

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-254914

(P2006-254914A)

(43) 公開日 平成18年9月28日(2006.9.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 B O 6 5
審査請求 有 請求項の数 72 O L (全 51 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-77210 (P2006-77210)	(71) 出願人	594095671
(22) 出願日	平成18年3月20日 (2006.3.20)		ザ ボード オブ トラスティーズ オブ
(62) 分割の表示	特願2005-54684 (P2005-54684) の分割		ザ リーランド スタンフォード ジュ
原出願日	平成7年2月6日 (1995.2.6)		ニア ユニバーシティ
(31) 優先権主張番号	08/195,967		The Board of Truste
(32) 優先日	平成6年2月10日 (1994.2.10)		es of the Leland St
(33) 優先権主張国	米国 (US)		anford Junior Unive
			rsity
			アメリカ合衆国 94305-1850
			カリフォルニア, パロアルト, ウェルチロ
			ード 900番地, スイート350
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 活性化CD4+T細胞の表層上のレセプターに対するリガンド (ACT-4-L)

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 CD4<sup>+</sup>T-細胞表面上の受容体に対する新規なリガンドの提供。

【解決手段】 ATCC HB11483として寄託されているハイブリドーマHBL106により生成される、L106と称するモノクローナル抗体以外であり、しかも、ある特定の配列で示されるアミノ酸配列以外のアミノ酸配列を有する、ACT-4受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナー、および、当該特異的結合パートナーをコードする核酸セグメントの提供。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) ATCC HB11483として寄託されているハイブリドーマHBL106により生成される、L106と称するモノクローナル抗体以外であり；そして

(b) 図10-1～図10-2に示される完全なアミノ酸配列以外のアミノ酸配列を有する、ACT-4受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナー。

## 【請求項 2】

抗体の形でリガンド以外である請求の範囲第1項記載の特異的結合パートナー。

## 【請求項 3】

図10-1～図10-2に示されるアミノ酸配列のフラグメント、変異体、突然変異体又は誘導体、又はそれらの相同体又は類似体であり、場合によっては、接合体又は複合体の形で存在する請求の範囲第1又は2項記載の特異的結合パートナー。 10

## 【請求項 4】

毒素又はラベルをさらに含んで成る接合体又は複合体の形で存在する請求の範囲第1項記載の特異的結合パートナー。

## 【請求項 5】

図5-1～図5-2に示されるアミノ酸配列からの少なくとも5個の隣接したアミノ酸のセグメントを有する請求の範囲第3項記載の特異的結合パートナー。

## 【請求項 6】

図10-1～図10-2のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の配列の同一性を示す請求の範囲第5項記載の特異的結合パートナー。 20

## 【請求項 7】

図10-1～図10-2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質に共通する抗原決定基を有する請求の範囲第1～6のいずれか1項記載の特異的結合パートナー。

## 【請求項 8】

細胞内ドメイン、トランスメンブランダドメイン又は細胞外ドメインを含んで成る請求の範囲第1～7のいずれか1項記載の特異的結合パートナー。

## 【請求項 9】

細胞外ドメインを含んで成る請求の範囲第8項記載の特異的結合パートナー。

## 【請求項 10】

図10-1～図10-2に示されるACT-4受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナーの細胞外ドメインからの少なくとも5個の隣接したアミノ酸を有する細胞外ドメインを含んで成り；図10-1～図10-2の特異的結合パートナーの細胞外ドメインが、図10-1～図10-2にまた示される核酸配列のSmaI部位の下流のC-末端領域に位置する請求の範囲第9項記載の特異的結合パートナー。 30

## 【請求項 11】

前記細胞外ドメインが完全な長さである請求の範囲第10項記載の特異的結合パートナー。

## 【請求項 12】

グリコシル化される請求の範囲第1～11のいずれか1項記載の特異的結合パートナー。 40

## 【請求項 13】

結合されたポリペプチドをさらに含んで成る請求の範囲第1～12のいずれか1項記載の特異的結合パートナー。

## 【請求項 14】

前記結合されたポリペプチド配列が共有結合される請求の範囲第13項記載の特異的結合パートナー。

## 【請求項 15】

ポリペプチド鎖が、前記特異的結合パートナーに対応するアミノ酸配列及びさらに、前記結合されたポリペプチドに対応するアミノ酸配列を含んでいる融合タンパク質を含んで成る請求の範囲第13項記載の特異的結合パートナー。 50

- 【請求項 16】  
前記結合されたポリペプチドが免疫グロブリンの不変領域である請求の範囲第13項記載の特異的結合パートナー。
- 【請求項 17】  
可溶性形で存在する請求の範囲第1～15のいずれか1項記載の特異的結合パートナー。
- 【請求項 18】  
ラベル化される請求の範囲第1～17のいずれか1項記載の特異的結合パートナー。
- 【請求項 19】  
それらの表面上に ACT-4 受容体を発現する CD4<sup>+</sup> T細胞のインビトロ活性化を示す請求の範囲第1～18のいずれか1項記載の特異的結合パートナー。 10
- 【請求項 20】  
それらの表面上に ACT-4 受容体を発現する CD4<sup>+</sup> T細胞のインビトロ活性化を刺激する請求の範囲第1～19のいずれか1項記載の特異的結合パートナー。
- 【請求項 21】  
抗体への結合のために図10-1～図10-2に示される特異的結合パートナーと競争するフラグメントを含んで成る請求の範囲第1～20のいずれか1項記載の特異的結合パートナー。
- 【請求項 22】  
結合成分が ACT-4 受容体ポリペプチド以外であり、そして図10-1～図10-2に示される完全なアミノ酸配列を有するポリペプチドと交差反応しない請求の範囲第1～21のいずれか1項記載の特異的結合パートナーに対して特異性を有する結合成分。 20
- 【請求項 23】  
抗体結合ドメインを含んで成る請求の範囲第22項記載の結合成分。
- 【請求項 24】  
(a) ヒト抗体結合ドメインの一部又はすべて；又は  
(b) 抗体のヒト適合化された部分、  
を含んで成る、ACT-4 受容体ポリペプチドに対する特異性を有する結合成分。
- 【請求項 25】  
抗体のヒト適合された部分及び非ヒト抗体結合ドメインを含んで成る請求の範囲第22項記載の結合成分。 30
- 【請求項 26】  
抗体の Fab または F(ab)<sub>2</sub> を含んで成る請求の範囲第24項記載の結合成分。
- 【請求項 27】  
モノクローナル抗体を含んで成る請求の範囲第23～26のいずれか1項記載の結合成分。
- 【請求項 28】  
ヒト適合された H鎖及びヒト適合化された L鎖を含んで成るヒト適合化されたモノクローナル抗体を含んで成り、  
(1) 前記ヒト適合化された L鎖が、ACT-4-L-h-1 リガンドの細胞外ドメインに特異的に結合する非ヒト抗体の L鎖の対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列を有し、そしてヒト L鎖可変領域骨格配列に実質的に同一の可変領域骨格配列を有する3種の相補性決定領域 (CDR1, CDR2及びCDR3) を含んで成り；そして 40  
(2) 前記ヒト適合化された H鎖が、非ヒト抗体の H鎖の対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列を有し、そしてヒト H鎖可変領域骨格配列に実質的に同一の可変領域骨格配列を有する3種の相補性決定領域 (CDR1, CDR2及びCDR3) を含んで成り；  
ここで前記ヒト適合化された抗体が、10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> の下限及び非ヒト抗体の結合親和性の5倍内である上限を有する結合親和性を伴って ACT-4-L-h-1 の細胞外ドメインに特異的に結合する請求の範囲第27項記載の結合成分。
- 【請求項 29】  
前記 ACT-4 受容体ポリペプチド又は ACT-4-L-h-1 リガンドのための特異的結合パートナーが B細胞の表面上に存在し、そして前記特異的結合パートナー又はリガンド 50

への結合成分の結合が B 細胞の活性化を阻害する請求の範囲第 22 ~ 28 のいずれか 1 項記載の結合成分。

【請求項 30】

前記 ACT - 4 受容体ポリペプチド又は ACT - 4 - L - h - 1 リガンドのための特異的結合パートナーが B 細胞の表面上に存在し、そして前記特異的結合パートナー又はリガンドへの結合成分の結合が B 細胞の活性化を刺激する請求の範囲第 22 ~ 28 のいずれか 1 項記載の結合成分。

【請求項 31】

前記 ACT - 4 受容体ポリペプチド又は ACT - 4 - L - h - 1 リガンドのための特異的結合パートナーが B 細胞の表面上に存在し、そして前記リガンドへの抗体の結合が CD4<sup>+</sup> T - 細胞を活性化する B - 細胞の能力を阻害する請求の範囲第 22 ~ 28 のいずれか 1 項記載の結合成分。

10

【請求項 32】

ACT - 4 受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナーの細胞外ドメインに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を含んで成る結合成分。

【請求項 33】

図 10 - 1 ~ 図 10 - 2 に示される完全なアミノ酸配列をコードする核酸配列以外の核酸配列を有する ACT - 4 受容体ポリペプチドの一部又はすべてのための特異的結合パートナーをコードする核酸セグメント。

【請求項 34】

請求の範囲第 1 ~ 19 のいずれか 1 項記載の特異的結合パートナーをコードする核酸セグメント。

20

【請求項 35】

図 10 - 1 ~ 図 10 - 2 に示される配列の 5' - 未翻訳領域のヌクレオチド 1 と 112 との間の少なくとも 25 個の隣接するヌクレオチドを含んで成る請求の範囲第 33 項記載の核酸セグメント。

【請求項 36】

図 10 - 1 ~ 図 10 - 2 に示される配列からの 15 ~ 500 個の隣接するヌクレオチドを有する請求の範囲第 33 項記載の核酸セグメント。

【請求項 37】

請求の範囲第 22 ~ 32 のいずれか 1 項記載の結合成分をコードする核酸配列。

30

【請求項 38】

請求の範囲第 33 ~ 37 のいずれか 1 項記載の核酸セグメントを含む複製可能な発現ベクター。

【請求項 39】

請求の範囲第 38 項記載の発現ベクターを含むように形質転換されている原核又は真核宿主生物。

【請求項 40】

それらの表面上に ACT - 4 受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナーを発現する B - 細胞に実質的に富んでいる単離された細胞集団。

40

【請求項 41】

その表面上に ACT - 4 受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナーを発現する単離された安定細胞系。

【請求項 42】

ATCC HB11483 として寄託されたハイブリドーマ HBL106 により生成された L106 と称するモノクローナル抗体以外である ACT - 4 受容体のための特異的結合パートナー、及び医薬的に許容できるキャリアーを含んで成る医薬組成物。

【請求項 43】

医薬的に許容できるキャリアーと組合して、請求の範囲第 1 ~ 19 のいずれか 1 項記載の特異的結合パートナーを含んで成る医薬組成物。

50

## 【請求項 4 4】

医薬的に許容できるキャリアーと組合して、図10-1～図10-2に示されるアミノ酸配列又はそのフラグメント、変異体、突然変異体又は誘導体を有する ACT-4 受容体のための特異的結合パートナーを含んで成る医薬組成物。

## 【請求項 4 5】

医薬的に許容できるキャリアーと組合して、ACT-4 受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナーに対して特異性を有する ACT-4 受容体ポリペプチド以外の結合成分を含んで成る医薬組成物。

## 【請求項 4 6】

前記結合成分が請求の範囲第22～32のいずれか1項記載のようなものである請求の範囲第45項記載の医薬組成物。 10

## 【請求項 4 7】

請求の範囲第42～46のいずれか1項記載の医薬組成物の有効量を投与することを含んで成る、患者における免疫応答を改良するための方法。

## 【請求項 4 8】

前記投与段階がエクスピボで実施される請求の範囲第47項記載の方法。

## 【請求項 4 9】

前記患者の免疫応答が抑制される請求の範囲第47又は48項記載の方法。

## 【請求項 5 0】

移植片拒絶、GVHD、自己免疫疾患、炎症、感染剤、HTVL感染された細胞又はHIVの処理に使用するための請求の範囲第47～49のいずれか1項記載の方法。 20

## 【請求項 5 1】

炎症性腸疾患又は障害の処理に使用するための請求の範囲第47～49のいずれか1項記載の方法。

## 【請求項 5 2】

免疫応答の改良に使用するための請求の範囲第1～21のいずれか1項記載の特異的結合パートナー又は請求の範囲第22～32のいずれか1項記載の結合成分。

## 【請求項 5 3】

ACT-4を認識できる免疫調節剤のためのスクリーニング方法であって、

ACT-4 受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナーと試験されるべき材料とを接触せしめ；そして 30

前記特異的結合パートナーと試験下の材料との間の結合を検出することを含んで成る方法。

## 【請求項 5 4】

その特異的結合パートナーにより ACT-4 受容体ポリペプチドの認識に影響を及ぼすことができる免疫調節剤のためのスクリーニング方法であって、(a) ACT-4 受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナー、(b) ACT-4 受容体又はその特異的結合類似体及び(c) 試験下の剤と一緒に接触せしめ；そして成分(a)と(b)との間の結合を検出することを含んで成る方法。

## 【請求項 5 5】

前記 ACT-4 受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナーが個体表面に固定されている請求の範囲第54項記載の方法。 40

## 【請求項 5 6】

選択された抗原に対する免疫応答を誘発するための方法であって、

請求の範囲第30項記載の結合成分を患者に投与し；そして

前記選択された抗原に患者を暴露することを含んで成る方法。

## 【請求項 5 7】

活性化された CD4<sup>+</sup> T-細胞をモニターするための方法であって、

ACT-4 受容体の細胞外ドメインに特異的に結合する ACT-4 受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナーと細胞とを接触せしめ；そして 50

前記活性化されたCD4<sup>+</sup> T - 細胞の存在を示すために前記特異的結合パートナーと前記細胞との間の特異的結合を検出することを含んで成る方法。

【請求項58】

前記細胞が、患者からの組織サンプルを含んで成り、そして前記方法がインビトロで実施される請求の範囲第57項記載の方法。

【請求項59】

ヒト免疫欠損ウイルスによりCD4<sup>+</sup> T - 細胞の感染を阻害するための方法であって、ACT - 4受容体の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体とCD4<sup>+</sup> T - 細胞とを接触せしめることを含んで成る方法。

【請求項60】

ACT - 4に結合できる、図10 - 1 ~ 図10 - 2に示されるタンパク質の細胞外ドメインからの少なくとも5個の隣接するアミノ酸、又はその突然変異体、変異体又は誘導体を含んで成る細胞外ドメイン。

【請求項61】

請求の範囲第1 ~ 21のいずれか1項記載のACT - 4受容体のための特異的結合パートナーを含んで成る、活性化されたCD4<sup>+</sup> T - 細胞を検出するためのキット。

【請求項62】

患者の免疫応答の改良に使用するための医薬の調製に使用するための、請求の範囲第1 ~ 21のいずれか1項記載の特異的結合パートナー又は請求の範囲第22 ~ 32のいずれか1項記載の結合成分。

【請求項63】

請求の範囲第39項記載の宿主生物を培養することを含んで成る、請求の範囲第1 ~ 21のいずれか1項記載のACT - 4受容体のための特異的結合パートナー又は請求の範囲第22 ~ 32のいずれか1項記載の結合成分を生成するための方法。

【請求項64】

ACT - 4受容体又はその特異的結合類似体の認識のために特異的結合反応への、図10 - 1 ~ 図10 - 2に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチド又は請求の範囲第1項記載の特異的結合パートナーの使用。

【請求項65】

図10 - 1 ~ 図10 - 2に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド又は請求の範囲第1項記載の特異的結合パートナーの認識のために特異的結合反応へのACT - 4受容体又はその特異的結合類似体の使用。

【請求項66】

ACT - 4と特異的に結合できる特異的結合剤である可溶性ポリペプチド。

【請求項67】

図10 - 1 ~ 図10 - 2のアミノ酸配列を有するが、但しそのトランスメンブランサブ配列を除く請求の範囲第66項記載のポリペプチド。

【請求項68】

トランスメンブラン配列によりリポソームの調製物の表面上に担持される、請求の範囲第1項記載の特異的結合パートナー又は図10 - 1 ~ 図10 - 2に示される完全なアミノ酸配列を有する特異的結合パートナーポリペプチドを含んで成る組成物。

【請求項69】

組織サンプル、たとえば生検サンプル又は血液サンプルにおけるACT - 4受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナーを含んで成る分析物を検出するための方法であって、分析物を認識できる特異的結合剤を含んで成る第1試薬、及び分析物として類似するか又は相補的な結合特異性の特異的結合剤を含んで成る第2試薬と分析物を接触せしめ、前記第2試薬のためのラベルを供給し、そして前記第2試薬のそのパートナーへの特異的結合を検出し又は定量化することを含んで成る方法。

【請求項70】

組織サンプル、たとえば生検サンプル又は血液サンプルにおけるACT - 4受容体ポリペ

10

20

30

40

50

プチドのための特異的結合パートナーに対して相補的結合特異性を有する物質を含んで成る分析物を検出するための方法であって、ACT-4受容体ポリペプチドのための特異的結合パートナーを含んで成る第1試薬、及び分析物として類似するか又は相補的な結合特異性の特異的結合剤を含んで成る第2試薬と分析物とを接触せしめ、前記第2試薬のためのラベルを提供し、そして前記第2試薬のそのパートナーへの特異的結合を検出し又は定量化することを含んで成る方法。

【請求項71】

炎症状態、たとえば炎症性腸疾患又は障害をたぶん有する患者からの生検サンプルに対して実施される、炎症状態の検出のための請求の範囲第69又は70項記載の診断方法。

【請求項72】

ACT-4受容体ポリペプチド又はACT-4受容体のための特異的結合パートナー又はその特異的結合類似体を含んで成る分析物の検出又は定量化のための特異的結合アッセイを実施するためのキットであって、分析物を認識できる特異的結合剤を含んで成る第1試薬、分析物として類似するか又は相補的な結合特異性の特異的結合剤を含んで成る第2試薬、及び前記第2試薬のためのラベル(たとえば放射性ラベル又は酵素ラベル)を含んで成るキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般に活性化CD4<sup>+</sup>T細胞の表層上のレセプターに対するリガンド(ACT-4-L)の単離及び特性決定に関する。本発明は更にこのリガンドに対する抗体、免疫応答をモニター及び/又は調節するためにこのリガンド及び抗体を利用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫応答は白血球と呼ばれる末梢血液細胞の多様な集団により主に媒介される。白血球にはリンパ球、顆粒球及び単球が含まれる。顆粒球は更に好中球、好酸球及び好塩基球に細分類される。T-リンパ球は胚のリンパ球前駆細胞を起源とする。分化は胸腺の中で起こり、そして前胸腺細胞、皮質胸腺細胞、次いで骨髓質胸腺細胞中間体段階を経て様々なタイプの成熟T-細胞となる。これらのサブタイプには、CD8<sup>+</sup>T細胞(細胞障害性/サブレンサーT細胞としても知られる)であって活性化したときに標的細胞を溶解せしめる能力を有する細胞、及びCD4<sup>+</sup>T細胞(Tヘルパー及びTインデューサー細胞としても知られる)であって活性化したときにその他の免疫系細胞タイプを刺激する能力を有する細胞が含まれる。

【0003】

免疫系応答はいくつかの異なる状況において誘導される。最も頻繁な応答は感染性微生物に対する所望の防御である。しかしながら、望ましくない免疫応答が、外来組織の移植の後に、又は自己免疫疾患(それにおいては身体自体の抗原の一つが免疫応答に対する標的となる)において生じうる。免疫応答は、マイトジェン又は一定のレセプターに対する抗体によってインビトロにおいて開始させることもできる。

【0004】

これらの各状況において、免疫応答は白血球細胞タイプ間の複雑な相互作用を介する刺激性現象により変換される。しかしながら、関与する細胞タイプ及び細胞タイプ間の相互作用の種類は種々の刺激性現象で異なりうる。例えば、侵入する細菌に対する免疫応答は往々にしてMHCクラスIIレセプターと細菌抗原との間での複合体の形成により変換され、それはその後CD4<sup>+</sup>T細胞を活性化する。一方、ウィルス感染に対する免疫応答は主にMHCクラスI/ウィルス抗原複合体の形成及びそれに続くCD8<sup>+</sup>細胞の活性化により変換される。

【0005】

ここ数年、多くの白血球細胞表層抗原が同定されており、その一部はシグナル変換において機能していることが示されている。シグナルは細胞表層レセプターと、可溶性リガン

10

20

30

40

50

ド又は細胞表層結合型リガンドのいずれかとの間で変換されることが見い出されている。白血球表層分子のアミノ酸配列はいくつかの特徴的な反復 (recurring) 配列又はモチーフを含んで成る。これらのモチーフは進化に参与し、類似のフォルディングパターンを有し、そして類似のタイプの相互作用を媒介するものと推定されている。イムノグロブリン及び神経成長因子レセプタースーパーファミリーを含むいくつかのスーパーファミリーが述べられている。

【0006】

神経成長因子レセプターファミリーの構成員には、神経細胞上に見い出せるNGFR; B細胞抗原CD40; 活性化CD4<sup>+</sup>細胞上に見い出せるラットのOX-40抗原 (Malletら、EMBO J. 9:1063-1068 (1990)) (引用することで本明細書に組入れる); 腫瘍壊死因子 (TNF) に対する様々な細胞タイプ上に見い出せる2種類のレセプター LTNFR-1及びTNFR-II; T細胞上に見い出せる4-1BB; ショープ (Shope) フィブロマウシルスのオープンリーディングフレームである SFV-T2; 並びに可能性としては fas, CD27及びCD30が含まれる。一般的には Mellet & Barclay, Immunology Today 12:220-222 (1990) (引用することで本明細書に組入れる) を参照のこと。

10

【0007】

細胞表層レセプターの同定は、移植拒絶、自己免疫疾患及び炎症の如くの望ましくない免疫応答を抑制するための新たな因子を示唆せしめた。免疫細胞のレセプターが可溶性分子又は細胞結合型レセプターに結合するのを阻止する因子、特に抗体が、免疫応答を損わせることができる。理想的には、因子は望ましくない免疫応答 (例えば移植拒絶) のみをブロックし、所望の応答 (例えば病原性微生物に対する応答性) を及ぼす残留能力を残したままとすべきである。いくつかの因子、例えばCD3レセプター及びIL-2レセプターに対する抗体の免疫抑制作用は既に臨床試験において試験されている。いくつかの試験は良い結果を示しているが、重要な問題が残っている。

20

【0008】

第1に、患者はこのブロック因子に対する免疫応答をもつようになることがあり、これは別の因子を得ることができない限り、持続式の免疫抑制効果を阻止する。

第2に、標的抗原を発現する細胞は、免疫機能を残したまま、その抗原を発現することをやめることによってそのブロック因子の存在に適用できるようになりうる。この状況においては、単独の免疫抑制因子による持続式処置は無効となる。

30

【0009】

第3に、治療剤に関する多くの標的は1種より多くの白血球サブタイプの上に乗っているものであり、その結果特定の細胞性サブタイプのみを応答を選択的にブロック又は排除し、それ故感染性微生物を打倒するための無傷の残留免疫能力を残すことは一般に可能ではない。

以上に基づき、免疫応答を抑制できる追加の、且つ改善された因子、特に選択的抑制の可能な因子についてのニーズがあることが明らかである。本発明は、活性化ヒトCD4<sup>+</sup>T-リンパ球上に局在するレセプターに対するリガンド (ACT-4-L) を提供することにより、このような及びその他のニーズをある程度満足せしめる。

【0010】

図10-1~図10-2に示す完全アミノ酸配列は Muiraら、Mol. Cell Biol. 11 (1991) 1313-1325において開示されており、gp 34タンパク質を含んで成るとなっているが、このタンパク質についての用途は認識されていない。このタンパク質に対する抗体を生起させた。

40

【発明の開示】

【0011】

本発明は ACT-4レセプターポリペプチドに対する特異的結合性パートナーを提供し、これは

(a) ATCC HB11483として寄託されたハイブリドーマHBL106により生産されるL106と命名されているモノクローナル抗体以外のものである; そして

50

(b) 図10-1 ~ 図10-2 に示す完全アミノ酸配列以外のアミノ酸配列を有する。

【0012】

詳しくは、本発明は抗体以外のものである精製 ACT-4-L リガンドポリペプチドに関する。適切には、この特異的結合性パートナーは図10-1 ~ 図10-2 に示すアミノ酸配列のフラグメント、変異体、突然変異体もしくは誘導体、又はその類似体の同族体を含んで成り；任意的にはコンジュゲート又は複合体の形態をとっている。この特異的結合性パートナーは、ACT-4-L-h-1 と命名され、且つ図10-1 ~ 図10-2 に示した代表的な ACT-4-L リガンドのアミノ酸に由来するセグメント、又は少なくとも5個、そして適切には5 ~ 160 個の連続アミノ酸を有するポリペプチドを含んで成りうる。このポリペプチドは通常 ACT-4-h-L-1 配列と少なくとも80%の配列同一性を示し、そして往々にして ACT-4-L-h-1 リガンドと共通の抗原決定基を共有する。このポリペプチドは通常細胞内ドメイン、トランスメンブランダドメイン又は細胞外ドメイン、好ましくは細胞外ドメインを含んで成る。

10

【0013】

本発明は ACT-4-L-リガンドの精製細胞外ドメインも提供する。これらのドメインは全長 ACT-4-L-h-1 細胞外ドメインに由来する少なくとも5個の連続アミノ酸を含んで成る。この細胞外ドメインは、C-末端領域に位置し、図10-1 ~ 図10-2 において示す核酸配列の SmaI 部位の下流にある。これらの細胞外ドメインの一部は全長型である。その他の細胞外ドメインは全長ドメインのフラグメントである。一部の細胞外ドメインは ACT-4-L-h-1 リガンドに特異的に結合する。その他の細胞外ドメインは ACT-4-L-h-1 の典型的なレセプターに特異的に結合し、そのレセプターは ACT-4-h-1 と命名されている。一部の細胞外ドメインは、特定の機能特性、例えば ACT-4-h-1 レセプターに特異的に結合する能力を有するドメインより本質的に成る。従って、本発明は図10-1 ~ 図10-2 において示すタンパク質の細胞外ドメイン由来の少なくとも5個の連続アミノ酸配列を含んで成る細胞外ドメイン、又は ACT-4 と結合できるその突然変異体、変異体もしくは誘導体も提供する。

20

【0014】

一部の特異的結合性パートナー、例えば細胞外ドメインは表層上に ACT-4-h-1 レセプターを発現する CD4<sup>+</sup> T 細胞のインビトロ活性化を阻害する。その他の特異的結合性パートナー、例えば細胞外ドメインはかかる T 細胞のインビトロ活性化を刺激する。特異的結合性パートナーがリガンドフラグメントであるとき、これは図10-1 ~ 図10-2 に示す特異的に結合性のパートナーと、抗体に対する結合について競合しうる。

30

【0015】

細胞外ドメインを含む上記の任意の特異的結合性パートナーは更に、共有結合的にコンジュゲートされた、又は融合タンパク質の一部を構成しうる連結第2ポリペプチドを含んで成りうる。適当な連続ポリペプチドには、イムノグロブリン重鎖の定常領域、並びに毒素又はラベルが含まれる。

【0016】

本発明の特異的結合性パートナーは適切には可溶性形態であり、且つラベル化されていてよい。特に、本発明は可溶性ポリペプチドを提供し、それは ACT-4 に特異的に結合することのできる特異的結合性因子である。かかるポリペプチドは、図10-1 ~ 図10-2 のアミノ酸配列を有するであろうが、ただしそのトランスメンブランス配列は除く。

40

【0017】

本発明は更に、ACT-4-L-h-1 リガンドに特異的に結合するドメインより本質的に成る ACT-4 レセプターポリペプチドを提供する。

本発明は更に、ACT-4-L-h-1、好ましくはその細胞外ドメインに特異的に結合する抗体の如くの結合性成分を考慮する。

本発明は更に任意の上記の特異的結合性パートナーに特異的な結合性成分を提供し、その結合性成分は ACT-4 レセプターポリペプチド以外のものであり、そして図10-1 ~ 図10-2 に示す完全アミノ酸配列を有するポリペプチドとは交差反応性でない。

50

適切には、この結合性成分は抗体結合性ドメインを含んで成る。

【0018】

更に、本発明は ACT-4 レセプターポリペプチドに特異的な結合性成分を提供し、これは (a) ヒトの抗体結合性ドメインの一部もしくは全体、又は (b) 抗体のヒト型領域を含んで成る。好適な抗体はヒト型抗体、例えばヒト型領域と非ヒト抗体結合性ドメインを含んで成る抗体、及びヒト抗体である。ヒト型抗体の例は以降により詳しく説明する。

【0019】

この結合性成分は様々な結合特異性を有する。例えば、一部のヒト型抗体は B 細胞の表層上の ACT-4-L-h-1 リガンドに特異的に結合し、B 細胞の活性化を阻害する。その他の抗体は B 細胞の活性化を刺激する。その他の抗体は B 細胞の表層上の ACT-4-L

10

h-1 リガンドに特異的に結合し、B 細胞が CD4<sup>+</sup> T 細胞を活性化する能力を阻害する。  
抗体はモノクローナル抗体であってよい。この結合性成分は抗体の Fab 又は F(ab)<sub>2</sub> を含んで成りうる。

【0020】

本発明の更なる観点は、ACT-4 レセプターの特異的結合性パートナー、例えば上記のものをコードする核酸セグメント (図10-1~図10-2に示す完全アミノ酸配列をコードする核酸セグメント以外のセグメント)、又は上記の結合性成分をコードする核酸セグメントを含んで成る。これらの核酸セグメントは、適当な複製可能発現ベクターへの組込み及び原核細胞又は真核細胞であってその後培養せしめる宿主細胞への組込みにより、関連

20

【0021】

別の観点において、本発明は薬理組成物に関する。本発明は、ATCC HB11483として寄託されたハイブリドーマ HBL106により生産される L106と命名されたモノクローナル抗体以外のものである ACT-4 レセプターに対する特異的結合性パートナーと、薬理的に許容される担体との組合せを含んで成る薬理組成物を提供する。この薬理組成物は適切には薬理的に活性な担体と、上記した如くの ACT-4-L-h-1 リガンドの細胞外ドメインに特異的に結合する因子とを含んで成る。他方、本発明は図10-1~図10-2に示すアミノ酸配列を有する ACT-4 レセプター又はそのフラグメント、変異体、突然変異体もしくは

30

【0022】

適当な組成物は、例えばトランスメンブラン配列を介してリポソーム製剤の表層上に担持された、上記の特異的結合性パートナー又は図10-1~図10-2に示す完全アミノ酸配列を有する特異的結合性パートナーポリペプチドを含んで成る。

【0023】

本発明は更に患者の免疫応答を改善する方法、例えば免疫応答を抑制する方法を提供し、この方法は有効な量の上記のもの如くの薬理組成物を投与することを含んで成る。この投与は生体外で実施してよい。好適な因子はモノクローナル抗体 ACT-4-L リガンド

40

【0024】

本発明は更に ACT-4 を認識することのできる免疫調節因子についてスクリーニングする方法を提供し、この方法は：

ACT-4 レセプターポリペプチドに対する特異的結合性パートナーを試験すべき物質と

50

接触させる；そして

この特異的結合性パートナーとこの因子、即ち試験する物質との結合を検出する；  
ことを含んで成る。

【0025】

他方、本発明は特異的結合性パートナーによる ACT-4 レセプターポリペプチドの認識に影響を及ぼすことのできる免疫調節因子についてスクリーニングする方法を提供し、この方法は：(a) ACT-4 レセプターポリペプチドに対する特異的結合性パートナー；(b) ACTレセプター又はその特異的結合性類似体；及び(c) 試験する因子；とを互いに接触させ；そして成分(a)と(b)との結合力を検出する；ことを含んで成る。適切には、ACT-4 レセプターに対する特異的結合性パートナーを固相表面に固定する。

10

【0026】

この方法は免疫抑制因子をスクリーニングするための方法に利用でき、この場合においてはこの方法は、特異的結合性パートナー、特に ACT-4-L-h-1 リガンドポリペプチドを潜在性の免疫抑制因子と接触させることを含んで成る。ACT-4-L-h-1 リガンドポリペプチドとこの因子との特異的な結合を検出する。この特異的な結合は免疫抑制活性の指標である。

【0027】

更なる観点において、本発明は選定した抗原に対する免疫応答を誘導する方法を提供し、この方法は

上記の適当な結合性成分を患者に投与する；そして

その患者を選定の抗原に暴露する；

ことを含んで成る。

20

【0028】

本発明は更に活性化CD4<sup>+</sup> T細胞をモニターする方法を提供する。この方法は細胞、例えば患者由来の組織サンプルを、ACT-4 レセプターに対する特異的結合性パートナー、例えば ACT-4-L-リガンドポリペプチドであって ACT-4-h-1 レセプターの細胞外ドメインに特異的に結合するものと接触させることを含んで成る。ACT-4-Lリガンドポリペプチドと組織サンプルとの特異的な結合は、活性化CD4<sup>+</sup> T細胞の存在を示唆するために検出する。この方法はインビトロで行うのが好適である。

【0029】

更なる観点において、本発明はひと免疫不全ウイルスによるCD4<sup>+</sup> T細胞の感染を阻害する方法を提供し、この方法はCD4<sup>+</sup> T細胞を、ACT-4 レセプターの細胞外ドメインに特異的に結合する抗体と接触させることを含んで成る。

30

本発明は更に活性化CD4<sup>+</sup> T細胞を検出するためのキットを提供し、これは上記の ACT-4 レセプターに対する特異的結合性パートナーを含んで成る。

【0030】

本発明の別の観点は、図10-1～図10-2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド又は請求項1記載の特異的結合性パートナーを、ACT-4 レセプター又はその特異的結合性類似体の認識のための特異的結合性反応に利用することを含んで成る。

他方、本発明は ACT-4 レセプター又はその特異的に結合性の類似体を、図10-1～図10-2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド又は請求項1記載の特異的結合性パートナーの認識のための特異的結合性反応に利用することを提供する。

40

【0031】

本発明は更に例えば生検サンプル又は血液サンプルの如くの組織サンプル中の ACT-4 レセプターに対する特異的結合性パートナーを含んで成る分析物を検出する方法を提供し、この方法はこの分析物を、その分析物を認識することのできる特異的結合性因子を含んで成る第1試薬と、この分析物に類似又は相補結合特異性の特異性因子を含んで成る第2試薬と接触させ(ここでラベルが第2試薬に施されている)、そしてこの第2試薬のそのパートナーに対する特異的な結合を検出又は定量することを含んで成る。

【0032】

50

本発明についての更なる方法は、例えば生検又は血液サンプルの如くの組織サンプル中の ACT - 4 レセプターに対する特異的結合性パートナーに対して相補結合特異性を有する物質を含んで成る分析物を検出するための方法についてであり、この方法はこの分析物を ACT - 4 レセプターに対する特異的結合性パートナーを含んで成る第 1 試薬と、この分析物に類似又は相補結合特異性の特異的結合性因子を含んで成る第 2 試薬と接触させ（ここでラベルが第 2 試薬に施されている）、そしてこの第 2 試薬のそのパートナーに対する特異的な結合を検出又は定量することを含んで成る。

【 0 0 3 3 】

これらの方法は炎症症状、例えば炎症性腸疾患又は障害の如くの診断又は検出において利用できる。これらは炎症症状を有するものと推定される患者由来の生検サンプルに基づいて実施できる。

10

【 0 0 3 4 】

更に、本発明は ACT - 4 レセプターに対する特異的結合性パートナーを含んで成る分析物、又は ACT - 4 レセプターもしくはその特異的な結合性類似体の検出又は定量のための特異的結合性アッセイを実施するためのキットを提供し、ここでこのキットは前記分析物を認識できる特異的結合性因子を含んで成る第 1 試薬、この分析物に類似又は相補結合特異性の特異的結合性因子を含んで成る第 2 試薬、及びこの第 2 試薬のためのラベル（例えば放射能又は酵素ラベル）を含んで成る。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 3 5 】

20

定 義

20種の天然アミノ酸についての略語は慣用の用法に従う（Immunology-A Synthesis, E. S. Golub & D. R. Gren編 Sinauer Associates, Sunderland, MA. 第 2 版、1991）（引用することで本明細書に組入れる）。20種の慣用アミノ酸の立体異性体（例えば D - アミノ酸）、非天然アミノ酸、例えば、 $\beta$ -ジ置換化アミノ酸、N - アルキルアミノ酸、乳酸及びその他の慣用的でないアミノ酸も本発明のポリペプチドにとって適切な成分である。慣用的でないアミノ酸の例には、4 - ヒドロキシプロリン、 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸塩、 $\epsilon$ -N, N, N - トリメチルリジン、 $\epsilon$ -N - アセチルリジン、O - ホスホセリン、N - アセチルセリン、N - ホルミルメチオニン、3 - メチルヒスチジン、5 - ヒドロキシリジン、 $\epsilon$ -N - メチルアルギニン並びにその他の類似のアミノ酸及びイミノ酸（例えば 4 - ヒドロキシプロリン）が含まれる。

30

【 0 0 3 6 】

本明細書に用いるポリペプチド記述において、左側の方向はアミノ末端方向であり、そして右側方向はカルボキシ末端方向であり、標準の用法及び慣習に従う。同様に、何らかのことわりのない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側先端は 5' 末端である；二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向は 5' 方向と呼ぶ。真性 RNA 転写体の 5' から 3' に至る付加の方向は転写方向と呼ぶ。RNA と同じ配列を有し、且つ RNA 転写体の 5' 末端に対して 5' 側にある DNA 鎖上の配列領域を「上流配列」と呼ぶ。RNA と同じ配列を有し、且つ RNA 転写体の 3' 末端の 3' 側にある DNA 鎖上の配列領域は「下流配列」と呼ぶ。

【 0 0 3 7 】

40

「ポリヌクレオチド配列」なる語は、5' から 3' 末端方向で読まれるデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の一本鎖又は二本鎖ポリマーを意味する。これは自己複製プラスミド、DNA 又は RNA の感染性ポリマー及び非機能性 DNA 又は RNA を含む。

【 0 0 3 8 】

以下の用語を 2 種以上のポリヌクレオチド間の配列関係を説明するために用いた：「対照配列」、「対比枠」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセンテージ」。「対照配列」は配列対比のための基準として用いる規定の配列である。対照配列は、より大きな配列のサブセット、例えば全長 cDNA もしくは配列表に示している遺伝子配列のセグメント、例えば図 5 - 1 ~ 図 5 - 2 もしくは図 10 - 1 ~ 図 10 - 2 に示すポリヌクレオチド配列のセグメントであってよく、又は完全 cDNA もしくは遺伝子配列を構成するものであってよい。一

50

般に、対照配列は長さが少なくとも20ヌクレオチド、しばしば長さが少なくとも25ヌクレオチド、そして往々にして長さが少なくとも50ヌクレオチドである。

【0039】

2種のポリヌクレオチドはそれぞれ(1)これら2種のポリヌクレオチド間で類似である配列(即ち、完全ポリヌクレオチド配列の一部)を含んで成ることがあり、そして(2)これらの2種のポリヌクレオチド間で異なる配列を更に含んで成ることがあり、2種の(又はそれより多くの)ポリヌクレオチド間の対比は、一般に局所的な配列類似性領域を同定及び対比するために「対比枠」で2種のポリヌクレオチドの配列を対比することにより行う。本明細書で用いる「対比枠」は少なくとも20個の連続ヌクレオチド位の観念的なセグメントであってそれにおけるポリヌクレオチド配列が少なくとも20個の連続ヌクレオチドの対照配列と対比できうるものであり、そしてここでこの対比枠の中のポリヌクレオチド配列の一部は対照配列と対比させたときに2種の配列の最適整合に対して20%以下の付加又は欠失(即ち、ギャップ)を含んで成りうる。

10

【0040】

対比枠の整合に関する配列の最適整合は、Smith & Waterman, Appl. Math. 2 : 482 (1981)の局所相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48 : 443 (1970)の相同性整合アルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85 : 2444 (1988)の類似の方法についての探索により、これらのアルゴリズムのコンピューター化実行により(FASTDB (Intelligenetics), BLAST (National Center of Biomedical Information) 又はGAP, BESTFIT, FASTA 及びTFASTA (Wisconsin Genetics Software Package Release7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI))、又は視察により行うことができ、そしてこの様々な方法により得られる最良の整合性(即ち、対比枠で最高の配列類似性パーセンテージをもたらすもの)を選定する。

20

【0041】

「配列同一性」なる語は、2種のポリヌクレオチド配列が対比枠で同一(即ちヌクレオチド-ヌクレオチド基準で)であることを意味する。「配列同一性のパーセンテージ」なる語は、2種の最適に整合せしめた配列を対比枠で対比させ、双方の配列において同一の核酸塩基(即ちA, T, C, G, U又はI)が存在する位置の数を決定して対合位置数を得、その対合位置数を対比枠の中の総位置数(即ち、枠のサイズ)で除し、そしてその結果に100を乗じて配列同一性のパーセンテージを得ることにより計算される。

30

【0042】

本明細書において用いる「実質的に同一」なる語は、ポリヌクレオチド配列の特徴であって、そのポリヌクレオチド配列が対照配列と対比されたときに、少なくとも20個のヌクレオチド位置の対比枠で、しばしば少なくとも25~50ヌクレオチドの枠で、少なくとも70, 80又は85%の配列同一性、好ましくは少なくとも90~95%の配列同一性、より通常には少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含んで成るという特徴を意味し、ここでこの配列同一性のパーセンテージは、対照配列を、対比枠で欠失又は付加を全部で対照配列の20%未満において含みうるポリヌクレオチド配列と対比させることにより計算する。この対照配列はより大きな配列のサブセット、例えば図5-1~図5-2に示す全長ACT-4-h-1配列又は図10-1~図10-2に示す全長ACT-4-L-h-1配列のセグメントであってよい。

40

【0043】

ポリペプチドに適用したときの用語「実質的に同一」とは、2種類のペプチド配列を例えばプログラムBLAZE (Intelligenetics), GAPにより、又はBESTFITによりデフォルトギャップ(default gap)重みを用いて最適整合せしめたときに、それらが少なくとも70%又は80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%又はそれより高い配列同一性(例えば99%の配列同一性)を共有していることを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は保存型アミノ酸置換により相違する。保存型アミノ酸置換は類似の側鎖を有する残基の置換可能性を意味する。

【0044】

50

例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群はグリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンであり；脂肪族 - ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群はセリン及びトリプトファンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群はアスパラギン及びグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群はフェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群はリジン、アルギニン及びヒスチジンであり；そして硫黄含有側鎖を有するアミノ酸はシステイン及びメチオニンである。好適な保存型アミノ酸置換基は：バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、及びアスパラギン - グルタミンである。

#### 【0045】

「実質的に純粋」なる語は、目的物質が、優勢的に存在している物質（即ち、モルベースで、それは組成物中の任意のその他の個別の物質よりも豊富となっている）となっていることを意味し、そして好ましくは実質的に精製された画分は、この目的物質が存在している全ての巨大分子物質のうち少なくとも約50%（モルベースで）を占めているような組成物をいう。一般に、実質的に純粋な組成物は組成物の中に存在している全ての巨大分子物質の約80~90%より多くを占めているであろう。最も好ましくは、この目的物質は本質的に均質となるまで精製されており（慣用の検出方法によっては組成物中に夾雑物質が検出できない）、ここでこの組成物は単独種の巨大分子物質より本質的に成る。

#### 【0046】

本明細書において物体に適用する用語「天然」とは、物体が天然において見い出せうるという事実を意味する。例えば、生物（ウイルスを含む）の中に存在し、天然資源から単離でき、そして研究室の中で人偽的に意図的に改変されていないポリペプチド又はポリヌクレオチド配列が天然である。

#### 【0047】

「エピトープ」なる語は、イムノグロブリン又はT細胞レセプターに特異的に結合できる任意のタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は通常アミノ酸又は糖側鎖の如くの分子の化学的に活性な基より成り、そして特異的な三次元構造特性及び特異的な帯電特性を有する。

特異的な結合性は、二量複合体についての解離定数が  $1 \mu\text{M}$ 、好ましくは  $100\text{nM}$ 、そして最も好ましくは  $1\text{nM}$ であるときに存在しているといえる。

#### 【0048】

本明細書で用いる「高度同系変異体」なる語は、ヒト及び高等哺乳動物種間で、例えば霊長類、豚類及び牛類間で進化的及び機能的に近縁している遺伝子配列を意味する。この語は、げっ歯類、例えばラット由来の配列は含まない。従って、ACT-4-h-1遺伝子に対する同系霊長類遺伝子とは、ACT-4-h-1レセプタータンパク質に対して最大の配列同一性を有し、且つACT-4-h-1タンパク質のそれと類似の発現パターン（即ち、活性化 $\text{CD4}^+$ 細胞上で発現）を示す発現タンパク質をコードする霊長類遺伝子である。同様に、ACT-4-L-h-1遺伝子に対する同系霊長類遺伝子とは、その発現タンパク質がACT-4-L-h-1リガンドタンパク質に対して最大の配列同一性を示し、且つ類似の発現パターン（即ち、活性化B細胞上で発現）を示す遺伝子である。

#### 【0049】

細胞の集団は、選定の細胞タイプが集団の少なくとも30%、50%又は70%を構成するとき、選定の細胞タイプに実質的に富んでいるといえる。

「患者」なる語はヒト及び脊椎対象体を含む。

#### 【0050】

試験物質は、競合アッセイにおいて過剰量の試験物質が対象物の結合を実質的に阻害するとき、対照物質と抗原に対する特異的結合について競合している。莫大なタイプ数の競合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ及びELISAが有用である。Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor (1988)を参照のこと。「実質的に阻害」とは、試験物質が対照物質の特異的結合を通常少なくとも10%、25%、50%、75%又は90%低下させることを意味する。競合アッセイにより同定される試験物質には、対照

10

20

30

40

50

物質と同一のエピトープに結合するもの、及び対照抗体が結合するエピトープに立体障害が生ずるほどに十分に近い隣接エピトープに結合するものが含まれる。

【0051】

詳細な説明

I. ACT-4レセプターポリペプチド

本発明の一態様に従うと、活性化CD4<sup>+</sup>T細胞の表層上のレセプター(ACT-4レセプターと呼ぶ)及びそのフラグメントが提供される。ACT-4レセプターポリペプチドなる語は、一般に全長タンパク質及びそのフラグメントを包括するように用いられている。ACT-4レセプターなる語は通常全長タンパク質のために確保されている。特性決定する最初のACT-4レセプターのアミノ酸配列(以降ACT-4-h-1)を図5-1~図5-2に示す。接尾辞hはヒト起源を意味し、そして接尾辞-1はACT-4-h-1が特性決定される最初のACT-4であることを示す。ACT-4レセプターなる語は図5-1~図5-2に示す配列を有するタンパク質のみを意味するだけでなく、ACT-4-h-1の対立形質型、非対立形質型及び高度同系の変異体、並びに任意のこれらの天然又は誘導型突然変異体をも意味する。

10

【0052】

通常、ACT-4レセプターポリペプチドはACT-4-h-1配列と実質的な配列同一性をも示すであろう。一般に、ACT-4レセプターポリペプチドは、ACT-4-h-1配列由来の少なくとも4個、そしてより一般には、5, 6, 7, 10又は20, 50又はそれより多くの連続アミノ酸を含むであろう。機能性ドメイン、例えば結合性ドメイン又はエピトープは4個ほどの少ないアミノ酸より形成されることが当業界において知られている。

20

【0053】

ACT-4レセプターポリペプチドは一般にACT-4-h-1のアミノ酸配列との実質的なアミノ酸配列同一性を示し、そして図5-1~図5-2に示すACT-4-h-1をコードするヌクレオチド配列との実質的な配列同一性を示すヌクレオチド配列によりコードされるであろう。ACT-4レセプタータンパク質をコードするヌクレオチドは一般にストリンジェンシー条件下でACT-4-h-1配列とハイブリダイズするであろう。しかしながら、これらのヌクレオチドはストリンジェンシー条件下で、Malletら、EMBO J. 9: 1063-68 (1990)(引用することで本明細書に組入れる)(特にMelletらの文献のFigure 2Aを参照のこと)に記載のOX-40レセプターをコードする核酸とは通常ハイブリダイズしないであろう。

30

【0054】

ストリンジェンシー条件は配列依存性であり、そして種々の環境で異なるであろう。一般に、ストリンジェンシー条件は、規定のイオン強度及びpHにおいて、特異的な配列の熱融点(T<sub>m</sub>)より約5℃低くなるように選定される。T<sub>m</sub>は標的配列のうちの50%が好適に対合するプローブにハイブリダイズする温度である(規定のイオン強度及びpHで)。一般に、ストリンジェンシー条件はpH7において塩濃度が少なくとも約0.02モラーであり、且つ温度が少なくとも約60℃である条件であろう。数多くの要因、例えばとりわけ相補鎖の塩基組成及びサイズ、有機溶媒の存在、並びに塩基誤対合の程度がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに有意な影響を及ぼしうるため、任意のパラメーターの絶対値よりもパラメーターの組合せの方が一層重要である。

40

【0055】

通常、ACT-4レセプターポリペプチドはACT-4-h-1と共通の少なくとも1つの抗原決定基を共有しているであろうが、しかしラットOX-40ポリペプチドに対する抗体とは特異的に反応しないであろう。共通の抗原決定基の存在は変異タンパク質とACT-4-h-1に対して調製した任意の抗体との交差反応により確認される(IV章参照のこと)。交差反応は往々にしてACT-4-h-1に対するポリクローナル抗血清を用いて試験されるが、しかしACT-4-h-1に対する1又は数種のモノクローナル抗体、例えばL106と命名された抗体を用いて試験されることもできる。

【0056】

50

往々にして ACT-4 レセプターポリペプチドは改質ポリペプチド骨格を含むであろう。改質にはポリペプチドの化学的誘導化、例えばアセチル化、カルボキシル化等が含まれる。これらはグリコシル化改質（N-及びO-連結）並びに一般のポリペプチドのプロセッシング変異体も含まれる。これらのプロセッシング工程には特に酵素改質、例えばユビキチン化及びホスホリル化が含まれる。例えば Hershko & Ciechanover, *Ann. Rev. Bioch.* 51 : 335-364 (1982) を参照のこと。例えば ACT-4-h-1 タンパク質は重度に改質され、アミノ酸配列に基づく推定分子量がわずかに 27kDa であるのに対し、観察される分子量は約 50kDa である。2つの推定グリコシル化部位がその細胞外ドメインにおいて同定された。

#### 【0057】

ACT-4 レセプターは ACT-4-h-1 に関して見い出せる形態的な特徴の一部又は全てを共有するようである。ACT-4-h-1 についてのアミノ酸配列は 22 又は 24 個のアミノ酸の推定 N-末端シグナル配列を含む。この 24 個のアミノ酸配列は von Heijne, *Nucleic Acids Res.* 14 : 4683-4690 (1986) (引用することで本明細書に組入れる) の基準に基づく可能性が高い。ACT-4-h-1 レセプターは 27 個のアミノ酸にわたって広がる残基 213-240 の単独の付加疎水性ストレッチを含む。

#### 【0058】

この疎水性ストレッチはおそらくはトランスメンブランに相当し、そしてその存在は I 型の膜内在タンパク質である ACT-4-h-1 と一致する（即ち、単独のトランスメンブランとドメインと、細胞外領域を含んで成る N 末端ドメイン及び細胞内領域を含んで成る C 末端ドメインとを有する）。トランスメンブランセグメントに対してアミノ近位である ACT-4-h-1 の 189 又は 191 個のアミノ酸（シグナル切断部位の正確な位置に依存）を細胞外ドメインと命名し、一方トランスメンブランセグメントに対してカルボキシ近位である 37 個のアミノ酸を細胞内ドメインと命名する。アミノ末端から、この細胞外ドメインは NH<sub>2</sub>-末端疎水性推定シグナル配列、及び対合したシステイン残基間でのジスルフィド結合により形成される 3 本の鎖内ループを有する。

#### 【0059】

ACT-4 レセプターポリペプチドの形態的アレンジメントは神経成長因子レセプター族のその他の構成員、特にラット OX-40 レセプターのそれに似ている。しかしながら、その他の構成員はいくつかの細胞外ジスルフィドループにおいて、及び細胞内ドメインのサイズにおいて多少の相違を有する。Mallet & Barclay、前掲を参照のこと。

#### 【0060】

上記のドメイン全てが、全ての ACT-4 レセプターポリペプチドにおいて存在している必要はないが、細胞外ドメインが存在していることが最も期待される。事実、一部の ACT-4 レセプターポリペプチドにおいては、細胞外ドメインのみが存在していることが可能であり、そしてかかるタンパク質の天然の状態は細胞表層結合型タンパク質ではなく、可溶性タンパク質であり、例えば細胞外体液の中に分散されている。可溶性変異形態の存在はその他の細胞表層レセプター、例えば神経成長因子レセプター族の一構成員である SFV-T2 に関して観察された。Mallet & Barclay、前掲を参照のこと。

#### 【0061】

実質的に全長のポリペプチドの他に、本発明はポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントを提供する。有意義な生物学的活性にはレセプター結合能、抗体結合能（例えば、フラグメントは抗体に対する特異的な結合に関してインタクト ACT-4 レセプターと競合する）、免疫原性（即ち、フラグメントに対する B 又は T 細胞応答を刺激するエピトープを保有）、及び ACT-4 レセプターポリペプチドのためのリガンドへの結合の作動能又は拮抗能が含まれる。ACT-4 レセプタータンパク質又はそのドメインのセグメントは通常少なくとも約 5, 7, 9, 11, 13, 16, 20, 40 又は 100 個の連続アミノ酸を含んで成るであろう。

#### 【0062】

ACT-4 レセプターポリペプチドのセグメントは往々にして機能性又は構造的ドメインの境界付近で終結する。かかるセグメントの特定の機能又は構造特性を司るアミノ酸より

10

20

30

40

50

本質的に成る。構造及び機能性ドメインはヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列データ、例えば図5-1~図5-2に示すものを公共の又は私有の配列データベースと対比させることにより同定される。好ましくは、その他の公知の構造及び/又は機能のタンパク質において認められる配列モチーフ又は推定タンパク質コンホメーションドメインを同定するコンピューター化対比法を利用する。構造ドメインは細胞内ドメイン、トランスメンブランドメイン及び細胞外ドメインを含み、この細胞外ドメインは3つのジスルフィド結合ループを含む。機能性ドメインは細胞外結合性ドメインを含み、それを通じてACT-4レセプターポリペプチドは外的可溶性分子又はその他の細胞結合型リガンド及び細胞内シグナル変換ドメインと相互作用する。

#### 【0063】

一部のフラグメントは細胞外ドメインのみ、例えば1又は複数のジスルフィド結合ループのみを含むであろう。かかるフラグメントは往々にしてインタクトACT-4レセプターポリペプチドの結合特異性を保持するであろうが、しかしそれは膜結合型であるよりは可溶性型であろう。かかるフラグメントはACT-4レセプター結合性の競合インヒビターとして有用である。

#### 【0064】

ACT-4レセプターは神経成長因子レセプター族の構成員としてのその立場により更に同定される。ACT-4-h-1のアミノ酸配列はNGF-R, TNF-R, CD40, 4-1BB及びfas/AP01に対して少なくとも20%の同一性である。ACT-4-h-1は、活性化CD4<sup>+</sup>細胞上での選択発現を特徴とするラットOX-40遺伝子と62%のアミノ酸配列同一性を示す。

#### 【0065】

ACT-4レセプターは特徴的な細胞分布によっても同定される。最も顕著には、ACT-4レセプターは通常活性化CD4<sup>+</sup>T細胞上で容易に検出される(発現する細胞の%は通常約25又は50%より高く、そして往々にして約80%である;平均チャンネル蛍光は通常、免疫蛍光染色を経てカルター・プロフィール・フロー・サイトメーターで約10、そして往々にして約20~25である)。ACT-4レセプターは通常、休止T細胞、B細胞(PMVで活性化されていない限り)、NK細胞及び単球(PMAで活性化されていない限り)上に実質的に存在しない。実質的に存在しないとは、ACT-4を発現する細胞の%が通常約5%未満、そしてより通常には約2%未満であり、そして平均チャンネルが通常、細胞の免疫蛍光染色を経てカルター・プロフィール・フロー・サイトメーターで測定して約4未満、そしてより通常には約2未満であることを意味する(実施例2参照のこと)。

#### 【0066】

ACT-4レセプターは通常活性化CD8<sup>+</sup>細胞上では低レベルで発現される(発現する細胞%は約4~10%であり;免疫蛍光染色を経たカルター・プロフィール・フロー・サイトメーターでの平均チャンネル蛍光は約2~4である)。CD8<sup>+</sup>細胞上で認められる低レベルの発現は、発現がCD8<sup>+</sup>細胞のサブ集団に限定されることを示唆する。活性化CD4<sup>+</sup>細胞の表層上のACT-4レセプターの発現は、いくつかの異なる活性化メカニズム、例えば同種異系抗原、破傷風又はマイトジェン(例えばPHA)刺激に関して観察されている。発現は、同種異系抗原又は破傷風毒素刺激の約7日後、及びPHA刺激の約3日後にピークを迎える。

#### 【0067】

これらのデータは、ACT-4レセプターが、休止細胞上には実質的に存在していない初期活性化抗原に分類されうることを示唆する。ACT-4レセプターが活性化CD4<sup>+</sup>細胞上で優先的に発現され、そして活性化CD8<sup>+</sup>細胞上でははるかに少ない程度で発現され、しかしながらほとんど又は全てのその他のリンパ球サブタイプ上では実質的に存在しない(PMAの如くの高度な非生理学的刺激に対応する応答は除く)という観察は、ヒト白血球上で見い出せるその他の活性化抗原の細胞タイプ特異性に反している。

#### 【0068】

活性化CD4<sup>+</sup>T細胞の表層上のACT-4レセプターの発現は、レセプターがこれらの細

10

20

30

40

50

胞の活性化において機能していることを示唆する。かかる機能は神経成長因子レセプター族のいくつかのその他の構成員のそれと一致する、例えば、CD40はBリンパ球におけるG1-S相転移を刺激し、そして神経成長因子レセプターはサイトカイン神経成長因子からのシグナルを変換し、これは神経の分化及び生存をもたらしめる (Barde, Neuron 2 : 1525-1534 (1989) (引用することで本明細書に組入れる)。しかしながら、ACT-4レセプターのその他の機能、例えばその他のリンパ球細胞タイプとの相互作用も想定されうる。かかる機能の存在はその他の神経成長因子レセプター族の構成員、例えば腫瘍壊死因子であってそれと腫瘍壊死因子レセプターとの相互作用は炎症又は腫瘍細胞死をもたらしうるような因子の多彩な機能と一致する。

#### 【0069】

ACT-4レセプターの実質的な1又は複数の機能性ドメイン(例えば細胞外ドメイン)を含んで成るフラグメント又は類似体を異種のポリペプチド配列に結合させることができ、これにより得られる融合タンパク質はACT-4レセプターフラグメント及び/又はその融合パートナーにより付与される機能的な(1又は複数の)特性を示すようになる。

#### 【0070】

融合パートナーに対するACT-4レセプターフラグメントの配向は、構築のし易さ、タンパク質分解に対する安定性、熱安定性、免疫反応性、アミノ-又はカルボキシ-末端残基修飾等の如くの実験配慮に依存するであろう。潜在的な融合パートナーには発色原酵素、例えば -ガラクトシダーゼ、プロテインA又はG、FLAGタンパク質、例えばBlonar & Rutter, Science 256 : 1014-1018 (1992)に記載のもの、毒素(例えばジフテリア毒素、シュードモナス エクトトキシンA、リシン毒素、又はホスホリパーゼC)及びイムノグロブリン成分が含まれる。

#### 【0071】

ACT-4レセプターフラグメント及びイムノグロブリン成分の融合により形成される組換グロブリン(Rg)に往々にして、利用した特定のイムノグロブリンクラスの定常領域に一体化した生理学的特性のほとんど又は全てを有する。例えば、組換グロブリンは補体を固定でき、抗体依存性細胞毒性を媒介し、B細胞を刺激し、又は血管壁を横断して細胞間空間に侵入できうる。組換グロブリンは通常、ACT-4レセプター細胞外ドメインのC末端を重鎖イムノグロブリンの定常領域ドメインのN末端に融合させることにより形成され、これにより自生イムノグロブリン鎖のコンホメーションをシミュレートさせる。

#### 【0072】

イムノグロブリン鎖は好ましくはヒト起源とする。特にその組換グロブリンが治療的用途を意図する場合である。組換グロブリンは通常可溶性であり、そして未改質のACT-4レセプターに対していくつかの有利な特性を有する。これらの特性には、長い血清半減期、ACT-4レセプターが親和性を有している標的細胞をエフェクター機能によって溶解する能力、並びにこの組換グロブリンを結合分析において固定化するのに利用できるプロテインA及びGの如くの分子に結合する能力が含まれる。

#### 【0073】

### II. ACT-4に対するリガンド

本発明は、ACT-4レセプターポリペプチドに特異的に結合し、且つかかるポリペプチドと、少なくともある程度、非共有結合によって複合体を形成できるリガンドも提供する。ACT-4-Lリガンドポリペプチドなる語は一般に全長タンパク質及びそのフラグメントを包括するように利用される。この語は通常はACT-4レセプターポリペプチドに対する抗体を含まない。ACT-4リガンドなる語は通常全長タンパク質を意味するのに用いる。リガンドは天然でも合成分子でもよく、そして可溶性形態でも、細胞表層に定着されていてもよい。

#### 【0074】

複数種のリガンドが同種のACT-4レセプターに結合しうる。逆に、一種のリガンドが複数種のACT-4レセプターに結合しうる。通常、ACT-4レセプターに対するリガンドの結合は、ACT-4レセプターを担持している細胞及び/又はACT-4リガンドを担持し

10

20

30

40

50

ている細胞の物理的及び/又は機能的表現型を改変するシグナル発信を開始するであろう。ACT-4又はそのリガンドのいづれかに対する抗体はシグナル変換をブロック又は刺激する能力を有しうる。むしろ、レセプターとしてのACT-4及びリガンドとしてのその特異的結合性パートナーの表示はある程度任意的であり、そしてある状況においてはその逆であってよい。

**【0075】**

ACT-4-Lリガンドポリペプチドを供給するための起源材料は、種々の細胞タイプ、特にリンパ球及び造血細胞、体液及び組織抽出物を、プローブとしての好ましくは水性可溶性形態におけるラベル化ACT-4レセプターポリペプチドによるスクリーニングにより同定する。活性化B細胞又はB細胞系が適切でありうる(実施例8参照のこと)。HTLV-I感染化T細胞も適切である。往々にして、ACT-4レセプター又はその結合性フラグメントを、スクリーニングの目的のために第2タンパク質に融合又は連結させる。特に適切なのは、ACT-4-h-1の細胞外部分をイムノグロブリン重鎖の定常領域に融合することによって形成される組換グロブリンである。ACT-4-Lリガンドポリペプチドを細胞又はその他の生物材料からこのスクリーニング法により、伝統的なタンパク質化学技術を利用して同定する。

10

**【0076】**

かかる技術には、硫酸アンモニウムによるかかる物質の選択的沈殿、カラムクロマトグラフィー、免疫沈殿法、その他が含まれる。例えば、R. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag, NY, 1982) (引用することで本明細書に組入れる)を参照のこと。通常、精製手順はアフィニティークロマトグラフィー工程を含み、それにおいてはACT-4レセプターポリペプチド又はその結合性フラグメントを固定化試薬として用いる。ACT-4-定常領域はその定常領域成分をプロテインA又はGに結合させることによって簡単に固定化できる。ACT-4-Lリガンドポリペプチドはアフィニティー試薬としてACT-4レセプターに対する抗-イディオタイプ抗体を用いて精製することもできる。

20

**【0077】**

アミノ酸配列を決定するため又はリガンドのポリペプチドフラグメントを獲得するため、リガンドをトリプシンで消化してよい。ペプチドフラグメントは逆相高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)により分離でき、そして気相配列決定により分析できる。当業界に公知のその他の配列決定法も利用できる。配列データはACT-4-LリガンドポリペプチドをコードするcDNA又はゲノムクローンの単離のための縮重プローブをデザインするのに利用できる。

30

**【0078】**

他方、ACT-4-LリガンドポリペプチドをコードするcDNAクローンは発現クローニングにより獲得できる。この手法においては、ACT-4-Lリガンドポリペプチドを発現する細胞からcDNAライブラリーを調製する。(上記の通りに同定;前掲)。ライブラリーを適当な細胞(例えばCOS-7)において発現させ、そしてACT-4-Lリガンドポリペプチドを担持するクローンをラベル化されたACT-4又はその結合性フラグメントによるスクリーニングにより同定し、イムノグロブリン重鎖の定常ドメインに任意的に融合させる。

40

**【0079】**

特性決定するACT-4レセプターポリペプチドに対する第1リガンドのcDNA配列及び推定アミノ酸配列を図10-1~図10-2に示す。このリガンドをACT-4-L-h-1と命名し、接尾辞hはヒト起源を示し、そして接尾辞1はこれが特性決定最初のリガンドであることを示す。ACT-4-L-h-1のcDNA配列のコード領域はgp 34又はTA 34と呼ぶポリペプチドのそれと同一又はほぼ同一である。MiuraらMol. Cell. Biol. 11: 1313-1325 (1991) (引用することで本明細書に組入れる)を参照のこと。本発明はまたACT-4-L-h-1の対立形質、非対立形質、スプライス及び高度同系変異性、並びに任意のこれらの天然又は誘導化突然変異体を示すリガンドも含む。

50

## 【0080】

かかる変異体は一般に ACT-4-L-h-1 配列との実質的な配列同一性を示し、そしてより一般的には、ACT-4-L-h-1 配列由来の5, 6, 7, 10又は20, 50又はそれより多くの連続アミノ酸を含むであろう。かかる変異体は更に、図10-1~図10-2に示す ACT-4-L-h-1 をコードするヌクレオチド配列との実質的な配列同一性を示すヌクレオチド配列によりコードされるであろう。かかる変異体をコードするヌクレオチドは更にストリンジェンシー条件下で一般に ACT-4-L-h-1 DNA配列とハイブリダイズするであろう。

## 【0081】

しかしながら、一部のかかるヌクレオチドはストリンジェンシー条件下では ACT-4-L-h-1 の低度同系変異体（例えばラット）をコードするDNA配列とハイブリダイズしないであろう。ACT-4-L-h-1 の多くの変異体は、ACT-4-L-h-1 リガンドポリペプチドと少なくとも一の抗原決定基を共有するであろう。それは、それに対するモノクローナル又はポリクローナル抗体との交差反応性により確認される。しかしながら、一部のかかる変異体は ACT-4-L-h-1 の低度同系変異体に対する抗血清と交差反応しないであろう。

## 【0082】

多くの ACT-4-L リガンドポリペプチドは ACT-4-L-h-1 と、上記の観点の少なくとも一つにおいて類似性を示すであろうが、ACT-4 レセプターに対する特異的な結合能力を除き、ACT-4-L-h-1 との共通性を示さないその他のリガンド族が ACT-4 レセプターに対して存在していることが総合的に可能性である。かかるリガンド族は本発明の中に明確に包含される。

## 【0083】

往々にして、ACT-4-L リガンドポリペプチドは前述のI章の中で説明したタイプの骨格改質を含むであろう。例えば、ACT-4-L-h-1 ポリペプチドは、アミノ酸配列に基づく推定分子量がわずか21kDa であるのに対し、観察される分子量が約34kDa であるほどに重度に改質される。4つの推定N-連結グリコシル化部位が細胞外ドメインの中で同定された。

## 【0084】

多くの ACT-4-L リガンドポリペプチドは ACT-4-L-h-1 に関して見い出せる形態学的特徴の一部又は全てを共有する傾向にある。ACT-4-L-h-1 アミノ酸配列は推定N末端細胞内ドメイン(aa1-23)、推定疎水性トランスメンブランドメイン(aa24-50)及び推定細胞外C末端ドメイン(aa51-183)を含む。この構造アレンジメントはII型膜内在タンパク質である ACT-4-L-h-1 と一致する(即ち、単独のトランスメンブランドメインと、細胞外領域を含んで成るC末端ドメイン及び細胞内領域を含んで成るN末端ドメインとを有する)。

## 【0085】

ACT-4-L リガンドポリペプチドは、その他の神経成長因子レセプタースーパーファミリーの構成員と結合するリガンドの構造及び/又は機能特性のうちのいくつかをも共有しうる。かかるリガンドには TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , CO40-L, CD27-L, CD30-L が含まれる。ACT-4-L-h-1 は、TNF- $\alpha$  とほんのわずかな一次アミノ酸配列同一性しか示さず、そしてその他のスーパーファミリーのリガンドとはより弱い類似性を有するが、これらのリガンド全ての間でのより高い類似性が、より高い次元の構造を形成するその推定能力において明らかとされている。公知のスーパーファミリーリガンドの細胞外ドメインは約150個のアミノ酸より成り、そしてスリット型の円筒構造へと組立てられるいくつかの $\beta$ -ブリーツ型シートを形成する(Bazanら、Current Biology 3:603-606 (1993)により「ジェリーロール」と呼ばれる)(引用することで本明細書に組入れる)。

## 【0086】

133個のアミノ酸より成る ACT-4-L-h-1 の細胞外ドメイン及び推定のフォルディングパターンは $\beta$ -ブリーツ型シート及び「ジェリーロール」の形成と一致する。明ら

かに、TNF- を除く全てのスーパーファミリーリガンドが、ある程度、II型膜内在細胞表層タンパク質としても存在する。スーパーファミリーリガンドは可溶性タンパク質としても存在し、かかる形態がACT-4-Lリガンドポリペプチドに関して存在していることを示唆する。ACT-4-L-h-1のC末端細胞外ドメインは様々なデヒドロゲナーゼと多少の配列同一性を示す。即ち、一部のACT-4-Lリガンドポリペプチドはデヒドロゲナーゼ活性を有することがありこれは細胞間シグナル伝達において機能する。

**【0087】**

実質的な全長ポリペプチドの他に、本発明は全長ACT-4-Lリガンドポリペプチドの生物活性フラグメントを提供する。有意義な生物活性には、ACT-4レセプター、例えばACT-4-h-1に対する結合能、第2ACT-4-Lリガンドポリペプチドに対する結合能、抗体結合能（例えば、フラグメントはインタクトACT-4-L-h-1リガンドポリペプチドと、抗体に対する特異的結合について競合する）、免疫原性（即ち、フラグメントに対するB又はT細胞応答を刺激するエピトープを保存）、及びACT-4-h-1の多くのACT-4レセプターポリペプチドに対する第2ACT-4-Lリガンドポリペプチドの結合の作動能又は拮抗能が含まれる。

10

**【0088】**

全長ACT-4-Lリガンドポリペプチドのセグメントは通常、図10-1～図10-2に示すアミノ酸配列由来の少なくとも5個の連続アミノ酸を含むであろうが、しかし160個より多くの連続アミノ酸は含んで成らないであろう。往々にして、セグメントは図10-1～図10-2に示す配列由来の約10, 20, 50, 75, 100又は133個の連続アミノ酸を含み、1

20

**【0089】**

一部のフラグメントは細胞外ドメインのみを含むであろう。かかるフラグメントは天然ACT-4-Lリガンドポリペプチドの全長ドメインを含む。その他のフラグメントはその成分を含む。かかるフラグメントは往々にしてインタクトACT-4-Lリガンドポリペプチドの結合特異性を保持しているであろうが、しかし膜結合型であるよりは可溶性であろう。かかるフラグメントはレセプターに対するACT-4-Lリガンドポリペプチドの競合インヒビターとして有用である。

**【0090】**

全長ACT-4-Lリガンドポリペプチドのフラグメントは往々にして機能的又は構造的ドメインの境界付近の（即ち、約5, 10又は20aa以内）それらの末端の一方又は双方において終結する。構造的又は機能的境界により両端で終結するフラグメントは本質的に機能的又は構造的特性を司るACT-4-Lアミノ酸の特定のセグメント（又はドメイン）より成る。構造的及び機能的ドメインは図10-1～図10-2に示すようなヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列データを公共又は私有の配列データベースと対比させることにより同定される。

30

**【0091】**

好ましくは、その他の公知の構造及び/又は機能のタンパク質において見い出せる配列モチーフ又は推定タンパク質コンホメーションを同定するコンピューター化対比法を利用する。結合性ドメインはエピトープマッピングにより同定できる。前述のVI章を参照のこと。構造ドメインは細胞内ドメイン、トランスメンブランドメイン及び細胞外ドメインを含む。機能性ドメインは細胞外結合性ドメイン（それを通じてACT-4-Lリガンドポリペプチドは外的可溶性分子又は細胞結合型レセプターと相互作用する）及び細胞内シグナル変換ドメインを含む。

40

**【0092】**

ACT-4-L-h-1及び近縁リガンドの発現は細胞タイプ及び活性化状況に依存する。実施例8参照のこと。最も顕著には、ACT-4-L-h-1は一部のPMA/イオノマイシン活性化B細胞系上で容易に検出される。ACT-4-L-h-1は新鮮な休止B細胞上には実質的に存在しない。ACT-4-L-h-1はHLTV-1感染T細胞上でも発現し、そして一定の環境においてはその他のT細胞タイプ上に感染しうる。実施例8参照のこと。

50

## 【0093】

ACT-4 レセプター（活性化CD4<sup>+</sup>細胞上に優先的に発現される）に対するACT-4-Lリガンド（活性化B細胞上で発現）の親和力は、リガンドとレセプターとの間での相互作用がCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はB細胞の活性化/分解において機能しうることを示唆する。CD4<sup>+</sup>T細胞及びB細胞の双方の活性化は抗原特異的及び非特異的刺激を必要とする多段階過程であることが知られる。ACT-4とACT-4-Lとの相互作用は、これらの抗原を担持する対応の細胞の一方又は双方に対して有効な非抗原性特異的刺激を構成するようである。

## 【0094】

この刺激は例えばリガンド-レセプター結合がリガンド及び/又はレセプターにおける細胞内ドメインにおいて酵素活性を誘引するときに検出される。その活性は対応の細胞の一方又は双方における代謝現象のカスケードを開始させる。他方、この刺激は間接的なものであってよい。例えば、ACT-4とACT-4-Lとの相互作用は、その他のリガンド-レセプターペア間の細胞相互作用の起き易さを高めうるか、又は白血球の局在化又は泳動をコントロールしうる。

## 【0095】

ACT-4とACT-4-Lとの相互作用は、その他のT<sub>H</sub>-B細胞レセプター/リガンドペア、例えばCD2/LFA-3 (Moingeonら、Nature 339: 314 (1988))、CD4/MHCクラスII (Doyle & Stominger, Nature 330: 256-259 (1987))、LFA-1/ICAM-I/ICAM-2 (Makgobaら、Nature 331: 86-88 (1988) 及びStauntonら、Nature 339: 61-64 (1989) 及びB7/CD28 (Linsleyら、J. Exp. Med. 173: 721-730 (1991))の結合と一緒に作用しうる。ACT-4/ACT-4-L相互作用はCD4<sup>+</sup>T細胞及び/又はB細胞に対する可溶性分子の結合により高まったり低まったりもしうる。同様に、可溶性分子はサイトカイン、例えばインターロイキンIL-1からIL-13、腫瘍壊死因子及び、インターフェロン、及び、腫瘍壊死因子ベクター(TFG-)、コロニー刺激因子(CSF)、並びに顆粒単球コロニー刺激因子(GM-CSF)である。

## 【0096】

ある状況における一定のT細胞サブタイプ上のACT-4-Lリガンドの発現はACT-4/ACT-4-L相互作用に関する追加の又は代替の機能を授けうる。例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)又はその他のウイルス及び病原体によるT細胞の感染効率は、ACT-4もしくはACT-4-Lにより、又はこれら2つの間の相互作用により影響されうる。更に、ACT-4及びACT-4-Lは同種の細胞(例えば活性化CD4<sup>+</sup>T細胞)により発現されうる。このような状況において、レセプターとリガンドとの相互作用はその対応の細胞の増殖及び活性化状態に影響を及ぼしうる。

## 【0097】

ACT-4-Lリガンドポリペプチドの実質的に1又は複数の機能性ドメイン(例えば細胞外ドメイン)を含んで成るフラグメント又は類似体は異種のポリペプチド配列に融合又は連結せしめてよく、これにより得られる融合タンパク質はACT-4-Lリガンドポリペプチド及び/又は融合パートナーにより授けられる(1又は複数種の)機能特性を示す。適当な融合パートナーは前述のI章に記載してある。

## 【0098】

ACT-4-Lリガンドポリペプチドは対応のACT-4レセプターをアフィニティー精製するのに利用できる。ACT-4-Lリガンドポリペプチドは第2ACT-4-Lリガンド又はACT-4レセプターの作動因子又は拮抗因子としても有用であり、そして前掲のVII章に記載した治療法において利用できる。ACT-4リガンドポリペプチドはACT-4及び/又はACT-4-Lの作動因子及び拮抗因子を同定するためのスクリーニングアッセイにおいても有用である。

## 【0099】

## III . ポリペプチドを製造する方法

## A . 組換技術

10

20

30

40

50

図5-1～図5-2に示すACT-4-h-1のヌクレオチド及びアミノ酸配列、並びにその他のACT-4レセプター変異体についての対応の配列は、全長ACT-4レセプターポリペプチド配列のポリペプチド及びそのフラグメントの製造を可能にする。同様に、ACT-4-L-h-1のアミノ酸配列及びその他のACT-4-Lリガンドポリペプチドについての対応の配列は全長及びフラグメントリガンドポリペプチドの製造を可能にする。かかるポリペプチドはACT-4又はACT-4-Lをコードするポリヌクレオチド又はこれらのいずれかのフラグメント及び類似体の発現により原核又は真核宿主細胞において製造される。

#### 【0100】

クローニングしたDNA配列は、その配列を発現ベクターの中の発現コントロール配列に作用可能的に連結（即ち、発現コントロール配列が確実に機能するように配置）されると、宿主の中で発現される。発現ベクターは一般にエピソームとして又は宿主染色体DNAの組込部として宿主生物の中で複製可能である。一般に、発現ベクターは所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出及び/又は選択を可能とするために選択マーカー、例えばテトラサイクリン耐性又はヒグロマイシン耐性を含むであろう（例えば米国特許第4,704,362号参照のこと）。

#### 【0101】

E.コリ（*E. coli*）は本発明のDNA配列をクローニングするために有用な一原核宿主である。利用に適するその他の微生物宿主にはバチルス属（*bacilli*）、例えばバチルス・スブチリス（*B. subtilis*）、及びその他の腸内細菌、例えばサルモネラ（*Salmonella*）、セラチア（*Serratia*）及び様々なシュードモナス（*Pseudomonas*）種が含まれる。これらの原核宿主において発現ベクターを作ることでもでき、これは一般に宿主細胞に適応する発現コントロール配列（例えば複製起点）を含むであろう。更に、任意の数の様々な公知のプロモーター、例えばラクトースプロモーター系トリプトファン（*trp*）プロモーター系、ペクターラクタマーゼプロモーター系、又はファージラムダ由来のプロモーター系が存在しているであろう。これらのプロモーターは一般に、任意的にオペレーター配列と共に発現をコントロールし、そして転写及び翻訳を開始せしめるためのリボソーム結合部位配列等を有するであろう。

#### 【0102】

その他の微生物、例えば酵母も発現のために利用できうる。発現コントロール配列、例えばプロモーター、例えば3-ホスホグリセリン酸キナーゼ又はその他の解糖酵素に係るプロモーター、並びに複製起点、ターミネーション配列等を所望通りに有する適当なベクターを伴うサッカロマイセス（*Saccharomyces*）が好適な宿主である。通常はバキュロウィルス（*baculovirus*）に由来する適当なベクターを伴う昆虫細胞（例えばSF9）もACT-4レセプター又はリガンドポリペプチドを発現するために適する。Luckowら、*Bio/Technology* 6: 47-55 (1988)を参照のこと（引用することで本明細書に組入れる）。

#### 【0103】

高等真核哺乳動物組織細胞培養物も本発明のポリペプチドを発現及び製造するために用いてよい（Winnacker, *From Genes to Clones* (VCH Publishers, NY, NY, 1987)（引用することで本明細書に組入れる）を参照のこと。真核細胞が実際には好適であり、なぜならヒトタンパク質を分泌及び自生的に改質できる多くの適当な宿主細胞系が当業界において開発されているからである。それにはCHO細胞系、様々なCOS細胞系、HeLa細胞、ミエローマ細胞系、ジャーカット細胞等が含まれる。

#### 【0104】

これらの細胞についての発現ベクターには発現コントロール配列、例えば複製起点、プロモーター（例えばHSV tkプロモーター又はpgk（ホスホグリセリン酸キナーゼ）プロモーター）、エンハンサー（Queenら、*Immunol. Rev.* 89: 49 (1986)）、並びに必須のプロセシング情報部位、例えばリボソーム結合性部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位（例えばSV40大型T AgポリA付加部位）及び転写ターミネーター配列が含まれていてよい。

10

20

30

40

50

## 【0105】

好適な発現コントロール配列はイムノグロブリン遺伝子由来のプロモーター、SV40、アデノウイルス、牛パピロマウイルス等に由来するプロモーターである。注目のDNAセグメント(ACT-4レセプターをコードするポリペプチド)を含むベクターは公知の方法により宿主細胞に移入でき、それは細胞宿主のタイプに依存しうる。例えばCaCl<sub>2</sub>トランスフェクションが原核細胞のために一般に利用され、一方その他の細胞宿主のためにはCaPO<sub>4</sub>処理又はエレクトロポレーションが利用されうる。ベクターはエピソームとして、又は宿主染色体に組み入れて存在してよい。

## 【0106】

B. 天然の ACT-4 又は ACT-4-L ポリペプチド

天然 ACT-4レセプターポリペプチドはアフィニティークロマトグラフィーの如くの慣用の技術により単離される。例えば、ポリクローナル又はモノクローナル抗体を事前に精製しておいた ACT-4-h-1 に対して生起させ、そして公知の技術によって適当なアフィニティークラムに付加させる。例えばHudson & Hay, Practical Immunology (Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 1980) 第8章を参照のこと(引用することで本明細書に組み入れる)。例えば、抗-ACT-4-h-1はそのFcドメインをホモ二価架橋剤、例えばジメチルピメリデートと架橋させることを介してプロテインAセファロースカラムに固定化できる。

## 【0107】

次いで細胞抽出物をカラムに通し、そしてACT-4レセプタータンパク質をカラムに特異的に結合させ、例えば0.5Mのピロジエン酸pH2.5で溶出させる。通常、ACT-4レセプターのインタクト形態がかかる単離技術により得られる。ペプチドフラグメントはインタクト分子の化学的(例えば臭化シアン)又は酵素解裂(例えばVプロテアーゼ又はトリプシン)によりインタクトACT-4レセプターから作り上げる。

## 【0108】

天然ACT-4-Lリガンドポリペプチドは類似の手法を利用して精製できるが、ただしアフィニティー試薬はACT-4-L-h-1に特異的な抗体とする。

## 【0109】

C. その他の方法

他方、ACT-4又はACT-4-Lポリペプチドは化学的な方法により合成できるか、又は翻訳を誘導するポリヌクレオチド鋳型を利用するインビトロ翻訳系により製造される。ポリペプチドの化学合成及びインビトロ翻訳のための方法は当業界に公知であり、そしてBerger & Kimmel, Methods in Enzymology、第152巻、Guide to Molecular Cloning Techniques Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1987に更に記載されている。

## 【0110】

IV. 核酸A. ACT-4 又は ACT-4-L 核酸のクローニング

実施例5はACT-4-h-1と命名したACT-4レセプターのcDNAクローンについての核酸配列データを提供する。この配列は翻訳領域並びに3'及び5'フランキング領域の双方を含む。この配列データはプローブをデザインするために利用でき、そのプローブによりその他のACT-4レセプター遺伝子を単離する。これらの遺伝子にはACT-4-h-1をコードするヒトゲノム遺伝子、並びに高等哺乳動物由来のcDNA及びゲノムクローン、並びに対立形質及び非対立形質、並びにこれらの遺伝子の全ての天然及び誘導化突然変異体が含まれる。詳しくは、本願において開示する全てのACT-4レセプターポリペプチドをコードする全ての核酸フラグメントを提供する。多くの種のゲノムライブラリーが市販されており(例えばClontech, Palo Alto, CA)、又は慣用の手順により新規に単離できる。cDNAライブラリーは最良には、ACT-4-h-1を大量に発現する活性化CD4<sup>+</sup>細胞から調製する。

## 【0111】

クローンを単離するために用いるプローブは一般に図5-1~図5-2に示すcDNA配列

10

20

30

40

50

のおよそ少なくとも24個の連続ヌクレオチドの配列（又はその相補体）を含んで成る。例えば、図5-1～図5-2に示す配列に対応する全長ポリヌクレオチドをラベルし、そして例えば EMBL4 又は GEM11(Promega Corporation, Madison, WI)の中のヒトゲノムクローンライブラリーからゲノムクローンを単離するためのハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。

#### 【0112】

ブランクリフトをスクリーニングするための一般的なハイブリダイゼーション条件 (Benton & Davis, Science 196 : 180 (1978)) は、50%のホルムアルデヒド、5×のSSC又はSSPE、1～5×のデンハーツ溶液、0.1～1%のSDS、100～200 μgの剪断異種DNA又はtRNA、0～10%の硫酸デキストラン、約 $1 \times 10^8$  cpm/μgの比活性を有する $1 \times 10^5$ ～ $1 \times 10^7$  cpm/mlの変性プローブ、並びに42℃で約6～36時間のインキュベーションとしてよい。プレハイブリダイゼーション条件は本質的に同一であるが、ただしプローブを含ませず、そしてインキュベーション時間を一般に短くする。洗浄条件は一般に1～3×のSSC、0.1～1%のSDS、50～70℃とし、洗浄溶液を約5～30分で変換する。ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は一般に、高度同系又は非対立形質変異体の単離に関しては、例えばACT-4-h-1のヒトゲノムクローンにとってのそれよりも弱いストリンジェンシーとする。

10

#### 【0113】

他方、プローブはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を採用する方法によりACT-4レセプター遺伝子をクローニングするのに利用できる。PCR増幅は例えばPCR Technology : Principles and Applications for DNA Amplification (編 H. A. Erlich, Freeman Press, NY, NY, 1992) ; PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications(編 Innisら、Academic Press, San Diego, CA, 1990) ; Mattilaら、Nucleic Acids Res. 19 : 4967 (1991) ; Eckert, K. A and Kunkel, T. A., PCR Methods and Applications 1 : 17 (1991) ; PCR (編 McPhersonら、IRL Press, Oxford) ; 及び米国特許第4,683,202号に記載されている（これらは引用することで本明細書に組入れる）。

20

#### 【0114】

他方、図5-1～図5-2に示す配列全体又は一部に対応する合成ポリヌクレオチド配列はオリゴヌクレオチドの化学合成によって構築されうる。ヌクレオチド置換、欠失及び付加を本発明のポリヌクレオチドの中に組入れることができる。ヌクレオチド配列の変異は、遺伝コードの縮重、様々なACT-4レセプター対立形質の配列多形性、微細な配列決定誤差に由来し得、又は照射もしくはEMSに対する曝露を利用するコード核酸のランダム突然変異により、又は部位特異的突然変異誘発もしくは近代分子生物学のその他の技術により操作して変化させることにより導入することができる。Sambrookら、Molecular Cloning : A Laboratory Manual (C. S. H. P. Press, NY第2版、1989) (引用することで本明細書に組入れる)を参照のこと。

30

#### 【0115】

機能性ポリペプチドを生産するように転写及び翻訳されることのできるヌクレオチド配列に関して、遺伝子コードの縮重は同一のポリペプチドをコードするいくつかのヌクレオチド配列をもたらす。本発明はかかる配列全てを含む。一般に、ヌクレオチド置換、欠失及び付加は、ストリンジェンシー条件下で図5-1～図5-2に示すACT-4-h-1の配列にハイブリダイズするACT-4レセプターポリヌクレオチドの能力を実質的に破綻しないものであるべきである。一般に、ACT-4レセプターポリペプチドは天然ACT-4レセプター配列(図5-1～図5-2)と実質的に同一である少なくとも25個の連続ヌクレオチドを含んで成り、より通常にはACT-4レセプターポリヌクレオチドは天然のACT-4レセプター配列と実質的に同一である少なくとも50～100個の連続ヌクレオチドを含んで成る。

40

#### 【0116】

ACT-4レセプターポリヌクレオチドは短いオリゴヌクレオチド(例えば図5-1～図5-2に示すACT-h-1配列由来の約10, 15, 25, 50又は100連続塩基)、例えばハイ

50

ブリダイゼーションプローブ用及びPCR(又はLCR)プライマー用のものであってよい。ACT-4レセプターポリヌクレオチド配列は転写を促進する配列(発現配列)及びコード配列の翻訳を促進する配列を含む大型ポリヌクレオチドの一部を含んで成ってよく、これによりコード化ポリペプチド生成物が生成される。

【0117】

かかるポリヌクレオチドの構築は当業界に公知であり、そしてSambrookら、前掲(C. S. H. P. Press, NY 第2版、1989)に更に記載されている。ACT-4レセプターポリペプチドは、別のタンパク質(例えばグルタチオン S-トランスフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ又はイムノグロブリンFcドメイン)をコードする別のポリヌクレオチド配列とイン・フレームで融合して融合タンパク質の発現をコードさせることができる(例えばByrnら、Nature, 344: 667-670 (1990)を参照のこと)(引用することで本明細書に組入れる)。

【0118】

ACT-4-L遺伝子をコードする核酸は、プローブデザインのための出発材料として図10-1~図10-2に示すACT-4-L-h-1 cDNA配列を用い、類似の手法により製造できる。ACT-4-L遺伝子には、ACT-4-L-h-1をコードするヒトゲノム遺伝子、対立形質及び非対立形質変異体、高度同系変異、並びにこれらの遺伝子全ての天然及び誘導型突然変異体が含まれる。詳しくは、本願において開示する全てのACT-4-Lポリペプチドをコードする全ての核酸フラグメント(ゲノム、cDNA又は合成型)を提供する。

【0119】

天然配列の突然変異を有する核酸フラグメントにおいて、一般に突然変異はストリンジエンシー条件下でACT-4-L-h-1のヌクレオチド配列にハイブリダイズするACT-4-Lポリヌクレオチドの能力を実質的に破綻しないであろう。ACT-4-Lリガンドポリヌクレオチドは短いオリゴヌクレオチド(例えば図10-1~図10-2に示すACT-4-L-h-1配列由来の約10, 15, 25, 50又は100連続塩基)であってよく、例えばハイブリダイゼーションプローブ用及びPCR(又はLCR)プライマー用のものであってよい。ACT-4-Lリガンドポリヌクレオチド配列は、ACT-4ポリヌクレオチド配列に関して説明した通り、大型のポリヌクレオチドの一部を含んで成ってよい。

【0120】

V. 抗体及びハイブリドーマ

本発明のさらなる態様においては、ACT-4及びACT-4-Lポリペプチドに対する抗体が供給される。

【0121】

A. 抗体の一般的な特徴

抗体又は免疫グロブリンは典型的には、4種の共有結合されたペプチド鎖から構成される。たとえば、IgG抗体は2種のL鎖及び2種のH鎖を有する。個々のL鎖はH鎖に共有結合されている。他方、個々のH鎖は、免疫グロブリンコンホーメーションとしても知られている“Y”配置を形成するために他に共有結合される。それらの分子のフラグメント、又はH又はL鎖のみでさえ、抗原を結合することができる。抗体、抗体のフラグメント、及び個々の鎖はまた、免疫グロブリンとしても本明細書において言及される。

【0122】

通常の抗体H又はL鎖は、N-末端(NH<sub>2</sub>)可変(V)領域及びC-末端(-COOH)不変(C)領域を有する。H鎖可変領域は、V<sub>H</sub>(たとえばV<sub>H</sub>も包含する)として言及され、そしてH鎖可変領域はV<sub>L</sub>(V<sub>L</sub>又はV<sub>L</sub>も包含する)として言及される。可変領域は抗体の同起源抗原に結合する分子の一部であり、そしてF<sub>c</sub>領域(C領域の第2及び第3ドメイン)は抗体のエフェクター機能(たとえば補体固定化、オプソニン作用化)を決定する。完全な長さの免疫グロブリン又は抗体“L鎖”(一般的に25kDa、約214個のアミノ酸)は、N-末端で可変領域遺伝子(一般的には約110個のアミノ酸)及びCOOH-末端で(C<sub>κ</sub>)又は(C<sub>λ</sub>)不変領域遺伝子によりコードされる。

【0123】

10

20

30

40

50

完全な長さの免疫グロブリン又は抗体“H鎖”(一般的には約50Kd、約446個のアミノ酸)は、同様に、可変領域遺伝子(一般的には約116個のアミノ酸をコードする)及び不変領域遺伝子の1つ、たとえば遺伝子(約330個のアミノ酸をコードする)によりコードされる。典型的には、“ $V_L$ ”は $V_L$ 及び/又は $J_L$ ( $J$ 又は連結領域)遺伝子セグメントによりコードされるL鎖の一部を含み、そして“ $V_H$ ”は $V_H$ 及び/又は $D_H$ ( $D$ 又は多様化領域)及び $J_H$ 遺伝子セグメントによりコードされるH鎖の一部を含むであろう。一般的には、Roitt et al., Immunology (2d ed. 1989), Chaptor 6 及び Paal, Fundamental Immunology (Raven Press, 2d ed., 1989) (それらは引用により本明細書に組込まれる)を参照のこと。

#### 【0124】

免疫グロブリンL又はH鎖可変領域は、相補性決定領域又はCDRとも呼ばれる3種の超可変領域により中断されている“骨格”領域から成る。骨格領域及びCDRの程度は定義されている(Kabat et al. (1987), “Sequences of Protein of Immunological Interest,” U. S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) (それらは引用により本明細書に組込まれる)を参照のこと)。異なったL又はH鎖の骨格領域の配列は比較的、種内に保存される。抗体の骨格領域、すなわち構成成分であるL及びH鎖の組合された骨格領域は立体空間においてCDRを位置付け、そして整列するように作用する。CDRは抗原のエピトープへの結合を主に担当している。CDRは典型的には、N-末端から順に出発して番号を付けられている、CDR1、CDR2、及びCDR3として言及される。

#### 【0125】

$C_H$ としても知られている、H鎖分子の不変領域は抗体のイソタイプを決定する。抗体は、H鎖イソタイプに依存してIgM、IgD、IgG、IgA及びIgEとして言及される。イソタイプはそれぞれ、H鎖不変領域のミュー( $\mu$ )、デルタ( $\delta$ )、ガンマ( $\gamma$ )、アルファ( $\alpha$ )及びエプシロン( $\epsilon$ )セグメントにコードされている。さらに、多くのサブタイプが存在する。2種のタイプのL鎖、すなわち $C_L$ 及び $C_{L2}$ が存在する。それらのサブタイプの決定基の典型的には、一般的には $C_L$ としても言及され、そして特に $C_{L1}$ 又は $C_{L2}$ として言及される、L鎖の不変領域に存在する。

#### 【0126】

H鎖イソタイプは抗体の異なったエフェクター機能、たとえばオプソニン作用又は補体固定を決定する。さらに、H鎖イソタイプは、抗体の分泌された形を決定する。分泌されたIgG、IgD及びIgEイソタイプは典型的には、単一の単位又はモノマー形で見出される。分泌されたIgMイソタイプはペンタマー形で見出され;分泌されたIgAはモノマー及びダイマーの両形で見出され得る。

#### 【0127】

##### B. 抗体の生成

ACT-4受容体、ACT-4-Lリガンド又はそれらのいずれかの結合フラグメントのいずれかを結合する抗体は、種々の手段でより生成され得る。非ヒトモノクローナル抗体、たとえばネズミ、ラット、等のモノクローナル抗体の生成は良く知られており、そしてたとえばACT-4受容体又はそのリガンド、又はそれらのいずれかの免疫原性フラグメントを含む調製物により動物を免疫化することによって達成され得る。特に、組換えACT-4又はACT-4-L遺伝子により安定してトランスフェクトされ、そしてACT-4受容体又はそれらに対するリガンドをそれらの細胞表面上に発現する細胞が特に免疫原として有用である。

#### 【0128】

免疫化された動物から得られる抗体産生細胞は不滅化され、そしてACT-4受容体又はそれらのリガンドに結合する抗体の生成のためにスクリーンされる。Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (C. S. H. P. NY, 1988) (引用により本明細書に組込まれる)を参照のこと。ACT-4-L-h-1に実質的に類似するか又は同一の一次アミノ酸配列を有するタンパク質に対する多くのネズミ抗体が、Tozawa et al., Int. J. Cance

10

20

30

40

50

r 41 : 231-238 (1988) ; Tanaka et al., Int. J. Cancer 36 : 549-555 (1985) ( 引用により本明細書に組込まれる ) により論ぜられている。

【 0 1 2 9 】

ヒトモノクローナル抗体の生成のためのいくつかの技法はまた、記載されているが、しかし一般的には、ネズミ技法よりも一層厄介で且つすべての抗原に適用できない。たとえば、Larrick et al., アメリカ特許第 5,001,065号 ( 引用により本明細書に組込まれる ) を参照のこと。種々の抗原に対するヒトモノクローナル抗体を生成するために都合良く使用されて来た 1 つの技法は、Ostberg et al. (1983), Hybridoma 2 : 361-367, Ostberg., アメリカ特許第 4,634,664号及びEngleman et al., アメリカ特許第 4,634,666号 ( これらは引用により本明細書に組込まれる ) のトリオーマ ( trioma ) 方法論である。この方法により得られる抗体産生細胞系はトリオーマとして呼ばれる。なぜならば、それらは 3 種の細胞、すなわち 2 種のヒト及び 1 種のマウス細胞から由来しているからである。トリオーマは、ヒト細胞から製造される通常のハイブリドーマよりも一層安定して抗体を生成することが見出された。

10

【 0 1 3 0 】

他のアプローチは、組換え DNA 技法によりヒト不変領域に非ヒト抗体の CDR 領域を連結することによってヒト適合化された免疫グロブリンの生成である。Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 10029-10033 (1989) 及び W0 90/07861 ( 引用により本明細書に組込まれる ) を参照のこと。ヒト適合化された免疫グロブリンは、実質的にヒト免疫グロブリンからの可変領域骨格残基 ( 受容体免疫グロブリンと称する ) 及び実質的にマウス免疫グロブリン、たとえば L106 抗体 ( 例 1 を参照のこと ) からの相補性決定領域 ( ドナー免疫グロブリンと称する ) を有する。不変領域は、存在するならば、実質的にヒト免疫グロブリンからでもあり得る。

20

【 0 1 3 1 】

ヒト可変ドメインは通常、骨髄配列が、CDR が由来するネズミ可変領域ドメインとの高い程度の同一性を示すヒト抗体から選択される。H 及び L 鎖可変領域骨格残基は同じか又は異なったヒト抗体配列に由来する。ヒト抗体配列は、天然に存在するヒト抗体の配列であり得、又はいくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であり得る。Carter et al., W0 92 /22653 を参照のこと。ヒト可変領域骨格残基からの一定のアミノ酸が、CDR コンホメーション及び / 又は抗原への結合に対するそれらの可能な影響に基づいての置換のために選択される。そのような可能な影響の研究は、特定位置でのアミノ酸の特徴のモデル試験、又は特定のアミノ酸の置換又は変異誘発の効果の経験的な観察によるものである。

30

【 0 1 3 2 】

たとえば、アミノ酸がネズミ L106 可変領域骨格残基と選択されたヒト可変領域骨格残基との間で異なる場合、ヒト骨格アミノ酸は通常、そのアミノ酸が、

( 1 ) 抗原を直接的に非共有結合しているか、

( 2 ) CDR 領域に隣接しているか、

( 3 ) さもなければ、CDR 領域 ( たとえば CDR 領域の約 3 以内に存在する ) と相互作用するか、又は

( 4 )  $V_L - V_H$  界面に関与していることが正当に予測される場合、マウス抗体からの同等の骨格アミノ酸により置換されるはずである。

40

【 0 1 3 3 】

置換のための他の候補体は、その位置でヒト免疫グロブリンのために普通ではない受容体ヒト骨格アミノ酸である。それらのアミノ酸は、L106 抗体の同等の位置からの又はより典型的なヒト免疫グロブリンの同等の位置からのアミノ酸により置換され得る。

【 0 1 3 4 】

ヒトモノクローナル抗体又はその結合フラグメントをコードする DNA 配列を単離するためのさらなるアプローチは、Huse et al., Science 246 : 1275-1281 (1989) により概略されている一般的な方法に従ってヒト B 細胞から DNA ライブラリーをスクリーニングし、そして次に、所望する特異性の抗体 ( 又は結合フラグメント ) をコードする配列をクロー

50

ニングし、そして増幅することによるものである。Huseにより記載される手段は、ファージ表示技法を組合してより効果的にされる。たとえばDower et al., WO 91/17271 及びMc Cafferty et al., WO 92/01047を参照のこと。ファージ表示技法はまた、ACT - 4 受容体又はそれらのリガンドのために親和性を有することが前もって示されている抗体のCDR領域を変異誘発するためにも使用され得る。改良された結合親和性を有する抗体が選択される。

#### 【0135】

L106抗体と同じエピトープに特異的に結合する抗 - ACT - 4 受容体抗体は通常、競争結合アッセイにより同定される。そのアッセイは、3成分、すなわち ACT - 4 ポリペプチド（たとえば ACT - 4 - h - 1）、通常ラベルされるL106抗体及び試験下での抗体を有する。しばしば、ACT - 4 受容体ポリペプチドは、固体支持体に固定される。試験抗体は、それが ACT - 4 受容体ポリペプチドに特異的に結合するL106抗体の量を減じる場合、L106抗体と同じエピトープに結合する。そのような抗体を得るために必要なスクリーニングの程度は、L106により結合される特異的エピトープが免疫原として使用される手段により抗体を生成することによって減じられ得る。L106と同じエピトープに結合する抗体は、L106抗体と実質的に（但し完全ではない）同一のアミノ酸配列を示すことができ、又はL106抗体とは無関係な一次構造を有することができる。

10

#### 【0136】

L106よりも異なった結合特異性を有する（すなわち異なったエピトープに結合する）抗体 - ACT - 4 受容体抗体は相補的アプローチにより同定される。試験抗体は、ACT - 4 受容体ポリペプチドに結合するためにL106抗体と競争することへの失敗についてスクリーンされる。スクリーニングの程度は、L106により結合される特異的エピトープを欠いているフラグメントが免疫原として使用される手段により抗体を生成することによって減じられ得る。

20

ACT - 4 - Lリガンドポリペプチドに対する選択された抗体に対する同じか又は異なった結合特異性を有する抗体は、類似する方法により同定され得る。

#### 【0137】

CD4<sup>+</sup> 又はB細胞の活性化を刺激するか又は阻害する能力を有する抗体は、セクションVIに論ぜられているスクリーニング方法により同定され得る。いくらかの抗体は、ある刺激（たとえばアロ抗原法ではあるが、しかしマイトジェン性ではなく、又は逆も同じである）に応じて活性化を選択的に阻害することができ、そして他に対しては阻害しない。いくらかの抗体の阻害能力は、抗体が添加される時点での活性化の後の時間に依存することができる。いくらかの抗体は他の刺激に無関係にCD4<sup>+</sup> 又はB細胞を活性化する能力を有するが、ところが他の抗体はPHA 又は PMA / イオノマイシンにより付与されるような他の刺激の効能を増強する能力を単に有することができる。

30

#### 【0138】

上記方法により単離された抗体は、たとえば一次抗体による動物の免疫化により抗 - イディオタイプ抗体を生成するために使用され得る。抗 - ACT - 4 受容体抗体のためには、一次抗体への結合が ACT - 4 受容体又はそのフラグメントにより阻害される抗 - イディオタイプ抗体が選択される。抗 - イディオタイプ抗体及び ACT - 4 受容体又はそのフラグメントの両者は主要免疫グロブリンを結合するので、抗 - イディオタイプ免疫グロブリンはエピトープの“内部像”を表わし、そして従って、ACT - 4 - Lリガンドポリペプチドを置換できる。ACT - 4 受容体を置換できる ACT - 4 - Lリガンドポリペプチドに対する抗 - イディオタイプ抗体は類似するアプローチにより生成され得る。

40

#### 【0139】

##### C. エピトープのマッピング

L106抗体、又は ACT - 4 受容体に対するいづれか他の選択された抗体により結合されるエピトープは、ACT - 4 受容体ポリペプチド、たとえば ACT - 4 - h - 1 からの異なったアミノ酸セグメントを含むフラグメントのファミリーを提供することによって決定される。個々のフラグメントは典型的には、少なくとも4, 6, 8, 10, 20, 50又は100個の隣

50

接するアミノ酸を含んで成る。集合的には、ポリペプチドのファミリーは、完全な長さの ACT - 4 受容体ポリペプチドのアミノ酸配列の多く又はすべてを包含する。そのファミリーのメンバーは、たとえばL106抗体への結合について個々に試験される。試験下で抗体に特異的に結合できる最少フラグメントは、抗体により認識されるエピトープのアミノ酸配列を示す。類似するアプローチが、ACT - 4 リガンドポリペプチドに対する抗体により結合されるエピトープをマッピングするために使用される。

#### 【0140】

##### D. 抗体のフラグメント及び免疫毒素

本発明のもう一つの態様においては、ACT - 4 受容体又はそれらのリガンドに対する抗体のフラグメントが供給される。典型的には、それらのフラグメントは、少なくとも  $10^7$  M 及びより典型的には  $10^8$  又は  $10^9$  M の親和性を有する、ACT - 4 受容体又はリガンドに対する特異的結合性を示す。抗体フラグメントは、別々の H 鎖、L 鎖 Fab, Fab', F (ab')<sub>2</sub>, Fabc 及び Fv を含む。フラグメントは、組換え DNA 技法により、又は損なわれていない免疫グロブリンの酵素的又は化学的分離により生成される。

10

#### 【0141】

さらなる態様においては、免疫毒素が供給される。免疫毒素は、所望する特異性を有する抗体に結合される毒素から成るキメラ化合物である。抗体は毒素のための標的化剤として作用する。一般的には、Pastan et al., Cell 47 : 641-648 (1986) を参照のこと。毒素成分は、化学的又は組換え DNA 技法により損なわれていない抗体又はそのフラグメントに結合される。好ましくは、毒素は、隣接するタンパク質の形で免疫グロブリン鎖に連結される。たとえば、Chovnick et al., Cancer Res. 51 : 465 ; Chaudhary et al., Nature 339 : 394 (1989) (引用により本明細書に組込まれる) を参照のこと。適切な毒素成分の例は前記セクション I に列挙されており、そしてたとえば The Specificity and Action of Animal, Bacterial and Plant Toxins Ced. P. Cuatrecasas, Chapman Hall, London, 1976) (引用により本明細書に組込まれる) に概説されている。

20

#### 【0142】

##### E. ハイブリドーマ及び他の細胞系

上記に論ぜられた抗体及びそれらのフラグメントを生成するすべてのハイブリドーマ、トリオーマ及び他の細胞系は本発明において明白に包含される。それらは、L106マウス抗体を生成する、ATCC HB11483として American Type Culture Collection, Rockville, MD 20852 にブダペスト条約に基づいて寄託されたハイブリドーマ系 HBL106 を含む。

30

#### 【0143】

##### F. 抗体の使用

ACT - 4 及び ACT - 4 - L ポリペプチドに対する抗体及びそれらの結合フラグメントは、好ましくは種々の組織に由来するヒト又は霊長類 cDNA を含む cDNA 発現ライブラリーをスクリーニングするために、及び構造的に関連する免疫交差反応性タンパク質をコードする、cDNA 挿入体を含むクローンを同定するために有用である。Aruffo & Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 8573-8577 (1987) (引用により本明細書に組込まれる) を参照のこと。

#### 【0144】

抗体はまた、天然の ACT - 4 受容体又は ACT - 4 - L リガンドポリペプチドに又は抗体を生成するために使用されるそれらのフラグメントに構造的に又は進化的に関連する免疫交差反応性タンパク質を同定し、そして / 又は精製するためにも有用である。抗体、その結合フラグメント、免疫毒素及びイディオタイプ抗体の診断又は治療使用がセクション VI に記載されている。

40

#### 【0145】

##### VI. アゴニスト及びアンタゴニストについてのスクリーニング

ACT - 4 及び ACT - 4 - L ポリペプチド、そのフラグメント、類似体、抗体及びそれに対する抗 - イディオタイプ抗体、並びに他の化学的又は生物学的物質は、そのリガンドに対する ACT - 4 の結合を阻止し又は増強するそれらの能力についてスクリーンされる。さ

50

らに、それらは代謝工程、たとえば ACT-4 受容体又はそれらの表面に固定されている ACT-4-L リガンドポリペプチドのいずれかを担持する細胞における DNA 合成又はタンパク質リン酸化を刺激し又は阻害するそれらの能力について試験される。

【0146】

いくつかの方法においては、試験下の化合物は、ACT-4-L リガンドポリペプチド（又はその融合タンパク質）の精製された結合フラグメントに対する ACT-4 受容体（又はその融合タンパク質）の精製された結合フラグメントの結合性を阻止し又は増強するその能力についてスクリーンされる。そのような実験においては、受容体又はリガンドフラグメントのいずれかが、通常、固体支持体に固定される。次に、試験化合物は、支持体への結合性のために ACT-4 又は ACT-4-L フラグメント（支持体に結合されていてもいなくても）と競争する。通常、試験化合物、又は競争リガンドもしくは受容体のいずれかがラベルされる。

10

【0147】

他の方法においては、ACT-4 受容体及び ACT-4-L リガンドポリペプチドの両者、又はそれらの分子の結合フラグメントのいずれかが細胞表面上に発現される。たとえば、ACT-4-L リガンドポリペプチドは活性化された B-細胞上に発現され、そして / 又は ACT-4 受容体ポリペプチドは活性化された CD4<sup>+</sup> T-細胞上に発現され得る。他方、リガンド又は受容体のいずれかは、たとえば COS-7 細胞において組換え DNA から発現され得る（例 6 を参照のこと）。それらの方法においては、アゴニズム又はアンタゴニズムの存在は、ACT-4 受容体と試験化合物の存在下で存在するそのリガンドとの間の結合性の程度から決定される。他方、試験化合物の活性は、ACT-4 受容体を担持する細胞及び / 又は ACT-4-L リガンドポリペプチドを担持する細胞において DNA 中への <sup>3</sup>H-チミジンの組み込み又はタンパク質中への <sup>32</sup>P-組み込みの測定によりアッセイされる。

20

【0148】

ACT-4 又は ACT-4-L ポリペプチド-誘発性 DNA 合成又はタンパク質リン酸化を阻止する化合物がアンタゴニストである。ACT-4 受容体又はそのリガンドとの相互作用を通して DNA 合成又はリン酸化を活性化する化合物がアゴニストである。アゴニスト又はアンタゴニストの活性はまた、白血球活性化の他の機能的又は物理学的エンドポイントから、又は臨床学的に所望の又は所望しない結果、たとえば細胞溶解活性、又は血管から組織中への白血球の遊出からも決定され得る。

30

【0149】

インビトロでの T-細胞増殖をアゴナイズし又はアンタゴナイズする剤の能力は、インビボでの免疫応答に影響を及ぼす能力と相互関係する。インビボ活性は典型的には、適切な動物モデル、たとえばマウス又はラットを用いてアッセイされる。同種移植片拒絶に対する剤の効果をアッセイするために、たとえば可能性ある治療剤が同種組織の導入の前、種々の時間で動物に投与され得；そして動物が移植片拒絶についてモニターされ得る。移植を実施し、そして移植片拒絶についてモニターするための適切な方法は記載されている（たとえば、Hislop et al., J. Thorac. Cardiovasc. 100 : 360-370 (1990) (引用により本明細書に組込まれる) を参照のこと)。

【0150】

40

VII . 治療及び診断方法及び組成物

A . 診断方法

ACT-4 受容体又はその mRNA、又は ACT-4-L リガンド又はその mRNA の変更された発生量又は機能的な突然変異に関連する免疫システムの疾患及び状態は、本発明のプロープ及び / 又は抗体を用いて診断され得る。ACT-4 受容体又は mRNA の検出は、活性化された CD4<sup>+</sup> T-細胞の他の白血球サブタイプの区別を可能にする。たとえば、ACT-4 受容体は、ACT-4 受容体に特異的に結合する抗体又は ACT-4-L ポリペプチドを用いて検出され得る。

【0151】

活性化された CD4<sup>+</sup> T-細胞の存在は、たとえば侵入する細菌に対しての MHC クラス II

50

誘発性免疫応答の表示である。活性化されたCD4<sup>+</sup>細胞及びCD8<sup>+</sup>細胞の数の比較は、それらのそれぞれの活性化された細胞タイプを卓越的に誘発する、細菌及びウイルス感染間での示差的な診断を可能にする。活性化されたCD4<sup>+</sup>細胞の存在はまた所望しない疾病及び免疫システムの状態、たとえば同種移植片拒絶、移植片-対-宿主疾患、自己免疫疾患、アレルギー及び炎症の表示である。そのような疾病及び状態の処理における治療剤の効能はモニターされ得る。

#### 【0152】

ACT-4-Lリガンド又はそのmRNAの検出は、活性化されたCD4<sup>+</sup>T-細胞の出現が今にも起こりそうである活性化されたB-細胞及び/又はシグナルの存在を示す。ACT-4-Lリガンドはたとえば、ACT-4-Lリガンドに特異的に結合する抗体又はACT-4受容体ポリペプチドを用いて検出され得る。ACT-4-Lリガンド、続くACT-4受容体の連続的な検出(又は逆も同様である)は、免疫応答における活性化の異なった一時的な段階を通しての経過のモニターを可能にする。

#### 【0153】

診断は、患者から細胞サンプル(たとえば血液サンプル、リンパ節生検又は組織)を除去することによって達成され得る。次に、サンプルは、(1)サンプルの個々の細胞における発現されたACT-4受容体又はACT-4-Lリガンドの量(たとえば抗体又はFACS<sup>TM</sup>分析による固定された細胞の免疫組織化学的染色による)、(2)個々の細胞におけるACT-4受容体又はACT-4-LリガンドmRNAの量(ラベルされた相補的なポリヌクレオチドプローブとのin situハイブリダイゼーションによる)、(3)RNA抽出、続くラベルされた相補的ポリヌクレオチドプローブへのハイブリダイゼーションによる細胞サンプルにおけるACT-4受容体又はACT-4-LリガンドmRNAの量(たとえば、ノーザンブロット、ドットブロット、溶液ハイブリダイゼーション又は定量的PCRによる)、又は(4)細胞サンプルにおけるACT-4受容体又はACT-4-Lリガンドの量(たとえば、細胞破壊、続く得られる細胞抽出物のイムノアッセイ又はウェスタンブロットによる)を決定するための分析にゆだねられる。

#### 【0154】

診断はまた、診断用試薬(たとえば、それぞれ、活性化されたCD4<sup>+</sup>T-細胞又はB-細胞のモニターのためにはラベルされた抗-ACT-4又はACT-4-L抗体)のインビボ投与、及びインビボイメージングによる検出により達成され得る。投与される診断剤の濃度は、標的抗原をそれらの細胞への結合がバックグラウンドシグナルに比較して検出できるのに十分であるべきである。さらに、診断剤は、最良の標的対バックグラウンドシグナル比を付与するために循環システムから急速に除去され得ることが所望される。診断用試薬は、カメライメージングのために放射性同位体により、又は磁気共鳴又は電子回転共鳴イメージングのために常磁性同位体によりラベルされ得る。

#### 【0155】

臨床的に確立された正常なレベルの範囲外である、個人からの細胞サンプルにおけるACT-4受容体又はACT-4-Lリガンドのタンパク質又はmRNAのレベルの変化(典型的には上昇)は、サンプルが得られる個人における所望しない免疫反応の存在を示すことができ、そして/又はそのような反応を進展せしめる(又はそのような反応を通して進行する)ための個人の素因を示すことができる。タンパク質又はmRNAのレベルは、一定の系統の細胞タイプ(たとえばACT-4受容体のための活性化されたCD4<sup>+</sup>細胞)及び発生起源を同定するための区分マーカーとして使用され得る。そのような細胞タイプ特異的検出は、所望しない免疫応答の組織病理学的診断のために使用され得る。

#### 【0156】

##### B. 診断用キット

本発明のもう1つの観点においては、前記診断方法のための診断用キットが提供される。キットは、診断用試薬、たとえばACT-4受容体及びACT-4-Lリガンドに対するラベルされた抗体、及びラベルを検出するための試薬及び/又は装置を包含する容器を含んで成る。そのようなキットに通常見出される他の構成成分もまた、診断試験を実施するた

10

20

30

40

50

めの教示と一緒に含まれ得る。

【0157】

#### C. 医薬組成物

予防又は治療処理のために使用される医薬組成物は、活性治療剤、たとえば ACT - 4 受容体、ACT - 4 - L リガンド、それらのフラグメント及びそれらに対する抗体及びイディオタイプ抗体、並びに種々の他の成分を含んで成る。好ましい形は、投与及び治療用途の意図されたモードに依存する。組成物はまた、所望する配合に依存して、動物又はヒト投与のための医薬組成物を配合するために通常使用されるピークルとして定義される、医薬的に許容できる非毒性キャリアー又は希釈剤を含むことができる。希釈剤は、組成物の生物学的活性に影響を及ぼさないように選択される。そのような希釈剤の例は、蒸留水、生理学的食塩水、リンガー液、デキストロス溶液、及びハックス液である。さらに、医薬組成物又は配合物はまた、他のキャリアー、アジュバント、又は非毒性、非治療性、非免疫原性安定剤及び同様のものを含むことができる。

10

【0158】

#### D. 治療方法

治療方法は、ヒト又は動物、特に脊椎哺乳類における種々の疾病の処理のために上記治療剤を使用する。治療剤は、ACT - 4 受容体、その結合フラグメント、ACT - 4 - L リガンド、その結合フラグメント、抗 - ACT - 4 受容体及び抗 - ACT - 4 - L リガンド抗体、及びそれらに対する抗 - イディオタイプ抗体、それらの抗体の結合フラグメント、それらの抗体のヒト適合化されたバージョン、及び前述の他の剤を含む。いくつかの治療剤は、ACT - 4 受容体とそのリガンドとの作用を阻止〔又はアンタゴニストすることによって機能する。〕

20

【0159】

好ましくは治療剤は、受容体に結合するためにリガンドと競争し、又はリガンドに結合するために受容体と競争する。他の治療剤は、その剤が標的化するポリペプチドを担持する細胞を殺すことによって機能する。たとえば、エフェクター機能を有するか又は毒素、放射性同位体又は薬物に接合される抗 - ACT - 4 受容体抗体は、活性化された CD4<sup>+</sup> T - 細胞を選択的に殺すことができる。同様に、抗 - ACT - 4 - L リガンド抗体は、類似する環境下で活性化された B 細胞を殺すことができる。活性化された細胞の選択的排除は、所望しない免疫応答が、患者が暴露される侵入微生物を攻撃するために不活性化された B - 細胞、CD4<sup>+</sup> 細胞及び CD8<sup>+</sup> 細胞の形で残存する免疫能力を保存しながら、減じられ又は排除され得るので、特に好都合である。他の治療剤は、ACT - 4 受容体と ACT - 4 - L リガンドとの間の相互作用のアゴニストとして機能する。

30

【0160】

#### 1. 投与の用量及び方法

治療用途においては、医薬組成物（たとえば、ACT - 4 - h - 1 又は ACT - 4 - L - h - 1 に対する抗体を含んで成る）は、病状の進行及びその合併症を治癒し、特に抑制し、又は検出できるように遅延するのに十分な量で、所望しない免疫応答（たとえば移植片拒絶）をすでに有する患者にインビボ又はエクソビボで投与される。これを達成するための適切な量は、“治療的に有効な用量”又は“効果的用量”として定義される。

40

【0161】

この使用のために有効な量は、病状の重症度、患者の一般的な状態、及び投与の経路、並びに存在するなら、他の免疫抑制薬物との組合せに依存するが、しかし一般的には、用量当たり約 10ng ~ 約 1 g の活性剤の範囲であり、そして患者当たり 10mg ~ 100mg の一回の用量単位が通常使用される。医薬組成物は、静脈内注入により全身的に又は注射により局部的に投与され得る。後者は、局在化された所望しない免疫応答、たとえば宿主 - 対 - 移植片拒絶のために特に有用である。薬物投与のための方法の簡単な再考のためには、Lang er, Science 249 : 1527-1533 (1990) (引用により本明細書に組込まれる) を参照のこと。

【0162】

50

予防用途においては、医薬組成物は、所望しない免疫反応をすでに有さないが、しかし危険性を有する患者（たとえば、移植手術を受ける予定の患者）に投与される。投与されるべく剤の量は“予防学的に有効な用量”であり、この正確な量は患者の健康の状態及び免疫性の一般的なレベルに依存するが、しかし一般的には、用量当たり10ng～1g、特に患者当たり10mg～100mgである。

#### 【0163】

本発明の治療剤は従来の免疫調節剤よりも、より選択的であり、且つ一般的には低い毒性であるので、それらは従来の剤により時々観察される副作用をほとんど引き起こさないであろう。さらに、治療剤のいくつかはヒトタンパク質配列（たとえばACT-4受容体又はACT-4リガンドの結合フラグメント又はヒト適合化された抗体）であるので、それらは免疫学的応答、たとえばネズミ抗-CD3抗体により観察される応答をほとんど引き起こさないであろう。本発明の治療剤はお互に、組合され得る。

10

#### 【0164】

たとえば、ACT-4-Lリガンドに対する抗体とACT-4受容体に対する抗体との組合せはT-細胞活性化に対して特に効果的な阻害を提供する傾向がある。本発明の剤はまた、従来の治療剤と組合され得、そしてそのような剤の用量を副作用に関連しない低レベルの用量に下げたために使用され得る。たとえば、他の免疫抑制剤、たとえば3ドメインに対する抗体、T細胞抗原（たとえばOKT4及びOKT3、CD28）、B-細胞抗原（B7又はB7-2）、抗胸腺細胞グロブリン、及び化学療法剤、たとえばシクロスポリン、グルココルチコイド、アザチオプリン、プレドニゾンが、本発明の治療剤と共に使用され得る。

20

#### 【0165】

標的細胞の特定集団の破壊のためには、本発明の治療剤を他の分子に接合することが好都合である。たとえば、前記剤は、特定の免疫抑制剤を含むリポソーム、特定のモノクローナル抗体又は細胞毒素又は細胞活性の他のモジュレーターに連結され、それにより、標的細胞集団への接合体の結合がその集団の変更をもたらすであろう。多くのタンパク質毒素が前記で論ぜられた。化学療法剤は、たとえばドキソルピシン、ダウノルピシン、メトレセキセート、毒胞毒素及び抗-センスRNAを包含する。抗生物質もまた使用され得る。さらに、放射性同位体、たとえばイットリウム-90、リン-32、鉛-212、ヨウ素-131又はパラジウム-109が使用され得る。発射される放射線が標的化された細胞を破壊する。

30

#### 【0166】

##### 2. 処置に敏感な疾病及び病状

上記医薬組成物は、免疫システムのいくつかの疾病及び病状を処理するために適切である。

##### a. 移植片拒絶

最近、組織及び器官、たとえば皮膚、腎臓、肝臓、心臓、肺、脾臓及び骨髄を移植するための手術技法の効能に関して相当の改良がなされて来た。たぶん、主な目立った問題は、移植された同種移植片又は器官に対して受容体における免疫耐性を誘発するための満足する剤の欠乏である。

#### 【0167】

同種細胞又は器官が宿主中に移植される場合（すなわち、ドナー及び受容体と同じ種からの異なった個体である場合）、宿主免疫システムは移植された組織の破壊を導びく、移植体における外来性抗原に対する免疫応答を開始する傾向がある（宿主-対-移植片疾患）。CD8<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>細胞及び単球はすべて、移植組織の拒絶に包含される。本発明の治療剤は、受容体におけるアロ抗原-誘発性免疫応答を阻止するのに有用であり（たとえば、ACT-4受容体又はACT-4-Lリガンドに対しての抗体によるCD4<sup>+</sup>T-細胞のアロゲン(allogen)-活性化の阻止又は排除のために有用である）、それにより、そのような細胞が移植された組織又は器官の破壊に関与することを妨げる。

40

#### 【0168】

##### b. 移植片-対-宿主疾患

50

本発明の治療剤についての関連する用途は、“移植片 - 対 - 宿主”疾患 (GVHD) に関する免疫応答の調節である。GVHDは、免疫学的コンピテント細胞が同種受容体に移入される場合に生じる潜在的に致命的な疾病である。この状況においては、ドナーの免疫適格細胞が受容体における組織を攻撃する。皮膚、腸上皮及び肝臓の組織が時々、標的であり、そしてGVHDの進行の間、破壊され得る。この疾病は、免疫組織がたとえば骨髄移植において移植される場合に特に重大な問題を提示するが、しかし低い重症度のGVHDかまた、他の場合、たとえば心臓及び肝臓移植において報告されている。本発明の治療剤は、ドナーの白血球 (特に活性化された $CD4^+$  T - 細胞及び B - 細胞) の活性化を阻止し又は排除するために使用され、それにより、宿主における標的細胞を溶解するそれらの能力を阻害する。

【0169】

c . 自己免疫疾患

免疫抑制が所望される追加の状況は、自己免疫疾患、たとえばインスリン依存性糖尿病、多発性硬化症、スティッフマン症候群、リウマチ様関節炎、重症筋無力症及びエリテマトーデスの処理に存在する。それらの疾病においては、身体がそれ自体の抗原の1つに対しての細胞性及び/又は体液性免疫応答を発生せしめ、その抗原の破壊を導びき、そして潜在的に能力の劣る及び/又は致命的な結果を導びく。活性化された $CD4^+$  T - 細胞は、多くの自己免疫疾患、たとえば糖尿病において主要な役割を演ずると思われる。

【0170】

活性化された B 細胞は、他の自己免疫疾患、たとえばスティッフマン症候群において主要な役割を演じる。自己免疫疾患は、 $CD4^+$  T - 細胞及び/又は B - 細胞の活性化を阻止し、そして/又は排除する本発明の治療剤の1つを投与することによって処理される。場合によっては、自己免疫疾患が標的にされる自己抗原又はそのフラグメントが、免疫抑制剤投与の直前、それと同時に又はその直後に投与され得る。この場合、耐性が抑制処理下で自己抗原に対して誘発され、それにより連続した免疫抑制のための必要性を回避する。たとえばCobbold et al., WO 90/15152 (1990)を参照のこと。

【0171】

d . 炎症

炎症は、食作用性白血球、たとえば顆粒球及び単球の流体の蓄積及び移動による毛細拡張の結果を表わす。炎症は、種々の感染に対して宿主を防御することにおいて重要であるが、しかしまた、炎症性疾患、たとえば過敏性ショック、関節炎、痛風及び虚血性再灌流の所望しない結果をも有する。活性化された T - 細胞は炎症において重要な調節役割を有し、食作用白血球を活性化するインターフェロン 及びコロニー刺激因子を放す。

【0172】

活性化された食作用白血球は、内皮細胞を標的化するために食細胞を結合するように作用する、ホーミング受容体 (homing receptor) と称する多くの特異的細胞表面分子の発現を誘発される。炎症応答は本発明の治療剤による処理により減じられ、又は排除され得る。たとえば、ACT - 4 又は ACT - 4 - L に対する抗体は、活性化された $CD4^+$  細胞の活性化を阻止し、又はそれを排除し、それにより、食作用細胞型の活性化のために必要とされる分子のそれらの細胞からの開放を妨げる。

【0173】

e . 感染剤

本発明はまた、感染剤に起因する疾病及び病状を防止し又は処理することにワクチンの効能を増強するための方法も提供する。 $CD4^+$  T - 細胞及び/又は B - 細胞を活性化する能力を有する治療剤 (たとえば ACT - 4 又は ACT - 4 - L リガンドに対する一定のモノクローナル抗体) が、選択された抗原を含むワクチンの投与の直前、それと同時に又はその直後に投与される。治療剤は、選択された抗原に対しての免疫応答を高めるように作用する。それらの方法は、免疫欠損性疾病を有する患者において特に好都合である。

【0174】

f . HTLV - I 感染

ACT - 4 - h - L - 1 に対する抗体はまた、HTLV - I - 感染の細胞を殺すためにも有用

10

20

30

40

50

である。上記のように、そのような細胞は、ACT-4-h-1と同一であるか又はほぼ同一であるgp 34 抗原を発現する。それらの方法は通常、HTLV-I 感染の個人に対してインビボ又はエキスピボで実施される。しかしながら、その方法はまた、HTLV-I 感染のHIV 細胞をインビトロで殺すためにも効果的である。たとえば、その方法は、分析下での組織サンプルとの接触による感染から病院の労働者を保護するために特に有用である。

【0175】

HTLV-I 感染の危険性は、本発明の方法に従ってサンプルを処理することによって減じられ得る（但し、サンプルはHTLV-I の存在以外の何かについて試験される場合）。ACT-4-h-L-1 に対する抗体及びまた、ACT-4-h-1 に対する抗体は、HTLV-I 感染を有する個人に観察される免疫システムの不安の原因を減じ又は排除するのに効果的である。そのような不安の原因は、ACT-4 受容体を通してCD4<sup>+</sup> T-細胞と感染されたT-細胞との相互作用を可能にする、HTLV-I 感染されたT-細胞上での表面抗原としてのACT-4-h-L-1 の存在に起因する。

10

【0176】

g. AIDSの処理

HIV ウィルスは、CD4 受容体に結合することによってヒトCD4<sup>+</sup> T-細胞を感染することが知られている。しかしながら、存在する生産性感染のためには、CD4 受容体はCD4<sup>+</sup> T-細胞の受容体上に存在するもう1つの受容体と相互作用すべきである。活性化されたT-細胞の表面上での受容体としてのACT-4の同定は、ACT-4及び/又はそのリガンドACT-4-LがCD4と相互作用し、そしてT-細胞のHIV 感染に寄与していることを示唆する。ACT-4又はACT-4-Lに対して標的化される、治療的有効量の治療剤は、HIV 感染を阻止し、そしてそれにより、AIDSを処理することに効果的であり得る。それらの治療剤はまた、HIV 感染されたCD4<sup>+</sup> T-細胞をインビボ又はインビトロで殺害するためにも効果的であり得る。インビトロ方法は、上記のように偶発的な感染から病院労働者を保護することに利用される。

20

【0177】

h. 炎症性腸疾患の処理

ACT-4-L-L-1及びその特異的結合類似体及びパートナー（ACT-4を包含する）は炎症性腸疾患に関連して使用されることが見出された。

【0178】

ACT-4の組織発現は、直接的なアルカリホスファターゼ免疫組織化学的染色の標準技法を用いて調査された（たとえば、Immunocytochemistry: Practical Applications in Pathology and Biology, J. Polak and S. van Noorden, eds. John Wright and Sons, Bristolを参照のこと）。潰瘍性大腸炎及びCrohn's 病患者からの腸の生検組織サンプルは、抗-ACT-4抗体L106により陽性に染色した。L106+細胞群が、炎症の部位で粘膜を浸潤するリンパ様細胞間に見られた。正常な個人からの腸組織のサンプル又は患者からの単純な腸組織のサンプルにおいては、散乱されたL106+細胞が見られた。

30

従って、本発明はインビボ及びインビトロ診断方法、及び処理方法を提供する。

【実施例】

【0179】

次の例は例示的であって、本発明を限定するものではない。

40

例1: ACT-4-h-1に対するモノクローナル抗体

マウスを、PHA-形質転換T-リンパ芽球により免疫化した。免疫化されたマウスからの脾臓細胞を、SP2/O骨髓腫細胞により融合し、そしてT-細胞クローンに対して特異的な抗体を分泌するハイブリドーマを選択した。ハイブリドーマを限界希釈法によりクローン化した。得られたハイブリドーマの1つにより生成された、L106と称するモノクローナル抗体を、さらなる特徴化のために選択した。L106抗体は、IgG1イソタイプを有することが見出された。HBL106と称する、前記抗体を生成するハイブリドーマは、ATCC HB11483として寄託された。

【0180】

50

## 例 2 : L106抗体により認識されるポリペプチドの細胞分布

抗体L106を含むサンプルが、L106抗体に結合する組織及び細胞タイプを同定するために、Fourth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (Vienna 1989)で一定の関係者に利用された。その研究会からのデータは、Leukocyte Typing IV (ed. W. Knapp, Oxford U. Press, 1989) (引用により本明細書に組込まれる)に示され、そして付随するコンピューターデータベースはWalter R. Gilks, MRC Biostatistics Unit, Cambridge University, Englandから入手できる。この文献は、L106抗体が約50KDaのポリペプチドを結合することを報告する。

### 【0181】

このポリペプチドは、HUT-102細胞(形質転換されたT-細胞系)、PHA-活性化された末梢血液リンパ球、BBV-形質転換されたB-リンパ球細胞系、及びHTLV-II形質転換されたT-細胞系、PMA-活性化された扁桃細胞、ConA-又はPHA-活性化されたPBL及びPMA-活性化された単球上に存在することを報告されている。ポリペプチドは、中でも休止好塩基性細胞、内皮細胞、線維芽細胞、インターフェロン-活性化単球、末梢非-T-細胞、末梢顆粒球、末梢単球、末梢単核細胞、末梢T細胞及び末梢赤血球細胞上には実質的に不在であることを報告された。

### 【0182】

本発明者は、50KDaのポリペプチド(この後、“ACT-4-h-1受容体”と称する)が活性化されたT-細胞のCD4<sup>+</sup>亜種上に選択的に発現されることを示すデータを得た。1つの一連の実験において、細胞-特異的ACT-4-h-1発現を、2色染色法により分別されていないPBLに対して分析した。PBLを約2日間、PHAにより活性化し(例3に記載される培養条件を用いる)、そして2種の異なってラベルされた抗体(FITC及びPEラベル)による染色により異なった細胞サブタイプ上でのACT-4-h-1の細胞表面発現について分析した。ラベルを、Picker et al., J. Immunol. 150: 1105-1121 (1993) (引用により本明細書に組込む)により記載されるようにして、FACS<sup>TM</sup>分析により検出した。

### 【0183】

1種の抗体L106はACT-4-h-1に対して特異的であり、他の抗体は特定の白血球サブタイプに対して特異的であった。図1は、L106染色が個々の図のY-軸上に示され、そして抗-CD4、抗-CD8及び抗-CD19染色がそれぞれの図のX-軸として示されている3種の図を示す。抗-CD4により染色された図に関しては、多くの細胞が二重陽性として現われる(すなわち、CD4及びACT-4-h-1の両者を発現する)。抗-CD8により染色された図に関しては、かなり少数の細胞が二重陽性として現われる。抗-CD19により染色された図に関しては(B-細胞マーカー)、二重陽性細胞は実質的に存在しない。

### 【0184】

もう1つの一連の実験においては、ACT-4-h-1の発現を、単離された細胞型に対する単色染色により分析した。細胞を、蛍光的にラベルされたL106抗体により染色し、そしてラベルをFACS<sup>TM</sup>分析により検出した。Engleman et al., J. Immunol. 127: 2124-2129 (1981) (引用により本明細書に組込む)を参照のこと。いくつかの実験において、細胞を約2日間、PHA刺激により活性化した(再び、例3に記載される培養条件を用いる)。上記2色染色実験からの結果と共に、この実験からの結果は表1に要約されている。

### 【0185】

表1は、活性化されたCD4<sup>+</sup>細胞の約80%が、CD4<sup>+</sup>細胞が単離されているか(一色染色)又は分別されていないPBLにおけるか(2色染色)に関係なく、20以上の平均チャネル蛍光を伴ってACT-4-h-1を発現したことを示す。活性化されたCD8<sup>+</sup>細胞上でのACT-4-h-1の発現のレベルは、2色染色実験において、活性化されたCD4<sup>+</sup>T-細胞上でよりも一層低く、そして一色染色においては、ひじょうに低い。従って、活性化されたCD8<sup>+</sup>細胞上での発現の程度は、CD8<sup>+</sup>細胞が活性化の前、他のPBLから分別されているかどうか依存するように思える。

### 【0186】

分別されていないCD8<sup>+</sup>細胞においては(2色染色)、細胞の約30%が、約4の平均チ

チャンネル蛍光を伴って、ACT-4-h-1を発現する。分別された細胞においては、わずか4%の細胞が、約2の平均チャンネル蛍光を伴って、ACT-4-h-1を発現する。それらのデータは、ACT-4-h-1が活性化されたCD8<sup>+</sup>細胞の小サブタイプ上にものみ発現され、そしてこのサブタイプは、CD8<sup>+</sup>細胞が他のPBLの存在下で活性化される場合、幾分より有力であることを示唆する。

【0187】

表1はまた、ACT-4-h-1が試験されたすべての休止白血球サブタイプ(すなわちCD4<sup>+</sup>T-細胞、CD8<sup>+</sup>T-細胞、CD19<sup>+</sup>B-細胞、CD14<sup>+</sup>単球、顆粒球及び血小板)上に実質的に不在であり、そしてまた、活性化されたB-細胞及び単球上にも実質的に不在であったことを示す。ACT-4-h-1はまた、試験されたほとんどの腫瘍細胞系上に実質的に不在であることが見出された。しかしながら、Molt3, Raji及びNC37細胞系は、低レベルの発現を示した。

10

【0188】

【表 1】

		ACT-4-h-1 発現の細胞特異性		
		ACT-4-h-1 の発現 %細胞	MCP <sup>1</sup>	
二色染色				
CD4 <sup>+</sup>	T-細胞 (休止)	<2	<2	10
CD4 <sup>+</sup>	T-細胞 (活性化された) <sup>2</sup>	80	25	
CD8 <sup>+</sup>	T-細胞 (休止)	<2	<2	
CD8 <sup>+</sup>	T-細胞 (活性化された)	10	4	
CD19 <sup>+</sup>	B-細胞 (休止)	<2	<2	
CD19 <sup>+</sup>	B-細胞 (活性化された)	<2	<2	
CD14 <sup>+</sup>	単球 (休止)	<2	<2	
CD14 <sup>+</sup>	単球 (活性化された)	<2	<2	
一色染色				
PBLa	(休止)	<2	3	20
PBLa	(活性化された)	50	27	
CD4 <sup>+</sup>	(休止)	<2	<2	
CD4 <sup>+</sup>	(活性化された)	80	22	
CD8 <sup>+</sup>	(休止)	<2	<2	
CD8 <sup>+</sup>	(活性化された)	4	2	
顆粒球		<2	<2	
血小板		<2	<2	
腫瘍系				
Molt-4, CEM, Rut 78, H9, Jurkat		<2	<2	30
RPB-ALL, Sanary, T-AU		<2	<2	
Molt-3		20	3	
B-LCL, Arent, RML, JY, KNY, PGR		<2	<2	
MSAS ; GESS, 9037, 9062		<2	<2	
Dandi, Ramos, Namalwa		<2	<2	
Raji, NC37		30	4	
U937, THP-1, HL-60		<2	<2	
Kgla, K562, HEL		<2	<2	

<sup>1</sup> MCF=平均チャネル蛍光

<sup>2</sup> : “活性化された”ものとして示される細胞は、約3日間 PHAにより刺激された。

40

## 【0189】

例3 : CD4<sup>+</sup> T-細胞活性化に対して敏感な ACT-4-h-1 発現の時間経過

CD4<sup>+</sup> T-細胞を、種々の活性化刺激に応答しての ACT-4-h-1 受容体の発現について試験した。CD4<sup>+</sup> T-細胞を、固相免疫吸着により末梢血液単核細胞から精製した。5 × 10<sup>4</sup> 個の CD4<sup>+</sup> T-細胞を、10% ヒト血清により補充された RPMI 培地を含むマイクロタイターウェルにおいて活性剤と共に培養した。3種の異なる活性剤を使用した：(1

50

)  $5 \times 10^4$  個の照射された (3000ラド) 単球、(2) PHA ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 及び (3) テタヌストキソイド ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )。  $^3\text{H}$ -チミジンを、収穫の12~16時間前、培養物に添加した。収穫の後、Engleman et al., J. Immunol. 127: 2124-2129 (1981) により記載されるようにして、細胞を、種々のラベルされた抗体 (L106、抗-CD4 及び抗-CD8) と共にインキュベートすることにより細胞表面抗原の発現について試験した。

#### 【0190】

図2はアロ抗原活性化に応答しての ACT-4-h-1 の出現を示す。活性化の前、発現は観察されなかった。ACT-4-h-1 受容体を発現する細胞の%は、時間と共に上昇し、アロ抗原活性化の約7日後、約30%のピークを示した。その結果はまた、ACT-4-h-1 を発現する実質的にすべての細胞がまた、CD4 受容体を発現し、そしてそのような細胞はCD8 受容体を実質的に発現しなかったことを示す。

10

#### 【0191】

図3はテタヌストキソイド活性化に応答しての ACT-4-h-1 の発現についての類似するデータを示す。再び、ACT-4-h-1 を発現する細胞の%は、約7日でピークを示した。しかしながら、この時点で、より高い% (約60%) の細胞が受容体を発現した。図4は、PHA 活性化に応答しての  $\text{CD}4^+$  T-細胞上での ACT-4-h-1 の出現についての類似するデータを示す。この場合、受容体を発現する  $\text{CD}4^+$  T-細胞の%は、活性化の3日後、約65%でピークを示した。

ACT-4-h-1 は種々の活性化刺激に応答して発現される  $\text{CD}4^+$  T-細胞活性化抗原であることが結論づけられる。

20

#### 【0192】

##### 例4: ACT-4-h-1 cDNA のクローニング

ACT-4-h-1 受容体のためのcDNAクローンを、Aruffo & Seed(前記)により最初に開発された、わずかに変性されたCOS細胞発現システムを用いて単離した。RNAを、72時間PHA活性化されたヒト末梢血液リンパ球から単離した。全RNAをTRI-試薬(Molecular Research Center)により抽出し、そしてポリ(A)+RNAをオリゴdT-磁気ビーズ精製(Promega)により単離した。cDNAを、スーパースクリプト逆転写酵素(Gibco/BRL)及びオリゴdTプライマーを用いて、Gubler & Hoffman, Gene 25: 263-369 (1982)の方法により合成した。プラント末端化されたcDNAを、非-自己-相補的BstX1アダプターに連結し、そしてSephacryl S-400回転カラム上を通し、連結されていないアダプター及び小さなフラグメント(300塩基対以下)を除去した。

30

#### 【0193】

次に、連結されたcDNAを、BstX1により切断された真核発現ベクター pcDNA-IRL(すなわち pcDNA-I (Invitrogen) の耐アンピシリン性バージョン)中に連結した。その連結反応の沈殿されそして洗浄された生成物を、E.コリ株MW1100 (BioRad)中にエレクトロポレートした。形質転換された細菌のアリコートのコロニー形成及びコロニー計数は、増幅されていないライブラリーにおいて2百万の独立したクローンの合計数を示した。平均挿入サイズは、1.2kbであることが決定された。多量のライブラリーを、液体培地、すなわち250mlの標準のLB培地において増幅した。プラスミドをアルカリ溶解により回収し、そしてイオン交換カラム(Qiagen)上で精製した。

40

#### 【0194】

ヤギ集密性のCOS-7細胞を、精製されたプラスミドDNAによりエレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。細胞を100mmの皿上にプレートし、そして48時間増殖せしめた。細胞をPBS-EDTA溶液によりプレートから回収し、モノクローナル抗体L106と共にインキュベートし、そして標準方法に従って処理した。第2回目の処理は、プレートに吸着された多くのCOS細胞としての富化を示した。エピソームDNAをHirt方法により免疫選択された細胞から回収し、そして増幅のために細菌中にエレクトロポレートした。

#### 【0195】

第2回目のHirt調製物からのプラスミドにより形質転換された細菌を、約100のコロニーの小さなプール中に希釈した。そのプールを増幅し、そしてそれらのDNAを精製し、そ

50

して免疫蛍光により COS - 7 細胞上での L106 抗原の発現を付与する能力について試験した。フィコエリトリン - 接合の L106 抗体を用いて、COS - 7 細胞単相を染色し、そして細胞を手動制免疫蛍光顕微鏡により試験した。8 つのプールのうち 4 つのプールからの Miniprep DNA は、発現について試験される場合、陽性であった。最良の発現を有するプール、すなわちプール E を、12 のコロニーの小さなプールに分割した。8 つのサブプールのうち 3 つのサブプールは陽性であり、そしてサブプール E1 をプレートし、単一コロニーの分析を行った。コロニー E1 - 27 は、トランスフェクトされた COS 細胞の表面上に ACT - 4 - h - 1 受容体の高レベル発現を付与することが見出された。

【 0 1 9 6 】

#### 例 5 : cDNA 配列の分析

E1 - 27 と称するクローンからの挿入体を pBluescript 中にサブクローンし、そして ALF スクエンサー (Pharmacia) に基づく T7 ポリメラーゼ自動読取り配列を決定キット (Pharmacia) を用いて、ジデオキシ鎖終結方法により配列決定した。制限地図は、サブクローニングのためのいくつかの便利な部位を示した。5 つのサブクローンを pBluescript において生成し、そして M13 前進性及び普遍的プライマーにより両鎖を配列決定した。

【 0 1 9 7 】

ACT - 4 - h - 1 の cDNA 及び推定されるアミノ酸配列は図 5 - 1 ~ 図 5 - 2 に示される。1,137 個の塩基対の ACT - 4 - h - 1 cDNA は、14 - bp の 5' - 未翻訳領域及び 209 - bp の 3' - 未翻訳領域を含む。AATAAA ポリアデニル化シグナルは、1,041 位で存在し、続いて 80 - bp のポリ A 末端が 1,057 位で開始する。最長の読み取り枠は、15 位での最初の ATG で始まり、そして 846 位での TGA で終結する。予測されるアミノ酸配列は、典型的なタイプ 1 膜内在性タンパク質の配列である。疎水性の分析は、開始 ATG に続いて推定上のシグナル配列を示し、そして塩基性残基の短い範囲に続いて、疎水性残基の長い範囲が存在した。

【 0 1 9 8 】

予測されるシグナルペプチド切断部位は、残基 22 又は 24 で存在し (後者は、von Heijne, *Nucleic Acids Res.* 14 : 4683-4690 (1986) (引用により本明細書に組込む) の基準によりより有望である)、その部位は 253 個のアミノ酸残基の成熟タンパク質を切断する (又は低い可能性の部位で切断が生じる場合、255 個のアミノ酸残基が存在する)。疎水性の分析はまた、トランスメンブランドメインであると予測される 27 個の疎水性残基の単一の大きな範囲を示し、これは 189 (又は 191) 個のアミノ酸の細胞外ドメイン及び 37 個のアミノ酸の細胞内ドメインを予測する。細胞外ドメインはシステインに富んでおり、ここでは、18 個のシステインが 135 個のアミノ酸の範囲内に見出される。成熟タンパク質のための予測される分子量 (M) は 27,400 であり、そしてアミノ酸残基 146 及び 160 で 2 つの可能性ある N - グリコシル化部位が存在する。

【 0 1 9 9 】

BLAZE プログラムを用いての、swiss-prot データベースにおける既知の配列と ACT - 4 - h - 1 のアミノ酸配列との比較は、神経成長因子受容体超科のメンバーとの配列類似性を示す。アミノ酸配列は、NGF - R, TNF - R, CD40, 41 - BB 及び fas / APO-1 について少なくとも 20% の同一性を示し、そして OX - 40 については 62% の同一性を示し、ギャップ及び欠失を可能にする。種々のタンパク質の整合は、複数のシステインに富むモチーフの保存を示す。それらのモチーフの 3 種は ACT - 4 - h - 1 及び OX - 40 に存在し、それに比較して、他の 4 種のそのようなモチーフは NGF - R 及び CD40 に存在する。

【 0 2 0 0 】

プログラム BLAST 及び FASTDS を用いての、Genbank and FMBL データベースにおける既知の配列と ACT - 4 - h - 1 のヌクレオチド配列との比較は、神経成長因子受容体超科のわずか 1 種のメンバー OX - 40 との高い程度の配列類似性を示した。ギャップ及び挿入を可能にした後、配列の同一性は 66% である。ACT - 4 - h - 1 及び OX - 40 ヌクレオチド配列の比較は、両者が 14 - bp の 5' 未翻訳領域を含み、そして両者が約 80 - bp のポリ A 末端を含むことを示す。

10

20

30

40

50

## 【0201】

しかしながら、ACT-4-h-1においては、187-bp~209-bpのわずかに延びた3'末翻訳領域が存在し、そして816-bp~834-bpの延びたコード領域、すなわち18-bp又は6個のアミノ酸挿入の差異が存在する。2種のアミノ酸配列の整合は、4個のアミノ酸挿入がシグナル配列切断部位の前に生じることを示す。従って、成熟ACT-4-h-1受容体タンパク質は、OX-40よりも1つ多くのアミノ酸残基を含む（すなわち253対252個のアミノ酸）。注目すべき事には、ACT-4-h-1ヌクレオチド配列はOX-40配列よりも一層多くのGCに富んでおり（70%対55%）、これは2種の配列が緊縮条件下でハイブリダイズしないであろうことを示唆する。

## 【0202】

10

## 例6：安定したACT-4-h-1トランスフェクタントの生成

XbaI-HindIIIフラグメントを、例4に記載の構造体から切出し、そしてXbaI/HindIII消化されたpcDNA-I-neo(Invitrogen)中に挿入し、ACT-4-h-1-neoと称する発現ベクターを生成した(図6)。このベクターをSf1により線状化し、3種の真核細胞系中にエレクトロポレートした。それらの細胞系は、SP2/O(Balb/O株に由来するマウス骨髄腫)、Jurkat(形質転換されたヒトT-細胞系)及びCOS-7(付着性サル細胞系)であった。48時間の回収期間の後、形質転換された細胞を1mg/mlのG418(Gibco)において選択した。

## 【0203】

20

3週間の選択の後、neo-耐性細胞系を飽和濃度のL106抗体と共にインキュベートし、洗浄し、そしてACT-4-h-1を発現する細胞を選択するためにヤギ抗-マウスIgGにより被覆された100mmペトリ皿上に積層した。結合されなかった細胞を洗浄した後、付着細胞を回収し、そして組織培養において拡張した。細胞系はさらに2回のパンニング及び発現を受けた。得られた細胞系を、多くのACT-4-h-1を表わすために直接的な免疫蛍光染色により示した(図7)。

同じ手段及び原理を用いて、ACT-4-L-h-1を発現する安定した細胞系を得た(例10を参照のこと)。

## 【0204】

## 例7：ACT-4-h-1-免疫グロブリン融合タンパク質の合成

30

ACT-4-h-1の細胞外ドメインがヒト免疫グロブリンの不変ドメインのN-末端にそのC-末端を通して連結されている安定した融合タンパク質を構成した。例4に記載されるACT-4-h-1をコードするベクターをSmaI及びNotIにより切断し、トランスメンブラン、原形質及び3'末翻訳領域を包含する、SmaI部位の下流のすべてのACT-4-h-1配列を切出した。残る領域は、ACT-4-h-1の可溶性細胞外部分をコードする(図8)。

## 【0205】

40

ACT-4-h-1細胞外ドメインに連結されるべき免疫グロブリン不変領域の源は、5K-41BB-EgIと称するプラスミドであった(Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:10360-10364)(引用により本明細書に組込む)。このプラスミドは、ヒトIg、イソタイプ1のヒンジ、CH2及び末端CH3ドメインをコードする。1.3kbのBamHI/EagIゲノムフラグメントを含む。このフラグメントは、プラント末端連結により形成されるべきSmaI結合を通してペプチド読み取り枠を保存しながら、ACT-4-h-1ベクターのSmaI/NotI末端中への挿入のために変性を必要とした。

## 【0206】

ベクター5K-41BB-EgIをBamHIにより切断し、そして得られる5'拡張部をクレノウフラグメントによりフィルインした。次に、ベクターをEagIにより切断し、プラント及びNotI適合性部位を有する1.3kbのフラグメントを放した。このフラグメントを、SmaI/NotIにより消化されたACT-4-h-1により連結した。連結混合物をE.コリ中にエレクトロポレートし、そして複数の形質転換クローンを、プライマーとしてACT-4-h-1及びIgG1ヌクレオチドフラグメントを用いてPCRによりスクリーンした。

50

## 【0207】

ACT-4-h-1-IgG1コードを含むプラスミドをCOS細胞中にエレクトロポレートした。細胞を5日間増殖せしめ、この時点で、上清液を収穫し、そして0.2ミクロンの膜を通して濾過し、殺菌した。上清液を、ドットプロットにより、ACT-4-h-1-IgG1の発現について試験した。上清液をニトロセルロース上にプロットし、そして5%脱脂ドライミルクによりブロックした。レプリカプロットを抗体L106又はアルカリホスファターゼによりラベルされたヤギ抗-ヒト免疫グロブリンIgG (America Qualex)によりプローブした。抗体L106を、アルカリホスファターゼによりラベルされたヤギ抗-マウスIgGにより検出した。NBT/BCIP (Pierce) は比色基質として使用された。高い生産性の陽性クローンを結合部位で配列決定し、適切なベクター構造を確かめた。得られる融合遺伝子は、図9に示される。

10

## 【0208】

例8: ACT-4-h-1に対するリガンドを発現する細胞タイプの同定

ACT-4-h-1に対するリガンドを発現する細胞タイプを、プローブとして、例7に記載されるACT-4-h-1組換え免疫グロブリン融合タンパク質(この後、ACT-4-h-1-Rgと称す)を用いて、流動細胞計測法と組合しての間接的染色法により同定した。結合された融合タンパク質を、フィコエリトリン接合の抗-ヒトIgを用いて検出した。それらの実験は、ACT-4-h-1に対するリガンドが、Burkittリンパ腫細胞系(Jiyoye)、及びEBV-形質転換されたLCL 9037, 9059及びMSABを包含する、少数のB-細胞系上に低レベルで発現されたことを示した。それらの細胞系は3のMCFを伴って、5%の陽性を示した。表2を参照のこと。

20

## 【0209】

細胞系Jiyoyeに関しては、10のMCFを伴って90%の陽性で染色される、細胞系Jo-P5を生成するためにパンニング方法により細胞染色を陽性になるよう富化することが可能であった。新たに単離されたT-細胞、B-細胞、単球、樹枝状細胞、ほとんどのT-細胞腫瘍系及び骨髓性単球細胞系のPBMC及び精製されたサブ集団を包含する、試験される他の細胞系は、ACT-4-h-1に対するリガンドを実質的に有さなかった。しかしながら、2種のHTLV-Iは、T細胞系、すなわちHUT-102及びACT-4-h-1を発現するMT-2を感染せしめ、ここで後者はひじょうに高いレベルで感染せしめた。

## 【0210】

実験を、PHA又はPMA/イオノマイシンの組合せのいずれかを用いての細胞の活性化の後にくり返した。3日間、2 $\mu$ g/mlのPHAにより活性化されたPBMCは、ドナーに依存して、ACT-4-h-1に対するリガンドのために2~10%の陽性で染色した。PMA(10ng/ml)及びイオノマイシン(500ng/ml)の組合せを用いてのB-LCL細胞及びBurkitリンパ腫系の活性化は、いくつかの細胞系、特に休止状態で低レベルの発現を示したMSABのような細胞系のためのリガンドの実質的な発現を誘発した。表2を参照のこと。分別されていないB細胞もまた、リガンドの選択的発現を示した(15%の細胞陽性、MHC=5)。

30

## 【0211】

MSAB細胞に対する時間の経過の研究は、リガンド発現が活性化の2日後に始まり、そして3又は5日目でピークを示すことを示唆した。PMA/イオノマイシン活性化はまた、赤白血病細胞系及び試験された3種の骨髓腫単球のうち1種、すなわちTHP-1においてリガンドの選択的発現を誘発した。PMA/イオノマイシン活性化はまた、T-細胞においてリガンドの低レベルの発現を誘発するが、試験された他のT-細胞系においては誘発しなかった。

40

## 【0212】

【表 2】

表 2  
 異なった細胞型上での ACT-4-h-1 に対するリガンドの発現

B-LCL
-------

	休 止			活性化された <sup>1</sup>	
MSAB	2-5% <sup>2</sup>	mcf <sup>3</sup>	4	80 %	mcf 21
CESS	< 2			70 %	mcf 25
JY	< 2			40 %	9
REM	< 2			40 %	11
9059	2-5%	mcf	4	40 %	6
SKF	< 2			30 %	3
9037	2-5%	mcf	4	25 %	5
9062	< 2			10 %	5
PGF	< 2			6 %	10
ARENT	< 2			4 %	5
KHY	< 2			3 %	5

10

BURKITリンパ腫
------------

Jiyos	20%	mcf	4	7 %	5
Daudi	< 2			10 %	5
Naralwa	< 2			5 %	5
Raji	< 2			< 2	

他の B 細胞
---------

(Pra B)	NC-37	< 2		< 2	
(B-A11)	SB	< 2		15 %	5

30

【表 3】

## T-細胞

HSB-2	< 2	6 %	3
Jurkat	< 2	< 2	
Mol +4	< 2	< 2	
Mol +3	< 2	< 2	

10

## T-細胞 (続き)

	休 止	活性化された <sup>1</sup>	
HPB-ALL	< 2	< 2	
HU +78	< 2	< 2	
H9	< 2	< 2	
VB	< 2	< 2	

## 骨髄性単球

THP-1	< 2	25 %	mcf	5
V937	< 2	< 2		
HL60	< 2	< 2		

20

## 赤白血球

HEL	< 2	25 %		5
R562	2 %	25 %		5

30

## HTLV-1 感染された T-細胞

HUT-102	30%	mcf	4
MT-2	100%		100

- 1 : PMA/イノマイシン  
 2 : %陽性細胞  
 3 : 平均チャネル蛍光

40

## 【 0 2 1 4 】

例 9 : ACT-4-h-1 リガンドをコードするクローニング cDNA

リガンドのための cDNA クローンを、Aruffo & Seed により最初に開発された、わずかに変性された COS 細胞発現システムを用いて単離した。RNA を、72 時間 PMA/イオノマイシン - 活性化されたヒト EBV - 形質転換 B 細胞 (細胞系 MSAB) から単離した。全 RNA を TRI - 試薬 (Molecular Research Center) により抽出し、そしてポリ (A) + RNA をオリゴdT - 磁気ビーズ精製 (Promega) により単離した。cDNA を、スーパースクリプト逆転写酵素 (Gibco/BRL) 及びオリゴdTプライマーを用いて、Gubler & Hoffman, Gene 25 : 263-369 (1982) の方法により合成した。

## 【 0 2 1 5 】

50

プラント末端化されたcDNAを、非 - 自己 - 相補的BstX1アダプターに連結し、そしてSepharose 4Bカラム上に通し、連結されていないアダプター及び小さなフラグメント(300塩基対以下)を除去した。次に、連結されたcDNAを、BstX1により切断された真核発現ベクター-pcDNA (Invitrogen)中に連結した。その連結生成物を、沈殿せしめ、洗浄し、そして一千万個の独立したクローンの増幅されていないライブラリーを生成するE. coli株MC1061/P3中にエレクトロポレートした。ライブラリーにおける平均挿入体サイズは1 kbであった。多量のライブラリーを、250mlの標準LB培地において増幅した。プラスミドDNAをアルカリ溶解により回収し、そしてイオン交換カラム(Qiagen)上で精製した。

#### 【0216】

ヤギ集密性のCOS-7細胞を、精製されたプラスミドDNAによりエレクトロポレーションを用いてトランスフェクトした。細胞を100mmの皿上にプレートし、そして48時間増殖せしめた。細胞をPBS-EDTA溶液によりプレートから回収し、モノクローナル抗体ACT-4-h-1-Rgと共にインキュベートし、そして標準方法に従って処理した。第2回目の処理は、プレートに吸着された多くのCOS細胞としての富化を示した。エピソームDNAをHirt方法により免疫選択された細胞から回収し、そして増幅のために細菌中にエレクトロポレートした。

#### 【0217】

第2回目の選択からのプラスミドにより形質転換された細菌をクローン化し、そして増幅した。個々のクローンからのDNAを精製し、そしてCOS-7細胞においてACT-4-h-1に対するリガンドの発現を付与する能力について試験した。フィコエリトリン-接合のACT-4-h-1-Rgを用いて、COS-7細胞単相を染色し、そして次に、細胞を、手動免疫蛍光顕微鏡により試験した。クローン#2, 26及び30は、ACT-4-h-1-Rg結合活性の高レベル発現を与えた。

#### 【0218】

##### 例10: ACT-4-h-1に対するリガンドの配列分析

例9におけるクローン26からの挿入体を、HindIII及びXbaIクローニング部位でpBluescript中にサブクローン化した。クローンを、ALFスクエンサー(Pharmacia)に基づくT7ポリメラーゼ基礎の自動読取り配列決定キット(Pharmacia)を用いて、ジデオキシ鎖終結方法により配列決定した。3種のサブクローンをpBluescriptにおいて生成し、そしてM13前進性及び普遍的プライマーにより両鎖を配列決定した。クローン26のcDNA及び予測されるアミノ酸配列は図10-1~図10-2に示されている。その予測されるアミノ酸配列により形成されるポリペプチドを、ACT-4-L-h-1と称する。

#### 【0219】

ACT-4-L-h-1 cDNA配列は、1079個の塩基対、並びに137bpの5'UTR及び379bpの3'UTRを含む。AATAAAポリアデニル化シグナルは、1024位で存在し、続いて1049位で開始する20個の塩基のポリA末端が存在する。配列の分析は、21,000の計算された分子量と共に、183個のアミノ酸ポリペプチドをコードする単一の読み取り枠を示す。その読み取り枠は、149位で最初のATGで始まり、そして698位でのTGAで終結する。ATGは、-3位でA及び+4位でGを伴ってKozakコンセンサス開始配列を端に有する。疎水性の分析は、予測されるアミノ酸配列が、タンパク質のアミノ末端部分に約27個のaaの単一のトランスメンブランダメインを有するタイプII膜タンパク質の配列であることを示す。また、分子のC末端部分に4種のN-結合されたグリコシル化部位が存在する。

#### 【0220】

ACT-4-L-h-1のヌクレオチド配列とGenbank and EMBLデータベースにおける既知の配列との比較は、既知の遺伝子に対して有意な相同性を示さず、但し、Miura et al., Mol. Cell Biol. 11: 1313-1325 (1991)によるgp34と称するタンパク質をコードする遺伝子を除く。ACT-4-L-h-1のコード領域のcDNA配列は、gp34の配列と同一である。しかしながら、ACT-4-L-h-1は、gp34配列と比較して、追加の112個のヌクレオチドを5'末端で含んだ。追加のヌクレオチドは5'末翻訳領域内で存在する

10

20

30

40

50

ので、それらの存在は、発現生成物をたぶん変えない。おそらく、ACT-4-L-h-1 クローンは、より完全な逆転写物に由来し、そしてインビボ5'末端の代表である。たぶん、余分な配列は、タンパク質の翻訳を調節することに関与している。

#### 【0221】

ACT-4-L-h-1リガンドの予測されるアミノ酸配列とProtein Information Resource (PIR)データベースにおける既知配列とのFast DB プログラムを用いての比較は、gp34との同一性及びTNFとのひじょうに弱い相同性を示した。Chou & Fasmanにより開発された二次構造予測アルゴリズム (secondary structure prediction algorithm)は、ACT-4-L-h-1リガンド及びTNF- $\alpha$ が両とも、有意な量の $\alpha$ 構造を形成する傾向があることを予測する。この予測は、タンパク質のTNFファミリーの他のメンバーが構造において富んでいるジェリーロール (jelly roll)配置を形成するのに適合され、又は予測される観察と一致する。

10

#### 【0222】

本発明を明確に理解するために、本発明は例及び上記開示においていくらか詳細に記載されて来た。しかしながら、一定の変更及び修飾が本発明の範囲内で実施され得ることは明らかであろう。すべての出版物及び特許出願は、それぞれが個々に示されているかのように、同じ程度にすべての目的のためにそれらの全体を引用により本明細書に組込まれる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0223】

【図1】図1は、種々の細胞タイプ上でのACT-4-h-1の発現を分析するための末梢血液の2色染色を示す。

【図2】図2は、同種異系抗原-活性化CD4<sup>+</sup>T細胞上でのACT-4-h-1発現の比率を示す。MCF=平均チャンネル蛍光。

【図3】図3は、破傷風毒素活性化CD4<sup>+</sup>T細胞上でのACT-4-h-1発現の比率を示す。

【図4】図4は、PHA 活性化CD4<sup>+</sup>T細胞上でのACT-4-h-1発現の比率を示す。

【図5-1】図5-1は、ACT-4-h-1のcDNA (上行) 及び推定アミノ酸配列 (下行) を示す。この図はN末端シグナル配列の位置、2つの可能なシグナル切断部位 (垂直矢印)、及び2つのグリコシル化部位 (gly)を示す。

20

30

【図5-2】図5-2は、ACT-4-h-1のcDNA (上行) 及び推定アミノ酸配列 (下行) を示す。この図は、トランスメンブランドメイン (TM)、停止コドン、及びポリ-Aシグナル配列を示す。

【図6】図6は、ACT-4-h-1を発現する安定形質転換体の生産のための発現ベクターの構築を示す。

【図7】図7は、COS-7、ジャーカット及びSP2/O細胞系の安定形質転換体上でのACT-4-h-1の発現を示すFACS (商標) 分析を示す。

【図8】図8は、ACT-4-h-1細胞外ドメインとイムノグロブリン重鎖定常領域との組換グロブリンの形成のための融合を示す。

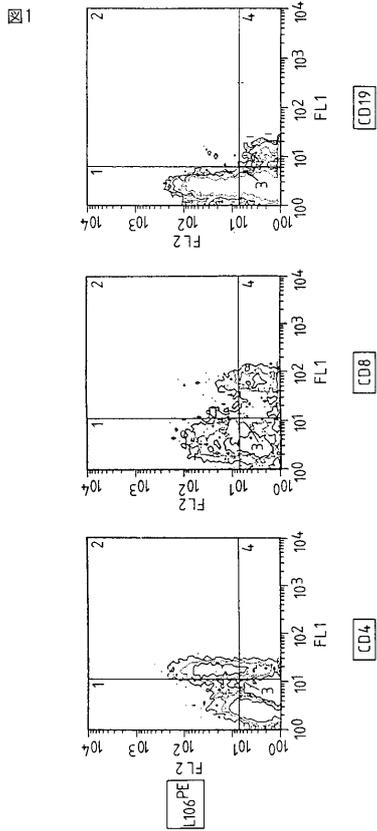
【図9】図9は、組換グロブリンを形成するACT-4-h-1細胞外ドメインとイムノグロブリン重鎖定常領域との融合より形成される組換グロブリンの模式図を示す。

40

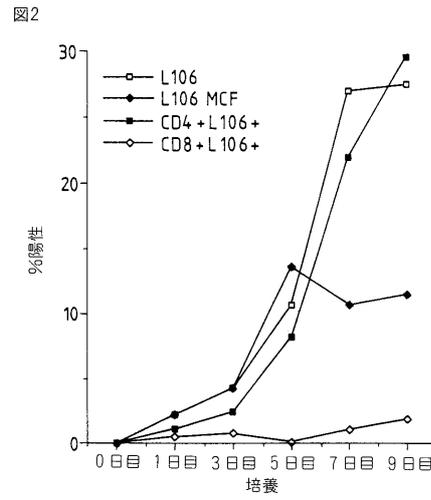
【図10-1】図10-1は、ACT-4-L-h-1のcDNA配列及び推定アミノ酸配列を示す。さらに、枠で囲ったトランスメンブランドメイン領域、及び2つのグリコシル化部位を示す。

【図10-2】図10-2は、ACT-4-L-h-1のcDNA配列及び推定アミノ酸配列を示す。さらに、2つのグリコシル化部位、及びポリ-A-シグナルを示す。

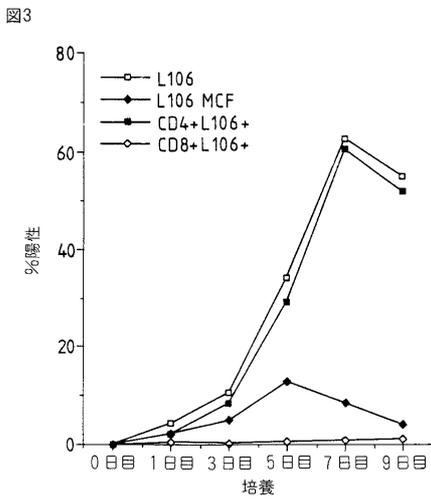
【 図 1 】



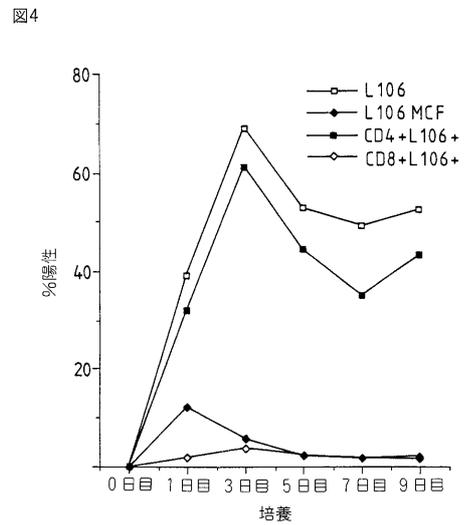
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 - 1 】

図5-1

```

      27                               54
CA GCA GAG ACG AGG ATG TGC GTG GGG GCT CGG CGG CTG GGC CGC GGG CCG TGT
  M C V G A R R L G R G P C
      signal sequence
      81                               108
GCG GCT CTG CTC CTC CTG GGC CTG GGG CTG AGC ACC GTG ACG GGG CTC CAC TGT
  A A L L L L L G L G L S T V T G L H C
      cleavage
      135                               162
GTC GGG GAC ACC TAC CCC AGC AAC GAC CGG TGC TGC CAC GAG TGC AGG CCA GGC
  V G D T Y P S N D R C C H E C R P G
      189                               216
AAC GGG ATG GTG AGC CGC TGC AGC CGC TCC CAG AAC ACG GTG TGC CGT CCG TGC
  N G M V S R C S R S Q N T V C R P C
      243                               270
GGG CCG GGC TTC TAC AAC GAC GTG GTC AGC TCC AAG CCG TGC AAG CCC TGC ACG
  G P G F Y N D V V S S K P C K P C T
      297                               324
TGG TGT AAC CTC AGA AGT GGG AGT GAG CGG AAG CAG CTG TGC ACG GCC ACA CAG
  W C N L R S G S E R K Q L C T A T Q
      351                               378
GAC ACA GTC TGC CGC TGC CGG GCG GGC ACC CAG CCC CTG GAC AGC TAC AAG CCT
  D T V C R C R A G T Q P L D S Y K P
      405                               432
GGA GTT GAC TGT GCC CCC TGC CCT CCA GGG CAC TTC TCC CCA GGC GAC AAC CAG
  G V D C A P C P P G H F S P G D N Q
      459                               486
GCC TGC AAG CCC TGG ACC AAC TGC ACC TTG GCT GGG AAG CAC ACC CTG CAG CCG
  A C K P W T N C T L A G K H T L Q P
      gly
      513                               540
GCC AGC AAT AGC TCG GAC GCA ATC TGT GAG GAC AGG GAC CCC CCA GCC ACG CAG
  A S N S S D A I C E D R D P P A T Q
      gly
      567                               594
CCC CAG GAG ACC CAG GGC CCC CCG GCC AGG CCC ATC ACT GTC CAG CCC ACT GAA
  P Q E T Q G P P A R P I T V Q P T E

```

【 図 5 - 2 】

図5-2

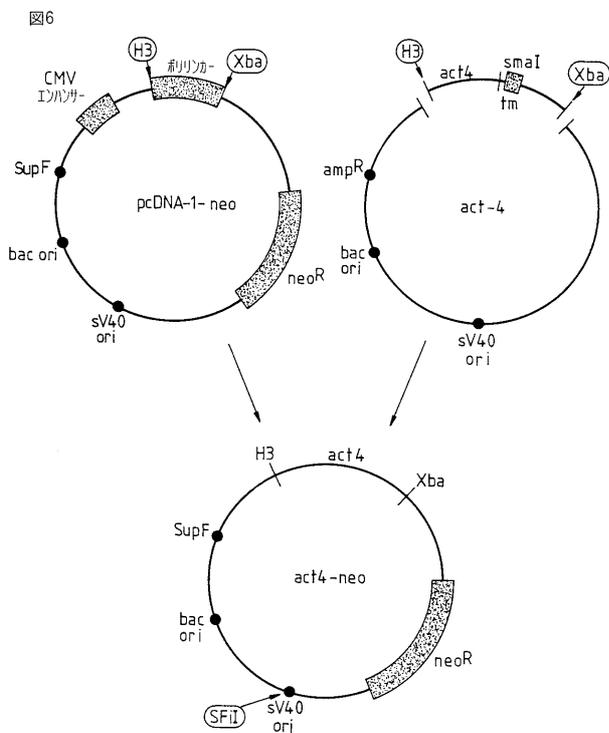
(続き)

```

      621                               648
GCC TGG CCC AGA ACC TCA CAG GGA CCC TCC ACC CGG CCC GTG GAG GTC CCC GGC
  A W P R T S Q G P S T R P V E V P G
      675                               702
GGC CGT GCG GTT GCC GCC ATC CTG GGC CTG GGC CTG GTG CTG GGG CTG CTG GGC
  G R A V A A I L G L G L V L G L L G
      TM
      729                               756
CCC CTG GCC ATC CTG CTG GCC CTG TAC CTG CTC CGG AGG GAC CAG AGG CTG CCC
  P L A I L L A L Y L L L R R D Q R L P
      783                               810
CCC GAT GCC CAC AAG CCC CCT GGG GGA GGC AGT TTC CGG ACC CCC ATC CAA GAG
  P D A H K P P G G G S F R T P I Q E
      837                               864
GAG CAG GCC GAC GCC CAC TCC ACC CTG GCC AAG ATC TGA CCT GGG CCC ACC AAG
  E Q A D A H S T L A K I *
      stop
      891                               918
GTG GAC GCT GGG CCC CGC CAG GCT GGA GCC CGG AGG GTC TGC TGG GCG AGC AGG
      945                               972
GCA GGT GCA GGC CGC CTG CCC CGC CAC GCT CCT GGG CCA ACT CTG CAC CGT TCT
      999                               1026
AGG TGC CGA TGG CTG CCT CCG GCT CTC TGC TTA CGT ATG CCA TGC ATA CCT CCT
      1053
GCC CCG CGG GAC CAC AAT AAA AAC CTT GGC AG
  Poly-A

```

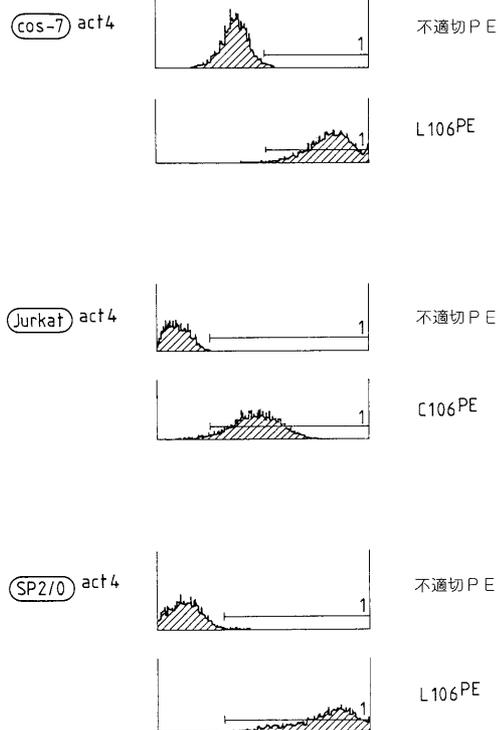
【 図 6 】



【 図 7 】

図7

安定細胞系においての ACT-4-h-1 の発現





## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	D
<b>A 6 1 P 37/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	N
<b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/02	
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06	
<b>A 6 1 P 31/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	
<b>A 6 1 P 31/18 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/00	
<b>A 6 1 P 1/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/18	
<b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/00	
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50	Z
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/15	Z
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
	C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ゴッドフライ, ウェイン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 0 6 2, ウッドサイド, スカイラインブルバード 1 8  
0 0 0

(72)発明者 アングルマン, エドガー ジョージ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 2 0 7, アザートン, レーン プレース 6 0

F ターム(参考) 2G045 CB01 DA36 FB03

4B024 AA01 BA61 CA01 CA11 CA20 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04

GA01 GA05 GA14 HA01

4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ03 QQ79 QR48

4B064 AG26 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA57X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA03 BA08 CA24  
CA44

4C084 AA02 AA07 AA13 AA14 AA17 AA27 BA08 BA23 BA35 BA41

BA44 CA53 CA62 MA05 NA13 NA14 ZA662 ZB082 ZB092 ZB112

ZB322 ZC552

4C085 AA13 AA14 BB11 BB31 BB36 BB41 BB43 CC02 CC05 CC22

EE01 EE03 KA26

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 EA20 FA74

专利名称(译)	活化的cd4 + t细胞表面受体的配体 ( act-4-l )		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006254914A</a>	公开(公告)日	2006-09-28
申请号	JP2006077210	申请日	2006-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	斯坦福大学		
申请(专利权)人(译)	在利兰·斯坦福初级大学董事会		
[标]发明人	ゴッドフライウエイン アングルマンエドガー ジョージ		
发明人	ゴッドフライ,ウエイン アングルマン,エドガー ジョージ		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C12Q1/02 A61K45/00 A61K38/00 A61K39/395 A61P37/02 A61P37/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P1/00 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 C12P21/08 A61K38/16 A61K38/21 A61P19/06 A61P19/08 A61P29/02 A61P31/04 A61P31/12 C07H21/04 C07K14/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K14/725 C07K16/16 C07K16/28 C07K19/00 C12N15/02 C12P21/02 C12R1/91 G01N33/566 G01N33/577		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/00 A61P19/06 A61P19/08 A61P29/00 A61P29/02 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 C07K14/70575 C07K14/70578 C07K16/28 C07K16/2875 C07K16/2878 C07K19/00 C07K2319/00 C07K2319/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K16/18 C12Q1/02 A61K45/00 A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P37/02 A61P37/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/18 A61P1/00 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D C12P21/08 A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA05 4B024/GA14 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA03 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA14 4C084/AA17 4C084/AA27 4C084/BA08 4C084/BA23 4C084/BA35 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/CA62 4C084/MA05 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA662 4C084/ZB082 4C084/ZB092 4C084/ZB112 4C084/ZB322 4C084/ZC552 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC22 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/KA26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	08/195967 1994-02-10 US		
其他公开文献	JP4745872B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

解决的问题：为CD4+T细胞表面的受体提供新的配体。 解决方案：保藏于ATCC HB11483的杂交瘤细胞HBL106产生的ACT-4受体不同于称为L106的单克隆抗体，其氨基酸序列不同于特定序列所示的氨基酸序列。 提供了用于多肽和编码特异性结合伴侣的核酸区段的特异性结合伴侣。 [选择图]无

ACT-4-h-1 発現の細胞特異性

	ACT-4-h-1 の発現 %細胞	h-1 の発現 MCF <sup>1</sup>
<u>二色染色</u>		
CD4 <sup>+</sup> T-細胞 (休止)	< 2	< 2
CD4 <sup>+</sup> T-細胞 (活性化された) <sup>2</sup>	80	25
CD8 <sup>+</sup> T-細胞 (休止)	< 2	< 2
CD8 <sup>+</sup> T-細胞 (活性化された)	10	4
CD19 <sup>+</sup> B-細胞 (休止)	< 2	< 2
CD19 <sup>+</sup> B-細胞 (活性化された)	< 2	< 2
CD14 <sup>+</sup> 単球 (休止)	< 2	< 2
CD14 <sup>+</sup> 単球 (活性化された)	< 2	< 2
<u>一色染色</u>		
PBLa (休止)	< 2	3
PBLa (活性化された)	50	27
CD4 <sup>+</sup> (休止)	< 2	< 2
CD4 <sup>+</sup> (活性化された)	80	22
CD8 <sup>+</sup> (休止)	< 2	< 2
CD8 <sup>+</sup> (活性化された)	4	2
顆粒球	< 2	< 2
血小板	< 2	< 2
<u>腫瘍系</u>		
Molt-4, CEM, Rut 78, H9, Jurkat	< 2	< 2
RPB-ALL, Sanary, T-AU	< 2	< 2
Molt-3	20	3
B-LCL, Arent, RML, JY, KNY, PGR	< 2	< 2
MSAS ; CESS, 9037, 9062	< 2	< 2
Dandi, Ramos, Namaiwa	< 2	< 2
Raji, NC37	30	4
U937, THP-1, HL-60	< 2	< 2
Kgla, K562, HEL	< 2	< 2

<sup>1</sup> MCF = 平均チャネル蛍光

<sup>2</sup> : "活性化された" ものとして示される細胞は、約 3 日間 PHAに