断用剤コンジュゲートを使用して、*in vitro*または*in vivo*で樹状細胞およびB細胞の存在を検出することも可能である。実施例6は、ヒトLDCAM mRNA転写物が、ヒト乳房、網膜、胎児肝臓、脾臓、胎児心臓、肺、胎盤、甲状腺、お

10

20

30

40

50

よび肺癌に見られることを示す。マウス L D C A M m R N A の発現に関する同様の研究は、マウス L D C A M m R N A が、全胚、精巢、リンパ系由来樹状細胞および三重ネガティブ細胞に見られることを示した。L D C A M は自身に結合するため、L D C A M を用いて、これらの組織におけるその機能的役割を研究することも可能である。

【 0 1 3 2 】

あるいは、さらなるターゲット細胞上の、限定されるわけではないが、B 7 L - 1、C R T A M および L D C A M などの他の L D C A M 結合パートナーに L D C A M をターゲットイングすることも可能である。例には、限定されるわけではないが、C R T A M を介した、活性化 C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、N K - T 細胞および / または N K 細胞 ; L D C A M を介した、B D C A 3 + ヒト樹状細胞および C D 8 + を含む樹状細胞などの抗原提示細胞が含まれる。 10

【 0 1 3 3 】

アッセイにおいて、L D C A M とともに、抗 L D C A M または C R T A M 抗体、ペプチポディ等に付着させたいいくつかの異なる療法剤または他の機能するマーカーを、コンジュゲート中で用いて、細胞に対する剤の細胞傷害効果を検出し、そして比較するか、または組織および細胞における L D C A M の役割を研究することも可能である。L D C A M ポリペプチドに付着させることも可能な診断用剤および療法剤には、限定されるわけではないが、薬剤、毒素、放射性核種、発色団、比色反応または蛍光定量反応を触媒する酵素等が、意図する適用にしたがって選択される特定の剤とともに含まれる。薬剤の例には、多様な型の癌を治療する際に使用するもの、例えば L - フェニルアラニン・ナイトロジェンマスタードまたはシクロホスファミドなどのナイトロジェンマスタード、シス - ジアミノジクロロ白金などの挿入剤、5 - フルオロウラシルなどの代謝拮抗剤、ピンクリスチンなどのピンカルカロイド、並びにプレオマイシン、ドキシソルピシン、ダウノルピシンおよびその誘導体などの抗生物質が含まれる。毒素の例は、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、緑膿菌 ( P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a ) 外毒素 A、リボソーム不活性化タンパク質、トリコセセンなどのマイコトキシン、並びにそれらの誘導体および断片 ( 例えば一本鎖 ) である。診断使用に適した放射性核種には、限定されるわけではないが、<sup>1 2 3</sup> I、<sup>1 3 1</sup> I、<sup>9 9 m</sup> T c、<sup>1 1 1</sup> I n、および <sup>7 6</sup> B r が含まれる。療法使用に適した放射性核種には、限定されるわけではないが、<sup>1 3 1</sup> I、<sup>2 1 1</sup> A t、<sup>7 7</sup> B r、<sup>1 8 6</sup> R e、<sup>1 8 8</sup> R e、<sup>2 1 2</sup> P b、<sup>2 1 2</sup> B i、<sup>1 0 9</sup> P d、<sup>6 4</sup> C u、および <sup>6 7</sup> C u が含まれる。 20 30

【 0 1 3 4 】

適切な慣用法いずれかによって、こうした剤を、L D C A M とともに、抗 L D C A M または C R T A M 抗体、ペプチポディ等に付着させることも可能である。L D C A M はタンパク質であるため、例えば、所望の剤上の官能基と反応して、共有結合を形成することも可能である、アミノ酸側鎖上の官能基を含む。あるいは、タンパク質または剤を誘導体化して、所望の反応性官能基を生成するか、または付着させることも可能である。誘導体化には、多様な分子をタンパク質に付着させるのに利用可能である、二官能性カップリング試薬 ( P i e r c e C h e m i c a l C o m p a n y、イリノイ州ロックフォード ) の 1 つの付着を伴うことも可能である。タンパク質を放射標識するいくつかの技術が知られる。例えば適切な二官能性キレート剤を用いることによって、放射性核種金属を L D C A M に付着させることも可能である。 40

【 0 1 3 5 】

こうして、L D C A M とともに抗 L D C A M または C R T A M 抗体、ペプチポディ等、および適切な診断用剤または療法剤を含む、コンジュゲート ( 好ましくは共有結合したものを ) を調製する。該コンジュゲートを、特定の適用に適した量で投与するか、または別の方式で使用する。

【 0 1 3 6 】

上述のように、L D C A M は C o n A および P H A に引き起こされる T 細胞増殖を遮断し、そして T C R m A b が誘導する T 細胞増殖を阻害しないため、マイトジェン誘導性 50

T細胞増殖に対するLDCAMの阻害効果は、サイトカイン分泌、例えばIL-2の阻害である可能性もある。したがって、本発明のLDCAMの別の使用は、T細胞において、LDCAMがIL-2産生に果たす役割を研究するための研究ツールとしてのものである。B7L-1またはその相互作用を検出するため、本発明のLDCAMポリペプチドを*in vitro*アッセイで使用することもまた、可能である。

#### 【0137】

本発明の1つの態様は、機能不全免疫系と関連する障害を治療する方法に関する。より具体的には、LDCAMは、ConAのT細胞刺激およびPHAのT細胞刺激を遮断することが知られるため、LDCAMは、T細胞応答に仲介される炎症および自己免疫障害を治療するのに有用でありうる。LDCAMタンパク質、好ましくは可溶性ポリペプチド、および薬学的に許容しうる希釈剤またはキャリアーを含む組成物を哺乳動物に投与して、こうした炎症または自己免疫障害を治療することも可能である。LDCAM/Fcの形の可溶性LDCAMを注射しておいたSCIDマウスは、脾臓細胞充実度(*cellularity*)の増加を経験する。この増加の一部は、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)としても知られる、DX-5<sup>+</sup>細胞の増加のためである。LDCAM/FcおよびNK細胞増殖因子のIL-15を注射すると、SCIDマウスは、相加的にNK細胞の増加を示す。これは、LDCAM、LDCAM断片、可溶性LDCAMとともにLDCAMアゴニストがNK細胞を生成する能力をさらに証明する。この発見を考慮して、本発明の別の態様には、LDCAM、可溶性LDCAM、LDCAM断片とともにLDCAMアゴニストを含有する、本発明の薬剤組成物を個体に投与することによって、該個体においてNK細胞数を増加させる方法が含まれる。別の態様において、NK細胞を、LDCAMまたはLDCAMの可溶性型とともにLDCAMアゴニストと接触させて、そしてNK細胞が増殖するのを可能にすることによって、*ex vivo*でNK細胞を増加させることも可能である。同様に、ちょうど記載したように、さらなるサイトカインまたは増殖因子と組み合わせ、LDCAMまたはLDCAMの可溶性型とともにLDCAMアゴニストを投与することによって、*in vivo*または*ex vivo*でNK細胞を生成することも可能である。したがって、*in vivo*または*ex vivo*で、NK細胞を生成する本発明の方法は、LDCAMと連続してまたは同時に併用して、サイトカインの有効量を使用することをさらに含むことも可能である。こうしたサイトカインには、限定されるわけではないが、インターロイキン(「IL」類)、IL-15、IL-3およびIL-4、顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子(「GM-CSF」)またはGM-CSF/IL-3融合体からなる群より選択されるコロニー刺激因子(「CSF」)、あるいはTNF- $\alpha$ 、CD40結合性タンパク質(例えばCD40-L)、4-1BBアンタゴニスト(例えば4-1BBおよび4-1BB-Lと免疫反応する抗体)またはc-kitリガンドなどの他のサイトカインが含まれる。

#### 【0138】

NK細胞は、Tリンパ球またはBリンパ球とは、形態および機能が異なる、巨大顆粒リンパ球である。NK細胞は、非MHC拘束方式で、特定の腫瘍細胞およびウイルス感染細胞の殺傷を仲介する。さらにNK細胞は骨髄移植レシピエントによるドナー細胞の拒絶に関与する。LDCAMは、NK細胞数を増加させるため、LDCAM、可溶性LDCAM、LDCAM断片とともにLDCAMアゴニストは、ウイルス感染細胞および感染性疾患と戦うのに有用である。同様に、LDCAM、可溶性LDCAM、およびLDCAM断片は、腫瘍細胞殺傷に有用である。したがって、本発明の範囲内にあるのは、感染性疾患を治療する方法および腫瘍に罹患した個体を治療する方法である。こうした療法は、腫瘍細胞を殺傷するか、または感染性疾患と戦う能力を増進するため、NK細胞数を増加させる必要がある個体に、LDCAM、LDCAMの可溶性型、またはLDCAM断片を投与することを伴う。同様に、LDCAM、可溶性LDCAM、例えばLDCAM融合タンパク質、またはLDCAM断片を、サイトカインと併用して、連続してまたは同時に投与することによって、本発明の療法を行うことも可能である。こうしたサイトカインには、限定されるわけではないが、インターロイキン(「IL」類)、IL-15、IL-3および

10

20

30

40

50

I L - 4、顆粒球・マクロファージ・コロニー刺激因子(「GM-CSF」)またはGM-CSF/I L - 3融合体からなる群より選択されるコロニー刺激因子(「CSF」)、あるいはTNF-、CD40結合性タンパク質(例えばCD40-L)、4-1BBアンタゴニスト(例えば4-1BBおよび4-1BB-Lと免疫反応する抗体)またはc-kitリガンドなどの他のサイトカインが含まれる。さらに、本発明の範囲内にあるのは、移植のレシピエントによる臓器および骨髄移植拒絶の影響を防止するかまたは減少させる方法である。こうした方法は、LDCAMアンタゴニストを含む組成物でレシピエントを治療し、こうしてNK細胞集団の増加を阻害して、そしてNK細胞が移植を拒絶する能力を減少させることを含む。ヒト内皮細胞(大動脈および臍帯)をヒトLDCAMの可溶性型で処理すると、細胞内のカルシウム流動が生じる。内皮細胞におけるカルシウム流動は、血管浸透性、内皮細胞遊走および血管形成、並びに白血球の接着および遊出を調節するのに重要である。したがって、LDCAMポリペプチドおよびLDCAM阻害剤を用いて、血液-脳関門を渡る薬剤搬送を改善し、腫瘍または病原体に対する免疫応答を増大させ、自己免疫または炎症症候群を和らげ、白血球接着およびアテローム斑の形成を和らげ、血管形成を遮断することも可能であり、そして病原性の血管漏出の治療に用いることも可能である。LDCAMポリペプチドとともに、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストは、共有結合または非共有結合二量体または三量体などのオリゴマーとして存在することも可能である。異なるLDCAMポリペプチド上のシステイン残基間に形成されるジスルフィド結合によって、オリゴマーを連結することも可能である。本発明の1つの態様において、T細胞、B7L-1またはそれ自体へのLDCAMの結合に干渉しない方式で、抗体(例えばIgG1)のFc領域に、LDCAMを融合させることによって、LDCAM二量体を生成する。Fcポリペプチドは、好ましくは、可溶性LDCAM(受容体結合部分のみを含む)のC末端に融合される。抗体由来ポリペプチドの多様な部分(Fcドメインを含む)に融合している異種ポリペプチドを含む融合タンパク質の一般的な調製は、例えば、本明細書に援用される、Ashkenaziら(PNAS USA 88:10535, 1991)およびByrnら(Nature, 344:677, 1990)に記載される。LDCAM:Fc融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を適切な発現ベクターに挿入する。LDCAM:Fc融合タンパク質を、抗体分子によく似た形で集合させ、その結果、Fcポリペプチド間に鎖間ジスルフィド結合が形成され、二価LDCAMを生じるのを可能にする。融合タンパク質が抗体の重鎖および軽鎖両方で作成されている場合、4つものLDCAM細胞外領域を持つLDCAMオリゴマーを形成することが可能である。あるいは、2つの可溶性LDCAMドメインをペプチドリンカーで連結することも可能である。

#### 【0139】

免疫グロブリンに基づくオリゴマーとしてのアンタゴニストおよびアゴニスト。適切な型のLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストには、キメラタンパク質が含まれ、該キメラタンパク質は、キメラタンパク質による二量体、三量体またはより高次の多量体の自発的形成を促進可能な第二のポリペプチドを含み、これらのキメラタンパク質は、それぞれの同族体と結合可能であり、そしてそれによって、炎症の影響および心臓血管疾患の症状を阻害するかまたは減少させる。アンタゴニストまたはアゴニストとして用いられるキメラタンパク質は、抗体分子、およびLDCAM、B7L-1またはCRTAM由来の可溶性ポリペプチドの部分を含むタンパク質であることも可能である。適切な融合タンパク質には、免疫グロブリンFc領域に連結された、LDCAM、B7L-1またはCRTAMポリペプチド、例えば細胞外ドメイン、または細胞外ドメインの断片が含まれる。Fc領域の断片とともに、Fc受容体に対して、減少した親和性を示すFc突然変異タンパク質(mutain)もまた使用可能である。可溶性LDCAM、B7L-1またはCRTAMとともにその断片を、免疫グロブリンのFc部分に、直接またはリンカー配列を通じて、融合させることも可能である。

#### 【0140】

LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストの1つの態様は、LDCAM、B7L-1

またはC R T A Mポリペプチドを抗体由来のF cポリペプチドに融合させることによって生成される2つの融合ポリペプチドを含む二量体に向けられる。こうした融合ポリペプチドをコードする遺伝子融合体を適切な発現ベクターに挿入する。組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞において、L D C A M、B 7 L - 1またはC R T A M - F c融合ポリペプチドを発現させ、そして抗体分子によく似た形で集合させ、その結果、F c部分間に鎖間ジスルフィド結合が形成され、二価分子を生じるのを可能にする。P C T出願W O 9 3 / 1 0 1 5 1に記載される1つの適切なF cポリペプチドは、ヒトI g G 1抗体のF c領域のN末端ヒンジ領域から天然C末端に渡る一本鎖ポリペプチドである。L D C A M、B 7 L - 1またはC R T A Mの二価型に関しては、こうした融合は、I g G分子のF c部分に対するものであることも可能である。他の免疫グロブリンアイソタイプを用いて、こうした融合体を生成することも可能である。例えば、ポリペプチド - I g M融合は、本発明のポリペプチドの十価型を生成するであろう。

10

#### 【0141】

抗体由来ポリペプチドの多様な部分(F cドメインを含む)に融合している特定の異種ポリペプチドを含む融合ポリペプチドの調製は当該技術分野において公知であり、そして、例えば、A s h k e n a z i r ( P N A S U S A 8 8 : 1 0 5 3 5 , 1 9 9 1 ) ; B y r n r ( N a t u r e , 3 4 4 : 6 7 7 , 1 9 9 0 ) ; 並びにH o l l e n b a u g h およびA r u f f o ( " C o n s t r u c t i o n o f I m m u n o g l o b u l i n F u s i o n P o l y p e p t i d e s " , C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y 中 , S u p p l . 4 , 1 0 . 1 9 . 1 - 1 0 . 1 9 . 1 1 ページ , 1 9 9 2 ) に記載されている。別の有用なF cポリペプチドは、米国特許第5,457,035号およびB a u m r ( E M B O J . 1 3 : 3 9 9 2 - 4 0 0 1 , 1 9 9 4 ) に記載されるF c突然変異タンパク質である。この突然変異タンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸19がL e u からA l a に変化し、アミノ酸20がL e u からG l u に変化し、そしてアミノ酸22がG l y からA l a に変化していることを除けば、W O 9 3 / 1 0 1 5 1 に示される天然F c配列のものと同一である。該突然変異タンパク質は、F c受容体に対し、減少した親和性を示す。F c部分を含む上述の融合ポリペプチド(およびそれらから形成されるオリゴマー)は、ポリペプチドAまたはポリペプチドGカラム上のアフィニティークロマトグラフィーによる容易な精製という利点を提供する。他の態様において、本発明のポリペプチドを、抗体重鎖または軽鎖の可変部に対して置換することも可能である。融合ポリペプチドが抗体の重鎖および軽鎖両方で作成されている場合、4つものI L - 1 7 R 細胞外領域を持つオリゴマーを形成することが可能である。

20

30

#### 【0142】

L D C A M アンタゴニストおよびアゴニスト ペプチドリンカーに基づくオリゴマー。あるいは、オリゴマーは、ペプチドリンカー(スパーサーペプチド)を含み、または含まず、多数のL D C A M、B 7 L - 1および/またはC R T A Mポリペプチドを含む融合ポリペプチドである。適切なペプチドリンカーの中には、米国特許第4,751,180号および第4,935,233号に記載されるものがある。適切な慣用的技術いずれかを用いて、所望のペプチドリンカーをコードするD N A 配列を、本発明のD N A 配列間に、そして該配列と同じ読み枠で挿入することも可能である。例えば、リンカーをコードする、化学的に合成したオリゴヌクレオチドを、配列間に連結することも可能である。特定の態様において、融合ポリペプチドは、ペプチドリンカーによって分離された、2~4の可溶性L D C A M、B 7 L - 1またはC R T A Mポリペプチドを含む。適切なペプチドリンカー、他のポリペプチドとの組み合わせ、およびその使用は、当業者に周知である。

40

#### 【0143】

L D C A M アンタゴニストおよびアゴニストのオリゴマー型には、L D C A M、B 7 L - 1またはC R T A Mポリペプチド、L D C A M、B 7 L - 1および/またはC R T A Mポリペプチドの細胞外ドメイン、あるいはその開示が本明細書に援用される米国特許第5,716,805号に記載されるジッパータンパク質などのジッパードメインと会合する

50



細胞外ドメインのLDCAM、B7L-1および/またはCRTAM断片が含まれることも可能である。ジッパードメインの他の例は、酵母転写因子GCN4に見られるものおよびラット肝臓に見られる熱安定性DNA結合タンパク質(C/EBP; Landschulzら, *Science* 243:1681, 1989)、優先的にヘテロ二量体を形成する核トランスフォーミングタンパク質、fosおよびjun(O'Sheaら, *Science* 245:646, 1989; TurnerおよびTjian, *Science* 243:1689, 1989)、およびネズミ・プロトオンコジーン、c-mycの遺伝子産物(Landschulzら, *Science*, 240:1759, 1988)に見られるものである。パラミクソウイルス、コロナウイルス、麻疹ウイルスおよび多くのレトロウイルスを含む、いくつかの異なるウイルスの融合体形成性(fusogenic)タンパク質もまた、ロイシンジッパードメインを所持する(BucklandおよびWild, *Nature* 338:547, 1989; Britton, *Nature* 353:394, 1991; DelwartおよびMosialos, *AIDS Research and Human Retroviruses* 6:703, 1990)。ロイシンジッパードメインは、該ドメインが見られるポリペプチドのオリゴマー化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、元来、いくつかのDNA結合性ポリペプチドで同定され、そして以来、多様な異なるポリペプチドで発見されてきた。既知のロイシンジッパーの中には、二量体化または三量体化する天然存在ペプチドおよび誘導体がある。ジッパードメイン(本明細書において、オリゴマー化ドメイン、またはオリゴマー形成ドメインとも称される)は、7アミノ酸反復を含み、しばしば他のアミノ酸の間に4または5のロイシン残基が散在する。ロイシンジッパーの使用およびロイシンジッパーを用いたオリゴマーの調製は、当該技術分野に周知である。

#### 【0144】

本発明は、スパーサーアミノ酸連結基を含む、または含まない、融合ポリペプチドを含む。例えば、2つの可溶性LDCAM、B7L-1またはCRTAMドメインを、米国特許第5,073,627号に記載されるような(Gly)<sub>4</sub>Ser(Gly)<sub>5</sub>Ser(配列番号32)などのリンカー配列を用いて連結することも可能である。他のリンカー配列には、例えば、GlyAlaGlyGlyAlaGlySer(Gly)<sub>5</sub>Ser(配列番号33)、(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>2</sub>(配列番号34)、(GlyThrPro)<sub>3</sub>(配列番号35)、および(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>Gly<sub>4</sub>SerGly<sub>5</sub>Ser(配列番号36)が含まれる。

#### 【0145】

LDCAM、B7L-1またはCRTAMポリペプチドなどのLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストの発現に適した宿主細胞には、原核生物、酵母、またはより高次の真核細胞が含まれる。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主での使用に適したクローニング用および発現ベクターは、例えば、Pouwelsら, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, エルセビア, ニューヨーク(1985)に記載されている。細胞不含翻訳系もまた、本明細書に開示されるDNA構築物由来のRNAを用いて、LDCAMポリペプチドを産生するのに使用可能である。

#### 【0146】

原核生物には、例えば大腸菌またはバチルス属(*Bacilli*)などのグラム陰性生物またはグラム陽性生物が含まれる。形質転換に適した原核生物宿主細胞には、例えば、大腸菌、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、並びにシュードモナス属(*Pseudomonas*)、ストレプトミセス属(*Streptomyces*)、およびブドウ球菌属(*Staphylococcus*)内の多様な他の種が含まれる。大腸菌などの原核宿主細胞において、組換えポリペプチドの該原核宿主細胞における発現を容易にするため、LDCAMポリペプチドはN末端メチオニン残基を含むことも可能である。N末端Metを、発現された組換えLDCAMポリペプチドから切断することも可能である。

#### 【0147】

10

20

30

40

50

LDCAM、B7L-1またはCRTAMポリペプチドなどのLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを、好ましくは、サッカロミセス属（例えば、*S. cerevisiae*）由来などの酵母宿主細胞において発現可能である。ピキア属（*Pichia*）、*K. lactis*、クロイベロミセス属（*Kluyveromyces*）などの酵母の他の属も使用可能である。酵母ベクターは、しばしば、2 $\mu$ 酵母プラスミド由来の複製起点配列、自律複製配列（ARS）、プロモーター領域、ポリアデニル化のための配列、転写終結のための配列、および選択可能マーカー遺伝子を含むであろう。酵母ベクターに適したプロモーター配列には、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ら、*J. Biol. Chem.* 255:2073, 1980）、または、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼなどの他の解糖酵素（Hessら、*J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, 1968；およびHollandら、*Biochem.* 17:4900, 1978）のプロモーターが含まれる。酵母発現に用いるのに適した他のベクターおよびプロモーターが、Hitzeman, EPA-73, 657またはFleerら、*Gene*, 107:285-195 (1991)；およびvan den Bergら、*Bio/Technology*, 8:135-139 (1990)にさらに記載される。別の代替物は、Russellら（*J. Biol. Chem.* 258:2674, 1982）およびBeierら（*Nature* 300:724, 1982）に記載されるグルコース抑制性ADH2プロモーターである。上記酵母ベクター中に、大腸菌での選択および複製のためのpBR322由来のDNA配列（Amp<sup>r</sup>遺伝子および複製起点）を挿入することによって、酵母および大腸菌両方で複製可能なシャトルベクターを構築することも可能である。

10

20

30

40

50

#### 【0148】

酵母因子リーダー配列を使用して、LDCAMポリペプチドの分泌を導くことも可能である。因子リーダー配列は、しばしば、プロモーター配列および構造遺伝子配列の間に挿入される。例えば、Kurjanら、*Cell* 30:933, 1982；Bittnerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5330, 1984；米国特許第4,546,082号およびEP 324,274を参照されたい。酵母宿主由来の組換えポリペプチドの分泌を容易にするのに適した他のリーダー配列が、当業者に知られる。3'端近傍でリーダー配列を修飾して、1以上の制限部位を含むさせることも可能である。これは構造遺伝子へのリーダー配列の融合を容易にするであろう。

#### 【0149】

酵母形質転換プロトコルが当業者に知られる。こうしたプロトコルの1つが、Hinnenら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978に記載される。Hinnenらのプロトコルは、0.67%酵母窒素基剤、0.5%カザミノ酸、2%グルコース、10 $\mu$ g/mlアデニンおよび20 $\mu$ g/mlウラシルからなる選択培地中でのTrp<sup>+</sup>形質転換体を選択する。

#### 【0150】

「リッチ」培地中の発現を誘導するため、ADH2プロモーター配列を含むベクターによって形質転換された酵母宿主細胞を増殖させることも可能である。リッチ培地の例は、80 $\mu$ g/mlアデニンおよび80 $\mu$ g/mlウラシルを補った、1%酵母エキス、2%ペプトン、および1%グルコースからなるものである。ADH2プロモーターの抑制解除（derepression）は、培地からグルコースが枯渇したとき起こる。

#### 【0151】

哺乳動物または昆虫宿主細胞培養系もまた、組換えLDCAMポリペプチドを発現するのに使用可能である。昆虫細胞における異種タンパク質産生のためのバキュロウイルス系

が、LuckowおよびSummers, *Bio/Technology* 6:47 (1988)に概説される。哺乳動物起源の樹立細胞株もまた、使用可能である。適切な哺乳動物宿主細胞株の例には、サル腎臓細胞のCOS-7株(ATCC CRL 1651)(Gluzmanら, *Cell* 23:175, 1981)、L細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、およびBHK(ATCC CRL 10)細胞株、およびMcMahánら(*EMBO J.* 10:2821, 1991)に記載されるようなアフリカミドリザル(*African green monkey*)腎臓細胞株CV1(ATCC CCL 70)由来であるCV-1/EBNA-1細胞株が含まれる。

#### 【0152】

哺乳動物宿主細胞発現ベクターのための転写および翻訳調節配列は、ウイルスゲノムより切り出されることも可能である。通常用いられるプロモーター配列およびエンハンサー配列は、ポリオマウイルス、アデノウイルス2、シミアンウイルス40(SV40)、およびヒト・サイトメガロウイルス由来である。SV40ウイルスゲノム由来のDNA配列、例えばSV40起点、初期および後期プロモーター、エンハンサー、スプライシング、およびポリアデニル化部位を用いて、哺乳動物宿主細胞における構造遺伝子配列の発現のための他の遺伝要素を提供することも可能である。ウイルス初期および後期プロモーターは、どちらもウイルス複製起点をも含有することも可能な断片として容易にウイルスゲノムから得られるため、特に有用である(Fiersら, *Nature* 273:113, 1978)。SV40ウイルス複製起点部位に位置するHind III部位からBgl I部位に渡る、およそ250bpの配列が含まれていれば、より小さいかまたはより大きいSV40断片もまた使用可能である。

#### 【0153】

哺乳動物宿主細胞において用いるための典型的な発現ベクターを、OkayamaおよびBerg(*Mol. Cell. Biol.* 3:280, 1983)に開示されるように構築することも可能である。C127ネズミ乳腺上皮細胞における哺乳動物cDNAの安定した高レベル発現に有用な系を、実質的にCosmanら(*Mol. Immunol.* 23:935, 1986)に記載されるように構築することも可能である。Cosmanら, *Nature* 312:768, 1984に記載される有用な高発現ベクター、PMLSV N1/N4はATCC 39890として寄託されている。さらなる有用な哺乳動物発現ベクターは、本明細書に援用される、EP-A-0367566および米国特許出願第07/701,415号、1991年5月16日出願に記載されている。ベクターは、レトロウイルス由来であることも可能である。天然シグナル配列の代わりに、そしてイニシエーター・メチオニンに加えて、米国特許第4,965,195号に記載されるIL-7のシグナル配列;Cosmanら, *Nature* 312:768(1984)に記載されるIL-2受容体のシグナル配列;EP 367,566に記載されるIL-4シグナルペプチド;米国特許第4,968,607号に記載されるI型IL-1受容体シグナルペプチド;およびEP 460,846に記載されるII型IL-1受容体シグナルペプチドなどの異種シグナル配列を付加することも可能である。

#### 【0154】

上述のような組換え発現系によって、本発明記載の単離、精製または均質タンパク質としてのLDCA Mアンタゴニストおよびアゴニストを産生することも、あるいは天然存在細胞から精製することも可能である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)による解析に際して、単一のタンパク質バンドに示されるように、LDCA Mを実質的に均質に精製することも可能である。

#### 【0155】

LDCA Mを産生する1つのプロセスは、LDCA MをコードするDNA配列を含む発現ベクターで形質転換された宿主細胞を、LDCA Mの発現を促進するのに十分な条件下で培養することを含む。次いで、使用した発現系に応じて、LDCA Mを培地または細胞抽出物から回収する。当業者に知られるように、組換えタンパク質を精製する方法は、使

10

20

30

40

50

用する宿主細胞種、および組換えタンパク質が培地に分泌されるかどうかなどの要因にしたがって多様であろう。

【0156】

例えば、組換えタンパク質を分泌する発現系を使用する場合、商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外ろ過装置を用いて、培地をまず、濃縮することも可能である。濃縮工程後、濃縮物をゲルろ過媒体などの精製マトリックスに適用することも可能である。あるいは、陰イオン交換樹脂、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または支持体を使用可能である。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク質精製に一般的に使用される他の種類であることも可能である。あるいは、陽イオン交換工程も使用可能である。適切な陽イオン交換体には、スルホプロピル基またはカルボキシメチル基を含む多様な不溶性マトリックスが含まれる。スルホプロピル基が好ましい。最後に、疎水性逆相高性能液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)媒体(例えばペンダントメチル、または他の脂肪族基を有するシリカゲル)を使用する、1以上のRP-HPLC工程を使用して、LDCAMをさらに精製することも可能である。多様な組み合わせの前述の精製工程のいくつかまたはすべてが周知であり、そしてこれを使用して、実質的に均質な組換えタンパク質を提供することも可能である。

10

【0157】

LDCAM結合性タンパク質のリガンド結合性ドメインを含むアフィニティーカラムを利用して、発現されたLDCAMポリペプチドをアフィニティー精製することも可能である。慣用的な技術を用いて、例えば利用するアフィニティーマトリックスに応じて、高塩溶出緩衝液中で、そしてその後、使用のためより低塩の緩衝液中に透析することによって、またはpHもしくは他の構成要素を変化させることによって、LDCAMポリペプチドをアフィニティーカラムからはずす(remove)ことも可能である。あるいは、アフィニティーカラムは、LDCAMに結合する抗体を含むことも可能である。実施例10は、LDCAMに対して向けられるモノクローナル抗体を生成するため、本発明のLDCAMを使用する方法を記載する。

20

【0158】

細菌培養中で産生された組換えタンパク質を、まず宿主細胞を破壊して、遠心分離し、不溶性ポリペプチドの場合は細胞ペレットから抽出し、また可溶性ポリペプチドの場合は上清液から抽出して、その後、1以上の濃縮、塩析、イオン交換、アフィニティー精製またはサイズ排除クロマトグラフィー工程を続けることによって、単離することも可能である。最後に、最終精製工程のため、RP-HPLCを使用することも可能である。凍結融解サイクリング、超音波、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む、好適な方法いずれかによって、微生物細胞を破壊することも可能である。

30

【0159】

精製を単純化するため、好ましくは、分泌ポリペプチドとしてLDCAMを発現する形質転換酵母宿主細胞を使用する。酵母から分泌される組換えポリペプチドは、Urdalら(J. Chromatog. 296:171, 1984)に開示されるものと類似の方法によって精製可能である。Urdalらは、分取用HPLCカラム上での組換えヒトIL-2精製のための、2つの連続する逆相HPLC工程を記載する。

40

【0160】

LDCAM核酸の有用な断片には、ターゲットLDCAM mRNA(センス)またはLDCAM DNA(アンチセンス)配列に結合可能な一本鎖核酸配列(RNAまたはDNAいずれか)を含む、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドは、本発明にしたがって、LDCAM cDNAのコード領域の断片を含む。こうした断片は、一般的に、少なくとも約14ヌクレオチド、好ましくは約14~約30ヌクレオチドを含む。既定のタンパク質をコードするcDNA配列に基づいて、アンチセンスまたはセンスオリゴヌクレオチドを得る能力は、例え

50

ば、SteinおよびCohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) およびvan der Krogh (BioTechniques 6:958, 1988) に記載されている。

【0161】

#### 4. CRTAM

上述のように、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストは、LDCAMなどの1以上のCRTAM結合パートナーへのCRTAM結合の下流生物学的効果を調節する、CRTAM特異的抗体、CRTAM特異的ペプチドまたはCRTAMに結合する可溶性ポリペプチド(LDCAMなど)を含む。CRTAMは、本明細書に完全に援用される米国特許第5,686,257号に記載される。ヒトCRTAMの配列を配列番号11に提供

10

【0162】

#### 5. LDCAMアンタゴニストおよびアゴニスト活性のアッセイ

本発明の精製LDCAMポリペプチド(ポリペプチド、断片、変異体、オリゴマー、および他の型を含む)は、多様なアッセイで有用である。

【0163】

態様には、LDCAMアゴニストまたはアンタゴニストとして作用する試験化合物を同定するスクリーニングアッセイが含まれる。限定されるわけではないが：(a)試験化合物と単離LDCAMポリペプチドを合わせ；(b)単離CRTAMポリペプチドを添加し；そして(c)試験化合物の存在下および非存在下で、LDCAMポリペプチドおよびCRTAMポリペプチド間の相対的結合を決定することを含む、LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストに関するスクリーニング法を含む、いくつかの形式および順列(permutation)が想定される。別の態様には：(a)LDCAMポリペプチドを発現する細胞と試験化合物を合わせ；(b)単離CRTAMポリペプチドを添加し；そして(c)試験化合物の存在下および非存在下で、LDCAMポリペプチドを発現する細胞およびCRTAMポリペプチド間の相対的結合を決定することを含む、LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストに関するスクリーニング法が含まれる。別の態様には：(a)LDCAMポリペプチドを発現する細胞と試験化合物を合わせ；(b)CRTAMポリペプチドを発現する細胞を添加し；そして(c)試験化合物の存在下および非存在下で、LDCAMポリペプチドを発現する細胞およびCRTAMポリペプチドを発現する細胞間の相対的結合を決定することを含む、LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストに関するスクリーニング法が含まれる。別の態様には：(a)単離LDCAMポリペプチドと試験化合物を合わせ；(b)CRTAMポリペプチドを発現する細胞を添加し；そして(c)試験化合物の存在下および非存在下で、LDCAMポリペプチド、およびCRTAMポリペプチドを発現する細胞間の相対的結合を決定することを含む、LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストに関するスクリーニング法が含まれる。別の態様には：(a)CRTAMポリペプチドを発現する細胞を合わせ；そして(b)CRTAMポリペプチドを発現する細胞および試験化合物間の相対的結合または生物学的効果を決定することを含む、LDCAMアゴニストに関するスクリー

20

30

40

【0164】

例えば本発明のLDCAMおよびLDCAM様分子を用いて、LDCAMポリペプチドの結合パートナーを同定することも可能であり、該ポリペプチドを用いて、細胞間コミュニケーション、細胞刺激、または免疫細胞活性を調節することもまた可能である。あるいは、本発明のLDCAMおよびLDCAM様分子を用いて、細胞間コミュニケーション、細胞刺激経路、または免疫細胞活性を調節する、非結合パートナー分子または物質、すなわちLDCAMアンタゴニストまたはアゴニストを同定することも可能である。

【0165】

50

L D C A Mポリペプチドはまた、結合親和性に関して、L D C A M結合性ポリペプチドの生物学的活性を測定する際にも使用を見出す。例には、限定されるわけではないが、L D C A M、C R T A M、B 7 1 - 4、B 7 L - 1とともに抗L D C A M抗体およびペプチボディが含まれる。例えば、異なる条件下のポリペプチドの貯蔵寿命および安定性を監視するための、「品質保証」研究を行うものによって、上に列挙する例を使用することも可能である。例えば、異なる温度で保管されているか、または異なる細胞種で産生された、限定されるわけではないが、L D C A M（ホモタイプ凝集）、B 7 L - 1、B 7 1 - 4、およびC R T A Mなどの結合パートナーポリペプチドの生物学的活性を測定する結合親和性研究において、L D C A Mポリペプチドを使用することも可能である。結合パートナーポリペプチドの修飾（例えば化学的修飾、一部切除、突然変異など）後、生物学的活性が保持されるかどうかを決定するため、該ポリペプチドを用いることもまた可能である。修飾ポリペプチドの結合親和性を、非修飾結合性ポリペプチドのものと比較して、結合性ポリペプチドの生物学的活性に対して、修飾が与えたいかなる不都合な影響も検出する。

10

#### 【0166】

結合パートナーを同定するアッセイ。L D C A Mポリペプチドおよびその断片を用いて、結合パートナーを同定することも可能である。L D C A Mの結合パートナーには、限定されるわけではないが、L D C A M（ホモタイプ凝集）、B 7 L - 1、B 7 L - 4、およびC R T A Mが含まれる。例えば、適切なアッセイいずれか、例えば慣用的な結合アッセイで、候補結合パートナーに結合する能力に関して、これらを試験することも可能である。例えば、L D C A Mポリペプチドを検出可能試薬（例えば放射性核種、発色団、比色反応または蛍光定量反応を触媒する酵素等）で標識することも可能である。候補結合パートナーを発現している細胞と、標識したL D C A Mポリペプチドを接触させる。次いで、細胞を洗浄して、未結合の標識したポリペプチドを除去し、そして標識の性質にしたがって選択した、適切な技術によって、細胞結合標識の存在を決定する。

20

#### 【0167】

本発明のL D C A Mポリペプチドを、各々、限定されるわけではないがL D C A M（ホモタイプ凝集）、B 7 L - 1、B 7 L - 4、およびC R T A Mなどの結合パートナーに関してスクリーニングするか、または該パートナーを同定する方法における試薬として用いることも可能である。例えば、L D C A Mポリペプチドを固体支持体材料に付着させて、そしてアフィニティークロマトグラフィーと類似の方式で、結合パートナーに結合させることも可能である。特定の態様において、慣用法によって、ポリペプチドを固体支持体に付着させる。一例として、ポリペプチドのアミノ酸側鎖上の官能基と反応するであろう官能基を含有するクロマトグラフィーカラムが入手可能である（Pharmacia Biotech, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイ）。代替法として、L D C A Mポリペプチド/Fc融合タンパク質（上に論じるようなもの）を、Fc部分との相互作用を通じて、プロテインAまたはプロテインG含有クロマトグラフィーカラムに付着させる。L D C A Mポリペプチドはまた、限定されるわけではないがL D C A M（ホモタイプ凝集）、B 7 L - 1、B 7 L - 4、およびC R T A MなどのL D C A M結合パートナーを、細胞表面上に発現する細胞を同定するのにも使用を見出す。精製L D C A Mポリペプチドとともに、変異体、断片、融合タンパク質または誘導体などの他の型を、カラムクロマトグラフィーマトリックスまたは類似の適切な支持体などの固相に結合させる。例えば磁気微小球体を該ポリペプチドでコーティングし、そして磁場を通じてインキュベーション容器に保持することも可能である。潜在的な結合パートナーの発現細胞を含有する細胞混合物の懸濁物を、ポリペプチドを有する固相と接触させる。細胞表面上に結合パートナーを発現している細胞は固定ポリペプチドに結合し、そして未結合細胞は洗い流される。あるいは、L D C A Mポリペプチドを検出可能部分にコンジュゲート化し、次いで、結合パートナー発現に関して試験しようとする細胞とインキュベーションする。インキュベーション後、未結合標識物質を取り除き、そして細胞上の検出可能部分の存在または非存在を決定する。さらなる代替法において、結合パートナーを発現していると推測される細胞の混合物を、ビオチン化したポリペプチドとインキュベーションする。インキュベーシ

30

40

50

ン期間は、十分な結合を確実にするため、典型的には少なくとも連続1時間である。次いで、アビジンでコーティングしたビーズを充填したカラムに、生じた混合物を通過させ、それによって、アビジンに対するビオチンの高い親和性が、所望の細胞のビーズへの結合を提供する。アビジンでコーティングしたビーズの使用法が知られる(Berensonら, *J. Cell. Biochem.*, 10D:239, 1986を参照されたい)。未結合成分を取り除く洗浄、および結合細胞の遊離は、慣用法を用いて行われる。いくつかの場合、結合パートナーに関してスクリーニングするか、または該パートナーを同定する上記の方法はまた、こうした結合パートナー分子またはそれらを発現している細胞などを用いるかまたは修飾して、単離するかまたは精製することも可能である。こうした方法によって発見される結合パートナーの例には、限定されるわけではないが、実施例に記載するように、LDCAM(ホモタイプ凝集)、B7L-1、B7L-4、およびCRTAMが含まれる。

10

#### 【0168】

結合アッセイ法の1つの例は以下のとおりである。候補結合パートナーcDNAを含有する組換え発現ベクターを構築する(限定されるわけではないが、LDCAM(ホモタイプ凝集)、B7L-1、B7L-4、およびCRTAMなど)。10cm<sup>2</sup>プレート中のCV1-EBNA-1細胞をこの組換え発現ベクターでトランスフェクションする。CV1-EBNA-1細胞(ATCC CRL 10478)は、CMV極初期エンハンサー/プロモーターから駆動されるEBV核抗原1を恒常的に発現する。CV1-EBNA-1は、McMahonら(*EMBO J.* 10:2821, 1991)に記載されるように、アフリカミドリザル腎臓細胞株CV-1(ATCC CCL 70)由来であった。トランスフェクション細胞を24時間培養し、そして次いで、各プレート中の細胞を24ウェルプレートに分ける。さらに48時間培養した後、トランスフェクション細胞(約4×10<sup>4</sup>細胞/ウェル)をBM-NFDMで洗浄する。BM-NFDMは50mg/ml脱脂粉乳が添加されている結合培地(25mg/mlウシ血清アルブミン、2mg/mlアジ化ナトリウム、20mM HEPES pH7.2を含有するRPMI1640)である。次いで、該細胞を、多様な濃度の、例えば上述のように作成したLDCAMの可溶性ポリペプチド/Fc融合ポリペプチドと、37°Cで1時間インキュベーションする。次いで、細胞を洗浄し、そして結合培地中で、<sup>125</sup>Iマウス抗ヒトIgGの一定の飽和濃度で、穏やかに攪拌しながら37°Cで1時間インキュベーションする。徹底した洗浄の後、トリプシン処理を介して細胞を遊離させる。上に使用するマウス抗ヒトIgGは、ヒトIgGのFc領域に対して向けられ、そしてJackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.、ペンシルバニア州ウェストグローブから得ることも可能である。該抗体は標準的クロラミン-T法を用いて放射ヨウ素標識される。該抗体は、細胞に結合しているいかなるLDCAMポリペプチド/FcポリペプチドのFc部分にも結合するであろう。すべてのアッセイにおいて、<sup>125</sup>I抗体の非特異的結合をFc融合ポリペプチド/Fcの非存在下でアッセイするとともに、Fc融合ポリペプチドおよび200倍のモル過剰の非標識マウス抗ヒトIgG抗体の存在下でもアッセイする。細胞結合<sup>125</sup>I抗体を、Packard Autogammaカウンターで定量化する。親和性計算(Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51:660, 1949)はMicrovaxコンピュータ上で実行されるRS/1(BBN Software、マサチューセッツ州ボストン)上で生み出される。結合はまた、高処理スクリーニング法に適した方法を用いても検出可能であり、これらの方法は例えばシンチレーション近接アッセイ(Udenfriendら, 1985, *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8672-8676)、均質時間分解蛍光法(Parkら, 1999, *Anal Biochem* 269:94-104)、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法(Clegg RM, 1995, *Curr Opin Biotechnol* 6:103-110)、または結合されたポリペプチドを潜在的な結合パートナーに曝露した際、例えばBiacore AB(スウェーデン・ウプサラ)に供給されるものなどのバイオセンサーを用いて、表面プラズ

20

30

40

50

モン共鳴のいかなる変化も測定する方法である。LDCA Mおよび/またはLDCA M様ポリペプチドへの結合に関してアッセイ可能な化合物には、限定されるわけではないが、Sigma - Aldrich (ミズーリ州セントルイス)、Arqule (マサチューセッツ州ウォバーン)、Enzymed (アイオワ州アイオワシティ)、Maybridge Chemical Co. (英国・コーンウォール州トレビレット)、MDS Panlabs (ワシントン州ボセル)、Pharmacopeia (ニュージャージー州プリンストン)、およびTrega (カリフォルニア州サンディエゴ)などの企業からしばしば大きいコンビナトリアルケミストリー化合物「ライブラリー」の一部として - 商業的に入手可能なものなどの、小有機分子が含まれる。これらのアッセイを用いてスクリーニングするのに好ましい小有機分子は、通常、10K分子量未満であり、そして細胞侵入 (penetration) を増進し、分解に抵抗し、そして/またはその生理学的半減期を延長する、いくつかの物理化学的および薬理学的特性を所持することも可能である (Gibbs, J., 1994, Pharmaceutical Research in Molecular Oncology, Cell 79 (2): 193 - 198)。天然産物、無機化学薬品、並びにタンパク質および毒素などの生物学的に活性である物質を含む化合物もまた、LDCA Mポリペプチドに結合する能力に関して、これらの方法を用いてアッセイすることも可能である。

10

#### 【0169】

酵母ツーハイブリッドまたは「相互作用トラップ」アッセイ。LDCA Mポリペプチドが、別のポリペプチド (例えばLDCA M (ホモタイプ凝集)、B7L - 1およびCRTAMなど) に結合するか、または潜在的に結合する場合、LDCA Mポリペプチドをコードする核酸はまた、相互作用トラップアッセイ (例えばGyurisら, Cell 75: 791 - 803 (1993) に記載されるものなど) で使用して、結合が生じる他のポリペプチドをコードする核酸を同定するか、または結合相互作用の阻害剤を同定することも可能である。これらの結合相互作用に関与するポリペプチドはまた、結合相互作用のペプチドまたは小分子阻害剤またはアゴニストに関して、スクリーニングするのにも使用可能である。

20

#### 【0170】

競合的結合アッセイ。別の種類の適切な結合アッセイは、競合的結合アッセイである。例えば、変異体の生物学的活性は、候補結合パートナーへの結合に関して、変異体が、天然ポリペプチドと競合する能力をアッセイすることによって、決定可能である。競合的結合アッセイは、慣用的方法論によって実行可能である。競合的結合アッセイに使用可能な試薬には、放射標識したLDCA M、およびLDCA M、B7L - 1、B7L - 4、またはCRTAM (内因性または組換え) ポリペプチドを細胞表面に発現する、損なわれていない細胞が含まれる。例えば、実施例に記載するLDCA M - Fc構築物などの放射標識可溶性LDCA M断片を用いて、結合パートナーへの結合に関して、可溶性LDCA M変異体と競合させることも可能である。Fc部分とポリペプチドAまたはポリペプチドG (固相上) の相互作用を通じて固相に結合した、可溶性結合パートナー/Fc融合ポリペプチドが使用可能である。ポリペプチドAおよびポリペプチドGを含有するクロマトグラフィークラムには、Pharmacia Biotech, Inc.、ニュージャージー州ピスカタウェイから入手可能なものが含まれる。

30

40

#### 【0171】

細胞間コミュニケーション、細胞刺激、または免疫細胞活性の調節剤を同定するアッセイ。細胞間コミュニケーション、細胞刺激または免疫細胞活性に対するLDCA Mポリペプチドの影響を操作して、ターゲット細胞におけるこれらの活性を調節することも可能である。例えば、開示するLDCA Mポリペプチド、開示するLDCA Mポリペプチドをコードする核酸、あるいはこうしたポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストを細胞または細胞群に投与して、細胞結合、細胞コミュニケーション、細胞刺激、またはターゲット細胞における活性を誘導するか、増進するか、抑制するか、または停止させることも可能である。この方式で使用可能なLDCA Mポリペプチド、アゴニストまたはアンタゴ

50



ニストの同定は、当業者に知られる多様なアッセイを介して実行可能である。こうしたアッセイに含まれるのは、LDCAMポリペプチドが、細胞結合、細胞間コミュニケーション、細胞刺激または活性に影響を及ぼす能力を評価するものである。こうしたアッセイは、例えば、LDCAMポリペプチドの存在下での免疫細胞相互作用の解析を伴うであろう。こうしたアッセイにおいて、LDCAMポリペプチドの存在下でコミュニケーションまたは細胞刺激の比率を測定し、そして次いで、こうしたコミュニケーションまたは細胞刺激が、候補アゴニストまたはアンタゴニストあるいは別のLDCAMポリペプチドの存在下で改変されるかどうかを決定するであろう。本発明のこの側面の典型的なアッセイには、サイトカイン分泌アッセイ、T細胞同時刺激アッセイ、並びに抗原提示細胞およびT細胞を伴う混合リンパ球反応が含まれる。これらのアッセイは、当業者に周知である。さらなるアッセイを、以下の実施例セクションに示す。

10

#### 【0172】

別の側面において、本発明は、試験化合物が、細胞の細胞結合、細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激活性に影響を及ぼす能力を検出する方法を提供する。この側面において、該方法は：(1) LDCAMポリペプチドまたはその断片を含む試験化合物と第一の群のターゲット細胞を、用いる特定のアッセイに適した条件下で接触させ；(2) ターゲット細胞間の細胞結合、細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激の純率を測定し；そして(3) 試験化合物の非存在下、試験化合物が存在しない以外は、第一の群の細胞と同一の条件下で、LDCAMポリペプチドまたはその断片を含有する対照細胞間の細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激の純率を観察することを含む。この態様において、対照細胞における細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激の純率を、LDCAM分子と試験化合物の両方で処理した細胞のものと比較する。比較によって、細胞結合、細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激のエフェクターが同定可能であるような、細胞結合、細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激の純率の相異が提供されるであろう。試験化合物は、細胞結合、細胞間コミュニケーションまたは細胞刺激を活性化するかまたは上方制御することによって、あるいは阻害するかまたは下方制御することによって、エフェクターとして機能可能であり、そしてこの方法を通じて検出可能である。

20

#### 【0173】

細胞増殖、細胞死、細胞分化、および細胞接着アッセイ。本発明のポリペプチドは、サイトカイン、細胞増殖（誘導または阻害いずれか）、または細胞分化（誘導または阻害いずれか）活性を示すことも可能であり、あるいは特定の細胞集団における他のサイトカイン産生を誘導することも可能である。現在までに発見された多くのポリペプチド因子は、1以上の因子依存性細胞増殖アッセイにおいて、こうした活性を示してきており、そしてしたがって、該アッセイは、細胞刺激活性の好適な確認として役立つ。本発明のポリペプチドの活性は、限定なしに、32D、DA2、DA1G、T10、B9、B9/11、BaF3、MC9/G、M+（プレB M+）、2E8、RB5、DA1、123、T1165、HT2、CTLL2、TF-1、Mo7eおよびCMKを含む細胞株に関するいくつかの日常的な因子依存性細胞増殖アッセイのいずれか1つによって立証される。本発明のLDCAMポリペプチドの活性は、他の手段の中でも、以下の方法によって測定可能である：

30

40

T細胞または胸腺細胞増殖に関するアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience (pp. 3.1-3.19: In vitro assays for mouse lymphocyte function; 第7章: Immunologic studies in humans); Takaiら, J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bertagnoliら, J. Immunol. 145: 1706-1712, 1990; Bertagnoliら, Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Bertagnoliら, J. Immunol. 149: 3778-3783, 1

50

992; Bowmanら, J. Immunol. 152:1756-1761, 1994に記載されるものが含まれる。

【0174】

脾臓細胞、リンパ節細胞または胸腺細胞のサイトカイン産生および/または増殖に関するアッセイには、限定なしに: KruisbeekおよびShevach, 1994, Polyclonal T cell stimulation, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修 Vol. 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, トロント; およびSchreiber, 1994, Measurement of mouse and human interferon gamma, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修 Vol 1 pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, トロントに記載されるものが含まれる。

10

【0175】

造血細胞およびリンパ球新生細胞の増殖および分化に関するアッセイには、限定なしに: Bottomlyら, 1991, Measurement of human and murine interleukin 2 and interleukin 4, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修 Vol 1 pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, トロント; deVriesら, J Exp Med 173:1205-1211, 1991; Moreauら, Nature 336:690-692, 1988; Greenbergerら, Proc Natl Acad Sci. USA 80:2931-2938, 1983; Nordan, 1991, Measurement of mouse and human interleukin 6, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修 Vol 1 pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, トロント; Smithら, Proc Natl Acad Sci USA 83:1857-1861, 1986; Bennettら, 1991, Measurement of human interleukin 11, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修, Vol 1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, トロント; Ciarlettaら, 1991, Measurement of mouse and human Interleukin 9, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修, Vol 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, トロントに記載されるものが含まれる。

20

30

【0176】

抗原に対するT細胞クローン応答に関するアッセイ(とりわけ、増殖およびサイトカイン産生を測定することによる、APC-T細胞相互作用に影響を与えるとともに直接的なT細胞効果に影響を与えるポリペプチドを同定するであろうもの)には、限定なしに: Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(第3章: In vitro assays for mouse lymphocyte function; 第6章: Cytokines and their cellular receptors; 第7章: Immunologic studies in humans); Weinbergerら, Proc Natl Acad Sci USA 77:6091-6095, 1980; Weinbergerら, Eur. J. Immun. 11:405-411, 1981; Takaiら, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takaiら, J. Immunol. 140:508-512, 198

40

50

8に記載されるものが含まれる。

【0177】

胸腺細胞または脾臓細胞細胞傷害性に関するアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第3章, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19;第7章, Immunologic studies in Humans); Herrmannら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmannら, J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handaら, J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takaiら, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takaiら, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Herrmannら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmannら, J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handaら, J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takaiら, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bowmanら, J. Virology 61:1992-1998; Takaiら, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnoliら, Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Brownら, J. Immunol. 153:3079-3092, 1994に記載されるものが含まれる。

【0178】

T細胞依存性免疫グロブリン応答およびアイソタイプスイッチングに関するアッセイ (とりわけ、T細胞依存性抗体応答を調節し、そしてTh1/Th2プロフィールに影響を及ぼすポリペプチドを同定するであろうもの)には、限定なしに：Maliszewski, J. Immunol 144:3028-3033, 1990;並びにMondおよびBrunswick, 1994, Assays for B cell function: in vitro antibody production, Current Protocols in Immunology中, Coliganら監修, Vol 1 pp.3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, トロントに記載されるものが含まれる。

【0179】

混合リンパ球反応(MLR)アッセイ (とりわけ、主にTh1およびCTL応答を生じるポリペプチドを同定するであろうもの)には、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (第3章、In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19;第7章、Immunologic studies in Humans); Takaiら, J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takaiら, J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnoliら, J. Immunol. 149:3778-3783, 1992に記載されるものが含まれる。

【0180】

樹状細胞依存性アッセイ (とりわけ、未刺激(naive)T細胞を活性化する樹状細胞に発現されるポリペプチドを同定するであろうもの)には、限定なしに：Gueryら, J. Immunol 134:536-544, 1995; Inabaら, J. Exp Med 173:549-559, 1991; Macatoniaら, J. Immunol 154:5071-5079, 1995; Porgadorら, 50

J Exp Med 182:255-260, 1995; Nairら, J Vir  
 ology 67:4062-4069, 1993; Huangら, Science  
 264:961-965, 1994; Macatoniaら, J Exp Med  
 169:1255-1264, 1989; Bhardwajら, J Clin I  
 nvest 94:797-807, 1994; および Inabaら, J Exp  
 Med 172:631-640, 1990に記載されるものが含まれる。

【0181】

リンパ球生存ノアポトーシスに関するアッセイ(とりわけ、スーパー抗原誘導後のアポ  
 トーシスを防ぐポリペプチドおよびリンパ球恒常性を制御するポリペプチドを同定するで  
 あるもの)には、限定なしに: Darzynkiewiczら, Cytometry 10  
 13:795-808, 1992; Gorczycaら, Leukemia 7:  
 659-670, 1993; Gorczycaら, Cancer Research  
 53:1945-1951, 1993; Itohら, Cell 66:233-2  
 43, 1991; Zacharchuk, J Immunol 145:4037-  
 4045, 1990; Zamaら, Cytometry 14:891-897,  
 1993; Gorczycaら, International Journal o  
 f Oncology 1:639-648, 1992に記載されるものが含まれる。

【0182】

T細胞拘束および発生の初期段階に影響を与えるポリペプチドに関するアッセイには、  
 限定なしに: Anticaら, Blood 84:1111-1117, 1994; Fi 20  
 neら, Cell Immunol 155:111-122, 1994; Galy  
 ら, Blood 85:2770-2778, 1995; Tokiら, Proc  
 Natl Acad Sci. USA 88:7548-7551, 1991に記載  
 されるものが含まれる。

【0183】

胚性幹細胞分化に関するアッセイ(とりわけ、胚性分化造血に影響を与えるポリペプチ  
 ドを同定するであろうもの)には、限定なしに: Johanssonら Cellular  
 Biology 15:141-151, 1995; Kellerら, Mole  
 cular and Cellular Biology 13:473-486, 1  
 993; McClanahanら, Blood 81:2903-2915, 199 30  
 3に記載されるものが含まれる。

【0184】

幹細胞生存および分化に関するアッセイ(とりわけ、リンパ造血を制御するポリペプチ  
 ドを同定するであろうもの)には、限定なしに: Methylcellulose co  
 lony forming assays, Freshney, 1994, Cul  
 ture of Hematopoietic Cells中, Freshneyら監  
 修 pp.265-268, Wiley-Liss, Inc., ニューヨーク州ニ  
 ューヨーク; Hirayamaら, Proc. Natl. Acad. Sci.  
 USA 89:5907-5911, 1992; Primitive hematop  
 oietic colony forming cells with high pr 40  
 oliferative potential, McNieceおよび Briddel  
 l, 1994, Culture of Hematopoietic Cells中  
 , Freshneyら監修 pp.23-39, Wiley-Liss, Inc.  
 , ニューヨーク州ニュー YORK; Nebenら, Experimental Hem  
 atology 22:353-359, 1994; Ploemacher, 199  
 4, Cobblestone area forming cell assay,  
 Culture of Hematopoietic Cells中, Freshne  
 yら監修 pp.1-21, Wiley-Liss, Inc., ニューヨーク州ニ  
 ュー YORK; Spooncerら, 1994, Long term bone ma  
 rrow cultures in the presence of stromal 50

cells, Culture of Hematopoietic Cells 中, Freshneyら監修 pp.163-179, Wiley-Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨーク; Sutherland, 1994, Long term culture initiating cell assay, Culture of Hematopoietic Cells 中, Freshneyら監修 Vol pp.139-162, Wiley-Liss, Inc., ニューヨーク州ニューヨークに記載されるものが含まれる。

## 【0185】

組織生成活性に関するアッセイには、限定なしに：国際特許公報第WO95/16035号（骨、軟骨、腱）；国際特許公報第WO95/05846号（神経、ニューロン性）；国際特許公報第WO91/07491号（皮膚、内皮）に記載されるものが含まれる。10  
創傷治癒活性に関するアッセイには、限定なしに：EaglstainおよびMertz, J. Invest. Dermatol 71:382-84(1978)に修飾されるような、Winter, Epidermal Wound Healing, pp.71-112(MaibachおよびRovee監修), Year Book Medical Publishers, Inc., シカゴに記載されるものが含まれる。

## 【0186】

アクチビン/インヒピン活性に関するアッセイには、限定なしに：Valeら, Endocrinology 91:562-572, 1972; Lingら, Nature 321:779-782, 1986; Valeら, Nature 321:776-779, 1986; Masonら, Nature 318:659-663, 1985; Forageら, Proc. Natl. Acad. Sci. US A 83:3091-3095, 1986に記載されるものが含まれる。20

## 【0187】

細胞運動および接着に関するアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(第6.12章, Measurement of alpha and beta chemokines 6.12.1-6.12.28); Taubら J. Clin. Invest. 95:1370-1376, 1995; Lindら APMIS 103:140-146, 1995; Mullerら Eur. J. Immunol. 25:1744-1748; Gruberら J Immunol. 152:5860-5867, 1994; Johnstonら J Immunol. 153:1762-1768, 1994に記載されるものが含まれる。30

## 【0188】

止血活性および血栓溶解活性に関するアッセイには、限定なしに：Linnettら, J. Clin. Pharmacol. 26:131-140, 1986; Burdickら, Thrombosis Res. 45:413-419, 1987; Humphreyら, Fibrinolysis 5:71-79(1991); Schaub, Prostaglandins 35:467-474, 1988に記載されるものが含まれる。40

## 【0189】

受容体-リガンド活性に関するアッセイには、限定なしに：Current Protocols in Immunology, Coliganら監修, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience(第7.28章, Measurement of cellular adhesion under static conditions 7.28.1-7.28.22), Takaiら, Proc. Natl. Acad. Sci. US A 84:6864-6868, 1987; Biererら, J. Exp. Me 50

d. 168:1145-1156, 1988; Rosensteinら, J. Exp. Med. 169:149-160 1989; Stoltenborgら, J. Immunol. Methods 175:59-68, 1994; Stittら, Cell 80:661-670, 1995に記載されるものが含まれる。

【0190】

カドヘリン接着および浸潤抑制因子活性に関するアッセイには、限定なしに：Hortschら J Biol Chem 270(32):18809-18817, 1995; Miyakiら Oncogene 11:2547-2552, 1995; Ozawaら Cell 63:1033-1038, 1990に記載されるものが含まれる。

【0191】

6. LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストの診断用および他の使用

本発明が提供するLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストをコードする核酸は、多くの診断または他の有用な目的に使用可能である。本発明の核酸は、解析、性質決定または療法使用のために組換えポリペプチドを発現するため；対応するポリペプチドを（恒常的に、または組織分化もしくは発生の特定の時期に、または疾患状態において）優先的に発現する組織のマーカースとして；サザンゲル上の分子量マーカースとして；染色体を同定するかまたは関連遺伝子位をマッピングするための染色体マーカースまたはタグとして（標識した場合）；潜在的な遺伝子障害を同定するために患者における内因性DNA配列と比較するため；ハイブリダイズしそしてしたがって新規関連DNA配列を発見するためのプローブとして；遺伝子フィンガープリンティングのためのPCRプライマーを得るための情報供給源として；他の新規核酸を発見するプロセスにおいて、既知の配列を「取り去る（subtract-out）」ためのプローブとして；発現パターンの検査用のものを含む、「遺伝子チップ」または他の支持体に付着するオリゴマーを選択し、そして作成するため；DNA免疫技術を用いて、抗ポリペプチド抗体を作成するため；抗DNA抗体を作成するかまたは別の免疫応答を誘発するための抗原として、そして遺伝子治療のために使用可能である。LDCAMポリペプチドおよび断片化ポリペプチドの使用には、限定されるわけではないが、以下が含まれる：ポリペプチドを精製し、そしてその活性を測定すること；搬送剤；療法試薬および研究用試薬；分子量マーカースおよび等電点電気泳動マーカース；ペプチド断片化用の対照；未知のポリペプチドの同定；並びに抗体の調製。これらの使用に適したいずれかの核酸またはすべての核酸を、製品として商品化するため、試薬等級またはキット形式に発展させることが可能である。上に列挙する使用を実行する方法は、当業者に周知である。こうした方法を開示する参考文献には、限定なしに、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”，第2版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Sambrook, J., E.F. FritschおよびT. Maniatis監修，1989、および“Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques”，Academic Press, Berger, S.L.およびA.R. Kimmel監修，1987が含まれる。

【0192】

プローブおよびプライマー。開示するLDCAM核酸、およびその断片の組み合わせの使用の中に、プローブまたはプライマーとしての断片の使用がある。こうした断片は、一般的に、DNA配列の少なくとも約17の隣接ヌクレオチドを含む。他の態様において、DNA断片は、DNA配列の少なくとも30、または少なくとも60の隣接ヌクレオチドを含む。ハイブリダイゼーション条件の選択に影響を与える基本的なパラメーターおよび適切な条件を考案するための手引きは、Sambrookら、1989に示され、そして上に詳細に記載されている。遺伝暗号の知識を、上に示すアミノ酸配列と組み合わせる用いて、縮重オリゴヌクレオチドの組を調製することも可能である。こうしたオリゴヌクレオチドは、例えばDNA断片を単離し、そして増幅するポリメラーゼ連鎖反応（PCR）

10

20

30

40

50

において、プライマーとして有用である。特定の態様において、非ヒト遺伝子ライブラリー用のプローブとして、縮重プライマーを使用することも可能である。こうしたライブラリーには、限定されるわけではないが、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリー、およびエレクトロニックEST（発現配列タグ）またはDNAライブラリーさえ含まれるであろう。次いで、この方法で同定された相同配列をプローブとして用いて、非ヒトLDCAM相同体を同定するであろう。

【0193】

染色体マッピング。当業者は、LDCAMポリペプチドをコードする核酸、並びにこれらの核酸の開示する断片および組み合わせを用い、周知の技術を用いて、これらの核酸がマッピングするヒト染色体を同定することも可能である。有用な技術には、限定されるわけではないが、放射ハイブリッドマッピング（高解像度）、染色体伸展（spread）に対するin situハイブリダイゼーション（中程度の解像度）、および個々のヒト染色体を含有するハイブリッド細胞株に対するサザンプロットハイブリダイゼーション（低解像度）などの多様な周知の技術におけるプローブとして、オリゴヌクレオチドを含む配列または部分を使用することが含まれる。例えば、放射ハイブリダイゼーションによって、染色体をマッピングすることも可能である。93の放射ハイブリッドのWhitehead Institute/MIT Center for Genome Research Genebridge 4パネルを用い、目的の遺伝子の推定上のエクソン内にあり、そしてヒトゲノムDNAから産物を増幅するが、ハムスターゲノムDNAを増幅しないプライマーを用いて、PCRを行う。PCRの結果をデータベクトルに変換し、これをWhitehead/MIT放射マッピングサイト（www-seq.wi.mit.edu）に提出する。該データはスコア化され、そして放射ハイブリッドマップ上の既知の配列タグ部位（STS）マーカーに比した染色体割り当ておよび配置が提供される。あるいは、GenBank非冗長データベース（ncbi.nlm.nih.gov/BLAST）、Locuslink（ncbi.nlm.nih.gov:80/LocusLink/）、Unigene（ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/UniGene）、AceView（ncbi.nlm.nih.gov/AceView）、Online Mendelian Inheritance in Man（OMIM）（ncbi.nlm.nih.gov/Omim）、Gene Map Viewer（ncbi.nlm.nih.gov/genemap）、および、Celera Discovery System（celera.com）などの私有（proprietary）データベース、などの、公共データベースおよび私有データベース中の配列に比較することによって、LDCAMポリペプチドをコードする核酸に対応するゲノム配列をマッピングする。利用可能なゲノム配列情報のこれらのコンピュータ解析は、LDCAMポリペプチドをコードする配列に対応するゲノム配列の特定の染色体位置の同定、並びにLDCAMゲノム配列および既知のヒト遺伝子障害の遺伝子マップ位置の間のユニークな遺伝子マッピング関係を提供することも可能である。

【0194】

診断法および遺伝子治療。当業者は、LDCAMポリペプチドをコードする核酸、および開示する断片、並びにこれらの核酸の組み合わせを用い、周知の技術を用いて、これらのポリペプチドに対応する遺伝子と関連する異常を解析することも可能である。これによって、このマーカーが再編成されているかまたは欠失している状態を識別することが可能になる。さらに本発明の核酸またはその断片を位置マーカーとして用いて、未知の位置の他の遺伝子をマッピングすることも可能である。本発明の核酸に対応する遺伝子の不全または不十分な量によって（直接または間接的に）仲介されるいかなる障害に対する治療を開発するのにも、該DNAが使用可能である。天然ヌクレオチド配列の本明細書の開示によって、不全遺伝子の検出、および正常遺伝子でのその交換が可能になる。不全遺伝子は、in vitro診断アッセイにおいて、そして本明細書に開示する天然ヌクレオチド配列と、この遺伝子に不全を宿すると推測されるヒト由来の遺伝子のものとを比較することによって、検出可能である。

10

20

30

40

50

## 【0195】

キャリアーおよび搬送剤。LDCAMポリペプチド(断片、変異体、融合タンパク質、誘導体、オリゴマー等)、アンタゴニストおよびアゴニスト(本明細書に記載するすべての種類の抗体を含む)とともにペプチボディ等はまた、剤を細胞に搬送するための輸送体としての使用も見出す。LDCAMポリペプチド(断片、変異体、融合タンパク質、誘導体、オリゴマー等)、アンタゴニストおよびアゴニスト(本明細書に記載するすべての種類の抗体を含む)とともにペプチボディ等は、*in vitro*法または*in vivo*法において、診断用剤または療法剤をこうした細胞に搬送するのに使用可能である。ポリペプチドに付着可能な検出可能(診断用)剤および療法剤には、限定されるわけではないが、毒素、他の細胞傷害性剤、薬剤、放射性核種、発色団、比色反応または蛍光定量反応を触媒する酵素等が、意図する適用にしたがって選択される特定の剤とともに含まれる。毒素の中には、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素A、リボソーム不活性化ポリペプチド、トリコセセンなどのマイコトキシン、並びにそれらの誘導体および断片(例えば一本鎖)がある。診断使用に適した放射性核種には、限定されるわけではないが、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、および $^{76}\text{Br}$ が含まれる。療法使用に適した放射性核種の例は、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、および $^{67}\text{Cu}$ である。こうした剤は、いかなる適切な慣用法によって、ポリペプチドに付着させることも可能である。ポリペプチドは、例えば、所望の剤上の官能基と反応して、共有結合を形成することも可能である、アミノ酸側鎖上の官能基を含む。あるいは、ポリペプチドまたは剤を誘導体化して、所望の反応性官能基を生成するか、または付着させることも可能である。誘導体化には、多様な分子をポリペプチドに付着させるのに利用可能である、二官能性カップリング試薬(Pierce Chemical Company、イリノイ州ロックフォード)の1つの付着を伴うことも可能である。ポリペプチドを放射標識するいくつかの技術が知られる。例えば適切な二官能性キレート剤を用いることによって、放射性核種金属をポリペプチドに付着させることも可能である。こうしてポリペプチドおよび適切な診断用剤または療法剤を含むコンジュゲート(好ましくは共有結合したものを)を調製する。該コンジュゲートを、特定の適用に適した量で投与するか、または別の方式で使用する。

10

20

## 【0196】

7. LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストの療法適用

上に定義され、そして限定されるわけではないがLDCAMポリペプチド(それとともにその変異体、断片、融合タンパク質、誘導体、ミモトープ等)、抗LDCAM抗体、抗LDCAMペプチボディ、CRTAMポリペプチド(それとともにその変異体、断片、融合タンパク質、誘導体、ミモトープ等)、抗CRTAM抗体および抗CRTAMペプチボディを含む、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストは、医学的状態および疾患を治療するのに有用である可能性がある。したがって本明細書全体で、「LDCAMアンタゴニストまたはアゴニスト」は、LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストの定義に記載する多様な態様のすべてを指す。

30

## 【0197】

一般的に、これらの疾患には、限定されるわけではないが、自己免疫疾患、炎症、癌、感染性疾患とともに、以下により詳細に記載するような他の状態が含まれる。使用する単数または複数の療法分子は、治療しようとする状態の病因および関与する生物学的経路に応じるであろう。例えば、LDCAM/CRTAMまたはLDCAM/LDCAM相互作用のアンタゴニストまたはアゴニストを、自己免疫疾患、炎症、癌、感染性疾患などに影響を及ぼす、細胞結合、細胞内シグナル伝達、細胞活性化、サイトカイン産生を伴う状態の治療のために選択することも可能である。より具体的には、LDCAMアゴニストは、実施例に記載するように、T細胞増殖、並びに限定されるわけではないがインターフェロン-ガンマおよびIL-2などの炎症誘発性サイトカインの放出などの炎症プロセスを「冷却する」であろう。LDCAMアゴニストは、自己免疫疾患、接触過敏症、多発性硬化症、移植片拒絶等の治療に使用可能である。LDCAMアンタゴニストは、LDCAMお

40

50



よび CRTAM の結合に干渉することによって、免疫応答を増進するであろう。したがって、LDCAM アンタゴニストは、免疫応答増進を要する疾患および状態の治療に有用であり、そして特に、限定されるわけではないが、癌、感染（ウイルス性または細菌性）、およびいくつかの移植設定におけるものなどの T 細胞応答不全に特徴付けられる疾患に有用であろう。

#### 【0198】

限定されるわけではないが、抗原に連結させた 1F12 抗体を用いて BDC A3 + DC をターゲティングして、そしてそれによって DC 集団に抗原を特異的に搬送し、その抗原に対する免疫寛容を与えることも可能であるなど、BDC A3 + DC の機能を調節して免疫応答の結果に影響を及ぼすことを含む多様な療法設定で、BDC A3 + DC に対する抗体を用いることも可能である。あるいは、炎症誘発性サイトカイン、ケモカイン等の炎症シグナルの存在下で、ターゲティングされた抗原は、その抗原に対する抗原特異的免疫応答を高めるであろう。正常組織および病的組織における、比較または相対的 BDC A3 + DC 定量化など、予後目的のため、1F12 抗体および他の抗 LDCAM 抗体を用いることも可能である。1F12 抗体および他の抗 LDCAM 抗体を用いて、多様な体液、臓器および組織から BDC A3 + DC を精製するかまたは単離することも可能である。1F12 抗体および他の抗 LDCAM 抗体を用いて、*in vivo* で BDC A3 + DC を枯渇させるか、または限定されるわけではないが、T 細胞プライミング、DC ホーミング、CD8 + T 細胞への抗原の交差提示などの免疫学的機能に干渉することも可能である。抗原の交差提示および抗原への交差寛容は、多くの自己免疫疾患、移植および癌に重要な細胞機構であるため、1F12 抗体および他の抗 LDCAM 抗体を用いて、BDC A3 + DC を通じた免疫応答を適宜調節することによって、これらの障害を治療することも可能である。

#### 【0199】

さらに、1F12 抗体および他の抗 LDCAM 抗体を *ex vivo* 細胞療法に用いることも可能である。1F12 抗体および他の抗 LDCAM 抗体を用いて、BDC A3 + DC を単離し、そして *ex vivo* で操作し、そして患者に再導入して疾患を治療することも可能である。例示目的のみとして、単離 BDC A3 + DC を癌抗原（限定されるわけではないが、表 2 に提示されるようなもの、上記）に曝露して、そして BDC A3 + DC / プロセシングされた癌抗原を患者に注入しなすことによって、癌に対する免疫寛容を断つことも可能である。別の態様において、癌抗原は患者由来であることも可能であるし、そして癌細胞の形であることも可能である。BDC A3 + DC が、アポトーシス細胞を貪食し、そして癌特異的 CTL エフェクターを生成するため、この外因性抗原を CD8 + T 細胞に提示することも可能である。したがって、患者から取り除いた癌細胞または腫瘍を、放射線照射または化学薬品 / 薬剤などのアポトーシス誘導性刺激に曝露して、そして患者から単離した BDC A3 + DC に曝露することも可能である。BDC A3 + DC は、アポトーシス癌細胞を貪食し、そしてクラス II MHC の背景で、癌抗原を提示するであろう。これらの DC が患者に再注入されて、そして患者自身の癌抗原に対して、CTL エフェクター応答をプライミングするであろう。CTL エフェクターは、患者癌抗原を発現する細胞のみを溶解するであろう。この *ex vivo* 療法の型を、限定されるわけではないが、手術、放射線照射および / または化学療法などの、他の慣用的療法と併用することも可能である。

#### 【0200】

実施例 19 は、CRTAM が LDCAM の同族体または結合パートナーであるという発見を記載する。LDCAM は、樹状細胞上、および特に新規に発見された BDC A3 + 樹状細胞上で発現され、この細胞は、上述のユニークな免疫学的特性を有するようである。CRTAM は、活性化 T 細胞上で発現される（示差発現実験によって決定されるような発現増加を示す、図 17 を参照されたい）。CD4 + および CD8 + T 細胞はどちらも CRTAM を発現し、そして活性化 CD8 + T 細胞上では、特に高いレベルで発現される。したがって、LDCAM および CRTAM 間の相互作用は、抗原提示細胞およびリンパ

10

20

30

40

50

系エフェクター細胞間（BDC A3 + DCを含む樹状細胞、およびCD8 + T細胞などのクラスI拘束T細胞を含むT細胞間など）の免疫学的シナプスの形成に關与する可能性もある。理論に束縛されることなく、抗原提示細胞およびT細胞間のLDCAM / CRTAM相互作用が殺傷の負の制御因子である可能性もある。実施例に示すように、LDCAM / CRTAM相互作用は、抗CD3刺激および多様なマイトジェンを含む、多様なT細胞活性化刺激の存在下で、T細胞の活性化を防止した。LDCAM / CRTAM間の相互作用が、抗原提示細胞がT細胞を抗原に結合させ、そしてプライミングする方法であることも可能である。これによって、DCで起こることが知られる、抗原提示細胞による多数の結合が可能になるであろう。

#### 【0201】

さらに、CRTAMが活性化NK細胞およびNK-T細胞上で発現され、そしてこれらの細胞が糖尿病の免疫病理に關与していることが報告されている（Kennedyら、J Leuk Bio 67 (2000)）。活性化NK細胞上で、CRTAMが高発現されていることを示す示差発現実験によって、このデータを確かめた（図17）。したがって、LDCAMおよびCRTAM間の相互作用は、抗原提示細胞およびNK-T細胞間の免疫学的シナプスの形成に關与しうる。したがって、本発明のLDCAMアンタゴニストを用いて、糖尿病疾患症状を引き起こす、抗原提示細胞（DCなど）およびNK細胞および/またはNK-T細胞間の相互作用を阻害するかまたは遮断することも可能である。

#### 【0202】

さらに、LDCAMは、神経組織、特に脳で発現されることが示されている（Biedererら、Science 297, 1525 (2002)）。したがって、ニューロン上のLDCAMおよびT細胞上のCRTAM間の相互作用は、神経系および免疫系間の免疫学的シナプスの形成に關与しうる。したがって、本発明のLDCAMアンタゴニストを用いて、CRTAMを発現する免疫細胞（T細胞など）およびLDCAMを発現するニューロン間の相互作用を阻害するかまたは遮断し、そしてこうしてこの相互作用から生じる疾患を防止するかまたは治療することも可能である。例には、多発性硬化症および以下に列挙する神経系の他の疾患が含まれる。CRTAMが活性多発性硬化症（MS）病巣で発現されることが、示差発現実験によって決定された（図17）。これによって、LDCAMアゴニストが、活性化T細胞の炎症誘発反応を減少させ、そして特に、活性化T細胞からのインターフェロン-ガンマの放出を防止するかまたは減少させることを予測する、しっかりした基礎が提供される。活性MS病巣において、そして再発を経験している患者の循環レベルにおいて、インターフェロン-ガンマが増加し、そしてインターフェロン-ガンマのレベル増加が、症状悪化およびミエリン破壊と相関することが、当該技術分野には周知である。したがって、LDCAMアゴニストは、T細胞がインターフェロン-ガンマなどの炎症誘発性サイトカインを放出するのを遮断することによって、白質の自己免疫様破壊を防止するかまたは減少させるであろう。

#### 【0203】

さらなる態様において、LDCAMアンタゴニストを用いて、限定されるわけではないが：白血病、エプスタイン-バーウイルス陽性鼻咽頭癌、結腸癌、胃癌、前立腺癌、腎細胞癌、子宮頸癌および卵巣癌、肺癌、哺乳動物肉腫および癌腫、例えば線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜性腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、線癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髓様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞種、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上皮細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髓膜腫、黒色腫、神経芽細胞種、網膜芽腫；急性リンパ球性白血病および急性骨髄性白血病（骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、および赤白血病）などの白血病；慢性白血病（慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ球性白血病）；および真性赤血球増加症、リンパ腫（ホ

10

20

30

40

50

ジキン病および非ホジキン病)、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症、および重鎖病などの癌の被験者を治療することも可能である。多様なリンパ増殖性障害もまた、治療可能であり、これらの障害には、自己免疫リンパ増殖症候群(ALPS)、慢性リンパ芽球白血病、毛様細胞白血病、慢性リンパ性白血病、末梢T細胞リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、外套細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、バーキットリンパ腫、エプスタイン-バーウイルス陽性T細胞リンパ腫、組織球性リンパ腫、ホジキン病、びまん性侵襲性リンパ腫、急性リンパ性白血病、Tガンマリンパ増殖性疾患、皮膚B細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫(すなわち菌状息肉症)およびセザリー症候群が含まれる。

#### 【0204】

LDCAMアンタゴニストはまた、当該技術分野に知られる他の認識される治療と併用可能である。例えば、癌の治療において、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストは、手術、化学療法、放射療法、養子免疫療法等と併用可能である。根底にある1つの論理的説明は、腫瘍塊が最小限であり、そして/または腫瘍細胞が手術中および手術後に循環内に抜け出し、そしてLDCAMアンタゴニストを通じた免疫療法が、この状況でより有効でありうることである。特定の態様において、本発明の防御的有用性および療法的有用性は、手術前、手術時、または手術後いずれかに癌被験者の免疫適格性を増進し、そして癌細胞に対する腫瘍特異的免疫を誘導することに向けられ、この目的は癌を阻害することであり、そして最終的な臨床上的目的は癌の退化および/または根絶である。

#### 【0205】

腫瘍性疾患の進行に対するLDCAMアンタゴニストの効果は、限定されるわけではないが：a)細胞性免疫の評価としての過敏性の遅延；b) *in vitro*での細胞溶解性Tリンパ球の活性；c)腫瘍特異的抗原のレベル；d)コンピュータ断層撮影(CT)スキャンなどの技術を用いた、腫瘍形態の変化；e)高リスクの個体における特定の癌のリスクの推定上のバイオマーカーレベルの変化、およびf)腫瘍形態の変化を測定することを含む、当業者に知られる方法いずれかによって監視可能である。あるいは、CTLアッセイ、増殖アッセイ、抗体捕捉アッセイ等の標準的技術を用いて、目的の抗原に対する免疫応答を測定することも可能である。

#### 【0206】

別の態様において、上述の抗原1以上で感作した抗原提示細胞(APC)を用いた養子免疫療法と、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを併用可能である。養子免疫療法は、感染性疾患または癌を治療する療法的アプローチを指し、ここで、免疫細胞が、直接または間接的に、感染細胞または腫瘍細胞および/または抗原性構成要素に対する特異的免疫を仲介し、そして感染性疾患の治療または腫瘍の退化を生じることが目的として、免疫細胞を宿主に投与する。1つの態様において、抗原感作APCを、ワクチン投与前、投与と同時に、または投与後に投与することも可能である。さらに、養子免疫療法の投与様式は、限定されるわけではないが、例えば皮下投与、静脈内投与、腹腔内投与、筋内投与、皮内投与または粘膜投与を含めて、多様であることも可能である。

#### 【0207】

LDCAMアゴニストを用いて、心臓血管疾患を治療することも可能である。本発明の態様には、心臓血管疾患を有する被験者において、心臓血管疾患を治療する方法であって、1以上のLDCAMアゴニストの有効量を単独でまたは併用いずれかで投与することを含む、前記方法が含まれる。

#### 【0208】

心臓血管疾患には、心臓および血管系とともに心臓および血管系の疾患状態によって損なわれる(*compromised*)臓器および系の病態生理を有する疾患状態が含まれる。限定されるわけではないが、例には：心臓および/または血管系の炎症、例えば心筋炎、慢性自己免疫心筋炎、細菌性およびウイルス性心筋炎とともに感染性心内膜炎；心不全；うっ血性心不全；慢性心不全；心不全の悪液質；非虚血性心筋症(拡張型心筋症；特発性拡張型心筋症；心原性ショック、体外循環サポートから派生する心不全(「ポンプ後症候群」)、虚血/再灌流傷害後の心不全、脳死関連心不全(Owenら, 1999(

10

20

30

40

50

Circulation. 1999 May 18; 99(19): 2565-70) に記載されるようなもの)；肥厚性心筋症；拘束型心筋症；非虚血性全身性高血圧；心臓弁膜症；催不整脈右室心筋症)および虚血性心筋症(アテローム発生；アテローム性動脈硬化症；動脈硬化症；末梢血管疾患；冠状動脈疾患；脳卒中、一過性虚血性発作および心筋梗塞を含む梗塞)を含む心筋症が含まれる。心臓血管疾患の定義に含まれる、さらなる疾患状態には：動脈瘤；動脈炎；アングナ；塞栓症；血小板関連虚血障害；虚血/再灌流傷害；再狭窄；僧帽弁および/または三尖弁逆流；僧帽弁再狭窄；無症状心筋虚血；レイノー現象；血栓症；深部静脈血栓症；肺塞栓症；血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)および溶血性尿毒症症候群(HUS)を含む血栓性微小血管障害、特発性血小板血症、播種性血管内凝固(DIC)、並びに異質の(foreign)または損傷組織表面への曝露に関連する血栓症および凝血異常、血栓性静脈炎；川崎血管炎を含む血管炎；高安動脈炎；静脈閉塞症、巨細胞動脈炎、ヴェゲナー肉芽腫症；シェーンライン・ヘノッホ紫斑病とともに細菌などの1以上の口腔病原体による歯周感染から生じる心臓血管疾患が含まれる。

10

#### 【0209】

1以上のLDCAマゴニストの療法使用のさらなる例には、血管形成術、頸動脈血管内膜切除術、血管移植片の吻合術、および留置カテーテルまたはシャントなどの長期心臓血管装置と併用した、肺虚血、冠状動脈虚血、および脳虚血を含む、血小板関連虚血障害後の冠状動脈疾患または傷害を患う個体の治療、そして血栓症、冠状動脈血栓症、脳動脈血栓症、心臓内血栓症、末梢動脈血栓症を含む血栓性障害；静脈血栓症、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)および溶血性尿毒症症候群(HUS)を含む血栓性微小血管障害、特発性血小板血症、播種性血管内凝固(DIC)、並びに異質のまたは損傷組織表面への曝露に関連する血栓症および凝血異常後の再開塞の防止が含まれる。

20

#### 【0210】

さらなる適応症には、血管形成術(すなわちバルーン血管形成術、レーザー血管形成術、冠状動脈アテローム切除術および類似の技術)、頸動脈、冠状動脈、末梢動脈または他の血管内ステントなどの血管内補てつ装置、透析アクセス器具の配置、または末梢血管疾患を治療する処置を受けるかまたは受けるであろう被験者；血栓形成のリスクが高い手術(すなわち冠状動脈バイパス術、補てつバルブまたは管の挿入等)を受ける個体が含まれる。

30

#### 【0211】

いくつかの肺障害もまた、LDCAマゴニストで治療可能である。こうした状態の1つは、TNF上昇に関連する成人呼吸困難症候群(ARDS)であり、そしてこれは毒性化学薬品、肺炎、外傷または他の原因への曝露を含む、多様な原因によって誘発される。本発明が開示する化合物、組成物および併用療法はまた、気管支肺異常形成(BPD)；リンパ管平滑筋腫症；および早産児の慢性線維性肺疾患の治療にも有用である。さらに、本発明の化合物、組成物および併用療法を用いて、石綿沈着症、炭坑作業員塵肺症、ケイ粉症または微細粒子への長期間の曝露に関連する類似の状態を治療する。本発明の他の側面において、LDCAマゴニストおよび併用療法を用いて、慢性気管支炎または気腫に関連する慢性閉塞性肺疾患(COPD)；嚢胞性線維症、特発性肺線維症および放射線誘導性肺線維症などの線維性肺疾患；肺サルコイドーシスを含む肺障害；並びにアレルギー性鼻炎、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎および喘息を含むアレルギーを治療する。

40

#### 【0212】

他の態様は、LDCAマゴニストまたは併用療法を用いて、多様なリウマチ性障害を治療する方法を提供する。これらには：成人および若年性関節リウマチ；全身性エリテマトーデス；通風；骨関節症；多発性筋痛；強直性脊椎炎を含む血清陰性脊椎関節症；およびライター病が含まれる。また、本発明のLDCAマゴニストおよび併用療法を用いて、乾癬性関節炎および慢性ライム関節炎を治療する。これらのLDCAマゴニストおよびアゴニスト、並びに併用療法でやはり治療可能であるのは、スティル病および関節リウマチに関連するブドウ膜炎である。さらに、皮膚筋炎および多発性筋炎を含む、随意

50

筋の炎症を生じる障害を治療する際に、本発明のLDCAMアゴニストおよび併用療法を用いる。さらに、本明細書に開示するLDCAMアゴニストおよび併用は、散発性封入体筋炎を治療するのに有用であり、これはこの筋疾患の進行に、TNFが重要な役割を果たしうるためである。さらに、関節破壊、並びに顔および手の丘疹状小結節が、多核巨細胞による炎症誘発性サイトカインの過剰産生に関連する、多中心性網内系組織球症を治療するのに、本明細書に開示するLDCAMアンタゴニストおよびアゴニスト、並びに併用を用いる。

#### 【0213】

移植に関連する障害、例えば移植片対宿主病、および心臓、肝臓、肺、皮膚、腎臓または他の臓器の移植を含む固形臓器移植から生じる合併症もまた、開示するLDCAMアンタゴニストまたは併用療法で治療可能である。LDCAMアンタゴニストを投与して、例えば肺移植後の閉塞性細気管支炎の発展を防止するかまたは阻害することも可能である。

10

#### 【0214】

開示するLDCAMアゴニストおよび併用療法で治療可能な多様な他の医学的障害には：多発性硬化症；ベーチェット症候群；シェーグレン症候群；自己免疫溶血性貧血；ベータ・サラセミア；筋萎縮性側索硬化症（ルー・ゲーリック病）；パーキンソン病；および未知の原因の腱鞘炎とともに、遺伝的欠損と関連する多様な自己免疫障害または疾患が含まれる。

#### 【0215】

レトロウイルス科（例えばヒト免疫不全ウイルス、例えばHIV-1（HTLV-II I、LAVまたはHTLV-II I/LAV、またはHIV-II Iとも称される；および他の単離体、例えばHIV-LP））；ピコルナウイルス科（例えばポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒト・コクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カリチウイルス科（Calciviridae）（例えば胃腸炎を引き起こす株）；トガウイルス科（例えばウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビウイルス科（例えばデング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス科（例えばコロナウイルス）；ラブドウイルス科（例えば水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（例えばエボラウイルス）；パラミクソウイルス科（例えばパラインフルエンザウイルス、おたふく風邪ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス）；オルトミクソウイルス科（例えばインフルエンザウイルス）；ブニヤウイルス科（例えばハンタンウイルス、ブンガウイルス（bungavirus）、フレボウイルスおよびナイロウイルス（Nairovirus））；アレナウイルス科（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（例えばレオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス）；ビルナウイルス科；ヘパドナウイルス科（B型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（パルボウイルス）；パポバウイルス科（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；アデノウイルス科（大部分のアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科（単純疱疹ウイルス（HSV）1および2、水痘・帯状ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）、ヘルペスウイルス類）；ポックスウイルス科（痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；およびイリドウイルス科（例えばアフリカ・ブタ熱ウイルス）；並びに未分類のウイルス（例えば海綿状脳症の病因学的作用因子、デルタ肝炎の病原体（B型肝炎ウイルスの不全付随体と考えられる）、非A非B肝炎の病原体（クラス1 = 体内感染；クラス2 = 非経口感染（すなわちC型肝炎））；ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、並びにアストロウイルス（astrovirus））による感染を含む、ウイルス感染の治療および/または防止に、LDCAMアンタゴニストを使用可能である。

20

30

40

#### 【0216】

ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）、ライム病ボレリア（*Borelia burgdorferi*）、レジオネラ・ニューモフィラ（*Legionella pneumophila*）、マイコバクテリウム属（*Mycobacteria*）種（例えばヒト型結核菌（*M. tuberculosis*）、鳥型結核菌（*M. avium*）、*M. イントラセルラレ*（*M. intracellular*

50

e)、M.カンサイ(M. kansaii)、M.ゴルドネ(M. gordonae)、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、淋菌(Neisseria gonorrhoeae)、髄膜炎菌(Neisseria meningitidis)、単球症リステリア(Listeria monocytogenes)、化膿連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)(A群連鎖球菌)、ストレプトコッカス・アガラクティエ(Streptococcus agalactiae)(B群連鎖球菌)、連鎖球菌属(Streptococcus)(ビリダンス群)、糞便連鎖球菌(Streptococcus faecalis)、ウシ連鎖球菌(Streptococcus bovis)、連鎖球菌属(嫌気性種)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)、病原性カンピロバクター属(Campylobacter)種、腸球菌属(Enterococcus)種、インフルエンザ菌(Haemophilus influenzae)、炭疽菌(Bacillus anthracis)、ジフテリア菌(Corynebacterium diphtheriae)、コリネバクテリウム種、ブタ丹毒菌(Erysipelothrix rhusiopathiae)、ウエルシュ菌(Clostridium perfringens)、破傷風菌(Clostridium tetani)、エンテロバクター・アエロゲネス(Enterobacter aerogenes)、肺炎桿菌(Klebsiella pneumoniae)、パストレラ・マルトシダ(Pasturella multocida)、バクテロイデス属(Bacteroides)種、フソバクテリウム・ヌクレアツム(Fusobacterium nucleatum)、ストレプトバチルス・モニリフォルミス(Streptobacillus moniliformis)、梅毒トレポネーマ(Treponema pallidum)、フランベジア・トレポネーマ(Treponema pertenuis)、レプトスピラ属(Leptospira)、およびイスラエル放線菌(Actinomyces israelii)による感染を含む、細菌による感染の治療および/または防止に、LDCAMアンタゴニストを使用可能である。

#### 【0217】

別の態様において、住血吸虫類；トリパノソーマ類；リーシュマニア属(Leishmania)種；フィラリア性線形動物；トリコモナス症；肉胞子虫症；無鉤条虫(Taenia saginata)、有鉤条虫(Taenia solium)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ(Cryptococcus neoformans)、煙色コウジ菌(Aspergillus fumigatus)、ヒストプラズマ・カプスラツム(Histoplasma capsulatum)、コクシジオイデス・イミチス(Coccidioides immitis)、旋毛虫症、皮膚ブラストミセス(Blastomyces dermatitidis)、トラコーマ・クラミジア(Chlamydia trachomatis)、鷲口瘡カンジダ(Candida albicans)、熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)、三日熱マラリア原虫(Plasmodium vivax)、四日熱マラリア原虫(Plasmodium malariae)、およびトキソプラズマ(Toxoplasma gondii)等による感染を含む、感染性単細胞生物に対して、被験者を治療するかまたは免疫するのに、LDCAMアンタゴニストを使用可能である。

#### 【0218】

さらなる療法適用には：ALS；アルツハイマー病；喘息；アテローム性動脈硬化症；自己免疫溶血性貧血；癌、特にB細胞に関連する癌；悪液質/摂食障害；慢性疲労症候群；硬変症(例えば原発性胆汁性肝硬変)；糖尿病(例えばインスリン糖尿病)；発熱；IgA系球体腎炎および原発性系球体腎炎を含む系球体腎炎；グッドパスチャー症候群；ギラン・バレー症候群；移植片対宿主病；橋本甲状腺炎；出血性ショック；痛覚過敏；炎症性腸疾患；骨関節症、乾癬性関節炎および関節リウマチを含む関節の炎症状態；挫傷(strain)、捻挫、軟骨損傷、外傷、整形手術、感染もしくは他の疾患プロセスから生じる炎症状態；インスリン依存性糖尿病；脳虚血(例えば、各々神経変性につながりうる

、外傷、癲癇、出血または脳卒中などの結果の脳傷害)を含む虚血傷害；肺疾患(例えばARDS)；多発性骨髄腫；多発性硬化症；重症筋無力症；骨髄性白血病(例えばAMLおよびCML)および他の白血病；筋疾患(例えば特に敗血症における筋タンパク質代謝)；神経毒性(例えばHIVに誘導されるようなもの)；骨粗鬆症；疼痛；パーキンソン病；天疱瘡；多発性筋炎/皮膚筋炎；自己免疫肺炎症を含む肺炎症；乾癬；ライター病；再灌流傷害；敗血症ショック；放射療法の副作用；シェーグレン症候群；一時的顎関節疾患；特発性血小板減少症および自己免疫新生児血小板減少症を含む血小板減少症；腫瘍転移；ブドウ膜炎；および血管炎が含まれる。

#### 【0219】

セリアック病を含む胃腸系の状態もまた、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストまたは併用療法で治療可能である。本発明のLDCAMアゴニストおよび併用療法を用いて、クローン病；潰瘍性大腸炎；特発性胃不全麻痺；慢性膵炎を含む膵炎、および急性膵炎と関連する肺傷害を治療する。やはり含まれるのは、尿生殖器系の障害、例えば自己免疫系球体腎炎、毒素への曝露による系球体腎炎、あるいは溶血性連鎖球菌または他の感染性病原体の感染から派生する系球体腎炎を含む系球体腎炎を治療するためのLDCAMアゴニストおよび併用療法を用いる方法である。

#### 【0220】

### 8. LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストの配合および投与

本発明は、医学的障害、そして特にLDCAMが仲介する障害を患う患者、好ましくは哺乳動物患者、そして最も好ましくはヒト患者を治療するための、組成物としての薬剤または療法剤、および方法を提供する。LDCAMが仲介するこうした障害には、LDCAMおよび結合パートナー、例えば限定されるわけではないがLDCAM、CRTAMおよびB7L-1などの間の結合によって(直接または間接的に)引き起こされるかまたは悪化される状態が含まれる。本開示の目的のため、用語「疾病」、「疾患」、「医学的状态」、「異常な状態」等は、用語「医学的障害」と交換可能に用いられる。用語「治療する(treat)」、「治療すること(treating)」および「治療(treatment)」には、本明細書において、治癒的、防御的(例えば予防的)および対症的または改善的治療が含まれる。こうした療法的使用のため、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを、周知の手段を通じて、必要な患者に投与することも可能である。本発明の薬剤組成物または療法組成物は、本明細書に記載するような、いずれかの型の1以上のLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを含有することも可能である。

#### 【0221】

**療法的に有効な量。**本発明の治療法または使用法を実施する際、本発明の療法剤の療法的有効量を、好ましくはLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストの活性に関連する疾患を治療するかまたは改善するため、治療しようとする状態を有する患者に投与する。本明細書において、用語「療法的有効量」は、意味がある患者の利益、すなわち相当する医学的状态の治療、治癒、防止または改善、あるいはこうした状態の治療、治癒、防止または改善率の増加を示すのに十分な薬剤組成物または方法の各療法剤または他の活性構成要素の総量を意味する。単独で投与される、個々の療法剤または活性成分に適用した際、該用語はその成分のみを指す。併用に適用した際、該用語は、連続して、または同時に、いずれで併用して投与したのであっても、療法効果を生じる成分の併用した量を指す。本明細書において、句、療法剤の「療法的有効量を投与する」は、障害の重症度を反映する、少なくとも1つの指標において、改善、そして好ましくは持続した改善を誘導するのに十分な量および期間、前記療法剤で患者を治療することを意味する。改善は、患者が、1日以上、またはより好ましくは1週間以上離れた、少なくとも2回の機会に改善を示したならば、「持続した」とみなされる。改善の度合いは、徴候または症状に基づいて決定され、そして決定にはまた、生活の質(quality-of-life)アンケートなどの、患者に実施されるアンケートを使用することも可能である。治療の量および期間が十分であるかどうか決定するため、患者の疾病の度合いを反映する多様な指標を評価することも可能である。選択された単数または複数の指標に関するベースライン値は、療法剤の最

10

20

30

40

50

初の用量の投与前に、患者を検査することによって、確立される。好ましくは、ベースライン検査は、最初の用量投与の約60日以内に行う。急性症状を治療するために療法剤が投与される場合、最初の用量は、傷害が生じた後、現実的にできるだけ速やかに投与される。選択された単数または複数の指標のベースラインを越える改善を、患者が明示するまで、LDCAMアンタゴニストまたはアゴニストなどの療法剤を投与することによって、改善を誘導する。慢性状態を治療する際、改善のこの度合いは、少なくとも1ヶ月以上、例えば、1、2、もしくは3ヶ月またはそれ以上の期間、あるいは無期限に、この薬剤を反復投与することによって、得られる。1~6週間の期間、または単回用量であっても、しばしば、傷害または他の急性状態を治療するのに十分である。治療後の患者の疾病の度合いが、1以上の指標にしたがって、改善されているように見えたとしても、同一レベル、あるいは減少した用量または頻度で、無期限に治療を続けることも可能である。ひとたび治療を減少させるかまたは中断したら、後に、症状が再出現した場合、元来のレベルで再開することも可能である。

10

#### 【0222】

投薬量決定。当業者は、適切な投薬量が、治療しようとする障害の性質および重症度、患者の体重、年齢、全身状態、および以前の疾病および/または治療、並びに投与経路などの要因に応じて、多様であろうことを認識するであろう。予備的用量は、動物試験にしたがって決定可能であり、そしてヒト投与の投薬量決定を、標準的投薬量決定試験などの、当該技術分野に認められた慣例にしたがって行う。例えば、療法的有効用量は、最初に、細胞培養アッセイから概算可能である。投薬量は、化合物の比活性に応じるであろうし、そして日常的な実験によって、容易に決定可能である。用量は、細胞培養で決定されるようなIC50(すなわち症状の最大障害の半分を達成する試験化合物の濃度)を含みつつ、毒性を最小限にする、循環血漿濃度範囲を達成するように、動物モデルにおいて、配合可能である。こうした情報を用いて、ヒトにおいて、有用な用量を、より正確に決定することも可能である。最終的には、主治医が、個々の患者各々を治療する、本発明のポリペプチドの量を決定するであろう。まず、主治医は、本発明のポリペプチドを低用量で投与し、そして患者の応答を観察するであろう。患者に最適な療法効果が得られるまで、本発明のポリペプチドをより多い用量で投与することも可能であり、そしてその時点でさらに用量を増やさない。本発明の方法を実施するのに用いる多様な薬剤組成物は、kg体重あたり、約0.01ng~約100mg(または約0.1ng~約10mg、または約0.1マイクログラム~約1mg)の本発明のポリペプチドを含有すべきであると意図される。本発明の1つの態様において、本明細書に開示する多様な医学的障害を治療するため、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを週1回投与し、別の態様において、少なくとも週2回投与し、そして別の態様において、少なくとも週3回投与する。注射する場合、成人用量あたり、有効量のLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストは1~20mg/m<sup>2</sup>の範囲であり、そして好ましくは約5~12mg/m<sup>2</sup>である。あるいは、均一用量を投与することも可能であり、その量は、5~100mg/用量の範囲であることも可能である。皮下注射によって投与される均一用量の典型的な用量範囲は、5~25mg/用量、25~50mg/用量および50~100mg/用量である。本発明の1つの態様において、25mg/用量あるいは50mg/用量のLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを含有する、注射に許容しうる調製物を投与することによって、以下に記載する多様な適応症を治療する。25mgまたは50mg用量を、特に慢性状態に対して、反復投与することも可能である。注射以外の投与経路を用いるならば、標準的な医学的実施にしたがって、用量を適切に調整する。多くの場合、患者状態の改善は、約25mgの用量のLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを、少なくとも3週間の期間に渡って、週1~3回、あるいは約50mgの用量のLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを、少なくとも3週間、週1または2回、注射することによって得られるであろうが、所望の度合いの改善を誘導するのに、より長い期間の治療が必要である可能性もある。不治の慢性状態では、措置は、患者の医師によって、こうしたものが必要だと思われたならば、用量および頻度に調整を行ったうえ、無期限に続けることも可能である。前述の用量は、1

20

30

40

50



8歳以上の年齢のヒトである、成人患者に関する例である。小児科患者（年齢4～17歳）に関しては、適切な措置は、週あたり1回以上の皮下注射によって投与される、最大用量25mgまでのLDCAマアタゴニストおよびアゴニストの0.4mg/kgの皮下注射を伴う。LDCAマポリペプチドに対する抗体を、LDCAマアタゴニストとして用いる場合、好ましい用量範囲は、0.1～20mg/kg、そしてより好ましくは1～10mg/kgである。抗LDCAマポリペプチド抗体の別の好ましい用量範囲は、0.75～7.5mg/体重kgである。ヒト化抗体、すなわち、抗体分子の抗原結合部分のみが非ヒト供給源由来である抗体が好ましい。こうした抗体を、静脈内注射または投与することも可能である。

#### 【0223】

配合。本発明のLDCAマアタゴニストまたはアゴニスト（限定なしに組換えおよび非組換え供給源を含む、いかなる供給源由来でもよいもの）の有効量を、生理学的に許容しうる希釈剤、キャリアー、または賦形剤などの他の構成要素と組み合わせる組成物を、本明細書に提供する。用語「薬学的に許容しうる」は、活性成分（単数または複数）の生物学的活性の有効性に干渉しない非毒性成分を意味する。投与に適した配合物には、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および配合物をレシipientの血液と等張にする溶質を含むことも可能である水性および非水性無菌注射溶液；並びに懸濁剤または粘稠化剤を含むことも可能な、水性および非水性無菌懸濁物が含まれる。ポリペプチドは、薬学的に有用な組成物を調製するのに用いられる既知の方法にしたがって、配合可能である。これらを、単一の活性成分として、または既定の適応症に適した他の既知の活性成分とともに、薬学的に許容しうる希釈剤（例えば、生理食塩水、Tris-HCl、酢酸、およびリン酸緩衝溶液）、保存剤（例えば、チメロサル、ベンジルアルコール、パラベン類）、乳化剤、可溶化剤、アジュバントおよび/またはキャリアーと混合して併用することも可能である。薬剤組成物に適した配合物には、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, 1980, Mack Publishing Company, ペンシルバニア州イーストンに記載されるものが含まれる。さらに、こうした組成物は、ポリエチレングリコール（PEG）、金属イオンと複合体化しているか、またはポリ酢酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲル類、デキストラン等のポリマー化合物に取り込まれているか、またはリポソーム、マイクロエマルジョン、ミセル、単層もしくは多層小胞、赤血球ゴーストもしくはスフェロプラストに取り込まれていることも可能である。リポソーム配合物に適した脂質には、限定なしに、モノグリセリド類、ジグリセリド類、スルファチド類、リゾレシチン、リン脂質類、サポニン、胆汁酸類等が含まれる。こうしたリポソーム配合物の調製は、例えば、米国特許第4,235,871号；米国特許第4,501,728号；米国特許第4,837,028号；および米国特許第4,737,323号に開示されるように、当該技術分野の技術レベルの範囲内である。こうした組成物は、物理的状態、可溶性、安定性、in vivo放出速度、およびin vivoクリアランス速度に影響を与えるであろうし、そしてしたがって、意図される適用にしたがって選択され、そのため、キャリアーの特性は、選択された投与経路に応じるであろう。本発明の1つの好ましい態様において、LDCAマまたはLDCAマ様ポリペプチドの持続放出型を用いる。開示する方法で使用するのに適した持続放出型には、限定されるわけではないが、緩慢溶解生体適合性ポリマー（米国特許第6,036,978号に記載されるアルギン酸微小粒子など）に被包されたLDCAマおよび/またはLDCAマ様ポリペプチド、このようなポリマー（局所適用ヒドロゲル類を含む）と混合されたもの、およびまたは生体適合性半透性移植体中に入れられたものが含まれる。

#### 【0224】

1つの態様において、LDCAマアタゴニストおよびアゴニストの持続放出型を用いる。開示する方法で使用するのに適した持続放出型には、限定されるわけではないが、緩慢溶解生体適合性ポリマー（米国特許第6,036,978号に記載されるアルギン酸微小粒子など）に被包されたLDCAマアタゴニストおよびアゴニスト、このようなポリマー（局所適用ヒドロゲル類を含む）と混合されたもの、およびまたは生体適合性半透性

10

20

30

40

50

移植物中に入れられたものが含まれる。

【0225】

可溶性LDCAMアンタゴニストおよびアゴニスト療法組成物を投与する際に使用可能な持続放出技術の1つの種類は、ヒドロゲル成分、例えば光重合可能ヒドロゲル(Sawhneyら, *Macromolecules* 26:581; 1993)を利用するものである。手術後癒着形成を防止し(Hill-Westら, *Obstet. Gynecol.* 83:59, 1994)、そして血管傷害後の血栓および血管狭窄を防止する(Hill-Westら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5967, 1994)ため、類似のヒドロゲルが用いられてきている。こうしたヒドロゲルにポリペプチドを取り込んで、活性剤の持続局所放出を提供することも可能である(WestおよびHubbel, *Reactive Polymers* 25:139, 1995; Hill-Westら, *J. Surg. Res.* 58:759; 1995)。持続局所放出LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストは、ヒドロゲルに取り込まれると、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストの半減期が長いことから、さらに持続性となるであろう。

10

【0226】

粒子サイズ約1mmの顆粒またはペレットの形の細かい多微粒子(multiparticulates)として、本発明の化合物を配合物中に含むことも可能である。カプセル投与のための材料の剤形はまた、粉末、軽く加圧されたプラグであることも、または錠剤であることさえ可能である。療法剤を加圧によって調製することも可能である。

20

【0227】

いかなる着色剤および香料を含むことも可能である。例えば、タンパク質(または誘導体)を配合し(例えばリポソームまたは微小球体被包)、そして次いで、着色剤および香料を含有する冷蔵飲料などの食用製品内にさらに含有させることも可能である。

【0228】

本発明の化合物の体積を、不活性成分で希釈するかまたは増加させることも可能である。これらの希釈剤には、炭水化物、特にマンニトール、-ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、修飾デキストランおよびデンプンが含まれることも可能である。三リン酸カルシウム、炭酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムを含む特定の無機塩もまた、充填剤として使用可能である。いくつかの商業的に入手可能な希釈剤は、Fast-Flu、Emdex、STA-Rx 1500、EmcompressおよびAvicel1である。

30

【0229】

療法剤を固形投薬型に配合する際に、崩壊剤を含むことも可能である。崩壊剤として用いる材料には、限定されるわけではないが、デンプンに基づく商業的崩壊剤、ExploTabを含む、デンプンが含まれる。グリコール酸デンプンナトリウム、Amberlite、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラミロペクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジピール、酸カルボキシメチルセルロース、天然海綿およびベントナイトはすべて使用可能である。崩壊剤の別の型は、不溶性の陽イオン交換樹脂である。粉末化粘剤は、崩壊剤として、そして結合剤として使用可能であり、そしてこれらには、寒天、カラヤゴムまたはトラガカントゴムなどの粉末化粘剤が含まれることも可能である。アルギン酸およびそのナトリウム塩もまた、崩壊剤として有用である。

40

【0230】

結合剤を用いて、療法剤をともに保持して、硬い錠剤を形成することも可能であり、そして結合剤にはアラビアゴム、トラガカントゴム、デンプンおよびゼラチンなどの天然産物由来の材料が含まれる。他のものには、メチルセルロース(MC)、エチルセルロース(EC)およびカルボキシメチルセルロース(CMC)が含まれる。ポリビニルピロリドン(PVP)およびヒドロキシメチルセルロース(HPMC)はどちらも、療法剤を顆粒化するため、アルコール性溶液中で使用可能である。

【0231】

50

配合プロセス中での粘着を防止するため、療法剤の配合中に抗摩擦剤 ( a n t i f r i c t i o n a l a g e n t ) を含むことも可能である。療法剤およびダイ壁の間に、層として潤滑剤を用いることも可能であり、そしてこれらには、限定されるわけではないが：マグネシウム塩およびカルシウム塩を含むステアリン酸、ポリテトラフルオロエチレン ( P T F E )、流動パラフィン、植物油およびワックスが含まれることも可能である。ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、多様な分子量のポリエチレングリコール、Carbowax 4000および6000などの可溶性潤滑剤もまた使用可能である。

#### 【0232】

配合の間の薬剤の流動特性を改善し、そして加圧の間の再配置を補助しうる、流動促進剤を、添加することも可能である。流動促進剤には、デンプン、タルク、焼成シリカおよび水和ケイアルミン酸が含まれることも可能である。

#### 【0233】

水性環境への本発明の化合物の溶解を補助するため、界面活性剤を湿潤剤として添加することも可能である。界面活性剤には、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウムおよびジオクチルスルホン酸ナトリウムなどの陰イオン性界面活性剤が含まれることも可能である。陽イオン性界面活性剤も使用可能であり、そしてこれには塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトニウムが含まれることも可能である。界面活性剤として配合物中に含まれることも可能な、潜在的な非イオン性界面活性剤のリストは、ラウロマクロゴル400、ポリオキシ40ステアレート、ポリオキシエチレン水素化ヒマシ油10、50および60、モノステアリン酸グリセロール、ポリソルベート40、60、65および80、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースである。これらの界面活性剤は、タンパク質または誘導体の配合物中に、単独でまたは異なる比の混合物として存在することも可能である。

#### 【0234】

添加剤もまた、化合物の取り込みを増進するため、配合物に含まれることも可能である。潜在的にこの特性を有する添加物は、例えば、脂肪酸、オレイン酸、リノール酸およびリノレン酸である。

#### 【0235】

徐放配合物が望ましい可能性もある。拡散または浸出機構いずれかによる放出を可能にする不活性マトリックス、例えば粘剤に、本発明の化合物を取り込むことも可能である。ゆっくり変性するマトリックス、例えばアルギン酸塩、多糖もまた、配合物中に取り込み可能である。本発明の化合物の徐放の別の型は、Oros療法系 ( A l z a C o r p . ) に基づく方法により、すなわち、浸透圧効果によって、単一の小さい開口部を通じて、水が進入するのを可能にし、そして薬剤が押し出されるのを可能にする半透膜中に、薬剤が封入される。いくつかの腸溶性コーティングもまた、遅延放出効果を有する。

#### 【0236】

他のコーティングを配合に用いることも可能である。これらには、コーティングパン中で適用可能な、多様な糖が含まれる。療法剤をフィルムコーティング錠剤中に提供することもまた可能であり、そしてこの例で用いる材料は2群に分けられる。第1群は、非腸溶材料であり、そしてメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシ-エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピル-メチルセルロース、カルボキシ-メチルセルロースナトリウム、プロピドンおよびポリエチレングリコール類が含まれる。第2群は、通常、フタル酸のエステルである、腸溶成分からなる。

#### 【0237】

成分の混合物を用いて、最適なフィルムコーティングを提供することも可能である。パンコーティング器具中または流動化ベッド中または加圧コーティングによって、フィルムコーティングを行うことも可能である。

#### 【0238】

やはり本明細書に意図されるのは、本発明のタンパク質（または誘導体）の肺搬送である。タンパク質（または誘導体）は、吸入されつつ哺乳動物の肺に搬送され、そして肺上皮裏打ちを横断して血流に入る（これに関する他の報告には、Adj e i r a , P h a r m a . R e s . ( 1 9 9 0 ) 7 : 5 6 5 - 9 ; A d j e i r a ( 1 9 9 0 ) , I n t e r n a t l . J . P h a r m a c e u t i c s 6 3 : 1 3 5 - 4 4 ( 酢酸ロイプロリド) ; B r a q u e t r a ( 1 9 8 9 ) , J . C a r d i o v a s c . P h a r m a c o l . 1 3 ( 補遺 5 ) : s . 1 4 3 - 1 4 6 ( エンドセリン - 1 ) ; H u b b a r d r a ( 1 9 8 9 ) , A n n a l s I n t . M e d . 3 : 2 0 6 - 1 2 ( 1 - アンチトリプシン) ; S m i t h r a ( 1 9 8 9 ) , J . C l i n . I n v e s t . 8 4 : 1 1 4 5 - 6 ( 1 - プロテイナーゼ) ; O s w e i n r a ( M a r c h 1 9 9 0 ) , " A e r o s o l i z a t i o n o f P r o t e i n s " , P r o c . S y m p . R e s p . D r u g D e l i v e r y I I , コロラド州キーストーン（組換えヒト成長ホルモン）; D e b s r a ( 1 9 8 8 ) , J . I m m u n o l . 1 4 0 : 3 4 8 2 - 8 ( インターフェロン - および腫瘍壊死因子 ) および P l a t z r a 、米国特許第 5 , 2 8 4 , 6 5 6 号（顆粒球コロニー刺激因子）が含まれる）。

#### 【0239】

本発明の実施に使用が意図されるのは、療法製品の肺搬送のために設計された広範囲の機械的装置であり、限定されるわけではないが、ネブライザー、定量吸入器、および粉末吸入器が含まれ、これらはすべて当業者に周知である。本発明の実施に適した商業的に入手可能な装置のいくつかの特定の例は、M a l l i n c k r o d t , I n c . 、ミズーリ州セントルイスに製造される U l t r a v e n t ネブライザー ; M a r q u e s t M e d i c a l P r o d u c t s 、コロラド州エングルウッドに製造される A c o r n I I ネブライザー ; G l a x o I n c . 、ノースカロライナ州リサーチトライアングルパークに製造される V e n t o l i n 定量吸入器 ; および F i s o n s C o r p . 、マサチューセッツ州ベッドフォードに製造される S p i n h a l e r 粉末吸入器である。

#### 【0240】

こうした装置はすべて、本発明の化合物の分配に適した配合物の使用を要する。典型的には、各配合物は、使用する装置の種類に特異的であり、そして療法に有用な希釈剤、アジュバントおよび/またはキャリアーに加えて、適切な噴霧剤成分の使用を伴うことも可能である。

#### 【0241】

本発明の化合物は、遠位肺への搬送を最も有効にするため、最も好適には、 $10\mu\text{m}$ （またはミクロン）未満、最も好ましくは  $0.5\sim 5\mu\text{m}$  の平均粒子サイズの微粒子型で調製されるべきである。

#### 【0242】

薬学的に許容しうるキャリアーには、トレハロース、マンニトール、キシリトール、スクロース、ラクトース、およびソルビトールなどの炭水化物が含まれる。配合物中で使用する他の成分には、D P P C、D O P E、D S P C および D O P C が含まれることも可能である。天然界面活性剤または合成界面活性剤も使用可能である。P E G も使用可能である（タンパク質または類似体の誘導体化における使用を別としても）。シクロデキストラリンなどのデキストランも使用可能である。胆汁酸塩および他の関連増進剤も使用可能である。セルロースおよびセルロース誘導体も使用可能である。緩衝配合物中の使用などで、アミノ酸も使用可能である。

#### 【0243】

また、リボソーム、微小カプセルまたは微小球体、封入複合体、または他の種類のキャリアーの使用も、意図される。

ジェットネブライザーまたは超音波ネブライザーいずれかのネブライザーの使用に適した配合物は、典型的には、溶液  $1\text{ml}$  あたり、約  $0.1\sim 25\text{mg}$  の生物学的活性タンパク質の濃度で、水に溶解された本発明の化合物を含むであろう。配合物はまた、緩衝剤および単糖も含むことも可能である（例えばタンパク質安定化および浸透圧制御のため）。

エアロゾルを形成する際、溶液の噴霧化に引き起こされるタンパク質の表面誘導性凝集を減少させるかまたは防止するため、ネブライザー配合物はまた、界面活性剤を含有することも可能である。

#### 【0244】

定量吸入装置で使用する配合物は、一般的に、界面活性剤の補助で、噴霧剤中に懸濁された本発明の化合物を含有する、細分割粉末を含むであろう。噴霧剤は、この目的に使用される慣用的成分いずれであることも可能であり、例えば、クロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボン、またはヒドロカーボンがあり、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノール、および1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン、またはその併用が含まれる。適切な界面活性剤には、三オレイン酸ソルビタンおよび大豆レシチンが含まれる。オレイン酸はまた、界面活性剤としても有用でありうる。

10

#### 【0245】

粉末吸入装置から分配するための配合物は、本発明の化合物を含有する、細分割乾燥粉末を含み、そしてまた、装置からの粉末の分散を容易にする量、例えば配合物の重量の50~90%で、ラクトース、ソルビトール、スクロース、マンニトール、トレハロース、またはキシリトールなどの充填剤を含むことも可能である。

#### 【0246】

療法化合物の併用。本発明のLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストは、それ自体または他のポリペプチドとの多量体（例えばヘテロ二量体またはホモ二量体）または複合体で、活性である可能性がある。その結果、本発明の薬剤組成物は、こうした多量体型または複合体型の本発明のポリペプチドを含むことも可能である。本発明の薬剤組成物は、本発明のポリペプチド（単数または複数）とポリペプチドまたはペプチド抗原との複合体の形であることも可能である。本発明は、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニスト、またはLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストと併用して同一患者に投与する1以上の他の薬剤と同時の、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストの投与をさらに含み、各薬剤は、その薬剤に適した措置にしたがって投与される。「同時投与」は、併用した構成要素での同時治療または連続治療とともに、薬剤を交互に投与する措置、または1つの構成要素を長期に投与し、そして他のもの（単数または複数）を断続的に投与する措置を含む。構成要素は、同一または別個の組成物中で、そして同一または異なる投与経路によって投与可能である。本発明の薬剤組成物と同時投与可能な構成要素の例は：M-CSF、GM-CSF、TNF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-17、IL-18、IFN、TNF0、TNF1、TNF2、G-CSF、Meg-CSF、トロンボポエチン、幹細胞因子、およびエリスロポエチンなどの、サイトカイン類、リンホカイン類、または他の造血因子、あるいはこれらの因子いずれかの阻害剤またはアンタゴニストである。薬剤組成物はさらに、ポリペプチドの活性を増進するか、あるいは治療中のその活性または使用を補足する（complement）がいずれかの他の剤を含有することも可能である。こうしたさらなる因子および/または剤を薬剤組成物中に含み、本発明のポリペプチドとの相乗効果を生じることがも、または副作用を最小限にすることも可能である。逆に、本発明のLDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを、特定のサイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解因子または抗血栓因子、あるいは抗炎症剤の配合物中に含み、該サイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血栓溶解因子または抗血栓因子、あるいは抗炎症剤の副作用を最小限にすることも可能である。同時に投与すべき薬剤のさらなる例には、限定されるわけではないが、抗ウイルス剤、抗生物質、鎮痛剤、コルチコステロイド、炎症性サイトカインのアンタゴニスト、非ステロイド性抗炎症剤、ペントキシフィリン、サリドマイド、並びにアザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、ヒドロキシクロロキン硫酸、メトトレキセート、レフルノミド、ミノサイクリン、ペニシラミン、スルファサラジン、および経口金、金チオリンゴ酸ナトリウム、および金チオグルコースなどの金化合物など

20

30

40

50

の疾患修飾抗リウマチ薬剤 (DMARD) が含まれる。さらに、LDCAM アンタゴニストおよびアゴニストは、LDCAM および / または CRTAM ポリペプチドに対する抗体またはペプチボディ、あるいは天然 LDCAM および / または CRTAM ポリペプチドの競合的阻害剤として作用する LDCAM または CRTAM ポリペプチド由来ペプチドを含む、第二の LDCAM アンタゴニストおよびアゴニストと併用可能である。

#### 【0247】

治療期間は多様であるが、典型的には少なくとも2週間、またはそれより長い期間に渡って、反復用量が投与されるであろうし、あるいは無期限に投与されることも可能である。治療しない期間と交互に数周期の治療を行うことも可能である。中断した場合、癌の再発が起こったならば、治療を再開することも可能である。

10

#### 【0248】

LDCAM アンタゴニストおよびアゴニストでの癌の治療を、他の治療と同時に行うことも可能であり、そして化学療法または放射線治療と同時に行うことも可能である。1つの例において、LDCAM アンタゴニストおよびアゴニストを、多様な腫瘍種に対して有効である剤、例えば Apo2 リガンド / TRAIL、または抗血管形成剤、例えば VEGF に対する抗体もしくは EGF 受容体に対する抗体と同時に投与する。LDCAM アンタゴニストおよびアゴニスト治療はまた、特定の種類の癌をターゲットとする他の治療、例えば腫瘍特異的抗原をターゲットとするモノクローナル抗体と併用可能であるし、あるいは特定の種類の癌に用いる他の治療と併用可能である。例えば、化学療法、ホルモン治療、タモキシフェン、ラロキシフェン、または HER2 をターゲットとする剤、例えば HERCEPTIN (登録商標) (Genentech, Inc.) などの抗 HER2 抗体、あるいはその組み合わせと、LDCAM アンタゴニストおよびアゴニストを同時投与して、乳癌を治療することも可能である。別の例において、LDCAM アンタゴニストおよびアゴニスト、並びに抗 CD20 モノクローナル抗体、RITUXIN (登録商標) (Genentech, Inc.) を併用して、慢性リンパ球性白血病または非ホジキンリンパ腫を治療する。本発明はまた、癌の化学療法に用いる多様な可溶性サイトカイン受容体またはサイトカインまたは他の薬剤と、LDCAM アンタゴニストおよびアゴニストの同時投与も意図する。「同時投与」は、併用した構成要素での同時治療または連続治療とともに、薬剤を交互に投与する措置、または1つの構成要素を長期に投与し、そして他のもの(単数または複数)を断続的に投与する措置を含む。こうした他の薬剤には、例えば、癌患者における骨損失を回復するのに用いられるビスホスホネート類、または同時投与される1以上の RANK アンタゴニストの使用が含まれる。同時投与される他の薬剤の例には、限定されるわけではないが、抗ウイルス剤、抗生物質、鎮痛剤、コルチコステロイド、炎症性サイトカインのアンタゴニスト、DMARD 類、多様な全身性化学療法措置および非ステロイド性抗炎症剤、例えば COX I または COX II 阻害剤などが含まれる。

20

30

#### 【0249】

投与経路。いかなる有効な投与経路を用いて、核酸を含む組成物を含む、LDCAM アンタゴニストおよびアゴニストを、療法的に投与することも可能である。非経口投与には、例えば、多量 (bolus) 注射によるか、または連続注入による、関節内、静脈内、筋内、病巣内、腹腔内または皮下経路を介した、注射が含まれ、そしてまた、例えば疾患または傷害部位での局所投与も含まれる。投与の他の適切な手段には、移植体からの持続放出; エアロゾル吸入および / またはガス注入; 点眼剤; 膣または直腸座薬; 頬側調製物; 丸剤 (ピル)、シロップ、ロゼンジ、アイスクリームまたはチューインガムを含む経口調製物; およびローション、ゲル、スプレー、軟膏または他の適切な技術などの局所調製物が含まれる。あるいは、ポリペプチドを発現する培養細胞を移植することによって、例えば LDCAM アンタゴニストおよびアゴニストを発現する細胞を移植することによって、ポリペプチド性 LDCAM アンタゴニストおよびアゴニストを投与することも可能である。細胞はまた、細胞増殖を調節するため、あるいはこうした細胞で所望の効果または活性を生じるため、本発明のポリペプチドの存在下で、ex vivo で培養されることも

40

50

可能である。その後、処理した細胞を、療法目的のため、*in vivo*で導入することも可能である。本発明のポリペプチドはまた、タンパク質形質導入法によって投与されることも可能である。この方法では、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを、限定されるわけではないが、TAT、Antp、またはVP22 (Schwarzeら, 2000, Cell Biology 10:290-295)などのタンパク質形質導入ドメイン(PTD)に共有結合させる。次いで、細胞を含有する組織培地にペプチドを添加することによって、PTD連結ペプチドを細胞に形質導入することも可能である (Schwarzeら, 1999, Science 285:1569; Lindgrenら, 2000, TIPS 21:99; Derossiら, 1998, Cell Biology 8:84; WO 00/34308; WO 99/29721; および WO 99/10376)。別の態様において、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストをコードするDNAでの、*in vivo*または*ex vivo*のトランスフェクションによって、患者自身の細胞が、LDCAMポリペプチドまたはアンタゴニストを産生するよう、誘導する。このDNAは、例えば、LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストをコードする裸のDNAまたはリポソーム被包DNAを注入することによって、あるいはトランスフェクションの他の手段によって、患者の細胞に導入可能である。本発明の核酸はまた、細胞または生物への核酸の導入のための他の既知の方法(限定なしに、ウイルスベクターまたは裸のDNAの形でのものが含まれる)によっても、患者に投与可能である。LDCAMアンタゴニストおよびアゴニストを、1以上の他の生物学的に活性である化合物と併用して投与する際、これらは、同一のまたは異なる経路によって投与可能であり、そして同時に、別個に、または連続して投与可能である。

10

20

30

40

50

#### 【0250】

**経口投与。**本発明のポリペプチドの療法的有効量を経口投与する際、本発明のポリペプチドは、錠剤、カプセル、粉末、溶液またはエリキシル剤の形であろう。錠剤型で投与する際、本発明の薬剤組成物は、さらに、ゼラチンまたはアジュバントなどの固体キャリアを含有することも可能である。錠剤、カプセル、および粉末は、本発明のポリペプチドを約5~95%、そして好ましくは本発明のポリペプチドを約25~90%含有する。液体型で投与する際、水、石油、ピーナツ油、ミネラルオイル、ダイズ油、またはゴマ油などの動物または植物起源の油、あるいは合成油などの液体キャリアを添加することも可能である。薬剤組成物の液体型はさらに、生理学的生理食塩溶液、デキストロースまたは他の糖類溶液、あるいはエチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコール類を含有することも可能である。液体型で投与する際、薬剤組成物は、本発明のポリペプチドを、重量約0.5~90%、そして好ましくは、本発明のポリペプチドを、約1~50%含有する。

#### 【0251】

**静脈内投与。**本発明のポリペプチドの療法的有効量を、静脈内、皮膚または皮下注射によって投与する際、本発明のポリペプチドは、発熱物質不含で非経口的に許容しうる水性溶液の形であろう。pH、等張性、安定性等を十分考慮した、こうした非経口的に許容しうるポリペプチド溶液の調製は、当該技術分野の範囲内である。静脈内、皮膚、または皮下注射のための好ましい薬剤組成物は、本発明のポリペプチドに加えて、塩化ナトリウム注射剤、リンゲル注射剤、デキストロース注射剤、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射剤、乳酸リンゲル注射剤、または当該技術分野に知られるような他のビヒクルなどの等張性ビヒクルを含有すべきである。本発明の薬剤組成物はまた、当業者に知られる、安定化剤、保存剤、緩衝剤、酸化防止剤、または他の添加物も含有することも可能である。本発明の薬剤組成物を用いた静脈内療法の期間は、治療する疾患の重症度、並びに個々の患者各々の状態および潜在的な特異体質反応に応じて、多様であろう。本発明のポリペプチドの各適用期間は、連続静脈内投与12~24時間の範囲内であろうと意図される。最終的には、主治医が、本発明の薬剤組成物を用いた静脈内療法の適切な期間に関して、決定するであろう。

#### 【0252】

骨および組織投与。骨、軟骨、腱または靭帯障害に有用な本発明の組成物に関しては、療法は、局所的に、全身性に、あるいは移植物または装置として局所的に、組成物を投与することを含む。投与する際、本発明に使用するための療法組成物は、もちろん、発熱物質不含で、生理学的に許容しうる型である。さらに、組成物は、望ましくは、骨、軟骨または組織損傷部位に搬送するため、粘稠性型で被包または注射することも可能である。創傷治癒および組織修復には、局所投与が適している可能性もある。場合によって上述のような組成物中に含まれていることも可能である、本発明のポリペプチド以外の療法的に有用な剤が、本発明の方法の組成物と同時にまたは連続して、交互にまたはさらに投与されることも可能である。好ましくは、骨および/または軟骨形成のため、組成物は、骨および/または軟骨損傷部位に、ポリペプチド含有組成物を搬送し、発展する骨および軟骨のための構造を提供することが可能であり、そして最適には、体に吸収されることが可能であるマトリックスを含むであろう。こうしたマトリックスは、他の移植医学的適用のため、現在用いられる素材で形成されることも可能である。マトリックス素材の選択は、生体適合性、生物分解性、機械的特性、美容的外見および界面特性に基づく。組成物の特定の適用が適切な配合を決めるであろう。組成物のための潜在的なマトリックスは、生物分解性でそして化学的に定義される、硫酸カルシウム、リン酸三カルシウム、ヒドロキシアパタイト、ポリ乳酸、ポリグリコール酸およびポリ無水物であることが可能である。他の潜在的な素材は、骨または真皮コラーゲンなどの生物分解性で、そして生物学的によく定義されるものである。さらなるマトリックスは、純粋なポリペプチドまたは細胞外マトリックス構成要素で構成される。他の潜在的なマトリックスは、焼結ヒドロキシアパタイト、  
10  
20  
30  
40  
50

バイオガラス、アルミン酸塩、または他のセラミックスなどの、非生物分解性でそして化学的に定義されるものである。マトリックスは、ポリ乳酸およびヒドロキシアパタイトまたはコラーゲンおよびリン酸三カルシウムなど、上述の種類素材のいずれかの組み合わせで構成されることも可能である。バイオセラミックスは、カルシウム - アルミン酸 - リン酸におけるように、組成が改変されていることも可能であり、そしてプロセッシングされて、孔サイズ、粒子サイズ、粒子形状、および生物分解性が改変されていることも可能である。現在好ましいのは、150 ~ 800ミクロンの範囲の直径を有する多孔粒子の形の、乳酸およびグリコール酸の50 : 50 (モル重量) コポリマーである。いくつかの適用において、カルボキシメチルセルロースまたは自己血餅などの隔絶剤 ( s e q u e s t e r i n g a g e n t ) を利用して、ポリペプチド組成物がマトリックスから解離するのを防止することが有用であろう。隔絶剤の好ましいファミリーは、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピル - メチルセルロース、およびカルボキシメチル - セルロースを含む、アルキルセルロース ( ヒドロキシアルキルセルロースを含む ) などのセルロース性素材であり、最も好ましいのは、カルボキシメチルセルロース ( C M C ) の陽イオン塩である。他の好ましい隔絶剤には、ヒアルロン酸、アルギン酸ナトリウム、ポリ ( エチレングリコール ) 、ポリオキシエチレンオキシド、カルボキシビニルポリマーおよびポリ ( ビニルアルコール ) が含まれる。本明細書において有用な隔絶剤の量は、総配合物重量に基づいて、0 . 5 ~ 20重量%、好ましくは1 ~ 10重量%であり、これは、ポリマーマトリックスからのポリペプチドの脱離を防止し、そして組成物の適切な取り扱いを提供するのに必要な量であり、それでもなお前駆細胞がマトリックスに浸潤するのを防止するほど多くなく、それによってポリペプチドが前駆細胞の骨形成活性を補助する機会を提供する量に相当する。さらなる組成物において、本発明のポリペプチドを、骨および/または軟骨欠損、創傷または問題の組織の治療に有益な他の剤と併用することも可能である。これらの剤には、上皮増殖因子 ( E G F ) 、血小板由来増殖因子 ( P D G F ) 、トランスフォーミング増殖因子 ( T G F - アルファおよび T G F - ベータ ) 、およびインスリン様増殖因子 ( I G F ) などの多様な増殖因子が含まれる。療法組成物はまた、現在、獣医学的適用にも有用である。特に、本発明のポリペプチドでのこうした治療には、ヒトに加えて、家畜およびセラブレッド系統のウマが、望ましい患者である。組織再生に使用すべきポリペプチド含有薬剤組成物の投薬措置は、ポリペプチドの作用を修飾する多様な要因、例えば形成される



のが望ましい組織の重量、損傷部位、損傷組織の状態、創傷サイズ、損傷組織の種類（例えば骨）、患者の年齢、性別、および食餌、あらゆる感染の重症度、投与期間および他の臨床的要因を考慮して、主治医によって決定されるであろう。投薬量は、再構成に用いたマトリックスの種類、および薬剤組成物中の他のポリペプチドの包含に応じて、多様である可能性もある。例えば、IGF I（インスリン様増殖因子I）などの他の既知の増殖因子を最終組成に添加してもまた、投薬量が達成される可能性もある。経過は、組織/骨増殖および/または修復の定期的な評価、例えばX線、組織形態計測的測定およびテトラサイクリン標識によって、監視可能である。

#### 【0253】

獣医学的使用。ヒト患者に加え、LDCA Mアンタゴニストおよびアゴニストは、ペット（イヌ、ネコ、鳥類、霊長類等）、飼育農場動物（ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、鳥類等）などの非ヒト動物、またはLDCA Mアンタゴニストおよびアゴニストが仲介する状態を患う動物いずれかの疾患状態の治療に有用である。こうした例では、適切な用量は、動物の体重にしたがって決定可能である。例えば、0.2～1 mg/kgの用量が使用可能である。あるいは、用量は、動物の表面面積にしたがって決定され、典型的な用量は、0.1～20 mg/m<sup>2</sup>、またはより好ましくは5～12 mg/m<sup>2</sup>の範囲である。イヌまたはネコなどの小動物に関しては、適切な用量は0.4 mg/kgである。好ましい態様において、LDCA Mアンタゴニストおよびアゴニスト（好ましくは患者と同じ種由来の遺伝子で構築される）は、動物の状態が改善されるまで、週1回以上、注射または他の適切な経路によって投与されるか、あるいは無期限に投与可能である。

10

20

#### 【0254】

薬剤製造。本発明はまた、本明細書に開示する各医学的障害の防止または療法的治療のための薬剤製造における、本明細書に多様に定義するようなLDCA Mアンタゴニストおよびアゴニストの使用にも関する。

#### 【0255】

本発明は、本発明の個々の側面の単一の例示として意図される、本明細書記載の特定の態様によって、範囲を制限されるものではなく、そして機能的に同等な方法および構成要素が、本発明の範囲内である。実際、当業者には、本明細書に示し、そして記載するものに加えて、本発明の多様な修飾が、前述の説明および付随する図から明らかとなるであろう。こうした修飾は、付随する請求項の範囲に属すると意図される。

30

#### 【0256】

本発明が記載されているが、以下の実施例は、特定の態様を例示することを意図し、そして本発明の範囲を限定することを意図しない。

配列同定番号および関連分子

#### 【0257】

【表 3】

配列番号	分子
1	ヒトLDCAMのDNA配列
2	ヒトLDCAMのアミノ酸配列
3	ネズミLDCAMのDNA配列
4	ネズミLDCAMのアミノ酸配列
5	LDCAM-Fc構築物のPCRオリゴプライマー
6	LDCAM-Fc構築物のPCRオリゴプライマー
7	ヒトB7L-1の長い細胞外ドメインのDNA配列
8	ヒトB7L-1の長い細胞外ドメインのアミノ酸配列
9	ヒトB7L-1の短い細胞外ドメインのDNA配列
10	ヒトB7L-1の短い細胞外ドメインのアミノ酸配列
11	ヒトCRTAMのアミノ酸配列
12	1F12抗体の可変重鎖のアミノ酸配列 (図6)
13	1F12抗体の可変軽鎖のアミノ酸配列 (図6)

10

20

## 【実施例】

## 【0258】

(実施例1)

B7L-1/Fc融合タンパク質の調製

以下は、B7L-1が結合する細胞を同定するのに用いる、ヒトB7L-1/Fcタンパク質の生成を記載する。融合タンパク質には、ヒトB7L-1の可溶性細胞外領域および突然変異タンパク質ヒトFc領域が含まれ、そしてまず、B7L-1の細胞外領域に隣接するプライマーを用いて、ヒトB7L-1の細胞外領域をコードするcDNAを単離することによって調製された(米国特許第5,011,912号を参照されたい)。

## 【0259】

B7L-1の細胞外ドメインをコードするヌクレオチド(同時係属出願S/N 60/095,663号、1998年8月7日出願の配列番号1のヌクレオチド108~1249)を単離するため、B7L-1の細胞外領域に隣接するオリゴヌクレオチドをPCR反応のプライマーとして用いて、反応のテンプレートのクローン#44904からPCR産物を得た。Sal1およびBglII制限酵素を用い、プライマーによって取り込まれたSal1およびBglII部位で、生じたPCR産物を消化した。Fc受容体結合を低下させるように突然変異させたヒトIgG1 Fc領域を含有する発現ベクター(pDC409)に、生じた断片を連結した。

30

## 【0260】

生じたDNA構築物をサル腎臓細胞株CV-1/EBNAにトランスフェクションした(psv3neoと同時トランスフェクション)。0.5%低免疫グロブリン・ウシ血清を含有する培地中で7日間培養した後、0.2%アジド溶液を上清に添加し、そして0.22μmフィルターを通じて上清をろ過した。次いで、4.6x100mmプロテインAカラム(PerSeptive BiosystemsのPOROS 20A)を用いたBioCadプロテインA HPLCタンパク質精製系に、およそ1lの培養上清を10ml/分で通過させた。プロテインAカラムは上清中の融合タンパク質のFc部分に結合し、融合タンパク質を固定し、そして上清の他の構成要素がカラムを通過するのを可能にする。30mlのPBS溶液でカラムを洗浄し、そしてpH3.0に調整したクエン酸を用いて、結合した融合タンパク質をHPLCカラムから溶出させた。pH7.4の1M HEPES溶液を用いて溶出すると同時に、溶出された精製融合タンパク質を中和した。

40

50

## 【0261】

(実施例2)

B7L-1結合研究

実施例1に記載するように調製したB7L-1/Fc融合タンパク質を用い、標準的フローサイトメトリー方法論にしたがった定量的結合研究を用いて、B7L-1結合に関して細胞株をスクリーニングした。スクリーニングする各細胞株に関して、該方法は、PBS中の2%FCS(ウシ胎児血清)、5%正常ヤギ血清および5%ウサギ血清でブロックされる細胞を1時間インキュベーションすることを含んだ。次いで、ブロックされた細胞を、PBS中の2%FCS、5%ヤギ血清および5%ウサギ血清中のB7L-1/Fc融合タンパク質5 $\mu$ g/mlとインキュベーションした。インキュベーション後、FACS緩衝液(PBS中の2%FCS)で試料を2回洗浄し、そして次いで、マウス抗ヒトFc/ビオチン(Jackson Researchから購入)およびSAPE(Molecular Probesから購入したストレプトアビジン-フィコエリトリン)で処理した。この処理によって、抗ヒトFc/ビオチンが結合したB7L-1/Fcいずれにも結合し、そしてSAPEが抗ヒトFc/ビオチンに結合して、細胞に結合したB7L-1/Fc上に蛍光同定標識を生じる。蛍光検出フローサイトメトリーを用いて、いかなる結合タンパク質に関しても、細胞を解析した。結果によって、ヒトB7L-1がヒト肺上皮株(WI-28)、ヒトBリンパ芽球株(DaudiおよびPAE8LBM1)、ヒト新鮮扁桃B細胞、flt3-L処置動物の脾臓/リンパ節由来のネズミCD8<sup>+</sup>樹状細胞、およびネズミT細胞リンパ腫S49.1によく結合することが示された。

10

20

## 【0262】

(実施例3)

B7L-1対受容体に関するWI-26発現ライブラリーのスクリーニング

以下は、実施例1に記載するように調製したB7L-1/Fc融合タンパク質を用いた発現クローニングライブラリーのスクリーニングを記載する。Current Protocols In Molecular Biology, Vol.1, (1987)に記載される方法を用いて、ヒト細胞株WI-26から発現ライブラリーを調製した。標準的間接的結合法を用いて、放射ヨウ素化B7L-1/Fc融合タンパク質を用いたB7L-1対受容体の発現に関するスライド・オートラジオグラフィーによって、CV1/EBNA細胞のトランスフェクション単層をアッセイした。対受容体を発現する細胞を示す陽性スライドを同定し、そしておよそ2,000の個々のクローンを含有する1つのプールを、B7L-1/Fc融合タンパク質の結合に関して潜在的に陽性であると同定した。

30

## 【0263】

プールを力価決定し、そしてプレーティングし、そして次いで掻き取って、CV1/EBNA細胞をトランスフェクションするためのプールしたプラスミドDNAを提供した。より小さいプールをスクリーニングした後、1つのプールは、B7L-1/Fcへの結合が可能な発現遺伝子産物の存在によって示されるように、B7L-1対受容体に関して陽性であるクローンを含有した。陽性プールを力価決定し、そしてプレーティングして、個々のコロニーを得た。潜在的な候補クローン各々からDNAを単離し、再トランスフェクションし、そして再スクリーニングした。生じた陽性クローンは、1535ヌクレオチドのcDNA挿入物を含有した。B7L-1対受容体(LDCAM)のcDNAコード領域は、配列番号1に開示するものに対応する。配列番号1がコードするアミノ酸配列を配列番号2に開示する。

40

## 【0264】

(実施例4)

ヒトLDCAMの発現

以下は、CV1/EBNA細胞における全長膜結合ヒトLDCAMの発現を記載する。pDC409発現ベクターに配列番号1のコード領域を連結することによって、ヒトLDCAMを発現するためのベクター構築物を調製した。次いで、発現ベクターをCV1/E

50

BNA細胞にトランスフェクションし、そしてMcMahanら, EMBO J. 10:2821, 1991に記載される技術を用いて発現した。

【0265】

細胞にショックを与え、そして数日間インキュベーションし、膜結合したLDCA Mを有する細胞を採取し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、洗浄し、そして損なわれていない型で用いた。

【0266】

配列番号1のヌクレオチド8~1130がコードするLDCA M細胞外領域を含むLDCA Mの可溶性型を発現するため、pDC409発現ベクターに、配列番号1の細胞外コード領域を連結することによって、ベクター構築物を調製する。該ベクターをCV1/EBNA細胞にトランスフェクションする。

【0267】

新鮮培地中で3日間インキュベーションした後、可溶性型を含有するCV1/EBNA細胞上清を回収し、そしてHPLC技術またはアフィニティークロマトグラフィー技術を用いてLDCA Mを単離することによって、可溶性LDCA Mを回収する。

【0268】

(実施例5)

LDCA M結合研究

LDCA Mが結合する細胞株を同定するため、以下の実施例9に記載するLDCA M/Fc融合タンパク質を調製し、そして細胞結合アッセイおよびFACSアッセイで用いた。標準的細胞結合およびFACS方法論を用いて、LDCA Mが、Bリンパ芽球細胞株、DAUDIおよびPAE8LBM1、ヒトB7L-1でトランスフェクションした細胞、LDCA Mでトランスフェクションした細胞、S49.1細胞、並びにFlt3-L処置マウスの脾臓およびリンパ節由来のリンパ系DCに結合することを見出した。

【0269】

(実施例6)

LDCA Mを発現する組織の同定

標準的RT-PCR方法論、ノーザン解析およびESTデータベース(GENBANK)配列マッチングを用いて、ヒトLDCA MおよびマウスLDCA MのmRNA発現に関して、いくつかの細胞株を調べた。結果によって、LDCA Mが広い範囲の組織分布を有することが示された。ヒトLDCA Mの発現は、乳房、網膜、胎児肝臓、脾臓、胎児心臓、肺、筋肉、胎盤、甲状腺、および肺癌に見られた。マウスmRNA LDCA Mは、全胚、精巣、および三重ネガティブ細胞に見られた。

【0270】

(実施例7)

ネズミLDCA Mの単離

可溶性ヒトB7L-1がネズミ・リンパ腫S49.1への結合を示した(実施例2)ため、ネズミLDCA M cDNAクローンに関して、S49.1発現ライブラリーをスクリーニングした。該方法は、S49.1細胞株RNA、並びに配列番号7および配列番号8に示すプライマーを用いた、RT-PCR方法論を含んだ。これらのプライマーは、データベース中に見出され、そしてヒトLDCA Mに相同性を有するネズミESTに基づく。該プライマーを用いたPCRによってcDNAを増幅し、S49.1細胞にネズミLDCA Mが存在することを確認した。

【0271】

増幅産物をクローニングベクターにクローニングし、そしてヒトLDCA Mコード領域に相補的なオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって、LDCA M cDNA挿入物を含有するクローンを検出した。ヒトLDCA Mと比較して、5'伸長を持つcDNAを検出するため、cDNAクローンの5'領域が増幅されるように、コード領域の5'端に相補的なオリゴヌクレオチドプライマーおよびcDNA挿入物に隣接するベクター配列に相補的なプライマーを用いて、アンカーPCRを行った。ゲル電気泳動によっ

て、PCR産物を調べ、そしてその長さをヒトLDCA M cDNAから同様に得た増幅産物と比較した。より長い5' PCR産物を生じるクローンのcDNA挿入物を配列決定して、ヒトLDCA Mと比較して、最初の4アミノ酸以外をコードするネズミLDCA M cDNAを生じた。ネズミLDCA Mのヌクレオチド配列を配列番号3に示す。配列番号3のヌクレオチド配列がコードするアミノ酸配列を配列番号4に提供する。

【0272】

(実施例8)

ネズミLDCA Mポリペプチドの発現

ネズミ細胞外B7L-1を発現するベクター構築物を調製するため、配列番号3のコード領域をpDC409発現ベクターに連結した。次いで、該発現ベクターをCV1/EBNA細胞にトランスフェクションし、そしてMcMahonら, EMBO J. 10:2821, 1991に記載される技術を用いて発現した。

【0273】

細胞にショックを与え、そして数日間インキュベーションした後、可溶性ネズミLDCA Mを含有する細胞上清を収集し、そしてHPLC技術を用いて、タンパク質を回収した。

【0274】

(実施例9)

LDCA M / 融合タンパク質の調製

以下は、LDCA Mが結合する細胞を同定するために用いる、ヒトLDCA M / Fcタンパク質の生成を記載する。融合タンパク質には、ヒトLDCA Mの可溶性細胞外領域および突然変異タンパク質ヒトFc領域が含まれ、そしてまず、LDCA Mの細胞外領域に隣接するプライマーを用いて、ヒトLDCA Mの細胞外領域をコードするcDNAを単離することによって調製された(米国特許第5,011,912号を参照されたい)。

【0275】

LDCA Mの細胞外ドメインをコードするヌクレオチドである配列番号1のヌクレオチド16~1137を単離するため、LDCA Mの細胞外領域に隣接するオリゴヌクレオチドをPCR反応のプライマーとして用いて、WI-26クローンからPCR産物を得た。プライマーを配列番号5および配列番号6に示す。Sal1およびBglII制限酵素を用い、プライマーによって取り込まれたSal1およびBglII部位で、生じたPCR産物を消化した。Fc受容体結合を低下させるように突然変異させたヒトIgG1 Fc領域を含有する発現ベクター(pDC409)に、生じた断片を連結した。

【0276】

生じたDNA構築物をサル腎臓細胞株CV-1/EBNAにトランスフェクションした。0.5%低免疫グロブリン・ウシ血清を含有する培地中で7日間培養した後、0.2%アジド溶液を上清に添加し、そして0.22μmフィルターを通じて上清をろ過した。次いで、4.6x100mmプロテインAカラム(PerSeptive BiosystemsのPOROS 20A)を用いたBioCadプロテインA HPLCタンパク質精製系に、およそ1lの培養上清を10ml/分で通過させた。プロテインAカラムは上清中の融合タンパク質のFc部分に結合し、融合タンパク質を固定し、そして上清の他の構成要素がカラムを通過するのを可能にする。30mlのPBS溶液でカラムを洗浄し、そしてpH3.0に調整したクエン酸を用いて、結合した融合タンパク質をHPLCカラムから溶出させた。pH7.4の1M HEPES溶液を用いて溶出すると同時に、溶出された精製融合タンパク質を中和した。

【0277】

(実施例10)

LDCA Mに対するモノクローナル抗体

本実施例は、LDCA Mに対するモノクローナル抗体を調製する方法を例示する。慣用的な技術、例えば米国特許第4,411,993号に記載される技術を用い、精製LDCA M、細胞外ドメインなどのその断片、合成ペプチド、またはLDCA Mを発現する細胞

10

20

30

40

50

を用いて、LDCAMに対するモノクローナル抗体を生成することも可能である。簡潔には、完全フロイントアジュバント中で乳化し、そして10～100 $\mu$ gの範囲の量を皮下または腹腔内注射した、免疫原としてのLDCAMで、マウスを免疫する。10～12日後、不完全フロイントアジュバント中で乳化したさらなるLDCAMで、免疫動物を追加免疫する。毎週～隔週の免疫スケジュールで、マウスを定期的に追加免疫する。後眼窩出血または尾先端切除によって、血清試料を定期的に採取し、ドットプロットアッセイまたはELISA（酵素連結免疫吸着アッセイ）によって、LDCAM抗体に関して試験する。

#### 【0278】

適切な抗体力価を検出した後、陽性動物に、生理食塩水中のLDCAMを最後に一度、静脈内注射する。3～4日後、動物を屠殺し、脾臓細胞を採取し、そしてネズミ骨髄腫細胞株、例えばNS1または好ましくはP3 $\times$ 63Ag8.653（ATCC CRL 1580）に融合させる。融合によってハイブリドーマ細胞が生成され、これを、非融合細胞、骨髄腫ハイブリッド、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）選択培地中、マルチマイクロタイタープレートに蒔く。

10

#### 【0279】

Engvallら、*Immunochem.* 8: 871, 1971および米国特許第4,703,004号に開示される技術を適応させ、精製B7L-1に対する反応性に関して、ELISAによってハイブリドーマ細胞をスクリーニングする。好ましいスクリーニング技術は、Beckmannら（*J. Immunol.* 144: 4212, 1990）に記載される抗体捕捉技術である。陽性ハイブリドーマ細胞を、同系BALB/cマウスに腹腔内注射して、高濃度の抗LDCAMモノクローナル抗体を含有する腹水を産生することも可能である。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、多様な技術によって、フラスコまたはローラーボトル中、*in vitro*で増殖させることも可能である。マウス腹水中で産生されたモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム沈殿、続いてゲル排除クロマトグラフィーによって、精製可能である。あるいは、プロテインAまたはプロテインGに対する抗体の結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーもまた使用可能であり、B7L-1への結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーも使用可能である。

20

30

#### 【0280】

（実施例11）

##### ノーザンプロット解析によるLDCAM発現の検出

以下は、本発明のLDCAMポリペプチドを発現する組織および細胞種を同定するために行う、ノーザンプロット実験を記載する。

#### 【0281】

1.2%アガロース・ホルムアルデヒドゲル上で、5 $\mu$ g～10 $\mu$ gの総RNAを分画し、そしてRNAをHybondナイロン膜（Amersham、イリノイ州アーリントンハイツ）上にプロットングすることによって、ノーザンプロットを生成した。Maniatis（*Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載されるような標準的ノーザンプロット生成法を用いた。いくつかの異なる供給源由来のmRNA 1 $\mu$ gを含有するポリA+多組織プロットを、Clontechから購入した。

40

#### 【0282】

製造者の指示にしたがって、Promegaのリボプローブ・コンビネーション・キットおよびT7 RNAポリメラーゼを用いて、LDCAMのコード領域を含有するリボプローブを生成した。ノーザンプロットを探索し（*probing*）、そして生じたX線フィルムを、陽性に結合したプローブに関して視覚化した結果によって、ネズミLDCAMに関して、5.0kBのハイブリダイズmRNAが、肺、肝臓、脳、精巣および脾臓樹状

50

細胞で検出されたことが示される。異なるサイズを有する、さらなるハイブリダイズmRNAには、肺および精巣のおよそ1.9kBのmRNA；LPSで刺激した骨髄マクロファージ、肺および精巣のおよそ3.0kBのmRNA；抗T細胞受容体抗体で刺激した脾臓T細胞、LPSで刺激した骨髄マクロファージ、および精巣のおよそ7.0kBのハイブリダイズmRNAが含まれ；そしておよそ9.0kBのハイブリダイズmRNAが、胸腺および抗T細胞受容体抗体で刺激した脾臓T細胞で検出された。

## 【0283】

(実施例12)

免疫系細胞結合研究

以下は、LDCAMが特定の活性化免疫系細胞に結合することを示す、FACS細胞結合実験を記載する。研究および比較目的のため、B7L-1の結合特性もまた含む。研究した細胞には、ネズミT細胞、ヒトT細胞、ネズミB細胞、ネズミNK細胞、ヒト内皮細胞、およびヒト腫瘍細胞株が含まれた。

10

## 【0284】

ネズミT細胞結合を研究するため、BALB/cネズミリンパ節(LN)細胞を、培地中、単独で、そして異なる刺激の存在下で、18~20時間培養した。培養した細胞を採取し、そしてB7L1/Fc融合タンパク質、LDCAM/Fc融合タンパク質および対照Fcタンパク質を用いた結合研究のために調製した。一晚培養した後、BALB/cネズミLN細胞は、典型的には>90%CD3+である。フローサイトメトリー解析を用いて、結合したタンパク質を検出した。表Iに示す結果は、未刺激T細胞(培地)および刺激T細胞(刺激による)上の平均蛍光強度単位(MFI)として表した観察される結合を示す。

20

## 【0285】

表I

## 【0286】

## 【表4】

Fc	培地	Con A	TCR mAb	PHA
対照Fc	12.7	10.4	14.5	14.2
B7L1Fc	11.7	14.3	24.0	12.6
LDCAM Fc	18.7	51.7	230.0	91.4

30

## 【0287】

T細胞サブセットによって解析すると、in vitroで抗TCR刺激した後、LN CD4+ネズミT細胞の75~80%が、検出可能なLDCAM結合を示した。LN CD8+ネズミT細胞の約50%が、検出可能な結合を示す。さらに、CD4+T細胞は、CD8+ネズミT細胞より高いレベルのLDCAM結合を示す。結果によって、LDCAM/Fcは未刺激T細胞に低レベルで結合することが立証される。しかし、ポリクローナル刺激で一晩活性化すると、結合は刺激に応じて5~20倍増加した。研究した刺激のうち、PMAはネズミT細胞に対して最低のLDCAM結合を誘導し、そして抗TCRは最高の結合を誘導する。

40

## 【0288】

LDCAMおよびその対構造B7L1へのヒトT細胞結合を研究するため、ヒト末梢血(PB)T細胞を、培地中、単独で、または異なる刺激の存在下で、18~20時間培養した。培養した細胞を採取し、そしてB7L1/Fc融合タンパク質、LDCAM/Fc融合タンパク質および対照Fcタンパク質いずれかを用いた結合研究のために調製した。フローサイトメトリー解析によって、ヒトPB T細胞上に結合したタンパク質を測定した。表IIは、未刺激T細胞(培地)および刺激T細胞(刺激による)上のMFIとして表した観察される結果を詳述する。

## 【0289】

表II

50

## 【0290】

## 【表5】

Fc	培地	Con A	PMA	PHA
対照Fc	4.7	4.8	3.5	4.3
B7L1Fc	6.3	7.5	4.5	5.7
LDCAM Fc	22.3	42.8	61.9	38.8

## 【0291】

結果は、PMAが、ネズミT細胞に対してより、ヒトT細胞に対して、より高いLDCAM結合を誘導することを示す。B7L1結合の非存在下で、ネズミおよびヒト両方のT細胞に対するLDCAMの特異的結合が存在することから、LDCAMがB7L1または異なる分子に結合性であり、そして自身には結合性でないことが示唆される。研究によって、T細胞がほとんどまたはまったくB7L1を発現しないことが示されるため、LDCAMは別の結合パートナーを有する可能性もある。

## 【0292】

上記と類似の研究を行って、ネズミ脾臓B細胞に対するLDCAMおよびB7L1結合を評価した。B7L1またはLDCAM結合のいずれも、未刺激ネズミB細胞上では検出されなかった。ネズミ脾臓B細胞をmucD40LまたはLPSと培養すると、低レベルのLDCAM結合が誘導されたが、認識可能なレベルのB7L1結合は検出されなかった。

## 【0293】

ネズミNK細胞への結合を研究するため、IL-15処置CB-17/SCIDマウスから脾臓を取り除き、そして非常に濃縮され、そして活性化されたネズミNK細胞の供給源として用いた。IL-15処置したSCIDマウスから単離した脾臓細胞は、60~80% DX-5陽性である。DX-5は全NKマーカーであり、多くの異なる系統のマウス由来のNK細胞上で発現される。上述のようにフローサイトメトリー解析を行って、DX-5+ *in vivo* IL-15活性化ネズミNK細胞へのB7L1およびLDCAM結合を検出した。表IIは、ネズミNK細胞結合研究の結果を提供する。

## 【0294】

## 表II

## 【0295】

## 【表6】

Fc分子	DX-5+ NK 細胞 %+ / MFI
対照Fc	8% / 88
B7L1Fc	19% / 265
LDCAM Fc	38% / 432

## 【0296】

ネズミおよびヒトのT細胞上で観察されるものとは対照的に、LDCAMおよびB7L1結合が、*in vivo*活性化ネズミNK細胞上で検出可能である。

ヒト内皮細胞へのB7L1およびLDCAM結合を研究することに向けられる実験の結果から、異なるドナー由来のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に対しては結合が見られないことが示された。しかし、1つのドナーB7L1由来の1つのHUVECは、対照Fcに比較して、低レベルのCD62EおよびCD106を誘導した。

## 【0297】

表IVは、ヒト腫瘍細胞株へのB7L1およびLDCAM結合を評価することに向けられる実験結果を詳述する。LDCAMまたはB7L1に結合する細胞の割合として、結果を示す。

## 【0298】

## 表IV

## 【0299】



【表 7】

細胞株	細胞種	LDCAMFc (%+)**	B7L1Fc (%+)**
U937	単球性白血病	10	7
K562	赤芽球性白血病	7	5
Jurkat	急性T細胞白血病	10	7
MP-1	B-細胞 LCL	46	10
DAUDI-hi	B-細胞 パーキット	8	6
RPMI 8866	B-細胞 リンパ腫	0	0
#88EBV	B-細胞 LCL	4	3
#33EBV	B-細胞 LCL	0	0
Tonsil G EBV	B-細胞 LCL	25	13
MDA231	乳房腺癌	8	9
OVCAR-3	卵巣癌	48	30
H2126M1	肺腺癌	0	0

10

## 【0300】

\* \* 対照Fcの結合を引いてあり、したがってこれはバックグラウンドを越える正味の+細胞%である。

結果によって、卵巣癌細胞株およびヒトB細胞腫瘍株のうち2つ(MP-1およびTonsil G)に対する有意なLDCAM結合が示される。B7L1もまた、これらの3つの腫瘍細胞株に結合するが、はるかにより低いレベルである。これらの結果によって、LDCAMが特定の種類のB細胞リンパ腫または異なる種類の癌腫のマーカーであることが示される。さらに、LDCAMまたはB7L1に仲介される生物学的シグナル伝達は、これらの種類の腫瘍に対する機能的抗腫瘍効果を仲介しうる。

20

## 【0301】

(実施例13)

T細胞増殖に対するLDCAMの影響

以下の議論は、ポリクローナル刺激によって誘導されるネズミおよびヒトのT細胞増殖に対するLDCAMの影響を評価するために行った実験を記載する。

30

## 【0302】

*in vitro*ネズミT細胞増殖の標準的モデルにおいて、LDCAM/Fc融合タンパク質およびB7L1/Fc融合タンパク質を評価した。正常BALB/cマウスからリンパ節(LN)細胞を得て、そして培地中の培養に置いた。多様な量の対照Fc、B7L1/FcおよびLDCAM/Fcを、単独で、またはConA、PHAまたは固定TCR mAbを含む、T細胞の異なるポリクローナル刺激の存在下で、培地に入れた。

## 【0303】

これらの実験の結果によって、LDCAMがConA誘導性ネズミT細胞増殖を強く阻害し(～0.625 μg/mlで50%阻害)、PHA誘導性増殖を中程度に阻害し(～5 μg/mlで50%阻害)、そして固定TCR mAbによって誘導される増殖に影響を与えない(*does not effect*)ことが立証された。ヒト末梢血T細胞増殖アッセイにおいて、LDCAMは、ConA誘導性増殖を阻害するが、PHAまたはOKT3誘導性増殖を有効に阻害しない。B7L1/Fcは、ネズミまたはヒトのT細胞の増殖応答に影響を与えない(*does not effect*)。

40

## 【0304】

結果によって、マイトジェンに誘導されたネズミおよびヒトT細胞増殖に対するLDCAM/Fcの阻害効果が、LDCAM結合パートナーの発現が活性化され、そして増加した後、サイトカイン分泌(特にIL-2)が阻害されるためであるか、またはT細胞の下流応答が制御されるためであることが示唆される。LDCAMはまた、T細胞間、T細胞およびAPC間またはT細胞およびNK細胞間の細胞間相互作用を調節することも可能で

50

ある。LDCAMがTCR mAb誘導性増殖を阻害できなかったことから、サイトカイン異常調節が起こり、ここでConAおよびPHAに誘導される増殖は非常にサイトカイン依存性であり、一方、抗TCR mAbによって誘導されるものではそれほどでもないことが示唆される。

## 【0305】

(実施例14)

ネズミT細胞サイトカイン産生に対するLDCAMの影響

以下は、PHA、ConAおよびTCR mAbでT細胞を*in vivo*活性化した後、ネズミLN細胞または精製T細胞サイトカイン分泌に対する影響に関してLDCAMを評価するために行う実験を記載する。結果を表Vに示す。検出されたサイトカインのレベルをpg/mlで表す。 10

## 【0306】

## 表V

## 【0307】

## 【表8】

培養条件	Fc分子	IL-2(pg/ml)	IFN-ガンマ (pg/ml)
培地	なし	<2	<10
	対照Fc	<2	<10
	LDCAM/Fc	<2	<10
ConA	なし	366	100
	対照Fc	614	244
	LDCAM/Fc	<2	<10
PHA	なし	36	358
	対照Fc	39	354
	LDCAM/Fc	10	<10
固定TCR mAb	なし	1703	1114
	対照Fc	1722	1215
	LDCAM/Fc	1642	1027

20

## 【0308】

結果は、LDCAM/Fcが、ConAおよびPHAのどちらにも誘導される、ネズミLN T細胞のIL-2およびIFN-ガンマ産生を有意に阻害することを示す。固定抗TCR mAbを用いて、ネズミT細胞からのサイトカイン産生を誘導した際、サイトカイン産生に対するLDCAMのより顕著でない効果が観察された。LDCAMは、TCR活性化後のIFN-ガンマ産生を減少させた。対照的に、TCR活性化後のIL-2産生は減少しなかった。これらの実験では、T細胞によってIL-4は非常にわずかしき生成されず、したがってLDCAMがIL-4または他のさらなるサイトカイン類/ケモカイン類のT細胞産生に影響を及ぼす(effect)のかどうかは評価しなかった。 30

## 【0309】

(実施例15)

ネズミ混合細胞活性化アッセイに対するLDCAMの影響

*in vitro*混合細胞アッセイを発展させて、T細胞がCD40L/CD40相互作用を通じてB細胞を活性化させる能力を調べた。該アッセイは、脾臓細胞およびLN細胞を抗TCR mAbと*in vitro*で36時間培養し、その後、T細胞が活性化され、そしてB細胞/APCと相互作用した後に生じる、T細胞およびB細胞/APC細胞活性化のフローサイトメトリー解析を行うことを伴う。 40

## 【0310】

脾臓細胞を、抗TCR mAb、ConA、PHAと、または培地中で、対照Fcのみと、またはLDCAM/Fcと、36時間培養した。CD19+ B細胞およびCD3+ T細胞活性化後、2色染色およびフローサイトメトリー解析を用いて、CD25、CD69、CD54、CD45Rb、CD44、CD28、CD23、CD86およびCD1 50

52の細胞表面発現を調べた。

【0311】

PHAまたはConAでの活性化後、CD69、CD54、およびCD25の発現が、培養中のT細胞およびB細胞上で、数倍増加していることが立証された。対照Fcがこれらの増加にほとんど影響を及ぼさないのに対して、LDCAMは、ConAでの活性化を介して、この培養系において、両方の細胞種上で誘導される、CD69、CD54およびCD25の発現を有意に減少させた（非活性化T細胞とほぼ同レベル）。ConAは、表面上に活性化分子（例えばCD40L）を発現するT細胞を活性化させる。活性化分子は、B細胞表面上の受容体に結合し、そしてB細胞を活性化して、細胞表面上の多様な活性化関連タンパク質を発現させる。PHA活性化T細胞およびB細胞の阻害は、ConAで活性化された後に観察されるものより穏やかな度合いで起こった。

10

【0312】

さらに、LDCAMは、ConAと培養した脾臓細胞において、CD3+およびCD3-両方で発現されるCD45RBのレベルを減少させた。CD45RBレベルの減少に対するこの効果は、LDCAMをTCR mAbで刺激した脾臓細胞と培養した場合、より顕著であり、そしてPHAを刺激剤として用いた場合、または細胞を培地のみで培養した場合、観察されなかった。

【0313】

TCR mAbを用いて、対照FcまたはLDCAM/Fcの存在下で培養脾臓細胞を刺激すると、この刺激により、T細胞およびB細胞上で誘導されるCD69、CD25、およびCD25のレベルは、LDCAMに影響されない（were not affected）ことが示された。しかし、LDCAMは、CD3+ T細胞および非T細胞両方の上のCD28発現を増加させた。1つの実験において、増加は5~10倍であり、そして他の実験では、増加は50%であった。これはまた、TCR mAbに加えて、ConAを刺激剤として用いた1つの実験でも観察された。LDCAMは、TCR mAbで活性化した後のB細胞（50%減少）およびT細胞（20~30%減少）上のCD45RB発現強度の中程度の減少を引き起こした。

20

【0314】

興味深いことに、LDCAMは、ポリクローナルT細胞刺激の非存在下で脾臓細胞を培養した際、脾臓細胞上のCD45RB発現に影響を及ぼさない（does not effect）。げっ歯類におけるCD45RB発現は、T細胞が未刺激細胞からメモリー細胞に進行するにつれて減少すると報告されている。また、CD4+ T細胞の異なる下位集団が高レベルまたは低レベルのCD45RBを発現し、そしてin vivoで別個の免疫機能を仲介する。

30

【0315】

上に論じる結果によって、特定の免疫刺激条件下で、特にConAおよびPHAによる刺激下で、LDCAMが、混合細胞アッセイにおいて細胞レベルで、T細胞活性化を阻害し、そして少なくとも部分的に、IL-2およびIFN-ガンマ産生を減少させることによって、これらのマイトジェンによって誘導されるT細胞増殖を阻害することが示唆される。

40

【0316】

LDCAMは、TCR mAbが誘導する活性化によって誘導されるIFNガンマ産生を中程度に下方制御するが、この系において、IL-2産生にはほとんど影響がなく、そして固定TCR mAbによって誘導されるネズミT細胞の増殖に影響を及ぼさない（does not effect）。LDCAMは、TCR mAbが活性化するT細胞およびB細胞のCD28発現の増加、並びにCD45RB発現の減少を引き起こす。これらのデータに基づいて、T細胞上のLDCAMまたはその結合パートナーは、限定されるわけではないが、抗腫瘍免疫応答、DTH応答、およびT細胞依存性抗感染性疾患免疫応答を含むT細胞エフェクター依存性免疫応答をin vivoで制御する（増加させる、減少させる、または向け直す）ことも可能である。

50

## 【0317】

上記の結果は、LDCAMがT細胞活性化経路を調節するのに有用であり、そしてこれを用いて、自己免疫疾患および炎症を治療可能であることを示唆する。

## 【0318】

(実施例16)

LDCAM・Fcは、ネズミNK細胞に結合し、そしてNK細胞増殖を引き起こす

以下は、LDCAMが脾臓NK細胞表面に恒常的に結合し、そしてこれらの細胞をIL-15で活性化すると、LDCAM結合レベルが増加することを立証する実験を記載する。該実験はまた、CB-17 SCIDマウスへのLDCAM:Fcの投与、並びに脾臓におけるNK細胞増殖および活性化に対する投与の影響もまた記載する。

10

## 【0319】

12匹の年齢一致メスCB-17/SCIDマウスを、群あたり3匹の4群に分けた。第0日、第1日、および第2日、第I群、第II群、第III群および第IV群に以下のタンパク質をIP投与した：第I群のマウスには10 $\mu$ gのヒトIgGを投与し；第II群のマウスには10 $\mu$ gのヒトIL-15を投与し；第III群のマウスには10 $\mu$ gのヒトLDCAM:Fc (Immunexのロット番号7488-16)を投与し；そして第IV群には各10 $\mu$ gのヒトLDCAM:FcおよびヒトIL-15を投与した。

## 【0320】

第3日(実験4日目)、マウスを安楽死させ、そして脾臓細胞を取り除いた。各脾臓を別個に計数し、そして次いで、フローサイトメトリー解析のため、ともにプールした。DX-5抗体を全ネズミNK細胞マーカーとして用いたフローサイトメトリーによって、各処置群の脾臓中のNK細胞数を決定した。さらに、CD69およびCD54発現を含むNK細胞活性化の他の測定値を評価した。

20

## 【0321】

実験結果を表VIに示す。LDCAM:Fc単独の投与(第III群)によって、ヒトIgG対照群(第I群)よりも約5倍、総回収脾臓細胞数が増加した。ヒトIL-15を単独で投与する(第II群)と、対照群(第I群)よりも約9倍、総回収脾臓細胞数が増加した。IL-15およびLDCAMの併用処置は、脾臓細胞数を相加的に増加させた。

## 【0322】

脾臓から回収されるNK細胞数は、脾臓中の総細胞回収と相関した。より具体的には、LDCAMは、処置マウス脾臓からの回収NK細胞数の約5倍の増加を誘導し；IL-15は、回収NK細胞数の約9倍の増加を誘導し；そしてLDCAMおよびIL-15の併用は、回収NK細胞数の約13倍の増加を誘導した。LDCAMはまた、CD69およびCD54を発現する脾臓中のNK細胞数も増加させた。この増加は、LDCAM:Fc投与後、*in vivo*で、NK細胞上のCD69またはCD54の発現が特異的に増加したためではなく、全NK細胞の増殖によるものであった。

30

## 【0323】

表VI

## 【0324】

## 【表9】

40

SCIDマウス群	脾臓細胞数 × 10 <sup>6</sup>	マウス数	%DX-5 <sup>+</sup> 細胞 (NK)	回収されたNK細胞数 × 10 <sup>6</sup>
第I群 (ヒトIgG対照)	2.3	3	67.8	1.6
第II群 (IL15陽性対照)	17.8	3	81.7	14.5
第III群 (LDCAM:Fc)	10.25	3	51.2	5.3
LDCAM:FcおよびIL15	24.8	3	72.6	18.0

50

## 【0325】

(実施例17)

F1t3リガンドに由来するユニークな樹状細胞集団の同定

F1t3リガンドで処置したヒトの血液中のまれな細胞集団(0.2% PBMC)が、未刺激CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>アロ反応性T細胞をプライミング可能であることが同定されてきており、こうした特性は樹状細胞(DCまたはDC類)の機能特性の1つである。健康なヒト志願者に10mg/kg/日のF1t3リガンド(FL)を10日間、毎日皮下注射して、第I相臨床試験を行った。F1t3リガンドの注射は、循環CD123<sup>+</sup>pDC、CD1c<sup>+</sup>DCとともに単球の数も非常に増加させることが示された。この臨床研究の途上、血液樹状細胞抗原-3(BDCA3)を発現するCD162<sup>++</sup>細胞のまれな集団が同定された。BDCA3<sup>+</sup>DCは、正常ドナーの総PBMCの0.06%に相当する。F1t3リガンド注射後、BDCA3<sup>+</sup>DCの頻度は、4~8倍増加する。抗BDCA3抗体に認識される抗原の性質は未知であるが、IL-3刺激によって上方制御されるようであり、したがってCD15s<sup>-</sup>CD162<sup>++</sup>DCが、末梢血DCのより「成熟した」型に相当するという概念がより強まった。

10

## 【0326】

図1に示すように、これらの細胞は、いくつかの骨髄特性を示し、そしてシアリル-ルイス-X(CD15s)を発現せず、そして明レベルのCD162(PSGL1)を発現する点で同定された。シアリル-ルイス-Xは大部分の血液DC上に発現される複合糖類である。表面タンパク質上のシアリル-ルイス-X(CD15s)の存在は、血管内皮を通じたDC遊出に役割を果たす。DC上にCD15s発現がないことから、これらの細胞が、遊出を通じて、血流を離れることができないことが示唆される。これらの細胞のさらなる表現型性質決定によって、骨髄関連表現型(CD11c<sup>+</sup>、CD13<sup>++</sup>、CD33<sup>暗</sup>)が明らかになった。興味深いことに、他の骨髄細胞と異なり、CD15s<sup>-</sup>CD162<sup>++</sup>血液DCは、Fc受容体またはCD11bを発現しない。Fc受容体の発現は、成熟に際して下方調節され、そして抗原捕捉(未成熟)段階から抗原提示(成熟)段階への移行の印となる。したがって、CD15s<sup>-</sup>CD162<sup>++</sup>DCは他の血液DCサブセットより成熟している可能性もある。

20

## 【0327】

DC集団に特有の細胞表面分子を同定する試みの中で、DC集団をさらに性質決定するため、ファージディスプレイ全細胞パニングおよび全遺伝子プロファイリングを使用した。全遺伝子アレイ解析によって、BDCA3<sup>+</sup>DCが、マウスCD8a<sup>+</sup>DCのヒト対応物であるらしいことが明らかになった。図2に示すように、マウスCD8a<sup>+</sup>DCおよびヒトBDCA3<sup>+</sup>DCのどちらでも、いくつかの異なる遺伝子が優先的に発現されている。これらの遺伝子のうち、BDCA3<sup>+</sup>DCおよびマウスCD8a<sup>+</sup>DCのみがLDCA M(Igsf4とも称される)を発現する。これらの結果は、BDCA3<sup>+</sup>細胞がIgsf4発現DCとしてよりよく定義されることを示す。これらの抗原提示細胞(APC)は、ネズミCD8a<sup>+</sup>DCのヒト対応物であるようであり、この集団は、抗原交差提示/交差寛容に關与するDCの特殊化集団である。交差提示/交差寛容は、多くの自己免疫疾患、炎症プロセスとともに移植における決定的な役割を果たす細胞機構である。BDCA3<sup>+</sup>DCをターゲティングする(多様な型の抗体、ペプチボディ、可溶性タンパク質、例えばLDCA Mおよび/またはCRTAMを用いて)ことは、多くの療法分野(上述のとおり)で重要である可能性もある。

30

40

## 【0328】

DC集団のアロ活性を決定するため、F1t3リガンドで処置した健康なヒト志願者の血液からCD162<sup>++</sup>およびCD14<sup>+</sup>細胞を精製し、そして10<sup>5</sup>の同種Tリンパ球の存在下で4日間培養した。トリチウム化チミジンを培養の最後の16時間添加した。結果は3回の独立した実験の代表である(図3)。これらの結果は、LDCA M陽性DCが強力なアロ刺激剤であることを示す。

## 【0329】

50

(実施例 18)

LDCAM 特異的抗体 (1F12)

これらの研究は、全細胞パニング・ファージディスプレイアプローチを用いて、LDCAM 特異的 s c f v 結合ファージを単離したこと；結合特異性に大きな変化を加えずに、抗 LDCAM s c f v 発現ファージを s c f v - F c 融合タンパク質（本明細書において、交換可能に「マキシボディ」と称する）に変換するのに成功したこと；そして抗 LDCAM s c f v - F c 融合タンパク質を、免疫沈降、免疫組織化学および機能アッセイに用いるのに成功したことを示す。s c f v ファージライブラリーを用いて、ヒト BDC A 3<sup>+</sup> 血液樹状細胞を、全 P B M C の背景でターゲットングした。このパニングアプローチから回収したファージのあるものは、BDC A 3<sup>+</sup> DC に特異的に結合した。簡潔には、F l t 3 リガンド処置した健康なヒト志願者由来の P B M C をファージおよび蛍光色素コンジュゲート化抗ファージ抗体で標識した。s c f v 繊維状ファージを、F l t 3 リガンドで処置した健康な志願者由来の P B M C とインキュベーションした。徹底的に洗浄することによって、非結合ファージを除去した。P B M C を抗 BDC A 3 抗体で標識し、そしてフローサイトメトリーによって精製した。酸性ショックによって、BDC A 3<sup>+</sup> DC の表面からファージを溶出させた。BDC A 3<sup>+</sup> DC 結合ファージを大腸菌中で増幅した。第一周期の BDC A 3<sup>+</sup> DC 結合ファージを第二選択周期で用いた。

10

【0330】

1F12 は、BDC A 3<sup>+</sup> DC に特異的に結合することが示された。次いで、C D 1 c、C D 12 3、C D 1 4 および BDC A 3 に対する抗体を添加した。図 4 の結果は、ファージ 1F12 ( 下列 ) が BDC A 3<sup>+</sup> DC を特異的に標識することを示す。上列は、繊維状ファージを含まない、バックグラウンド標識を示す。1F12 は、全細胞パニング・ファージディスプレイアプローチから得たファージの 4 % の 1 つであり、交差種反応性、すなわちマウスおよびヒトに対して交差種反応性である。1F12 s c f v は、フローサイトメトリー、組織学および免疫沈降によって、BDC A 3<sup>+</sup> DC に結合することが示されている。マウスにおいて、1F12 s c f v は、実施例 17 に記載するように、細胞傷害性 T リンパ球の活性化に重要な役割を果たすと考えられる、脾臓 DC の別個のサブセット ( C D 8 a<sup>+</sup> DC ) に特異的に結合することが示されている。

20

【0331】

1 つの特異的 s c f v - ファージ ( 1F12 ) を s c f v - F c 融合タンパク質に変換した。当該技術分野に周知の技術を用いて、s c f v をヒト I g G 1 の F c ドメインに融合させることによった。s c f v を s c f v - F c 融合タンパク質に変換しても、s c f v 結合領域の特異性に不都合な影響は生じなかった ( 図 5 に示すとおり - 1F12 s c f v - F c 融合タンパク質が、FACS 解析のためにビオチン化されていることに注目されたい ) 。可変重鎖領域の配列を配列番号 12 に提供し、そして 1F12 の可変軽鎖領域を配列番号 13 に提供する。

30

【0332】

1F12 は、LDCAM ( 当該技術分野において、I g s f 4、T S L C 1、S y n C A M およびネクチン様 2 としても知られる ) に特異的に結合することが示されてきている。s c f v - F c を哺乳動物発現ベクターに導入し、そして C O S 細胞中で産生した。1F12 s c f v - F c は骨髄由来マウス DC から 100 k D a 糖タンパク質を免疫沈降することが示された ( 図 7 を参照されたい ) 。100 k D a タンパク質は、質量分析によって、LDCAM であることが確認された。

40

【0333】

実施例 9 に記載する LDCAM - F c 融合タンパク質をドットプロット結合アッセイを用いて、1F12 - F c が LDCAM に特異的に結合することを明確に示した。簡潔には、LDCAM - F c または R A N K - F c ( 関連しない F c 対照 ) の 1 m g / m l 溶液 2 μ l をニトロセルロースフィルター上にスポットティングし、そして乾燥させた。ミルク / B S A / P B S で 1 時間ブロックした後、以下の試薬を膜上にスポットティングした：100 n g の抗 BDC A 3 - ビオチン m A b、100 n g の 1F12 s c f v - F c 抗

50

体または抗ヒトIgG - ビオチン ( Jackson Labs、メイン州バーハーバーの  
マウスFab' 2抗ヒトIgG - ビオチン)。strep - HRPを添加した後、TMB  
ペルオキシダーゼ基質 ( Kirkegaard Perry Laboratories  
、メリーランド州ガイザースバーグ) によって標識を明らかにした。図8に示すように、  
1F12 - scfv - Fc抗体は組換えLDCAM - Fcに特異的に結合したが、関連し  
ないRANK - Fcには結合しなかった。マウスおよびヒトLDCAMはほぼ同一で、タン  
パク質レベルでは98%の同一性を有しており、このことから1F12抗体の交差種反  
応性が説明される。BDCA3に対するmAbは、LDCAM - Fcに有意には結合せず  
、したがって、BDCA3抗原がLDCAMとは異なることが示唆される。

#### 【0334】

これらの結果は、1F12 scfv - Fc抗体 (または融合タンパク質) がLDCAM  
に特異的に結合することを示す。

#### 【0335】

(実施例19)

#### LDCAMがT細胞活性化を阻害する

これらの研究は、LDCAMがT細胞活性化を阻害することを示す。マウス ( Blk -  
6) CD4 + およびCD8 + を、プレートに結合したLDCAM - FCおよび以下のT細胞  
活性化刺激の1つに同時に曝露した: 抗CD3 mAb、conA、PHA、またはc  
onA + IL - 2。T細胞活性化のマーカーである、T細胞によるINF - ガンマ産生に  
関して、培養上清をアッセイした。簡潔には、B6D2F1から脾臓を採取し、すりつぶ  
し、そして赤血球を溶解し、そして細胞を計数した。製造者が示唆するプロトコルにした  
がって、Miltenyi Biotec抗CD8 (カタログ番号130 - 049 - 40  
1) および抗CD4 (カタログ番号130 - 049 - 201) MAC<sup>T</sup>M ビーズを用いて  
、CD8 + 細胞およびCD4 + 細胞を精製した。48ウェルプレートを、LDCAM - Fc  
(5 μg / ml) または陰性対照P7.5 FC (5 μg / ml) Fc分子いずれかで  
37 で2時間コーティングし、そして2回洗浄した。Fcタンパク質を含有しないウェ  
ルもまた含んだ。適切なウェルを抗CD3 mAbで37 で2時間コーティングし、そ  
して2回洗浄した。1mlの培地 (40% IMDM + 40% Clicks + 10% ウシ胎  
児血清 + ビルビン酸ナトリウム + 非必須アミノ酸 + 2Me + PSG) 中、 $1.25 \times 10^6$   
/ ml で細胞をプレティングした。マイトジェン: conA (1 μg / ml)、IL  
- 2 (200単位 / ml) またはPHA (1%) を適切なウェルに添加した。第1日およ  
び第5日に上清を抜き取り、そして商業的IFN - ガンマELISAキットを用いて、I  
FN - ガンマに関してアッセイした。

#### 【0336】

図9は、CD4 + T細胞が、抗CD3 mAbおよびconAによる活性化に対して  
、LDCAMによってアネルギー化されたことを示す (それぞれ図9Aおよび9C)。図  
9B、9D、9Fおよび9Hは、CD8 + T細胞が、それぞれ、抗CD3 mAb、c  
onA、PHA、およびconA + IL - 2による活性化に対して、LDCAMによって  
アネルギー化されたことを示す。これらの研究は、LDCAMが、接触依存性に、活性化  
T細胞表面上に発現される分子と相互作用して、多様な刺激によるT細胞の活性化を防止  
するかまたは弱めることを示す。これらの研究は、LDCAMが炎症経路の制御剤である  
ことを示す。したがって、LDCAMは、T細胞の活性化を防止するため、そして自己免  
疫疾患、炎症、移植、癌、感染等におけるように、T細胞活性化を伴う疾患の治療のため  
、薬剤組成物としての療法適用を有する。さらに、上に定義するようなLDCAMのアゴ  
ニストおよびアンタゴニストは、本明細書に記載する疾患を治療するための療法組成物で  
あることも可能である。

#### 【0337】

(実施例19)

#### CRTAMはLDCAMの同族体である

これらの研究は、CRTAMがLDCAMの同族体または結合パートナーであることを

10

20

30

40

50

示す。

FACS解析によって、LDCAM-FcがCD8<sup>+</sup> T細胞に結合し、そしてより低い度合いでCD4<sup>+</sup> T細胞に結合し(それぞれ、図10Dおよび10C)、一方、1F12 scfv-Fc抗体(すなわち抗LDCAM抗体)はこれらに結合しないことが示された(図10Aおよび10Bはアイソタイプ対照である)。さらなるFACS解析によって、抗CD3活性化CD8<sup>+</sup> T細胞は、高レベルでLDCAM-Fcに結合し(図11A)、そして1F12 scfv-Fc抗体には最低限しか結合しない(図11B)ことが示される。対照的に、LDCAM-Fcは、LDCAM-Fcに最小限の結合を(図11C)、そして1F12 scfv-Fc融合タンパク質に高レベルの結合を示した(図11D)。Flt3リガンドで処置したマウス由来のCD8<sup>+</sup>脾臓細胞は、LDCAM-Fcおよび1F12 scfv-Fc両方に異質の結合を示した(それぞれ図11Eおよび11F)。総合すると、これらの研究は、LDCAMが活性化細胞傷害性Tリンパ球(CTL)に結合することを示す。対照的に、1F12 scfv-Fc融合タンパク質は、これらの細胞を標識できない。これらの結果は、別のLDCAM対構造または同族体が、活性化CTLの表面上に存在することを示す。

10

#### 【0338】

LDCAM対構造の細胞表面発現は、活性化CD4<sup>+</sup> T細胞およびCD8<sup>+</sup> T細胞の細胞表面上に、一時的に発現されるものであることが示された。FACS解析によって、CD4<sup>+</sup> T細胞上の同族体へのLDCAM-Fc結合の細胞表面発現は、およそ24時間後に減少することが示された(図12C、12Fおよび12I)。興味深いことに、CD8<sup>+</sup> T細胞は、活性化24時間後に、LDCAM同族体の細胞表面発現の強い増加を(図12D)、そして活性化48時間後および72時間後に、細胞表面発現の漸進的な減少を示した(それぞれ図12Gおよび12J)。活性化CD4<sup>+</sup> T細胞およびCD8<sup>+</sup> T細胞の細胞表面上LDCAMの発現は、最小限であり、そして長期に渡って不変であった(図12B、12E、12Hおよび12K)。

20

#### 【0339】

結合対を免疫沈降させ、そして単離されたバンドに対して質量分析解析を行うことによって、LDCAMの同族体がCRTAMであることを決定した。1F12 scfv-FcおよびLDCAM-Fcは、近いが異なる分子量のタンパク質を免疫沈降した。活性化マウスCTLまたはマウス骨髄由来DCを表面ビオチン化し、そして界面活性剤を用いて溶解した。細胞溶解物をプロテインAビーズマトリックスであらかじめ清浄化した。1F12 scfv-Fcをマウス骨髄由来DC細胞溶解物に添加し、そしてLDCAM-Fcを活性化CTL細胞溶解物に添加し、次いでこれらを、各ターゲットの免疫沈降に用いた。プロテインAビーズマトリックスを添加して、LDCAM-Fcおよび1F12 scfv-Fc複合体を溶解物から抜き取った。図13に示す還元ゲル上で、沈降したタンパク質の見かけのMWを比較した。図13Aは、LDCAM-Fcによって活性化CTLから免疫沈降したバンドである。図13Bは、1F12 scfv-Fcによって骨髄由来DCから免疫沈降したバンドである。脾臓CD8<sup>+</sup> DCを用いて類似の結果を得た。

30

#### 【0340】

図13Aのバンドを切り出し、そして質量分析によって解析した。これらの結果を以下に提示し、そしてCRTAMがLDCAMの同族体であることが確認される。

40

#### 【0341】



【化 1 - 1】

Settings Used

peptide MW:

charge-state:

peptide error: 0.75 u

fragment error: 0.75 u

peak width: 1.0 u

e-value cutoff: 1.0E-15

recalibrate: no

N-terminal pyroglu considered: yes

Met oxidation considered (2 max): yes

Fixed cysteine: carbamidomethyl (160.031)

Variable cys mass (2 max):

Databases searched: nr\_aa, patent\_aa,

ms\_garbage\_aa, celera\_human\_aa,

celera\_mouse\_aa

10

		b	2+ b	b - H2O	y	2+ y	
		-----	-----	-----	-----	-----	
E	0	---	---	---	---	---	13
S	1	130.05	65.53	112.04	1411.67	706.34	12
E	2	217.08	109.04	199.07	1324.64	662.82	11
I	3	346.13	173.56	328.11	1195.60	598.30	10
S	4	459.21	230.10	441.19	1082.51	541.76	9
E	5	546.24	273.62	528.23	995.48	498.24	8
Q	6	675.28	338.14	657.27	866.44	433.72	7
A	7	803.34	402.17	785.33	738.38	369.69	6
L	8	874.38	437.69	856.36	667.34	334.17	5
E	9	987.46	494.23	969.45	554.26	277.63	4
S	10	1116.51	558.75	1098.49	425.21	213.11	3
Y	11	1203.54	602.27	1185.52	338.18	169.59	2
R	12	1366.60	683.80	1348.59	175.12	88.06	1

20

30

MAPLINK	E-VALUE	CHRG.	BEGIN	-	END	SEQUENCE	SEARCH DB
PROTEIN DESCRIPTION	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	8.1E-26	+2	319	-	331	ESEISEQALSYR	

【 0 3 4 2 】

## 【化 1 - 2】

nr\_aa ref|NP\_062338.1 cytotoxic and regulatory T cell molecule;  
 class I-restricted T cell-associated molecule [Mus musculus]  
 gi|3930161|gb|AAC80266.1| class I MHC-restricted T cell associated  
 molecule [Mus musculus]  
 MAP(01) 8.1E-26 +2 319 - 331 ESEISEQALESYR patent\_aa  
 gsp|AAW04405 Mouse CRTAM.  
 MAP(01) 8.1E-26 +2 145 - 157 ESEISEQALESYR nr\_aa  
 dbj|BAB24204.2 unnamed protein product [Mus musculus]  
 MAP(01) 8.1E-26 +2 331 - 343 ESEISEQALESYR nr\_aa  
 ref|XP\_236103.1 similar to cytotoxic and regulatory T cell molecule; class  
 I-restricted T cell-associated molecule [Mus musculus] [Rattus norvegicus] 10  
 MAP(01) 8.1E-26 +2 319 - 331 ESEISEQALESYR patent\_aa  
 gb|AAC10711.1 Sequence 4 from patent US 5686257  
 MAP(01) 8.1E-26 +2 319 - 331 ESEISEQALESYR  
 celera\_mouse\_aa cra|MCP17461.1 /len=388 /protein\_uid=197000028318745  
 /ga\_name=GA\_x6K02T2PVTD /ga\_uid=232000009795437 /transcript\_name=mCT4204.1  
 /transcript\_uid=110000066470850 /cg\_name=mCG5069.1 /start\_codon=0  
 /class=Otto

## 【 0 3 4 3】

E L I S A 形式で、図 1 4 は、L D C A M が C R T A M - F c に特異的に結合するが、  
 N e c l 1 タンパク質または I g G 対照に結合しないことを示す。別個の実験セットにお  
 いて、マウス胸腺腫細胞株 E L 4 ( T h e A m e r i c a n T y p e C u l t u r e 20  
 C o l l e c t i o n 、 A T C C T I B - 3 9 ) に、ヒト L D C A M ( 図 1 5 A )  
 またはヒト N e c l 1 ( 図 1 5 B ) をコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。  
 次いで、それぞれ 1 F 1 2 マキシポディまたは抗 N e c l 1 モノクローナル抗体を用い  
 た磁気細胞選別によって、形質導入細胞を濃縮した。濃縮した形質導入細胞を、h u C R  
 T A M - F c ( 太線 )、1 F 1 2 s c f v - F c ( 細い線 ) または抗 N e c l 1 抗体 ( 点線 )  
 で探査した。垂直線は、関連しない F c アイソタイプマッチ抗体で測定されるよう  
 な、非特異的結合の限界点に相当する。

## 【 0 3 4 4】

C R T A M の架橋は、i n v i t r o 活性化マウス C D 8 + T リンパ球によるサイ  
 トカイン分泌 ( I F N ) を下方制御することが示された ( 図 1 6 )。標準的 E L I S A 30  
 プレートを、抗 C D 3 モノクローナル抗体および / または L D C A M - F c タンパク質い  
 ずれかでコーティングする。標準法を用いて、活性化 C D 8 + T 細胞を単離し、そして  
 I g G 1 アイソタイプ対照または可溶性 C R T A M - F c いずれかの存在下でウェル ( 単  
 数または複数 ) に添加した。プレートに結合した L D C A M - F c によって細胞が架橋さ  
 れた場合、T 細胞による I F N 分泌には、劇的な減少が見られた。逆に、プレートに結  
 合した L D C A M - F c および細胞上に発現される C R T A M 間の競合剤として、アッセ  
 イに C R T A M - F c を添加すると、T 細胞による I F N 分泌の増加が見られた。これ  
 らの研究は、L D C A M 結合および C R T A M 架橋の生物学的結果が、T 細胞活性化、増  
 殖、および炎症誘発性サイトカイン放出を減少させることであることをさらに立証する。  
 こうしたものとして、限定されるわけではないが、L D C A M - F c 融合タンパク質また 40  
 は L D C A M の多量体化型とともに細胞表面上の C R T A M を架橋することも可能な抗 C  
 R T A M 抗体などの L D C A M アゴニストは、T 細胞活性化、増殖、および炎症誘発性サ  
 イトカイン放出を減少させるのに有用であろう。

## 【 0 3 4 5】

これらの研究は、L D C A M が、接触依存性に、活性化 T 細胞の表面上に発現される C  
 R T A M と相互作用することを示す。実施例 1 8 に記載する i n v i t r o 研究は、L  
 D C A M および C R T A M の相互作用が、多様な刺激による T 細胞活性化を防止するかま  
 たは弱めることを明らかに立証する。これらの研究は、L D C A M およびその同族体 C R  
 T A M が、炎症経路に関与することを示す。したがって、L D C A M は、T 細胞の活性化  
 を防止するため、そして自己免疫疾患、炎症、移植、癌、感染等におけるように、T 細胞 50

活性化を伴う疾患の治療のため、薬剤組成物としての療法適用を有する。さらに、本明細書全体に定義するようなLDCA M / CRTAM相互作用のアゴニストおよびアンタゴニストは、本明細書に記載する疾患を治療するための療法組成物として療法価値を有することも可能である。

【図面の簡単な説明】

【0346】

【図1】図1は、マウスCD8<sup>+</sup>樹状細胞のヒト対応物であり、交差提示および交差寛容の非常に重要な免疫調節抗原提示細胞である、ヒト樹状細胞の新規サブセットの表現型決定を示す。

【図2】図2は、マウスCD8<sup>+</sup>樹状細胞およびヒトBDCA3<sup>+</sup>樹状細胞間で共有される遺伝子の表である。 10

【図3】図3は、ヒトBDCA3<sup>+</sup>樹状細胞が、強力なアロ刺激剤であることを示すグラフである。

【図4】図4は、scfv発現ファージ1F12が、ヒトBDCA3<sup>+</sup>樹状細胞に特異的に結合することを示す、一連のFACSスキャンである。

【図5】図5は、scfvファージからscfv-Fc融合タンパク質への変換後、1F12 scfv-Fc融合タンパク質(「マキシボディ」)が、LDCA Mへの全体的な特異性を保持したことを例示するFACSスキャンである。

【図6】図6は、1F12 scfv(抗LDCA M scfv)の重鎖および軽鎖の可変領域のアミノ酸配列である。 20

【図7】図7は、1F12 scfv-Fcが、骨髄由来マウス樹状細胞から、100 kDa糖タンパク質を免疫沈降したことを示す免疫沈降ゲルの画像であり、該タンパク質は、続いて、質量分析によって、LDCA Mであることが示された。

【図8】図8は、1F12-scfv-Fc抗体が、組換えLDCA M-Fcに特異的に結合するが、関連しないRANK-Fcには結合しないことを示す、イムノドットプロットである。これらの結果は、1F12 scfv-Fc融合タンパク質がLDCA Mに特異的に結合することを示す。

【図9】図9は、CD4<sup>+</sup>T細胞が、LDCA Mによって、抗CD3 mAbおよびconAによる活性化に対してアネルギー化されたことを示す(それぞれ図9Aおよび9C)。図9B、9D、9Fおよび9Hは、CD8<sup>+</sup>T細胞が、LDCA Mによって、それぞれ、抗CD3 mAb、conA、PHAおよびconA+IL-2による活性化に対してアネルギー化されたことを示す。これらの研究は、LDCA Mが、接触依存性に、活性化T細胞表面上に発現される分子と相互作用し、多様な刺激によるT細胞の活性化を防止するかまたは弱めることを示す。これらの研究は、LDCA Mが炎症経路における制御剤であることを示す。 30

【図10】図10は、LDCA M-Fcが、CD8<sup>+</sup>T細胞に、そしてより低い度合いでCD4<sup>+</sup>T細胞に結合する(それぞれ、図10Dおよび10C)一方、1F12 scfv-Fc抗体(すなわち抗LDCA M抗体)が結合しないことを示す一連のFACSスキャンである(図10Aおよび10Bはアイソタイプ対照である)。これらの研究は、LDCA Mが、接触依存性に、活性化T細胞表面上に発現される分子と相互作用し、多様な刺激によるT細胞の活性化を防止するかまたは弱めることを示す。これらの研究は、LDCA Mが炎症経路における制御剤であることを示す。 40

【図11】図11は、抗CD3活性化CD8<sup>+</sup>T細胞が、高レベルでLDCA M-Fcに結合し(図11A)、そして1F12 scfv-Fc抗体には最低限にしか結合しない(図11B)ことを示す、一連のFACSスキャンである。対照的に、LDCA M-Fcは、LDCA M-Fcに最低限の結合を示し(図C)、そして1F12 scfv-Fc融合タンパク質には高い結合を示した(図11D)。Flt3リガンドで処置したマウス由来のCD8<sup>+</sup>脾臓細胞は、LDCA M-Fcおよび1F12 scfv-Fc両方に異質の結合を示した(それぞれ、図11Eおよび11F)。

【図12】図12は、LDCA M対構造(CRTAM)の細胞表面発現が、活性化CD4 50

+ T細胞およびCD8+ T細胞の細胞表面に一時的に発現されるものであることを示す、一連のFACSスキャンである。FACS解析は、CD4+ T細胞上の同族体への細胞表面発現LDCAM-Fc結合が、およそ24時間後に減少することを示した(図12C、12Fおよび12I)。興味深いことに、CD8+ T細胞は、活性化24時間後、CRTAMの細胞表面発現の強い増加を示し(図12D)、そして活性化48時間後および72時間後に細胞表面発現の漸進的な減少を示した(それぞれ図12Gおよび12J)。活性化CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞の細胞表面上のLDCAMの発現は、最小限であり、そして長期に渡って不変であった(図12B、12E、12Hおよび12K)。

【図13】図13Aおよび13Bは、免疫沈降由来のゲルである。図13Aは、活性化CTLからLDCAM-Fcによって免疫沈降したバンドである。図13Bは、骨髓由来DCから1F12 scfv-Fcによって免疫沈降したバンドである。脾臓CD8+ DCで同様の結果が得られた。図13A由来のバンドを切り出し、そして質量分析によって解析して、CRTAMがLDCAMの同族体であることを確証した。

10

【図14】図14は、LDCAMがCRTAMに特異的に結合することを立証するELISAデータを示すグラフである。

【図15】図15は、レンチウイルスベクターを形質導入されたEL4細胞が、細胞表面上にLDCAM(図15A)またはNec11(図15B)を発現することを例示するFACSアッセイを示す。形質導入細胞を可溶性組換えヒトCRTAM-Fcに曝露した。図15Aは、CRTAM-Fcが、LDCAMを発現するように形質導入された細胞に結合する(太線)が、Nec11を発現するように形質導入された細胞には結合しないことを示す(図15B)。

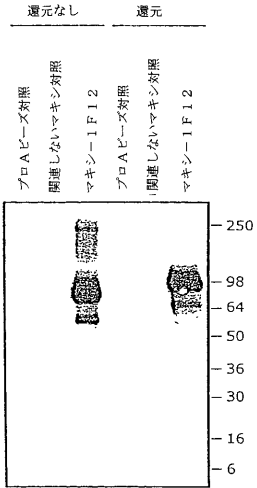
20

【図16】図16は、CRTAMとLDCAM-Fcの架橋が、in vitro活性化マウスCD8+ Tリンパ球によるサイトカイン分泌(IFN)を下方制御することを立証する。

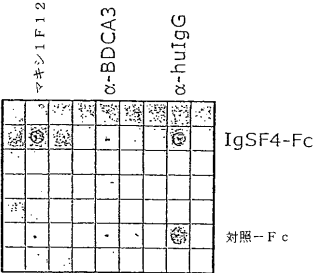
【図17】図17は、CRTAMが、より高い度合いで、マクロファージ、BDCA3+ DC、マスト細胞、活性多発性硬化症白質病巣、活性化NK細胞、混合白血球、およびT細胞で発現されることを示す、示差発現データである。



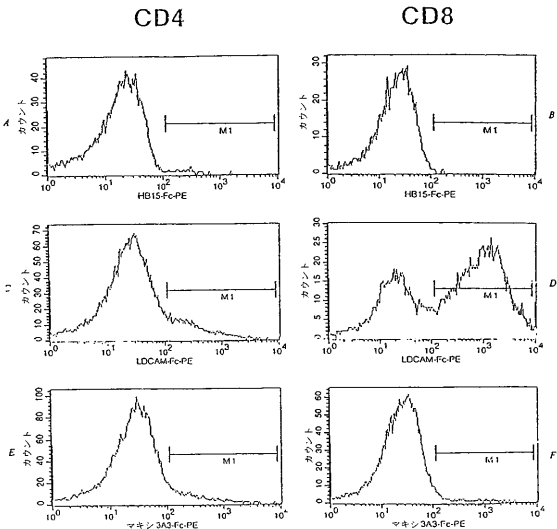
【 図 7 】



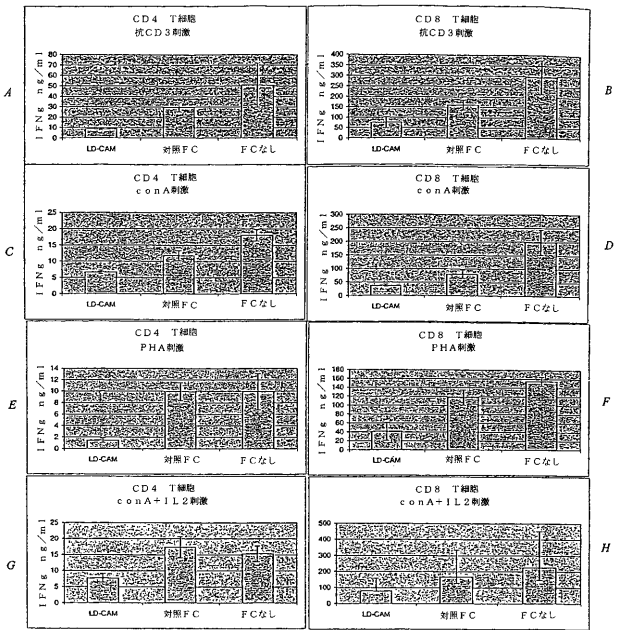
【 図 8 】



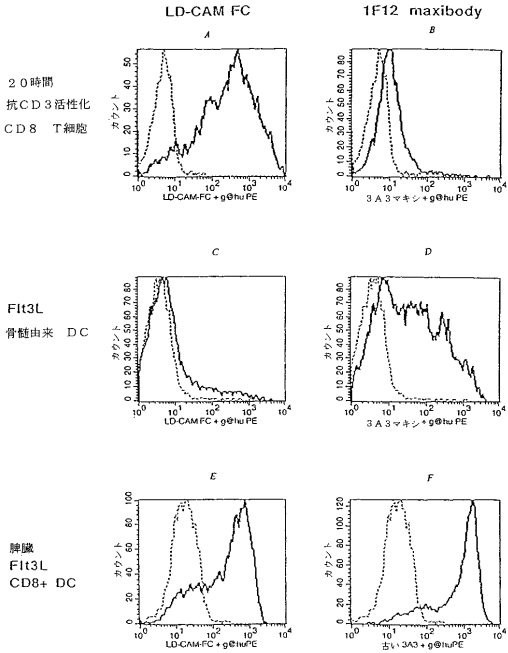
【 図 10 】



【 図 9 】

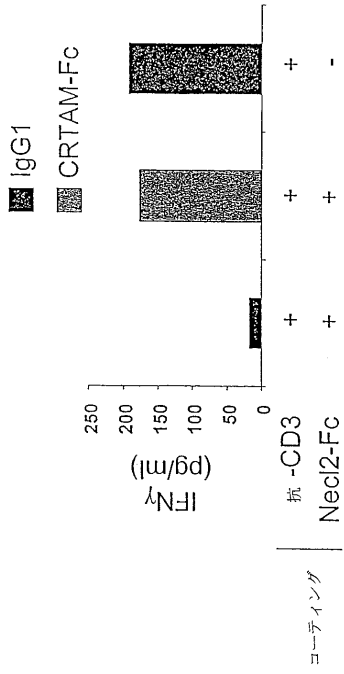


【 図 11 】

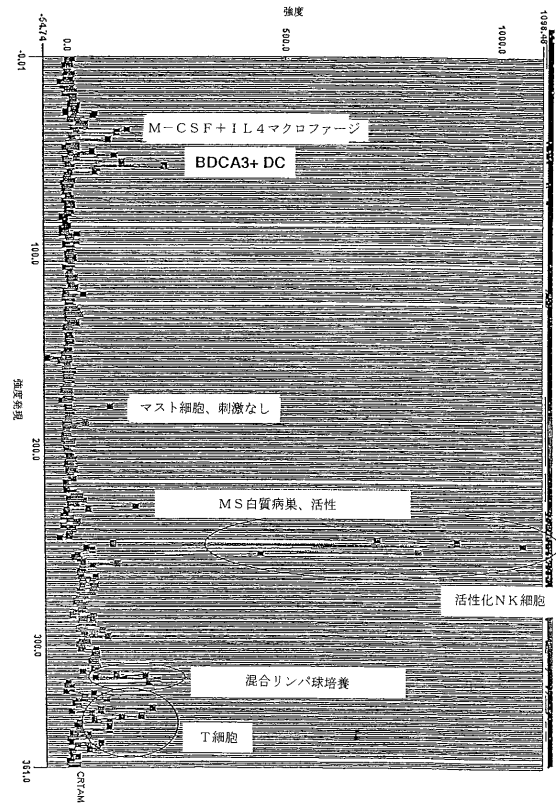




【 図 16 】



【 図 17 】



【 配列表 】

2007500132000001.xml



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern: Application No PCT/US2004/023822
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K14/705 C07K16/18 C12N5/08 G01N33/50 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/13844 A (CAMBRIDGE ANTIBODY TECH ; TEMPEST PHILIP RONALD (GB); THOMSON JULIA EL) 17 April 1997 (1997-04-17) 100% identity in 108 aa overlap to SEQ ID NO:13 -& DATABASE EPO Proteins 'Online! 9 March 1998 (1998-03-09), "Sequence 63 from Patent W09713844." XP002304687 retrieved from EBI accession no. EPOP:A62169 Database accession no. A62169	2,4
A	WO 00/32635 A (IXSYS INC) 8 June 2000 (2000-06-08) 91.3% identity in 120 aa overlap to SEQ ID NO:12	1,4
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* 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		Date of mailing of the international search report
9 November 2004		18.03.05
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Herrmann, K

### INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No  
PCT/US2004/023822

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2002/168712 A1 (BAUM PETER ROBERT ET AL) 14 November 2002 (2002-11-14) the whole document	1-4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2004/023822**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-4

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2004/023822

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

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

1. claims: 1-4

"LDCAM"-specific binding agents comprising the variable chain amino acid sequence according to SEQ ID NO:12 and/or SEQ ID NO:13 and subject-matter relating thereto.

2. claims: 5-8, 22-26 and 27-34

Methods of antagonizing the binding of "LDCAM" and "CRTAM", methods of screening for "LDCAM" antagonists or agonists comprising the use of "LDCAM" and "CRTAM" and subject-matter relating thereto.

3. claims: 9-20

An isolated dendritic cell population, comprising a CD11c+, CD13+, BDCA3+ and LDCAM+ dendritic cell phenotype and subject-matter relating thereto.

4. claim: 21

Methods of screening for "LDCAM" antagonists or agonists comprising combining an isolated "LDCAM" polypeptide with a test compound.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US2004/023822

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9713844	A	17-04-1997	AT 190650 T	15-04-2000
			AT 199091 T	15-02-2001
			AU 702049 B2	11-02-1999
			AU 7140596 A	30-04-1997
			CA 2233042 A1	17-04-1997
			DE 69607191 D1	20-04-2000
			DE 69607191 T2	28-09-2000
			DE 69611766 D1	15-03-2001
			DE 69611766 T2	02-08-2001
			DK 945464 T3	07-05-2001
			EP 0853661 A1	22-07-1998
			EP 0945464 A1	29-09-1999
			ES 2146020 T3	16-07-2000
			ES 2156035 T3	01-06-2001
			WO 9713844 A1	17-04-1997
			GB 2305921 A ,B	23-04-1997
			GR 3033436 T3	29-09-2000
			GR 3035775 T3	31-07-2001
			JP 2000500643 T	25-01-2000
			PT 853661 T	31-08-2000
PT 945464 T	31-07-2001			
WO 0032635	A	08-06-2000	US 6787638 B1	07-09-2004
			CA 2353703 A1	08-06-2000
			EP 1135416 A2	26-09-2001
			WO 0032635 A2	08-06-2000
			US 2005003469 A1	06-01-2005
US 2002168712	A1	14-11-2002	US 2004204568 A1	14-10-2004
			AU 776825 B2	23-09-2004
			AU 5550399 A	28-02-2000
			CA 2337100 A1	17-02-2000
			EP 1102848 A2	30-05-2001
			JP 2002523021 T	30-07-2002
			NZ 510356 A	24-12-2004
			WO 0008158 A2	17-02-2000

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 39/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00	Z 4 H 0 4 5
<b>C 1 2 N 5/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/12	
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/02	
<b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00	E
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	
<b>C 0 7 K 14/47 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50	Z
	G 0 1 N 33/15	Z
	C 0 7 K 14/47	

(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, MA, 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

(74) 代理人 100128750

弁理士 福所 しのぶ

(72) 発明者 ガリベール, ローラン・ジェイ

フランス国 0 1 2 8 0 プレヴッサン・モワン, プロムナード・ドゥ・ラ・ゴタス 2 5 0 アー

(72) 発明者 ヤン, ウェイ

アメリカ合衆国ワシントン州 9 8 0 2 9, イッサクワ, トゥーハンドレッドフォーティセブンス・ブレース・サウスイースト 4 5 4 9

F ターム(参考) 2G045 AA34 CB01 FB03

4B063 QA18 QQ08 QR48 QR77 QS25 QS32 QX02

4B065 AA90X BD39 CA46

4C084 AA02 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 CA01 CA03 CA53 CA56

DA27 NA14 ZB082 ZB222 ZC412

4C085 AA02 AA03 AA13 AA14 BA07 BA51 BB01 BB11 DD61 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 EA20 EA50

FA74