

(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2007-512836

(P2007-512836A)

(43) 公表日 平成19年5月24日(2007.5.24)

(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	4 B O 2 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 5
C O 7 K 14/46 (2006.01)	C O 7 K 14/46	4 C O 8 4
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 87 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-542548 (P2006-542548)
 (86) (22) 出願日 平成16年4月13日 (2004. 4. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年11月30日 (2005. 11. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/011171
 (87) 国際公開番号 W02005/060375
 (87) 国際公開日 平成17年7月7日 (2005. 7. 7)
 (31) 優先権主張番号 10/727, 012
 (32) 優先日 平成15年12月2日 (2003. 12. 2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505121431
 ヌベロ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 85, サニーヴェール, アルマノール ア
 ヴェニュー 675
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キラー細胞免疫グロブリン様レセプター様タンパク質を発現する細胞の標的化を用いる治療および診断の方法

(57) 【要約】

K I R H y 1 等の癌細胞の種類に属するいくつかの細胞は、K I R H y 1 のmRNAを発現できる。K I R H y 1 ポリペプチド、K I R H y 1 ポリペプチドをコードする核酸、および抗K I R H y 1 抗体を標的にすることにより、K I R H y 1 タンパク質を発現する癌細胞を死滅させるまたはその成長を阻害する方法が提供される。急性骨髄性白血病 (A M L) 等の、K I R H y 1 タンパク質発現細胞が関係する障害の治療法および診断法について記載する。

BLASTP ALIGNMENT OF SEQ ID NO: 3 KILLER CELL Ig-LIKE RECEPTOR-LIKE POLYPEPTIDE (KIRHy1) WITH HUMAN NK INHIBITORY RECEPTOR PRECURSOR (SEQ ID NO: 8)

Query: KIRHy1 (SEQ ID NO: 3)
 Subject: gi|205225628.1 NK inhibitory receptor precursor [Homo sapiens]
 (SEQ ID NO: 8)
 Length = 230

Score = 574 bits (1460), Expect = e-163
 Identities = 288/305 (94%), Positives = 289/305 (94%), Gaps = 15/305 (4%)

Query: 1 NPLLTLLALPLGLGVEVQITQPTTNGLRGSLVQCVYSSQWETLKGRCQATNR 60
 Subject: 1 NPLLTLLALPLGLGVEVQITQPTTNGLRGSLVQCVYSSQWETLKGRCQATNR 60

Query: 61 DCELVKTSSESGVSKSRVSIKDKQKQKPTVMDKMTADTTCGSKTQNDLQVT 120
 Subject: 61 DCELVKTSSESGVSKSRVSIKDKQKQKPTVMDKMTADTTCGSKTQNDLQVT 120

Query: 121 VQVVIDFAPTPVPTTPTAFPTQKTSSTPTGRLGWRRLKSLVLAALPTL 180
 Subject: 121 VQVVIDFA-----PTQKTSSTPTGRLGWRRLKSLVLAALPTL 165

Query: 181 LGLLVAAELAAKRRKQKAKKRRFQVQLQSLGDTADITLQAGTSFRKATKLS 240
 Subject: 166 LGLLVAAELAAKRRKQKAKKRRFQVQLQSLGDTADITLQAGTSFRKATKLS 225

Query: 241 SAQVQVSEVYTHGLFKDLSFASITLAKNDQSTYCKRGLSHLRRGPRPPTDS 300
 Subject: 226 SAQVQVSEVYTHGLFKDLSFASITLAKNDQSTYCKRGLSHLRRGPRPPTDS 285

Query: 301 TISRP 305
 TISRP
 Subject: 286 TISRP 290

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 11 のポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

DNA 配列である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含むように遺伝子的に操作された、宿主細胞。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のポリヌクレオチドを含むように遺伝子的に操作された宿主細胞であって、該宿主細胞内のポリヌクレオチドの発現を調節する調節配列に作動可能に結合された、宿主細胞。

【請求項 7】

配列番号 11 のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 11 に特異的に結合する、抗体。

【請求項 9】

前記抗体がモノクローナル抗体またはその抗体フラグメントである、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体がポリクローナル抗体またはその抗体フラグメントである、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

前記抗体が 12434a である、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 12】

急性骨髄性白血病 (AML) を引き起こす細胞に特異的な抗 KIRHy1 抗体を含み、該抗体が配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する、薬学的組成物。

【請求項 13】

前記抗体がモノクローナル抗 KIRHy1 抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

前記抗体が放射性同位体で標識された、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

前記抗体が毒素で標識された、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

前記抗体が AML を引き起こす細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害するのに有効な量で投与される、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

AML を引き起こす細胞で KIRHy1 タンパク質を標的化する方法であって、該方法は、該細胞に、組成物を、該 KIRHy1 発現細胞を標的とするのに有効な量で投与する工程を包含し、ここで、該組成物が、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する抗 KIRHy1 抗体である、方法。

【請求項 18】

AML を引き起こす KIRHy1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害する方法であって、該細胞に、組成物を、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で投与する工程を包含し、ここで、該組成物が、配列番号 3 のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する抗 K I R H y 1 抗体である、方法。

【請求項 19】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害する方法であって、該細胞に、化合物を、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で投与する工程を包含し、ここで、該化合物が、K I R H y 1 抗原を含む、方法。

【請求項 20】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害する方法であって、該細胞に、組成物を、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で投与する工程を包含し、ここで、該組成物が、組換えベクター内に K I R H y 1 またはその免疫原性フラグメントをコードする核酸を含む、方法。

10

【請求項 21】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害する方法であって、該細胞に、組成物を、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で投与する工程を包含し、ここで、該組成物が、組換えベクター内に K I R H y 1 またはその免疫原性フラグメントをコードする核酸を含む抗原提示細胞を含む、方法。

【請求項 22】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害する方法であって、該細胞に、組成物を、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で投与する工程を包含し、ここで、該組成物が、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する低分子を含む、方法。

20

【請求項 23】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害する方法であって、該細胞に、組成物を、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で投与する工程を包含し、ここで、該組成物が、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する非 K I R H y 1 ポリペプチドを含む、方法。

30

【請求項 24】

請求項 17 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法であって、前記細胞が、第二の治療剤と接触する、方法。

【請求項 25】

請求項 17 または 18 に記載の方法であって、前記抗 K I R H y 1 抗体組成物が、約 0 . 1 m g / k g 体重 ~ 約 1 0 m g / k g 体重の投薬範囲を達成するのに有効な量で投与される、方法。

【請求項 26】

請求項 17 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法であって、前記薬学的組成物が、薬学的に受容可能なキャリアとともに滅菌調製物で投与される、方法。

40

【請求項 27】

A M L からなる群より選択される癌を診断する方法であって、以下：

a) 細胞上の K I R H y 1 タンパク質の発現を検出または測定する工程；および

b) 該発現を正常な組織と比較する工程、

を包含する、方法。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の方法であって、前記発現が K I R H y 1 m R N A の発現である、方法。

【請求項 29】

請求項 27 に記載の方法であって、前記発現が抗 K I R H y 1 抗体を使用して検出または

50

測定される、方法。

【請求項 30】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における抗 K I R H y 1 抗体の使用であって、該抗体が、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する、使用。

【請求項 31】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における、K I R H y 1 抗原の使用。

【請求項 32】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における、組換えベクター内の、K I R H y 1 またはその免疫原性フラグメントをコードする核酸の使用。

【請求項 33】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における、K I R H y 1 またはその免疫原性フラグメントをコードする核酸を組換えベクター内に含む抗原提示細胞の使用。

【請求項 34】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する低分子の使用。

【請求項 35】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する非 K I R H y 1 ポリペプチドの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(1 . 関連出願の相互参照)

本出願は、米国特許出願第 10 / 727 , 012 号、2003 年 12 月 2 日出願、名称「キラー細胞免疫グロブリン様レセプター様タンパク質を発現する細胞を標的とする、治療および診断法」、代理人整理番号 N U V O - 02 C P の一部継続出願であり、該出願は、米国特許出願第 10 / 414 , 539 号、2003 年 4 月 14 日出願、名称「キラー細胞免疫グロブリン様レセプター様タンパク質を発現する細胞を標的とする、治療および診断法」、代理人整理番号 N U V O - 02 の一部継続出願であり、該出願は、P C T 出願第 P C T / U S 01 / 02623 号、2000 年 1 月 25 日出願、名称「新規核酸およびポリペプチド」、代理人整理番号 785 C I P 3 / P C T の一部継続出願であり、該出願は、P C T 出願第 P C T / U S 01 / 02687 号、2000 年 1 月 25 日出願、名称「新規核酸およびポリペプチド」、代理人整理番号 785 C I P 2 - 2 C / P C T の一部継続出願であり、該出願は、米国特許出願第 09 / 631 , 451 号、3000 年 8 月 3 日出願、名称「新規核酸およびポリペプチド」、代理人整理番号 785 C I P 2 B の一部継続出願であり、該出願は、米国特許出願第 09 / 491 , 404 号（現在放棄済み）、2000 年 1 月 25 日出願、名称「さまざまなライブラリーから得た新規コンティグ」、代理人整理番号 785 の一部継続出願である。本明細書に引用する上記および他のすべての米国特許および特許出願は、その全体を本明細書において参考として援用する。

【0002】

(2 . 背景)

(2 . 1 技術分野)

本発明は、キラー細胞免疫グロブリン様レセプター様タンパク質（本明細書では K I R H y 1 と略記する）を発現する細胞を用いる、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、

10

20

30

40

50

ペプチド、および低分子量物を標的とする、組成物および方法、ならびに、急性骨髄性白血病（AML）等の癌を含むさまざまな病理状態の治療および診断におけるそれらの利用に関する。

【0003】

（2.2 配列表）

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの配列は、配列表に記載し、IBM PC上でWindows（登録商標）2000オペレーティングシステムを用い2004年4月6日午後2時10分53秒に作成し、「NUVO-02CP2 PCT.txt」と表題を付けたファイルを入れたコンパクトディスクで提出する。その全体は本明細書において参考として援用する。配列表、「NUVO-02CP2 PCT.txt」のコンピュータ可読性フォーマット（「CRF」）およびコピー3つ（「コピー1」、「コピー2」、および「コピー3」）も提出する。本特許の出願人は、それぞれ米国特許法施行規則1.821条（c）項および（e）項にしたがって提出する、配列表のCRFならびにコピー1、コピー2、およびコピー3の内容が原本と同一であることをここに宣誓する。

10

【背景技術】

【0004】

（2.3 背景技術）

免疫療法は、癌、自己免疫疾患、移植拒絶反応を含む、さまざまな病理状態の治療に免疫系を利用する方法を提供する。

【0005】

20

例えば、癌の抗体療法には、抗原を発現する細胞を標的とする腫瘍抗原に対する抗体または抗体フラグメントの使用が含まれる。抗体または抗体フラグメントは、直接的または間接的細胞傷害効果を有するあるいは細胞傷害部位に結合または融合することができる。直接的な効果には、アポトーシスの誘導、成長因子レセプターのブロック、および抗イディオタイプ抗体の形成が含まれる。間接的な効果には、抗体依存性細胞介在性傷害（ADCC）および補体介在性細胞傷害（CMCC）が含まれる。もし抗体または抗体フラグメントが細胞傷害部位に結合または融合すると、腫瘍抗原発現細胞を損傷する道が開ける。（その全体を本明細書において参考として援用する、Green, et al., Cancer Treatment Reviews, 26: 269-286 (2000)）。

30

【0006】

抗体療法は特定の抗原を発現する細胞を標的とするため、正常な細胞または組織と交差反応する可能性がある。造血細胞等のいくつかの細胞は容易に前駆体と置き換わるが、多くの組織との交差反応は有害な結果をもたらす可能性がある。このため、かなりの研究者が腫瘍特異性抗原をみつけようと努力している。腫瘍特異性抗原は、殆ど腫瘍上のみでみつかっており、正常な組織よりも多い水準で腫瘍細胞内で発現している。腫瘍特異性抗原は、その抗原を発現する、癌または他の疾病に関係する細胞を標的とする抗体の標的となる。このような腫瘍特異性抗原に特異性を有する抗体は、細胞傷害性化合物と結合することができる、すなわち免疫療法において単独で利用できる。免疫毒素は細胞の死をもたらす細胞傷害性化合物を対象としている。例えば、脱グリコシル化リジンAに結合する抗CD22抗体は、従来型治療後に再発したB細胞リンパ腫の治療に使用でき（その全体を本明細書において参考として援用する、Amlot, et al., Blood 82: 2624-2633 (1992)）、初期臨床試験において有望な結果が得られている。

40

【0007】

免疫系は、微生物、新生物、および移植片を含め、非自己と認識される生物または細胞を除外するように働く。腫瘍に対する細胞介在性の宿主の応答には、新たに移動してきた腫瘍細胞を、腫瘍に関係する抗原（正常な細胞上では認識できない腫瘍に関係する抗原）を認識した後に、破壊する免疫監視の概念が含まれ、この概念によって細胞機序と細胞性免疫が結び付けられている。さらに、腫瘍に関係する抗原に対する体液の応答によって、

50

抗体が細胞の表面に結合することが契機となる、抗体依存性細胞介在性傷害（ADCC）および補体介在性溶解等の免疫学的プロセスを通して腫瘍細胞を破壊することが可能となる。

【0008】

免疫系の抗原認識が契機となって、サイトキンの産生、B細胞の増殖、およびそれに続く抗体産生を含む、なだれ現象が起こる。腫瘍細胞はエフェクター細胞に対する抗原提示能力が低下していることが多く、このため腫瘍特異性抗原に対する免疫応答が遅れる。場合によっては、腫瘍特異性抗原が免疫系によって非自己と認識されないこともあり、腫瘍特異性抗原に対する免疫応答が妨げられる。そのような場合、免疫系を刺激するあるいは操作することが、1種または2種以上の腫瘍特異性抗原を発現する癌の治療に有効な技術となる。

10

【0009】

例えば、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））はCD20、すなわち非ホジキン病リンパ腫のB細胞95%超にみられるB細胞に特異的な表面分子（両文献ともその全体を本明細書において参考として援用する、Press, et al., Blood 69: 584-591 (1987); Malony, et al., Blood 90: 2188-2195 (1997))に対するキメラ抗体である。リツキシマブは、ADCCを誘発し、インビトロで悪性B細胞をアポトーシスさせて細胞増殖を阻止する（その全体を本明細書において参考として援用する、Maloney, et al., Blood 88: 637a (1996)）。リツキシマブは現在、従来の治療法では効果のなかった、軽度の非ホジキン病リンパ腫が進行または再発した場合の治療剤として使われている。

20

【0010】

宿主が誘発され腫瘍細胞に対する免疫応答を開始する、活性な免疫療法は、治療ワクチンを使用することによって達成できる。ある種の腫瘍特異性ワクチンは、腫瘍細胞から単離され、スカシ貝由来のヘモシアニン（KLH）に結合され、補助剤と混合されて、軽度の濾胞性リンパ腫の患者に注入される、精製されたイディオタイプタンパク質を使用している（その全体を本明細書において参考として援用する、Hsu, et al., Blood 89: 3129-3135 (1997)）。別の種類のワクチンは、免疫応答の認識およびエフェクター段階の間に未変性T細胞に抗原を提示する、抗原提示細胞（APCs）を使用している。1種のAPCである、樹状細胞は、患者から樹状細胞を単離し、腫瘍抗原とともに培養し、細胞ワクチンとして患者に再注入する、細胞ワクチンに用いることができる（その全体を本明細書において参考として援用する、Hsu, et al., Nat. Med. 2: 52-58 (1996)）。裸のDNAの注入によっても免疫応答を誘発できる。マウスに注入した場合、B細胞リンパ腫由来のような、腫瘍イディオタイプタンパク質の低分子量鎖と高分子量鎖の両方をコードするビストロニックmRNAを発現するプラスミドDNAは、防御的抗腫瘍応答を引き起こすことができる（Singh, et al., Vaccine 20: 1400-1411 (2002)）。

30

【0011】

米国では毎年約10,600件の急性骨髄性白血病（AML）が新たに診断されている。AMLは、急性骨髄球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性顆粒球性白血病、急性非リンパ性白血病を含む、いくつかの病名でも呼ばれる。AMLは、成人では最も一般的な白血病であり、小児の白血病の半分程度を占める。白血病は骨髄で始まるが、血液、リンパ節、脾臓、肝臓、中枢神経系、および他の器官にも広がる。通常、固形の塊すなわち腫瘍を形成することはない。化学療法および血液幹細胞移植が主要な治療法であって、多くの患者が完治している。しかし、治療後の再発が大きな問題であり、死に至ることが多い。さらに、治療帰結の毒性効果および薬剤治療抵抗性の存在が、癌患者の生活の質を改善し死亡率を下げるために克服しなければならない大きな問題である。移植片対宿主病（GVHD）はドナーに起因する同種血液幹細胞移植における主要な問題であり、一方、潜在

40

50

的 A M L 細胞による再発は、化学療法開始前に患者から単離した血液幹細胞を用いる、自家性血液幹細胞移植における問題である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

腫瘍特異的であり、免疫原性が高く、幅広い患者に有効な、腫瘍関係抗原が欠如しているため、A M L および他の癌の治療手段としての免疫療法の使用が妨げられている (D a l e r b a e t a l . , C l i n . R e v . O n c o l . H e m a t o l . 46 : 33 - 57 (2003))。したがって、さまざまな標的手法の標的となり得る、癌細胞の表面に明確かつ特異的に発現される抗原を見出す必要が当分野にはある。このため、本特許の出願人は、A M L における治療的介入に有用な分子標的を見出し、A M L を診断し治療する方法をここに提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0013】

(3. 発明の概要)

本発明は、キラー細胞免疫グロブリン様レセプター (K I R) - 様タンパク質 (本明細書では K I R H y 1 と略記する) を発現する標的細胞を、フラグメントまたは他の修飾体、ペプチドおよび低分子量体を含む、K I R H y 1 ポリペプチド、K I R H y 1 タンパク質をコードする核酸、および抗 K I R H y 1 抗体等の標的要素を用いることにより、治療し診断する方法を提供する。K I R H y 1 タンパク質は、健常な細胞におけるその発現に比べ、ある種の造血性癌細胞においては高度に発現される。したがって、K I R H y 1 を発現する細胞を標的にすれば、健常な組織への効果を最小にする一方、造血性癌細胞を破壊または成長を阻害できる。同様に、K I R H y 1 抗原を有する場合には、非造血性腫瘍 (固形腫瘍) も標的とすることができる。例えば、K I R H y 1 発現癌細胞を抗 K I R H y 1 抗体で標的すれば、そのような細胞の成長阻害および / または破壊が可能である。本発明の一つの実施形態は、抗 K I R H y 1 抗体に放射性同位元素または他の細胞傷害性化合物等の細胞破壊材料を結合することにより、K I R H y 1 発現細胞を破壊する方法である。

20

【0014】

本発明は、さまざまな標的要素および組成物を提供する。そのような実施形態の一つは、抗 K I R H y 1 抗体製剤を含む組成物である。抗体の例には、単抗 K I R H y 1 抗体、K I R H y 1 を認識する相補性決定領域 (C D R s) の一つまたは二つ以上を保持する抗体の任意のフラグメント、K I R H y 1 を認識する C D R の一部または全体を保持するヒト化された抗 K I R H y 1 抗体、抗 K I R H y 1 結合体、および抗 K I R H y 1 抗体融合タンパク質を含め、単一の抗 K I R H y 1 抗体、2 種類または 3 種類以上の抗 K I R H y 1 抗体の組合せ、抗 K I R H y 1 抗体と非 K I R H y 1 抗体との組合せ、抗 K I R H y 1 抗体と治療薬との組合せ、抗 K I R H y 1 抗体と細胞破壊剤との組合せ、二特異性抗 K I R H y 1 抗体、F a b K I R H y 1 抗体またはそのフラグメントが含まれる。

30

【0015】

本発明のもう一つの標的実施形態は、例えば、K I R H y 1 ポリペプチド、またはそのフラグメント、および任意選択で好適な補助剤を含む、K I R H y 1 抗原を含む組成物である。さらに別の標的実施形態は、K I R H y 1 をコードする核酸、またはそのフラグメントあるいはその変異体、任意選択で組換えベクターを含む、組成物である。

40

【0016】

本発明の他の標的実施形態は、K I R H y 1 をコードする核酸によって形質転換された抗原提示細胞、またはそのフラグメントあるいはその変異体、任意選択で組換えベクターを含む、組成物である。

【0017】

また本発明の他の標的実施形態は、K I R H y 1 ポリペプチド、またはそのペプチドフラグメントを含む、製剤である。本発明の他の標的実施形態は、本発明の K I R H y 1 ポ

50

リペプチドまたはポリヌクレオチドと結合する非 K I R H y 1 ポリペプチドまたはペプチドである。

【 0 0 1 8 】

本発明の他の標的実施形態は、本発明の K I R H y 1 ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを認識するあるいはそれらと結合する低分子量物を含む製剤である。

【 0 0 1 9 】

本発明はさらに、標的の K I R H y 1 発現細胞に対し有効な量の標的要素または組成物を投与することを含む、K I R H y 1 発現細胞を標的とする方法を提供する。抗 K I R H y 1 抗体製剤、K I R H y 1 ポリペプチドまたはそのフラグメントを含む K I R H y 1 抗原、K I R H y 1 をコードする核酸またはそのフラグメントまたはその変異体さらに任意選択で組換えベクターからなる組成物、あるいは K I R H y 1 をコードする核酸によって形質転換された抗原提示細胞またはそのフラグメントあるいはその変異体さらに任意選択で組換えベクターを含む組成物を含め、本明細書に記載する標的要素または組成物はいずれも、上記の方法に使用できる。

10

【 0 0 2 0 】

さらに本発明は、標的の K I R H y 1 発現細胞に対し有効な量の標的要素または組成物を投与することを含む、K I R H y 1 発現細胞を標的とする方法を提供する。抗 K I R H y 1 抗体製剤、K I R H y 1 ポリペプチドまたはそのフラグメントを含む K I R H y 1 抗原、K I R H y 1 をコードする核酸またはそのフラグメントまたはその変異体さらに任意選択で組換えベクターからなる組成物、あるいは K I R H y 1 をコードする核酸によって形質転換された抗原提示細胞またはそのフラグメントあるいはその変異体さらに任意選択で組換えベクターを含む組成物、K I R H y 1 ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメント、本発明の K I R H y 1 ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合するポリペプチド、ペプチドまたは低分子量物を含め、本明細書に記載する標的要素または組成物はいずれも、上記の方法に使用できる。

20

【 0 0 2 1 】

本発明は、癌細胞の成長を阻害するのに有効な量の標的要素または組成物を投与することを含む、造血性癌細胞および K I R H y 1 発現癌細胞を含む癌細胞の成長を阻害する方法も提供する。抗 K I R H y 1 抗体調製物、K I R H y 1 ポリペプチドまたはそのフラグメントを含む K I R H y 1 抗原、K I R H y 1 をコードする核酸またはそのフラグメントまたはその変異体さらに任意選択で組換えベクターからなる組成物、あるいは K I R H y 1 をコードする核酸によって形質転換された抗原提示細胞またはそのフラグメントあるいはその変異体さらに任意選択で組換えベクターを含む組成物、K I R H y 1 ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメント、本発明の K I R H y 1 ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合するポリペプチド、ペプチドまたは低分子量物を含め、本明細書に記載する標的要素または組成物はいずれも、上記の方法に使用できる。

30

【 0 0 2 2 】

さらに本発明は、K I R H y 1 発現細胞に関する疾病を治療するのに有効な量の標的要素または標的組成物を投与するステップを含む、治療が必要な対象者における K I R H y 1 発現細胞の増殖に関する障害を治療する方法を提供する。抗 K I R H y 1 抗体製剤、K I R H y 1 ポリペプチドまたはそのフラグメントを含む K I R H y 1 抗原、K I R H y 1 をコードする核酸またはそのフラグメントまたはその変異体さらに任意選択で組換えベクターからなる組成物、あるいは K I R H y 1 をコードする核酸によって形質転換された抗原提示細胞またはそのフラグメントあるいはその変異体さらに任意選択で組換えベクターを含む組成物、K I R H y 1 ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメント、本発明の K I R H y 1 ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合するポリペプチド、ペプチドまたは低分子量物を含め、本明細書に記載する標的要素または組成物はいずれも、上記の方法に使用できる。

40

【 0 0 2 3 】

K I R H y 1 発現細胞の増殖に関する障害の例には、急性骨髄性白血病 (A M L) お

50

よび組織球性リンパ腫等の癌が含まれる。さらに、他のKIRHy1発現細胞の増殖に係る疾病には、ホジキン病、非ホジキンB細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、悪性リンパ腫、リンパ肉腫白血病、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、(骨髄性白血病としても知られている)慢性骨髄性白血病、骨髄単球性白血病、骨髄異形成症候群、伴性リンパ組織増殖性疾患；単核球増加症等のエプスタイン-バーウイルス関連症状；過剰増殖症；自己免疫疾患；創傷治癒；(超急性、急性、慢性の移植拒絶反応、および異種移植片拒絶反応を含む)器官および組織の移植拒絶反応等の疾病が含まれる。食道癌、胃癌、結腸癌、結腸直腸癌、結腸直腸性新生物に係るポリープ、膵臓癌および胆嚢癌、副腎皮質癌、ACTH産生型腫瘍、膀胱癌、脳内在性癌、神経芽腫、星状膠細胞性脳腫瘍、神経膠腫を含む脳の癌、転移性腫瘍細胞の中樞神経系侵襲、ユーイング腫瘍、口腔癌および咽頭癌を含む頭頸部癌、腎細胞癌を含む腎臓癌、肝臓癌、小細胞肺癌および非小細胞肺癌を含む肺癌、悪性腹水、悪性腹膜水、悪性黒色腫、ヒト皮膚角化細胞の腫瘍化、上皮細胞癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌を含む皮膚癌、および血管周囲細胞腫、中皮腫、カポジ肉腫、繊維肉腫および骨肉腫等の骨腫および肉腫を含む骨癌、子宮癌、子宮内膜癌、卵巣癌、卵巣(胚細胞)癌、卵胞における固形腫瘍、膣癌、外陰部癌、子宮頸癌を含む女性生殖器官の癌、(小細胞および管の)乳癌、陰茎癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、精巣癌、甲状腺癌、栄養膜癌、およびウィルムス腫等のKIRHy1抗原を有する非造血性腫瘍も標的とすることができる。本発明はさらに、本発明の標的要素または組成物を投与することによって、成長因子およびサイトカインを抑制または刺激して免疫系を変調する方法を提供する。本発明は、免疫細胞(ナチュラルキラー細胞、T細胞、B細胞、および骨髄性細胞)の活性化を通し、活性化の抑制を通し、またはKIRHy1ペプチドフラグメントまたはKIRHy1抗体によるこれらの細胞の増殖を刺激または抑制することにより、免疫系を変調する方法も提供する。

10

20

【0024】

このように本発明は、本発明の標的要素または組成物を投与することによって、治療の必要がある患者の免疫系を抑制して免疫関係障害を治療する方法を提供する。このような免疫関係障害には自己免疫疾患および器官移植拒絶反応が含まれるが、それらに限定されるものではない。

【0025】

本発明は、KIRHy1タンパク質および/または関係mRNAの発現パターンを測定するステップを含む、KIRHy1発現細胞に係る障害を診断する方法も提供する。本発明の別の実施形態により、抗KIRHy1抗体を用いてKIRHy1の発現を検知するステップを含む、KIRHy1発現細胞に係る障害を診断する方法が提供される。その後、発現レベルおよび発現パターンを所望の診断の好適な標準的効能と比較する。このような診断方法には、患者がKIRHy1が標的となるKIRHy1療法の対象になるかどうかを決定するための組成物、キットおよび他の方法が含まれる。

30

【0026】

本発明は、前記KIRHy1と上記障害の治療に一般的に使用されている治療剤および補助剤とのKIRHy1製剤を投与することによって、KIRHy1発現細胞に係る障害の治療および管理に使用される治療剤および補助剤の効果を増強する方法も提供する。

40

【0027】

(5. 発明の詳細な説明)

本発明は、ポリペプチド、核酸、抗体、結合するポリペプチド、ペプチド、および低分子物等の標的要素を、これら要素のいずれかのフラグメントまたは他の修飾物を含めて、使用し、KIRHy1を発現する細胞を標的する方法に関する。

【0028】

本発明は、前記KIRHy1に係る疾病および障害を診断し治療する新規方法を提供する。この方法には、KIRHy1抗原、抗原提示細胞等の標的成分を含む製剤、または下記の、標的要素、KIRHy1ポリペプチド、KIRHy1をコードする核酸、抗K

50

I R H y 1 抗体、K I R H y 1 ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合するポリペプチド、ペプチド、および低分子量物を含む薬学的組成物を有効量投与することが含まれる。細胞膜上のK I R H y 1 を標的とすることにより、これらの細胞の成長を阻害することまたはこれらの細胞を破壊することが期待できる。有効量とは、これら標的製剤が細胞表面のK I R H y 1 を標的とし、K I R H y 1 を発現する細胞の成長を阻害するまたは細胞を破壊するおよび/または細胞の転移を阻害するのに必要な量である。

【0029】

本発明の別の実施形態は、これらの障害の治療に一般的に使用される治療剤および補助剤を含みK I R H y 1 を認識する標的製剤を投与することによって、K I R H y 1 が関係する障害の治療および管理に使用される治療剤および補助剤の効果を増強することである。

10

【0030】

新生物性疾患の治療に有用な化学療法剤ならびに免疫抑制に使用される抗増殖剤および抗増殖薬には、ナイトロジェンマスタード、アルキル硫酸エステル、ニトロソ尿素、トリアゼン等のアルキル化剤；葉酸類似体、ピリミジン類似体、およびプリン類似体等の代謝拮抗剤；ピンカアルカロイド、エピボドフィロトキシン、抗生物質、および酵素等の天然産物；白金配位錯体、置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、および副腎皮質抑制剤等のミセル化剤；ならびにアドレノコルチコステロイド、黄体ホルモン、エストロゲン、アンドロゲン、および抗エストロゲン等のホルモンおよび拮抗剤が含まれる（その全体を本明細書において参考として援用する、C a l e b r e s i a n d P a r k s , p p . 1 2 4 0 - 1 3 0 6 i n , E d s . A . G . G o o d m a n , L . S . G o o d m a n , T . W . R a l l , a n d F . M u r a d , T h e P h a r m a c o l o g i c a l B a s i s o f T h e r a p e u t i c s , S e v e n t h E d i t i o n , M a c M i l l a n P u b l i s h i n g C o m p a n y , N e w Y o r k , (1 9 8 5) ）。

20

【0031】

これらの障害の管理に使用される補助療法には、例えば、放射線増感剤、抗原とグロブリンまたは - ガラクトシダーゼ等の異種タンパク質との組合せの使用、あるいは免疫感作中の補助剤の添加が含まれる。

【0032】

いくつかの治療剤では、標的応答を引き起こすレベルを達成するために、高用量が必要となることがあるが、用量依存性の副作用を引き起こす可能性が高くなる。したがって、本発明の標的治療法とK I R H y 1 発現に係る障害の治療に一般的に使用される薬剤とを併用することにより、こうした薬剤の用量をかなり下げることができ、従来の治療薬の長期間投与に伴う副作用の可能性も低くなる。このように、本発明の標的治療法の効用の一つは、これらの障害の従来型治療法に伴う副作用を軽減することである。

30

【0033】

(5 . 1 K I R H y 1 の標的化)

免疫系の機能は、細胞表面の相互作用とそれに伴う信号プロセスの複雑なネットワークによって支配されている。細胞表面のレセプターがリガンドによって活性化されると、信号が細胞に送られ、関与する信号伝達経路により、抑制の信号でも活性化の信号でもあり得る。

40

【0034】

ナチュラルキラー (N K) 細胞の細胞溶解活性は、細胞の溶解を開始させる活性化信号と細胞溶解を阻止する抑制信号の間のバランスによって制御される。N K 細胞は、ある種の腫瘍、ウイルス感染細胞、M H C クラス I 非対応正常造血細胞を認識して殺し、かつ骨髓移植の急性拒絶反応を媒介する（その全体を本明細書において参考として援用する、S a l m o n D i v o n e t a l . , B u l l . M a t h . B i o l . 6 5 : 1 9 9 - 2 1 8 (2 0 0 3) ）。N K 細胞が過剰な活性化信号を受けた時に、標的細胞が殺される。N K 細胞が特異的レセプターを有する、細胞表面M H C クラス I 抗原（

50

すなわち「自己の」MHCクラスI抗原)を標的細胞が発現すると、NK細胞は抑制されて標的細胞を殺さない。このようなNK細胞の特異的レセプターは2種類あり、キラー細胞免疫グロブリン(Ig)様レセプター(KIRs)およびC型レクチン様Ly49レセプターである。NK細胞の細胞傷害活性をダウンレギュレーションするMHCリガンドが関与すると、KIRsは負の信号を送る。KIRsは、チロシンキナーゼによってリン酸化される、免疫レセプターチロシン性抑制モチーフ(ITIM)を細胞質ドメイン内に有している。多くのKIRsに共通するITIMモチーフは、配列I/L/VxYxxL/Vを有しており、「x」は任意のアミノ酸(配列番号10)を表す(その全体を本明細書において参考として援用する、Heid et al., Curr. Opin. Immunol., 15: 233-237 (2003))。

10

【0035】

FDF03およびCD54のような、これらの膜レセプターのいくつかの可溶型が報告されており、病理状態のマーカーとして使用できる(その全体を本明細書において参考として援用する、Borges and Cosman, Cytokine and Growth Factor Reviews 11: 209-217 (2000))。Igの可変領域は特異的結合部位形成の場となり、一方、Igの安定領域はより保存的な対レセプター結合モジュールとなる。最近、免疫グロブリンの一員でIg可変領域を一つだけ有するCMRF-35およびPIGR-1がクローン化された(その全体を本明細書において参考として援用する、Shujian et al (1999), 欧州特許第0897981A1号)。

20

【0036】

樹状細胞、単核性細胞、CD19+B細胞、CD3+T細胞を含む、造血細胞のほとんどに抑制レセプターが存在していることは明らかである(その全体を本明細書において参考として援用する、Borges and Cosman (2000) supra; De Maria et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10285-88 (1997))。マスト細胞が発現する免疫レセプターも細胞の活性化信号をダウンレギュレーションすることが知られている(国際特許出願国際公開第98/48017号)。

【0037】

NK細胞上およびT細胞上のレセプターは、先天的免疫質を媒介し、骨髄移植拒絶反応だけでなくある種のウイルス感染細胞および黒色腫細胞を死滅させる際に重要な役割を果たすことが示されている。免疫グロブリンレセプターも自己免疫反応の媒介に関与している。ごく最近、免疫グロブリンレセプターが樹状細胞の成育および成熟に必要であることも示された(その全体を本明細書において参考として援用する、Fournier et al., J. Immunol., 165: 1197-1209 (2000))。抗Igレセプターモノクローナル抗体のT細胞への付加により、HIVに感染した標的細胞に対するT細胞の細胞溶解活性が誘発されることが示されている。抑制レセプターのダウンレギュレーションが、とりわけ、リウマチ様関節炎、多発性硬化症(MS)、全身性エリテマトーデス(SLE)、乾癬、および炎症性腸疾患(IBD)のような免疫障害を引き起こす、NK細胞およびT細胞の全体的活性化につながっていることは明らかである。

30

40

【0038】

対抗するキナーゼおよびホスファターゼが媒介する活性化信号および抑制信号が、免疫系のバランスを維持する上で非常に重要であることは明らかである。活性化信号が優勢な免疫系は自己免疫および炎症を起こす。抑制信号が優勢な免疫系は、感染細胞または癌細胞に対抗できにくくなる。新しい活性化レセプターおよび抑制レセプターを単離することは、レセプターを経由して伝送される生物学的信号を研究する上で非常に望ましい。さらに、それらの分子の単離により、自己免疫、炎症、および感染に関係する病状を制御および治療する手段が提供される。

【0039】

50

例えば、抗体またはリガンドと拮抗関係にある、K I R H y 1等のI T I Mモチーフを有する細胞表面レセプターは、免疫系が過度に活性化し、過剰な感染または免疫病状がみられる病状における細胞の機能をダウンレギュレーションするのに使用できる。一方、K I R H y 1またはK I R H y 1の可溶型に特異的に拮抗する抗体は、免疫機能の抑制に関係する病状において特定の免疫反応を活性化する細胞表面レセプターとレセプターのリガンドとの相互作用をブロックするのに使用できる。

【0040】

ヒトNK抑制レセプター前駆体 (g i 2 0 5 0 2 9 8 2) の同族体である、本発明のK I R H y 1タンパク質は、ある種の造血性癌において高度に発現されるが、非造血、健常細胞において高度に発現されることはない。したがって、K I R H y 1を発現する細胞を標的とすれば、健常な組織への影響を最小とする一方、癌細胞を破壊するまたは癌細胞の成長を阻害することができる。同様に、非造血型腫瘍 (すなわち固形腫瘍) も、K I R H y 1抗原を保持していれば、標的にできる。K I R H y 1の標的化は、K I R H y 1発現細胞の増殖に関係する障害の治療にも使用できる。K I R H y 1発現細胞の増殖に関係する障害の例には、(急性骨髄性白血病、急性骨髄球性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性顆粒球性白血病、および急性非リンパ性白血病としても知られている) A M Lならびに組織球性リンパ腫等の癌が含まれる。さらに、非ホジキンB細胞リンパ腫、B細胞白血病、T細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病 (A L L)、慢性骨髄性白血病 (C M L)、B細胞大細胞型リンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、伴性リンパ組織増殖性疾患、および単核球増加症等のエプスタイン - バーウイルス関連症状；全身性エリテマトーデス等の自己免疫障害；過剰増殖障害；器官および組織の移植拒絶反応；およびある種のアレルギー反応が含まれる。K I R H y 1抗原を保持する、乳癌、結腸癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、または上皮細胞癌等の非造血型腫瘍も標的とすることができる。

【0041】

K I R H y 1ポリペプチドおよびK I R H y 1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、それぞれ国際公開第01/55437号および国際公開第01/55437号に対応する、共願の米国特許出願第09/631,451号および米国特許出願第09/491,404号に開示されている。本明細書に引用する、これらおよび他の米国特許、特許出願、外国特許、国際公開はすべて、その全体を本明細書において参考として援用する。その全体を本明細書において参考として援用する、米国特許出願第09/491,404号はおおむね、少なくとも1種の新規核酸配列のコレクションまたはライブラリー、特にコンティグ、すなわち発現された配列の標識の整列に関するものである。その全体を本明細書において参考として援用する、米国特許出願第09/631,451号には、(特に取り上げた配列の全配列を含んでおり)、組換え分子、クローン化遺伝子またはその縮重変異体、特に対立遺伝子変異体等の天然の変異体、天然のポリヌクレオチドまたはポリペプチドのフラグメントまたは同族体または変異体、アンチセンスポリヌクレオチド分子、ポリクローナルな、モノクローナルな、単鎖の、二特異的な、フラグメントの、ヒトのおよびヒト化された抗体を含め、ポリペプチド上に存在する一つまたは二つ以上の抗原決定基を特異的に認識する抗体、さらにモノクローナルな抗体を産生する融合雑種腫瘍細胞を含め、K I R H y 1ポリペプチド、K I R H y 1ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド単離体、これらのポリヌクレオチド、ポリペプチド、および抗体が関係する診断および治療用途ならびにスクリーニングアッセイが開示されている。

【0042】

配列番号3のK I R H y 1ポリペプチドは、非グリコシル化状態での予測分子量が33 k Dである、ほぼ305のアミノ酸からなるタンパク質である。最初のメチオニンは配列番号2の114番から始まっており、推定される停止コドンは配列番号2の1028番から始まっている。予測された17残基の信号ペプチドは、配列番号3の残基1から残基17まで (すなわち、配列番号4) によりコードされる。この信号ペプチド領域は、N e u r a l N e t w o r k S i g n a l P V 1 . 1 (その全体を本明細書において参考として援用する、N i e l s e n e t a l . , I n t . J . N e u r a l S

10

20

30

40

50

y s t . 8 : 5 8 1 - 5 9 9 (1 9 9 7)) を用いて予測した。当業界の技術者なら、実際の断裂部位はコンピュータ・プログラムでの予測と異なる可能性のあることがわかるはずである。予測された膜貫通ドメインは、配列番号3の残基159から残基186まで(すなわち配列番号6)によってコードされる。膜貫通ドメインは、K y t e - D o o l i t t l e 疎水性予測アルゴリズム(その全体を本明細書において参考として援用する、J . M o l . B i o l . 1 5 7 : 1 0 5 - 1 3 1 (1 9 8 2)) を用いて予測した。当業界の技術者なら、実際のドメインはコンピュータ・プログラムでの予測と異なる可能性のあることがわかるはずである。P f a m ソフトウェアプログラム(その全体を本明細書において参考として援用する、S o n n h a m m e r e t a l . , N u c l . A c i d s R e s . 2 6 : 3 2 0 - 3 2 2 (1 9 9 8)) を用い、K I R H y 1 がアミノ酸33から110まで(配列番号5)に渡る免疫グロブリン(I g)ドメインを一つ含むと予測された。K I R H y 1 の可溶性部は配列番号7によって発現される。

10

20

30

【0043】

B L A S T P アルゴリズム(その両方の全体を本明細書において参考として援用する、A l t s c h u l e t a l . , J . M o l . E v o l . 3 6 : 2 9 0 - 3 0 0 (1 9 9 3) ; A l t s c h u l e t a l . , J . M o l . B i o l . 2 1 : 4 0 3 - 4 1 0 (1 9 9 0)) を用いてタンパク質データベースをサーチした結果、配列番号3がヒトNK抑制レセプター前駆体(g i 2 0 5 0 2 9 8 2) およびヒトCMRF35同族体(「CMRF35白血球I g 様レセプターに類似している」、g i 2 0 3 8 0 1 8 3) と相同であることがわかった。図1に配列番号3とヒトNK抑制レセプター前駆体(配列番号8)とを並べて示したが、この二つの配列は配列番号3のアミノ酸配列全体で94%の類似性および94%の同一性を示し、図中で、Aはアラニン、Cはシステイン、Dはアスパラギン酸、Eはグルタミン酸、Fはフェニルアラニン、Gはグリジン、Hはヒスチジン、Iはイソロイシン、Kはリジン、Lはロイシン、Mはメチオニン、Nはアスパラギン、Pはプロリン、Qはグルタミン、Rはアルギニン、Sはセリン、Tはスレオニン、Vはバリン、Wはトリプトファン、Yはチロシンである。ギャップを破線で表した。図2に配列番号3とCMRF35同族体(配列番号9)とを並べて示したが、この二つの配列は配列番号3のアミノ酸配列全体で89%の類似性および89%の同一性を示し、図中で、Aはアラニン、Cはシステイン、Dはアスパラギン酸、Eはグルタミン酸、Fはフェニルアラニン、Gはグリジン、Hはヒスチジン、Iはイソロイシン、Kはリジン、Lはロイシン、Mはメチオニン、Nはアスパラギン、Pはプロリン、Qはグルタミン、Rはアルギニン、Sはセリン、Tはスレオニン、Vはバリン、Wはトリプトファン、Yはチロシンである。ギャップを破線で表した。

40

40

50

【0044】

配列番号3に相当する遺伝子は17番染色体に局在している(実施例3参照)。CMRF35ファミリーも乾癬感受性座(P S O R S 2) に近い17番染色体に局在しており、乾癬感受性座はアトピー性皮膚炎の遺伝子座およびリウマチ様関節炎の遺伝子座とオーバーラップできる(その両方の全体を本明細書において参考として援用する、C l a r k e t a l . , T i s s u e A n t i g e n s 5 7 : 4 1 5 - 4 2 3 (2 0 0 1) ; S p e c k m a n e t a l . , H u m . G e n e t . 1 1 2 : 3 4 - 4 1 (2 0 0 3)) 。したがって、K I R H y 1 およびCMRF35ファミリーに属するものは、乾癬、アトピー性皮膚炎、リウマチ様関節炎、さらに自己免疫疾患全般に関与できる。

【0045】

K I R H y 1 は、A M L および組織球性リンパ腫のみならず、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、未分化大細胞型T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、T細胞白血病、慢性骨髄性白血病(C M L)、組織球性リンパ腫、形質細胞腫、非ホジキンリンパ腫、およびホジキンリンパ腫を含む、造血性癌で発現されるが、一方、ほとんどの非造血性、健常細胞ではK I R H y 1 を発現しない、または発現しても低レベル

である（図3および表3参照）。したがって、K I R H y 1を標的とすることはA M L等の造血性癌の治療において有用である。

【0046】

K I R H y 1ペプチドそれ自体も、毒素または放射性同位元素をインビボで腫瘍細胞に標的させるのに使用できる。K I R H y 1は、それ自体に結合する同種親和性接着性タンパク質である可能性がある。この場合、K I R H y 1の細胞外ドメインまたはドメインのフラグメントは、腫瘍細胞上に発現されたK I R H y 1に結合できる。次にこのペプチドフラグメントは、K I R H y 1保持腫瘍細胞に細胞傷害剤を送達する手段として使用できる。抗体とほぼ同様に、これらのフラグメントは、K I R H y 1抗原を発現する細胞を特異的に標的できる。腫瘍細胞に対する細胞傷害剤の標的送達により、腫瘍細胞の死および腫瘍成長の抑制がもたらされる。同種親和性結合により、無傷のレセプターに結合し活性化する細胞外フラグメントの能力の例は、C D 8 4レセプターに関して示されている（その全体を本明細書において参考として援用する、Martin, et al., J. Immunol. 167: 3668-3676 (2001)）。

10

【0047】

K I R H y 1レセプターの細胞外フラグメントは、K I R H y 1レセプターを発現する免疫細胞を変調することにも使用できる。レセプターの細胞外ドメインフラグメントは、細胞表面に発現されるレセプター自体と結合し活性化することができる。K I R H y 1レセプターを保持する細胞（NK細胞、T細胞、B細胞、および骨髄性細胞等）に関しては、これにより、免疫系を活性化または抑制する（インターフェロン等の）サイトカインの放出が刺激される。さらに、これらのフラグメントがK I R H y 1レセプターを保持する細胞に結合することによって、これらの細胞を活性化し、増殖を刺激することもできる。いくつかのフラグメントは無傷のK I R H y 1レセプターに結合して、免疫細胞による活性化信号およびサイトカインの放出をブロックすることができる。したがって、これらのフラグメントは免疫抑制効果を有する。免疫系を活性化し刺激するフラグメントは、抗腫瘍特性を有する。これらのフラグメントは、免疫が媒介する腫瘍細胞の死をもたらすことのできる、免疫学的応答を刺激することが可能である。同じフラグメントは、ウイルスおよび細菌等の外部からの侵入物に対して免疫系がマウントし応答を亢進するように刺激することができる。免疫応答を抑制するフラグメントは、リンパ組織増殖性の障害、自己免疫疾患、移植片対宿主病、気腫等の炎症性疾患の治療において有用である。

20

30

【0048】

（5.2 定義）

用語の核酸の「フラグメント」は、少なくとも5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも7ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも11ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも17ヌクレオチドである、核酸残基の配列を意味する。フラグメントは、好ましくは500ヌクレオチド未満であり、好ましくは200ヌクレオチド未満であり、より好ましくは100ヌクレオチド未満であり、より好ましくは50ヌクレオチド未満であり、最も好ましくは30ヌクレオチド未満である。フラグメントは、mRNA分子またはDNA分子の同一部分または関係部分を同定または増幅する、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、さまざまなハイブリッド形成法あるいはマイクロアレイ法に用いることが好ましい。フラグメントまたは部分から本発明の各ヌクレオチド配列を一意的に同定できる。フラグメントは、配列番号2の部分と実質的に同一な配列を含むことが好ましい。ポリペプチド「フラグメント」は、少なくとも5アミノ酸、好ましくは少なくとも7アミノ酸、より好ましくは少なくとも9アミノ酸、最も好ましくは少なくとも17アミノ酸またはそれ以上のアミノ酸残基の長さである。ペプチドは、好ましくは200アミノ酸未満、より好ましくは150アミノ酸未満、最も好ましくは100アミノ酸未満である。ペプチドは5アミノ酸から200アミノ酸までであることが好ましい。活性であるために、各ポリペプチドは生物学的活性および/または免疫学的活性を示すのに十分な長さを有しなければならない。「免疫原性」という用語は、天然の、組換えの、または合成のK I R H y 1ペプチド、あるいは任意のK I R H y 1ペプチドの、好適な動物または細胞における特異的免疫応答を誘発する能

40

50

力および特異的抗体に結合する能力を意味する。

【0049】

用語の「KIRHy1抗原」は、動物に導入された際、該動物における本発明のKIRHy1ポリペプチドまたはそのフラグメントに対する特異的免疫応答を刺激できる分子を意味する。

【0050】

用語の「変異体」（または「同族体」）は、例えば、組換えDNA技術によってもたらされる、アミノ酸の挿入、除去、および置換により天然のポリペプチドとは異なる任意のポリペプチドを意味する。問題の活性を失うことなしに、どのアミノ酸残基を置換、付加、または除去できるかを決定する指標は、特定のポリペプチド配列と相同なペプチドの配列を比較すること、高度に相同な領域（保存領域）におけるアミノ酸配列の数の変化を最小にすること、またはアミノ酸をコンセンサス配列で置き換えることで見出すことができる。

10

【0051】

別法として、同一または類似のポリペプチドをコードする組換え変異体を、遺伝子コード内の「重複部」を用いて合成または選別することができる。さまざまな制限部位を産生するサイレントな変化等の、さまざまなコドン置換を、プラスミドまたはウイルス性ベクターあるいは特定の原核系または真核系における発現に導入してクローニングを最適化することができる。リガンド結合親和性、鎖間親和性、または分解速度/代謝回転速度等の特性を変更するため、ポリヌクレオチド配列における変異を、ポリペプチドまたはポリペプチドの任意の部分の特性を変更するためポリペプチドに付加される他のペプチドのドメインに反映させることができる。

20

【0052】

「ストリンジェントな」という用語は、当分野で厳格と共通認識されている条件を表すために使われる。ストリンジェントな条件には高度にストリンジェントな条件（すなわち、0.5M NaHPO₄、7%硫酸ドデシルナトリウム（SDS）、1mM EDTAにおける65℃でのフィルター結合DNAのハイブリッド化および0.1xSSC/0.1%SDSによる68℃での洗浄）、および中等度にストリンジェントな条件（すなわち、0.2xSSC/0.1%SDSによる42℃での洗浄）も含まれる。他の例示的ハイブリッド化条件については、本明細書の実施例に記載する。

30

【0053】

デオキシオリゴヌクレオチドのハイブリッド化例において、模範的なハイブリッド化条件には、37℃での6xSSC/0.05%ピロリン酸ナトリウムでの洗浄（14塩基オリゴヌクレオチド用）、48℃（17塩基オリゴヌクレオチド用）、55℃（20塩基オリゴヌクレオチド用）、および60℃（23塩基オリゴヌクレオチド用）が含まれる。

【0054】

（5.3 KIRHy1抗原を用いる標的化）

本発明の一つの実施形態により、KIRHy1に対して免疫系を刺激してKIRHy1発現細胞を標的させるKIRHy1ポリペプチドを含む組成物が提供される。抗癌治療の目的で、細胞免疫およびヒト免疫をもたらす組成物に腫瘍抗原を用いることは当分野で周知されている。例えば、一種の腫瘍特異的抗原組成物には、腫瘍細胞から単離され、スカシ貝由来のヘモシアニン（KLH）に結合され、補助剤と混合されて軽度の濾胞性リンパ腫患者に注射される、イディオタイプタンパク質が含まれている（その全体を本明細書において参考として援用する、Hsu, et al., Blood 89: 3129-3135（1997））。その全体を本明細書において参考として援用する、米国特許第6,312,718号には、悪性B細胞、特にリンパ腫、慢性リンパ性白血病、および多発性骨髄腫に対して免疫応答を誘発させる方法が記載されている。この特許に記載されている方法は、（1）少なくとも1種のB細胞の悪性度に関係する抗原、（2）IL-2単独、あるいはサイトカインまたはケモカインの少なくとも1種との組合せ、および（3）少なくとも1種の脂質分子を有する、リポソームを含むワクチンを使用する。KIR

40

50

H y 1 抗原を用いて K I R H y 1 を標的する方法では、一般に、フラグメント、類似体、および変異体を含め、K I R H y 1 ポリペプチドを使用する。

【 0 0 5 5 】

他の例としては、1種の抗原提示細胞である、樹状細胞を細胞ワクチン内で使用することができ、樹状細胞は患者から単離され、腫瘍抗原とともに培養され、細胞ワクチンとして再注入される（その全体を本明細書において参考として援用する、H s u , e t a l . , N a t . M e d . 2 : 5 2 - 5 8 (1 9 9 6) ）。

【 0 0 5 6 】

この抗原療法と、化学療法または放射線療法等の治療で用いられる別の種類の治療剤との組合せも可能である。

10

【 0 0 5 7 】

(5 . 4 核酸を用いる標的化)

(5 . 4 . 1 核酸の直接送達)

いくつかの実施形態において、組換えベクター内の、K I R H y 1 あるいはそのフラグメント、類似体、または変異体をコードする核酸が使用される。こうした方法は当分野で公知である。例えば、裸のDNAを注射することによって、免疫応答を誘発することができる。マウスに注射すると、B細胞リンパ腫等からの腫瘍イディオタイプタンパク質の軽量鎖および重量鎖の両方をコードするビストロニックmRNAを発現するプラスミドDNAは、防御型の抗腫瘍応答を引き起こすことができる（その全体を本明細書において参考として援用する、S i n g h , e t a l . , V a c c i n e 2 0 : 1 4 0 0 - 1 4 1 1 (2 0 0 2) ）。K I R H y 1 ウイルス性ベクターは、本発明のK I R H y 1 をコードする核酸を細胞に送達するのに特に有用である。ベクターの例には、インフルエンザ、アデノウイルス、牛痘、単純ヘルペスウイルス、鶏痘、水疱性口内炎ウイルス、カナリア痘ウイルス、ポリオウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス、およびシンドビスウイルス由来のベクターが含まれる。もちろん、リポソーム等の非ウイルス性ベクターまたは裸のDNAさえも本発明のK I R H y 1 をコードする核酸を細胞に送達するのに有用である。

20

【 0 0 5 8 】

この種の治療法と、化学療法または放射線療法等の治療で用いられる別の種類の治療剤との組合せも可能である。

30

【 0 0 5 9 】

(5 . 4 . 2 細胞内で発現される核酸)

いくつかの実施形態において、（そのフラグメント、類似体、または変異体を含め）K I R H y 1 ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターは、樹状細胞またはマクロファージ等の細胞に導入される。抗原提示細胞（A P C）内で発現されると、K I R H y 1 細胞表面の抗体はT細胞に提示され、T細胞はK I R H y 1 に対する免疫応答を誘発する。このような方法も当分野で公知である。腫瘍抗原をA P Cに導入するための方法およびそれに有用なベクターは、その全体を本明細書において参考として援用する、米国特許第 6 , 3 0 0 , 0 9 0 号に記載されている。K I R H y 1 をコードするベクターはインビボでA P C内に導入することができる。別法として、エキソビボでK I R H y 1 またはK I R H y 1 をコードする核酸をA P Cに導入し、次いで患者に導入して、K I R H y 1 に対する免疫応答を誘発させることもできる。別の実施形態においては、K I R H y 1 抗原を提示する細胞は、エキソビボで抗K I R H y 1 細胞傷害性T細胞（C T L）の進展を刺激するのに使用され、続いて刺激されたC T Lは患者に導入される（その全体を本明細書において参考として援用する、米国特許第 6 , 3 0 6 , 3 8 8 号）。

40

【 0 0 6 0 】

この種の治療法と、化学療法または放射線療法等の治療で用いられる別の種類の治療剤との組合せも可能である。

【 0 0 6 1 】

(5 . 4 . 3 アンチセンス核酸)

50

本発明の別の態様は、K I R H y 1ヌクレオチド配列、またはそのフラグメント、類似体、または変異体とハイブリッド化できる、またはこれらに対し相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に対して相補的な（例えば、二重鎖のc D N Aのコード鎖に相補的な、またはm R N A配列に相補的な）ヌクレオチド配列を有する。具体的な態様において、K I R H y 1コード鎖の少なくとも10ヌクレオチド、25ヌクレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、250ヌクレオチド、または500ヌクレオチド、またはK I R H y 1コード鎖の全体、あるいはその一部のみに相補的な、アンチセンス核酸分子が提供される。K I R H y 1のフラグメント、同族体、誘導体、および類似体をコードする核酸分子またはK I R H y 1核酸配列に相補的なアンチセンス核酸も提供される。

10

【0062】

一つの実施形態において、アンチセンス核酸分子は、K I R H y 1タンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語の「コード領域」は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を意味する。他の実施形態において、アンチセンス核酸分子は、K I R H y 1タンパク質をコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「容認領域」に対してアンチセンスである。用語の「容認領域」は、アミノ酸に翻訳されない、コード領域に隣接する5'配列および3'配列（すなわち5'および3'非翻訳領域とも呼ばれる領域）を意味する。

【0063】

本明細書に開示するK I R H y 1タンパク質をコードするコード鎖配列が与えられると、Watson およびClick の規則またはHoogsteenの塩基対規則にしたがって、本発明のアンチセンス核酸を設計することができる。アンチセンス核酸分子は、K I R H y 1mRNAの全コード領域に対して相補的であり得るが、より好ましくは、K I R H y 1mRNAのコード領域または非コード領域の一部に対してのみアンチセンスなオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、K I R H y 1mRNAの翻訳開始部位周囲領域に対して相補的であることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、長さが例えば、5ヌクレオチド、10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、20ヌクレオチド、25ヌクレオチド、30ヌクレオチド、35ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、または50ヌクレオチドであってよい。本発明のアンチセンス核酸は、当分野で公知な手順を用いる、化学合成または酵素的連結反応で調製することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然のヌクレオチド、ならびに分子の生物学的安定性が増大するようにまたはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性が増大するようにさまざまに修飾されたヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドも使用できる）を使用して化学的に合成することができる。

20

30

【0064】

アンチセンス核酸の調製に使用できる修飾されたヌクレオチドの例には、5 - フルオロウラシル、5 - プロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、- D - ガラクトシルキューオシン、イノシン、N 6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N 6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウリジン、- D - マンノシルキューオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、ワイプトシン、プソイドウラシル、キューオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メツルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸(v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3

40

50

- アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル) ウラシル、(a c p 3) w、および 2 , 6 - ジアミノプリンが含まれる。別法として、アンチセンス核酸は、その中に核酸がアンチセンス配向でサブクロニングされた(すなわち、挿入された核酸から転写された R N A は、問題の標的核酸に対してアンチセンス配向であること、以下のセクションでさらに説明する) 発現ベクターを用いて生物学的に調製することができる。

【 0 0 6 5 】

本発明のアンチセンス核酸分子は、(例えば、転写および/または翻訳を阻害することにより) タンパク質の発現を阻害するために、一般に患者に投与されるあるいはインサイチュで産生され、K I R H y 1 タンパク質をコードする細胞の m R N A および/またはゲノム D N A とハイブリッドを形成するまたは細胞の m R N A および/またはゲノム D N A に結合する。ハイブリッド形成は、安定な二重鎖を形成する従来型のヌクレオチド相補性によるものであってよく、あるいは、例えば、D N A 二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの大きな溝における特異的な相互作用によるものであってよい。本発明のアンチセンス核酸分子を投与する経路の例には、組織部位での直接注射が含まれる。別法として、アンチセンス核酸分子を標的選択細胞に変性し、全身投与することができる。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子を選択される細胞表面上で発現されたレセプターまたは抗原と特異的に結合するように変性する(例えば、アンチセンス核酸分子を、細胞表面レセプターまたは抗原と結合するペプチドまたは抗体と結合させることによって) ことができる。アンチセンス核酸分子を本明細書に記載するベクターを用いて細胞に送達することもできる。十分な量の核酸分子を送達するため、アンチセンス核酸分子が強力な p o l I I プロモーターまたは p o l I I I プロモーターの制御下に置かれるベクター構造が好ましい。

【 0 0 6 6 】

さらに別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は - アノマー核酸分子である。 - アノマー核酸分子は相補的 R N A と特異的な二重鎖ハイブリッドを形成し、そのハイブリッドにおいては、通常の - 単位とは対照的に、鎖が互いに平方に走っている。例えば、G a u l t i e r , e t a l . , N u c l . A c i d s R e s . 1 5 : 6 6 2 5 - 6 6 4 1 (1 9 8 7) を参照されたい。アンチセンス核酸分子は 2 ' - o - メチルリボヌクレオチド(例えば、I n o u e , e t a l . , N u c l . A c i d s R e s . 1 5 : 6 1 3 1 - 6 1 4 8 (1 9 8 7) 参照) またはキメラ R N A - D N A 類似体(例えば、I n o u e , e t a l . , F E B S L e t t . 2 1 5 : 3 2 7 - 3 3 0 (1 9 8 7)) を含むこともでき、上記の文献はすべてその全体を本明細書において参考として援用する。

【 0 0 6 7 】

(5 . 4 . 4 リボザイム成分および P N A 成分)

また別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸はライボザイムである。ライボザイムは、m R N A 等の一重鎖の核酸を切断してライボザイムに対する相補領域を形成できるリボヌクリアーゼ活性を有する触媒作用のある R N A である。したがって、ライボザイム(例えば、ハンマーヘッド構造ライボザイム(H a s e l h o f f a n d G e r l a c h (1 9 8 8) N a t u r e 3 3 4 : 5 8 5 - 5 9 1 に記載)) を、m R N A 転写物の触媒的切断に使用し、それによって m R N A の翻訳を阻害することができる。本発明の核酸に対する特異性を有するライボザイムを、本明細書に開示する D N A のヌクレオチド配列(すなわち、配列番号 1 ~ 2) に基づいて設計することができる。例えば、テトラヒメナ L - 1 9 I V S R N A は、活性部位のヌクレオチド配列が切断される m R N A 内のヌクレオチド配列に対し相補的であるように調製できる。例えば、C e c h e t a l . , 米国特許第 4 , 9 8 7 , 0 7 1 号; および C e c h e t a l . , 米国特許第 5 , 1 1 6 , 7 4 2 号を参照されたい。別法として、本発明の m R N A を、R N A 分子の集団から特異的リボヌクリアーゼ活性を有する触媒作用のある R N A を選別するのに使用することができる。例えば、B a r t e l e t a l . , (1 9 9 3) S c i e n c e 2 6 1 : 1 4 1 1 - 1 4 1 8 を参照されたい。

【0068】

あるいは、三重らせん構造を形成する調節領域（例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー）に対して相補的なヌクレオチド配列を標的とすることにより、標的細胞内の遺伝子の転写を阻止し、遺伝子発現を阻害することができる。Helene. (1991) Anticancer Drug Des. 6: 569-84; Helene. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; Maher (1992) Bioassays 14: 807-15の全体を参照されたい。

【0069】

さまざまな実施形態において、本発明の核酸の塩基部分、糖部分、またはリン酸エステル骨格を変性して、例えば、安定性、ハイブリッド形成、または分子の溶解性を改良することができる。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸エステル骨格をペプチド核酸を産生するように変性することができる(Hyrup et al. (1996) Bioorg. Med. Chem. 4: 5-23参照)。本明細書で用いるように、用語の「ペプチド核酸」すなわち「PNAs」は、デオキシリボースリン酸エステル骨格が擬ペプチド骨格で置き換えられ、4つの天然核酸塩基のみが残存している、核酸模擬物、例えばDNA模擬物を意味する。PNAsの中性骨格が、低イオン強度条件下でのDNAおよびRNAとの特異的ハイブリッド形成を可能にしていることが示されている。PNAsオリゴマーの合成は、前記のHyrup et al. (1996)の文献; Perry-O'Keefe et al. (1996) PNAS 93: 14670-675に記載のように、標準的な固相ペプチド合成プロトコルにしたがって実施できる。

【0070】

本発明のPNAsを治療用途および診断用途に使用できる。例えば、PNAsは、転写または翻訳の停止を誘導するあるいは複製を阻止することにより遺伝子発現の配列特異的変性をおこなう、アンチセンス剤または抗遺伝子剤として使用できる。本発明のPNAsは、他の酵素、例えばS1ヌクレアーゼ(上記のHyrup B. (1996))との組合せで使用する場合の人工制限酵素として;またはDNA配列およびハイブリッド形成のプロブまたはプライマーとして(上記のHyrup et al. (1996));上記のPerry-O'Keefe et al. (1996))、PNAを対象とするPCRクランピングにより、遺伝子の一塩基対変異の分析にも使用できる。

【0071】

他の実施形態において、本発明のPNAsは、例えば、その安定性または細胞への取り込みを増強するために、PNAに親油性基または他の有用な基を結合することにより、PNA-DNAキメラを形成することにより、あるいはリボソームまたは当分野で公知の他の薬剤送達技術の使用により、変性することができる。例えば、PNA-DNAキメラは、PNAとDNAの有利な特性を組み合わせるように調製することができる。このようなキメラにより、DNAはDNAと相互作用する酵素、例えばリボヌクレアーゼHおよびDNAポリメラーゼを認識することが可能になり、一方、PNA部は高い結合親和性および特異性を提供する。PNA-DNAキメラは、塩基のスタッキング、核酸塩基間の結合数、または配向に基づいて選択される、好適な長さのリンカーを用いて結合できる(上記のHyrup (1996))。PNA-DNAキメラの合成は、前記のHyrup (1996)の文献およびFinn et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24: 3357-63に記載のように、実施できる。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホロアミダイト結合法を用いて固形支持体上で合成し、PNAとDNAの5'端を結合できる、核酸類似体、例えば5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホロアミダイトで変性することができる(Mag et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17: 5973-88)。次いで、PNAモノマーを逐次的に結合させて、5' PNAセグメントと3' DNAセグメントからキメラ分子を調製する(上記のFinn et al. (1996))。別法で、キメラ分子は5' DNAセグメントと3' PNAセグメントから合成できる。

Petersen et al. (1975) Bioorg. Med. Chem. Lett. 5: 1119-1124を参照されたい。

【0072】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、(例えばインピボで宿主細胞レセプターを標的するための)ペプチド等の他の付加基、あるいは細胞膜(例えば、Lettinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652; PCT出願 国際公開 第88/09810号参照)または血脳関門(例えば、PCT出願 国際公開 第89/10134号参照)を越えての輸送を容易にする薬剤を含むことができる。さらに、オリゴヌクレオチドを、開裂剤(例えば、Krol et al., 1988, BioTechniques 6: 958-976参照)または挿入剤(例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549参照)が契機となるハイブリッド形成で変性することができる。変性のため、オリゴヌクレオチドを、他の分子、例えばペプチド、クロスリンキング剤、輸送剤が契機となるハイブリッド、開裂剤が契機となるハイブリッド等と結合させることができる。

【0073】

(5.4.5 KIRHy1核酸)

単離された本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1~2のヌクレオチド配列のいずれかを含むポリヌクレオチド;配列番号1~2のフラグメント;配列番号1~2の配列をコードするタンパク質全長を含むポリヌクレオチド(例えば、配列番号3をコードする);および配列番号1~2のいずれか一つのポリペプチドの成熟タンパク質配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含むが、これらに限定されるものではない。本発明のポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で、(a)配列番号1~2のヌクレオチド配列のいずれかの相補体;(b)配列番号3~7,11のポリペプチドのいずれか一つをコードするポリヌクレオチド;(c)上に列挙したポリヌクレオチドのいずれかの対立形質変異体であるポリヌクレオチド;(d)上に列挙したタンパク質のいずれかの同族体をコードするポリヌクレオチド;または(e)配列番号3~7,11のポリペプチドの特定のドメインまたはトランシェーションを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、ハイブリッドを形成するポリヌクレオチドも含むが、これらに限定されるものではない。問題のドメインは、コードされるポリペプチドの性質によって、例えば、リガンド結合性の、細胞外の、膜貫通型の、または細胞質のドメイン、またはそれらの組合せを含む、レセプター様ポリペプチドのドメイン;可変性の免疫グロブリン様ドメインを含む、免疫グロブリン様タンパク質のドメイン;触媒性ドメインおよび基質結合性ドメインを含む、酵素様ポリペプチドのドメイン;ならびにレセプター接合性ドメインを含む、リガンドのポリペプチドのドメインであってよい。

【0074】

本発明のポリヌクレオチドには、天然のDNA、あるいは合成DNAの全体または一部、例えばcDNA、およびゲノムDNA、およびRNA、例えばmRNAが含まれる。本発明のポリヌクレオチドは、cDNAのコード領域全体を含む、またはcDNAのコード領域の一部を提示することができる。

【0075】

本発明は、本明細書に開示するcDNA配列に相当する遺伝子も提供する。相当する遺伝子は、本明細書に開示する配列情報を用い、公知の方法にしたがって単離することができる。このような方法には、好適なゲノムライブラリーまたは他のゲノム材料源内での遺伝子の同定および/または増幅のための開示された配列情報からのプローブまたはプライマーの調製が含まれる。さらに、当分野で公知の方法を用いて、5'配列および3'配列を得ることができる。例えば、配列番号1~2のポリヌクレオチドのいずれかまたはその一部をプローブとして用い、好適なハイブリッド形成条件下で適切なcDNAライブラリーまたはゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、配列番号1~2

のポリヌクレオチドのいずれかに相当する cDNA またはゲノム DNA の全長を入手できる。あるいは、適切な cDNA ライブラリーまたはゲノム DNA ライブラリー内での遺伝子の同定および / または増幅を可能にする好適なプライマーの基礎として、配列番号 1 ~ 2 のポリヌクレオチドを使用できる。

【0076】

本発明の核酸配列は、dbEST、gbpri、および UniGene 等の一つまたは二つ以上の公的なデータベースから得られる、ESTs および配列 (cDNA の配列およびゲノム配列も含め) から構築することができる。EST 配列は、配列同定情報、代表的なフラグメントまたはセグメントの情報、または遺伝子全長の新規セグメント情報を提供できる。

10

【0077】

本発明のポリヌクレオチドは、上に列挙したポリヌクレオチドと実質的に等価なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドも提供する。本発明によるポリヌクレオチドは、上に列挙したポリヌクレオチドに対して、例えば少なくともおよそ 65 %、少なくともおよそ 70 %、少なくともおよそ 75 %、少なくともおよそ 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、または 89 %、より一般的には少なくともおよそ 90 %、91 %、92 %、93 %、または 94 %、もっと一般的には少なくともおよそ 95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有することができる。

【0078】

本発明の核酸配列の範囲には、そのフラグメントが 5 ヌクレオチドを超える、好ましくは 7 ヌクレオチドを超える、より好ましくは 9 ヌクレオチドを超える、最も好ましくは 17 ヌクレオチドを超える、配列番号 1 ~ 2 のポリヌクレオチドのいずれかまたはその相補体とストリンジェントな条件下でハイブリッドを形成する核酸配列フラグメントが含まれる。選択的な (すなわち、本発明のポリヌクレオチドのいずれか一つと特異的にハイブリッドを形成する)、例えば 15、17、または 20 ヌクレオチドまたはそれ以上のフラグメントが想定される。ポリヌクレオチドと特異的にハイブリッドを形成できるプローブは、本発明のポリヌクレオチド配列と同じ遺伝子ファミリー内の他のポリヌクレオチド配列とを識別できる、またはヒト遺伝子と他の種の遺伝子とを識別できる、かつ好ましくは一意的ヌクレオチド配列に基づいている。

20

【0079】

本発明の範囲に入る配列は、これらの具体的な配列に限定されず、その対立形質の変異体および種の変異体も含まれる。対立形質の変異体および種の変異体は、配列番号 1 ~ 2 で示される配列、その代表的フラグメント、または配列番号 1 ~ 2 に対して少なくとも 90 % 相同な、好ましくは 95 % 相同な、同一種の別の単離物からの配列を有する核酸配列と比較することによって、機械的に決定できる。さらに、コドンの変動に対応するため、本発明には、本明細書に開示する特異的 ORFs がコードするのと同じアミノ酸配列をコードする核酸分子も含まれる。換言すれば、ORF のコード領域における、一つのコドンの同一のアミノ酸をコードする別のコドンによる置換が明白に想定される。

30

【0080】

配列番号 1 ~ 2 を含め、本発明の核酸に最も近い核酸は、アルゴリズムまたはプログラムを用いてデータベースをサーチすることによって入手できる。局所的な配列の配向をサーチするには、基本的な局所配向サーチツールである BLAST を使用することが好ましい (Altschul, S. F., J. Mol. Evol. 36: 290 - 300 (1993) および Altschul, S. F., et al., J. Mol. Biol. 21: 403 - 410 (1990))。

40

【0081】

開示したポリヌクレオチドおよびタンパク質の種の同族体 (すなわちオルソログ) も本発明により提供される。本明細書により提供される配列から好適なプローブまたはプライマーを調製し、所望の種の好適な核酸源をサーチすることによって、種の同族体を単離または同定することができる。

50

【0082】

本発明は、開示したポリヌクレオチドおよびタンパク質の対立形質の変異体、すなわちポリヌクレオチドがコードするタンパク質と同一、相同、または関連するタンパク質をコードする、単離されたポリヌクレオチドとは別の天然のかたちのもも包含する。

【0083】

本発明の核酸配列は、前記の核酸の変異体をコードする配列も対象とする。これらのアミノ酸配列変異体は、当分野で公知の方法で、好適なヌクレオチドの変化を天然ポリヌクレオチドまたは変異体ポリヌクレオチドに導入することによって調製できる。アミノ酸配列変異体の構築には、二つの可変要因がある。変異の位置および変異の性質である。アミノ酸配列変異体をコードする核酸は、アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを変異させて天然にはないものとするにより構築することが好ましい。これらの核酸改変は、種によって異なる核酸部位（変動部位）または高度に保存される領域（安定領域）でおこなうことができる。このような位置の部位は一般に連続的に改変され、例えば、まず保存的な改変をおこない（例えば、疎水的アミノ酸を別の疎水的アミノ酸に置換し）、ついでより大きな改変をおこない（例えば、疎水的アミノ酸を荷電アミノ酸に置換し）、その後除去または挿入を標的部位におこなう。一般に、アミノ酸配列の除去は1～30残基に及び、好ましくは1～10残基であり、通常隣接したものである。アミノ酸挿入には、長さが1残基から100残基またはそれ以上に及び、アミノ基および/またはカルボキシル基末端の融合、さらに一つまたは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。一般に、配列内挿入は、1～10残基アミノ残基に及んでもよく、好ましくは1～5残基である。末端挿入の例には、異なる宿主細胞における挿入または細胞内標的化に必要な異種信号配列、および発現されるタンパク質の精製に有用なFLAG（登録商標）等の配列またはポリヒスチジン配列が含まれる。

【0084】

好ましい方法において、新規アミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、部位特異的変異誘発によって改変される。この方法では、改変された部位のいずれの側面上で改変されたアミノ酸の両方の側鎖が安定な二重鎖を形成するように、所望のアミノ酸変異体ならびに十分近いヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドを改変するオリゴヌクレオチド配列が使用される。一般に、部位特異的変異誘発技術は当分野の技術者に周知されており、この技術はEdelman et al., DNA 2: 183 (1983)等の出版物に例示されている。ポリヌクレオチド配列において部位特異的変異を誘発する簡便かつ効率的な方法がZoller and Smith, Nucleic Acids rev. 10: 6487-6500 (1982)によって公表された。新規核酸のアミノ酸配列変異体を調製するのにPCRも使用できる。出発物質として少量のテンプレートDNAを使用する場合は、テンプレートDNAにおける対応する領域と配列が少々異なるプライマーにより所望のアミノ酸変異体が産生される。PCR増幅により、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドテンプレートとはプライマーによって特定される部位が異なるDNAフラグメントが大量に産生される。このDNAフラグメント産物はピラスミド内の相当領域を置換し、この結果、所望のアミノ酸変異体をコードするポリヌクレオチドが得られる。

【0085】

アミノ酸変異体を産生するための別の技術は、Wells, et al., Gene 34: 315 (1985)に記載されているカセット変異誘発技術であり、当分野で周知されている他の変異誘発技術は、例えば、Sambrook, et al., supra, and Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, et al.,に記載されている技術である。遺伝コードに特有の縮重により、実質的に同一なあるいは機能的に等価なアミノ酸配列をコードする他のDNA配列を、これらの新規核酸のクローニングおよび発現のための本発明の実践に使用できる。このようなDNA配列には、ストリンジェントな条件下で好適な新規核酸配列とハイブリッドを形成できるDNA配列が含まれる。

【0086】

本発明の好ましいポリペプチド短小体をコードするポリヌクレオチドは、本発明のドメインの1種またはそれ以上および異種タンパク質配列を含むキメラタンパク質または融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドの産生に使用できる。

【0087】

本発明のポリヌクレオチドにはさらに、上に列挙したポリヌクレオチドのいずれかの相補体も含まれる。ポリヌクレオチドは、DNA（ゲノムDNA、cDNA、増幅または合成）あるいはRNAであってよい。このようなポリヌクレオチドを入手するための方法およびアルゴリズムは当分野の技術者に周知されており、例えば、所望の配列と同一なポリヌクレオチドを機械的に単離できるハイブリッド化条件を決定するための方法も含まれる。

10

【0088】

本発明による、配列番号3のいずれか一つまたはその機能的等価物をコードし、成熟タンパク質配列を含むポリヌクレオチド配列は、好適な宿主細胞内での、核酸またはその機能的等価物の発現を目的とする組換えDNA分子の産生に使用できる。本明細書で同定したクローンのいずれかのcDNA挿入体も含まれる。

【0089】

本発明によるポリヌクレオチドは、確立済みの組換えDNA技術（Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NYを参照）により、さまざまな他のヌクレオチド配列のいずれかと結合することができる。ポリヌクレオチドとの結合に有用なヌクレオチド配列には、当分野で周知されている、ベクターの組合せ、例えば、プラスミド、コスミド、ファージ誘導体、ファージミド、その他が含まれる。したがって、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターおよびそのポリヌクレオチドを含む宿主細胞も提供する。一般に、ベクターには、少なくとも1種の生物体で機能する複製源、簡便な制限エンドヌクレアーゼ部位、および選択可能な宿主細胞のマーカーが含まれる。本発明によるベクターには、発現ベクター、複製ベクター、プローブ産生ベクター、および配列決定ベクターが含まれる。本発明による宿主細胞は、原核細胞でも真核細胞でもよく、単細胞生物または多細胞生物の一部であってもよい。

20

30

【0090】

また、本発明は、配列番号1～2のヌクレオチド配列のいずれかまたはそのフラグメントまたは本発明の他のポリヌクレオチドのいずれかを有する核酸を含む組換え体構造を提供する。一つの実施形態において、本発明の組換え体構造は、その中に配列番号1～2のヌクレオチド配列のいずれかまたはそのフラグメントを有する核酸が前向き配向または後ろ向き配向で挿入された、プラスミドまたはウイルス性ベクター等のベクターを含む。ベクターが本発明のORFsの一つを含む場合には、ベクターはさらに、例えば操作可能にORFに結合されたプロモーターを含め、調節配列を含む。多数の好適なベクターおよびプロモーターが当分野の技術者に公知であり、本発明の組換え体構造を構築するために市販品を入手できる。例示のため、以下のベクターを示す。細菌性ベクター：pBs、phagescript、PsiX174、PBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a（Stratagene社）；pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5（Pharmacia社） 真核細胞性ベクター：pWneo、pSV2cat、pOG44、PXTI、pSG（Stratagene社）、pSVK3、pBPV、pMSG、およびpSVL（Pharmacia社）。

40

【0091】

組換えタンパク質を産生するために、本発明の単離されたポリヌクレオチドを、Kauffman et al., Nucleic Acids Res. 19: 4485-4490 (1991)の文献に開示されている、pMT2発現ベクターまたはpED

50

発現ベクター等の発現制御配列に操作可能に結合することができる。多くの好適な発現制御配列が当分野で公知である。組換えタンパク質を発現させる一般的な方法も公知であり、R. Kaufman, Methods in Enzymology 185: 537-566 (1990)に例示されている。本明細書の「操作可能に結合」とは、本発明の単離されたポリヌクレオチドおよび発現制御配列が、結合されるポリヌクレオチド/発現制御配列によって形質転換される(形質移入される)宿主細胞によってタンパク質が発現されるようにベクター内または細胞内に導入することを意味する。

【0092】

プロモーター領域は、選択可能なマーカーを有するCAT(クロラムフェニコールトランスフェラーゼ)ベクターまたは他のベクターを用いて、任意の所望の遺伝子から選択することができる。好適なベクターは、pKK232-8およびpCM7の二つである。特定の提示可能な細菌性プロモーターには、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、PR、およびtrcが含まれる。真核細胞性プロモーターには、最初期のCMV、HSVチミジンキナーゼ、初期および晩期のSV40、レトロウイルスからのLTRs、およびマウスのメタロチオネイン-Iが含まれる。好適なベクターおよびプロモーターの選択は、当分野の通常の技術者に十分可能である。一般に、組換え発現ベクターには、宿主細胞の形質転換を可能にする、複製源および選択可能なマーカー、例えば、E. coliのアンピシリン抵抗性遺伝子およびS. cerevisiaeのTRP1遺伝子、ならびに下流構造配列の転写を指示する高度に発現された遺伝子由来のプロモーターが含まれる。このようなプロモーターは、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)等の解糖酵素をコードするオペロン、 α -要素、酸ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質、その他から得られる。異種構造配列は、適当な相において翻訳開始配列と翻訳停止配列から、さらに好ましくは、翻訳されたタンパク質の細胞周辺腔または細胞外媒体への分泌を指示できるリーダー配列から構築される。任意選択で、異種配列は、所望の特性、例えば、発現された組換え産物の安定化または精製の単純化を付与するアミノ末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードできる。細菌に使用するための有用な発現ベクターは、所望のタンパク質とともに操作可能な読み取り期における好適な翻訳開始信号および翻訳停止信号をコードする構造DNA配列に機能性プロモーターを挿入することにより構築される。このベクターは、1種またはそれ以上の表現型の選択可能なマーカーならびにベクターの維持を確保し、望ましい場合には宿主内での増幅を可能にする複製源を含む。形質転換のための好適な原核性宿主には、E. coli、Bacillus subtilis、Salmonella typhimurium、ならびにthe genera Pseudomonas、Streptomyces、およびStaphylococcus内のさまざまな種が含まれるが、選択の問題として他も使用できる。

【0093】

代表的ではあるが限定されない例として、細菌に使用するための有用な発現ベクターは、選択可能なマーカーならびに周知のクロニングベクターであるpBR322(ATCC 37017)の遺伝因子を含む市販のプラスミド由来の細菌性複製源を含むことができる。このような市販のベクターには、例えば、pKK223-3(Pharmacia Fine Chemicals社、Uppsala、スウェーデン)およびGEM 1(Promega Biotech社、Madison、WI、UAS)が含まれる。これらのpKK223の「骨格」部は、好適なプロモーターおよび発現される構造配列と組み合わせられる。好適な宿主株が形質転換され、宿主株が好適な細胞密度まで生育した後、好適な手段(例えば、温度の変更または化学的誘導)によって選択されたプロモーターは誘発または抑制され、細胞はさらに培養される。通常、細胞は、遠心分離によって回収され、物理的手段または化学的手段によって破壊され、粗抽出物がその後の精製に備えて取り出される。

【0094】

本発明のポリヌクレオチドを変異応答誘発にも使用できる。例えば、本明細書において参考として援用する、Fan, et al., Nat. Biotech. 17:

870-872 (1999)に記載のように、ポリペプチドをコードする核酸配列は、裸のプラスミドDNAの局所投与または注射、好ましくはDNAの筋内注射の後で、コードされたポリペプチドに対する抗体の形成に使用できる。核酸配列は組換え発現ベクター内に挿入されるのが好ましいが、裸のDNAの形であってもよい。

【0095】

(5.4.6 遺伝子療法)

本発明のポリヌクレオチドにおける変異によって、コードされたタンパク質は正常な機能を失う可能性がある。したがって、本発明は、本発明のポリペプチドの正常な活性を再建する；または本発明のポリペプチドが関与する病的状態を治療する、遺伝子療法を提供する。ベクター、より具体的にはウイルス性ベクター（例えば、アデノウイルス、アデノ関係ウイルス、またはレトロウイルス）の使用による、本発明のポリペプチドをコードする機能性遺伝子の好適な細胞への送達によってエキソピボ、インサイチュ、またはインピボが、あるいは物理的DNA輸送法（例えば、リポソームまたは化学的治療）の使用によってエキソピボが達成される。例えば、Anderson, Nature, 392 (Suppl): 25-20 (1998)を参照されたい。遺伝子療法技術のレビューについては、Friedmann, Science, 244: 1275-1281 (1989); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); およびMiller, Nature, 357: 455-460 (1992)を参照されたい。これらはすべてその全体を本明細書において参考として援用する。本発明のヌクレオチドのいずれか一つまたは本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の導入も、染色体外物質（一時的発現）または人工染色体（安定的発現）によって達成される。このような細胞を増殖するためまたはこのような細胞に所望の効果または活性を生じさせるために、本発明のタンパク質の存在下で細胞をエキソピボで培養することができる。治療のため、その後に治療済みの細胞をインピボで導入することができる。あるいは、他のヒトの病態において、本発明のポリペプチドの発現を阻止することまたは活性を阻害することが病態の治療に有用であることが想定される。アンチセンス療法または遺伝子療法を適用して、本発明のポリペプチドの発現を否定的に調節することが想定される。

【0096】

タンパク質の発現を阻止する別の方法には、当分野で公知の方法によって、アンチセンス分子を本発明の核酸、その相補体、その翻訳されたRNA配列に導入することが含まれる。さらに、標的除去法を用いてまたは組織特異的なサイレンサー等の否定的調節因子の挿入によって、本発明のポリペプチドを阻害することができる。

【0097】

また、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを発現するためにインピボで遺伝子操作によって改変された細胞を提供し、この場合、ポリヌクレオチドは細胞内でポリヌクレオチドを発現する宿主細胞に対して異種の調節配列と機能的に結びついている。この方法は、本発明のポリヌクレオチドの発現を増大または低下するのに使用できる。

【0098】

本発明が提供するDNA配列の知識によって、異種ポリペプチドの発現、発現の増大または低下を可能にする細胞の変性ができる。細胞がタンパク質を高レベルで発現するように、異種プロモーターの全体または一部を有する天然プロモーターの全体または一部を置換することによって、ポリペプチドの発現が増大するように細胞を変性（例えば、異種組換えによって）することができる。異種プロモーターは、所望のタンパク質をコードする配列に操作可能に結合するように挿入される。例えば、PCT出願国際公開第94/12650号、PCT出願国際公開第92/20808号、およびPCT出願国際公開第91/09955号を参照されたい。これらはすべてその全体を本明細書において参考として援用する。異種プロモーターDNAに加えて、増幅可能なマーカーDNA（例えば、カルバミルリン酸シンターゼ、アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ、およびジヒドロオキターゼをコードする、ada、dhfr、および多機能CAD遺伝子）および/またはイ

10

20

30

40

50

ントロンDNAを異種プロモーターDNAとともに挿入することができる。所望のタンパク質をコードする配列に結合されると、標準的な選別方法でマーカーDNAを増幅すれば、所望のタンパク質をコードする配列も細胞内で共に増幅される。

【0099】

本発明の他の実施形態において、本発明のポリヌクレオチドを含む異種遺伝子を誘発性調節要素の調節下で発現するように細胞および組織を改変することができ、この場合、異種遺伝子の調節要素は異種組換えによって置き換えることができる。本明細書に記載のように、遺伝子の既存の調節領域を別の種から単離された調節配列または遺伝子工学的方法で合成された新規な調節配列で置換するのに遺伝子標的化を用いることができる。このような調節配列を、プロモーター、エンハンサー、スカフォールド付着領域、負の調節要素、転写開始部位、調節タンパク質結合部位、または上記配列の組合せに含ませることができる。あるいは、標的化によって、RNAまたは産生されるタンパク質の構造または安定性に影響を及ぼす配列を置換する、除去する、付加する、または他の変性を加えることができる。これらの配列には、ポリアデニル化信号、mRNAの安定性要素、スプライス部位、タンパク質の輸送特性または分泌特性を増強または変性するリーダー配列、タンパク質またはRNA分子の機能または安定性を改変または改善する他の配列が含まれる。

10

【0100】

標的化は、調節配列の単純な挿入、遺伝子を新規調節配列の調節下に置くこと、例えば、新規プロモーターまたはエンハンサーあるいは両方を遺伝子上流に挿入することによってよい。あるいは、標的化は、組織特異的な負の調節要素の除去等の調節要素の単純な除去であってもよい。あるいは、標的化は、既存の要素の置換であってもよく、例えば、組織特異的なエンハンサーを天然の要素より幅広いまたは異なる細胞種特異性を有するエンハンサーで置き換えることができる。この場合、天然の配列は除去され、新しい配列が付加される。これらすべてにおいて、標的の同定は、標的DNAに隣接し、外因性DNAが細胞のゲノムに組み込まれている細胞の選別を可能にする、一つまたはそれ以上の選択可能なマーカー遺伝子を使用することによって容易になる。標的の同定は、負の選択可能なマーカーは外因性DNAに結合しても標的配列に隣接するように配置され、宿主細胞ゲノム内の配列間の厳密に同種の組換えが負の選択可能なマーカーの安定した組み込みをもたらさないような、負の選択の特性を示す一つまたはそれ以上のマーカー遺伝子を使用することによっても容易になる。これに有用なマーカーには、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(TK)遺伝子または細菌性キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(gpt)遺伝子が含まれる。

20

30

【0101】

本発明のこの態様にしたがって使用できる遺伝子標的化技術および遺伝子活性化技術は、Chappelの米国特許第5,272,071号、Sherwin他の米国特許第5,578,461号、Selden他の国際出願PCT/US92/09627号(国際公開第93/09222号)、Skoultschi他の国際出願PCT/US90/06436号(国際公開第91/06667号)により具体的に記載されており、これらはすべてその全体を本明細書において参考として援用する。

【0102】

40

(5.5 抗KIRHy1抗体)

別法で、免疫標的化には、標的に対する抗体、抗体フラグメント、または免疫系の感作細胞等の免疫系の構成要素の投与が含まれる。抗体または抗体フラグメントを用いて癌細胞を免疫標的化する方法は当分野で周知されている。米国特許第6,306,393号にはB細胞悪性腫瘍の免疫療法における抗CD22抗体の使用が記載されており、米国特許第6,329,503号には、蛇行性膜貫通抗原を発現する細胞の免疫標的化が記載されている(両米国特許ともその全体を本明細書において参考として援用する)。

【0103】

抗体が癌細胞によって発現されたKIRHy1に結合し、癌細胞および腫瘍の破壊を媒介するおよび/または癌細胞および腫瘍の成長を阻害するように、(ヒト化抗体またはヒ

50

トモノクローナル抗体、あるいはそのフラグメント、あるいは他のその変性物、任意選択で細胞傷害剤に結合されたものも含め) K I R H y 1 抗体を患者に導入することができる。このような抗体が治療効果を発揮する機序には、補体媒介細胞溶解、抗体依存性細胞傷害 (A D C C)、K I R H y 1 の生理学的機能の変性、結合または信号伝送経路の阻害、腫瘍細胞の分化の変性、腫瘍血管形成誘導因子プロファイルの改変、免疫刺激性または腫瘍抑制サイトカインおよび成長因子の分泌の変性、細胞接着の変性、および/またはアポトーシスの誘導が含まれるが、これらに限定されるものではない。放射性リガンドまたは細胞基質性毒素等の毒素剤または治療薬と結合した K I R H y 1 抗体も、治療として、K I R H y 1 を保持する腫瘍細胞に毒素剤または治療薬を直接送達するのに使用できる。

【0104】

K I R H y 1 抗体は、器官移植を受ける患者または関節炎等の自己免疫疾患の患者において免疫系を抑制するのに使用できる。健常な免疫細胞は、これらの抗体の標的となり、死ぬまたは系から駆逐されて、免疫系が抑制される。

【0105】

K I R H y 1 抗体は、この作用を発現する固形腫瘍の抗体療法として使用できる。K I R H y 1 抗体を用いる癌の免疫療法は、K I R H y 1 を特異的に発現する細胞が関係する癌を治療する新しい方法を提供する。上記のように、A M L および組織球性リンパ腫の細胞系においては K I R H y 1 が高度に発現されていることは、K I R H y 1 を治療用抗体の標的あるいはいくつかの細胞種または障害 (例えば A M L) の診断用マーカーとして使用できることを示す。他の種類の癌に対する抗体を用いる免疫療法は既に報告されており、これには結腸癌 (A r l e n e t a l . , C r i t . R e v . I m m u n o l . 1 8 : 1 3 3 - 1 3 8 (1 9 9 8))、多発性骨髄腫 (O z a k i e t a l . , B l o o d 9 0 : 3 1 7 9 - 3 1 8 6 (1 9 9 7) ; T s u n e n a r i e t a l . , B l o o d 9 0 : 2 4 3 7 - 2 4 4 4 (1 9 9 7))、胃癌 (K a s p r z y k e t a l . , C a n c e r R e s . 5 2 : 2 7 7 1 - 2 7 7 6 (1 9 9 2))、B細胞リンパ腫 (F u n a k o s h i e t a l . , J . I m m u n o t h e r . E m p h a s i s i T u m o r I m m u n o l . 1 9 : 9 3 - 1 0 1 (1 9 9 6))、白血病 (Z h o n g e t a l . , L e u k . R e s . 2 0 : 5 8 1 - 5 8 9 (1 9 9 6))、結腸直腸癌 (M o u n e t a l . , C a n c e r R e s . 5 4 : 6 1 6 0 - 6 1 6 6 (1 9 9 4) ; V e l d e r s e t a l . , C a n c e r R e s . 5 5 : 4 3 9 8 - 4 4 0 3 (1 9 9 5))、および乳癌 (S h e p a r d e t a l . , J . C l i n . I m m u n o l . 1 1 : 1 1 7 - 1 2 7 (1 9 9 1)) が含まれるが、これらに限定されるものではない。上記リファレンスはすべてその全体を本明細書において参考として援用する。

【0106】

K I R H y 1 抗体療法は既存癌の全期で有用であるが、特に進行した癌および転移性癌に対して好適である。抗体療法と化学療法、放射線療法、または外科的療法との組合せは、化学療法での治療を受けていない患者の場合に好ましく、一方、抗体療法による治療が1種またはそれ以上の化学療法を受けてきた患者に示される。さらに、抗体療法との併用により、化学療法の用量、特に化学療法剤の毒性に対して許容度が非常に低い患者の用量を減らすことができる。また、化学療法剤に対して抵抗性の腫瘍を有する癌患者の K I R H y 1 抗体による治療は、組み合わせて使用する化学療法剤に対する感度および応答性をもたらす。

【0107】

抗 K I R H y 1 免疫標的化に先立って、患者は、好ましくは腫瘍組織の免疫組織化学的アセスメント、定量的 K I R H y 1 画像処理、定量的 R T - P C R、または他の K I R H y 1 発現の有無および発現のレベルを示すことのできる他の信頼できる方法を用いた、癌細胞による K I R H y 1 発現の有無および発現のレベルの評価を受けることができる。例えば、血液または生検のサンプルを免疫組織化学的方法で評価して、K I R H y 1 発現細

10

20

30

40

50

胞の有無を測定するまたはサンプル内の細胞の表面上のK I R H y 1発現の程度を測定することができる。腫瘍組織または血清中に放出されたK I R H y 1のフラグメントを免疫組織化学的に分析する方法は当分野で周知されている。

【0108】

癌の治療に有用な抗K I R H y 1抗体には、腫瘍に対して強い免疫応答を引き起こせる抗K I R H y 1抗体、および直接細胞を傷害できる抗K I R H y 1抗体が含まれる。これに関して、抗K I R H y 1モノクローナル抗体は、補体介在性機序またはA D C C機序のいずれかで腫瘍細胞の溶解を誘発することができるが、両機序には、エフェクター細胞F cレセプター部位または補体タンパク質と相互作用するための免疫グロブリン分子の完全なF c部分が必要である。さらに、腫瘍の成長に直接生物学的影響を及ぼす抗K I R H y 1抗体は、本発明の実施において有用である。このような直接細胞傷害性抗体が機能する可能性のある機序には、細胞成長の阻害、細胞分化の変性、腫瘍の血管形成誘導因子のプロファイルの変性、およびアポトーシスの誘導が含まれる。特定の抗K I R H y 1抗体が抗腫瘍効果を及ぼす機序は、当分野で公知のように、A D C C、A D M M C、補体介在性細胞溶解、その他を決定する設計された任意の数のインビボアッセイを用いて評価することができる。

10

【0109】

特定の抗K I R H y 1抗体または抗K I R H y 1抗体の組み合わせの抗腫瘍活性は、好適な動物モデルを用いてインビボで評価することができる。例えば、ヒトA M L細胞が、ヌードマウスまたはS C I Dマウス等の免疫欠陥動物に導入された、異種間A M L癌モデルが挙げられる。有効性は、腫瘍形成の阻害、腫瘍の退行、または転移、その他を測定するアッセイを用いて予測できる。

20

【0110】

マウスまたは他の非ヒトモノクローナル抗体、ヒト/マウスキメラm A b sの使用により、幾人かの患者に中程度の免疫応答から強い免疫応答が引き起こされる可能性があるため注意されたい。最も重度な場合、免疫応答が免疫複合体の広範囲な形成につながり、腎不全を起こす可能性がある。したがって、本発明の治療方法の実施において使用するモノクローナル抗体は、完全にヒトのモノクローナル抗体または完全にヒト化されたモノクローナル抗体であって、高い親和性をもって標的のK I R H y 1抗原に結合するが患者に抗原性を示さないまたは示しても低いものである。

30

【0111】

本発明の方法では、抗K I R H y 1モノクローナル抗体(m A b s)単独および組合せ、または異なるm A b sの「反応混液」の投与が想定されている。K I R H y 1に結合する、2種またはそれ以上のモノクローナル抗体は、単独抗体に比べて、改善された効果を示す。あるいは、抗K I R H y 1抗体と異なる抗原に結合する抗体との組合せは、単独抗体に比べて、改善された効果を示す。このようなm A b 反応混液は、異なるエフェクター機序を用いるm A b sまたは直接細胞傷害性m A b sと免疫エフェクターの機能に依存するm A b sとの組合せを含む場合と同様に、いくつかの利点を有する。このような組合せm A b sは相乗的な治療効果を示すことができる。さらに、投与する抗K I R H y 1m A b sに、さまざまな化学療法剤、抗原ブロック剤、および免疫変性剤(例えば、I L - 2、G M - C S F)を含む他の治療剤を組み合わせることができるが、これらに限定されるものではない。抗K I R H y 1m A b sは、「裸」すなわち非結合状態で投与することができる、または治療剤と結合することができる。さらに、二特異的抗体も使用できる。このような抗体は、K I R H y 1に特異的な抗原結合ドメイン一つと他の抗原(例えば、C D 20等)に特異的な抗原結合ドメイン一つを有する。最終的には、F a b K I R H y 1抗体またはそれら抗体のフラグメント(他のタンパク質配列または毒素に結合したフラグメントも含む)も治療剤として使用できる。

40

【0112】

K I R H y 1と特異的に結合する抗体は、K I R H y 1を発現する細胞の免疫標的化ならびに細胞がK I R H y 1発現による障害を受ける疾病または障害の診断のための組成物

50

および方法において有用である。このような抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、単鎖抗体、キメラ抗体、二機能/二特異性抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、ならびにKIRHy1を特異的に認識する相補性決定領域(CDR)および/または抗原結合配列を有する化合物を含む、相補性決定領域(CDR)移植抗体が含まれる。Fab、Fab'、F(ab')₂、およびF_vを含め、抗原のフラグメントも有用である。

【0113】

用語の「特異的」は、抗体の可変領域がKIRHy1を排他的に認識し結合する(すなわち、ポリペプチドのファミリー内にみられる配列の同一性、同族性、または類似性に関わらず、他の類似したポリペプチドからKIRHy1を識別できる)が、抗体の可変領域以外の配列、特に分子の安定領域間の相互作用によって他のタンパク質(例えば、ELISA法における*S. aureus* protein A または他の抗体)との相互作用が可能であることを示す。抗KIRHy1抗体の結合特異性を評価できる、抗体におけるスクリーニングアッセイは、当分野で周知されており、日常的に実施されている(その全体を本明細書において参考として援用する、Chapter 6, *Antibodies A Laboratory Manual*, Eds. Harlow, et al., Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor, NY (1988))。

10

【0114】

KIRHy1ポリペプチドを動物の免疫化に使用して、KIRHy1と特異的に反応するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を得ることができる。このような抗体は、免疫原としてタンパク質の全体またはそのフラグメントを使用して得ることができる。ペプチド免疫原はさらにカルボキシル末端にシステイン残基を含むことができ、スカシ貝由来のヘモシアニン(KLH)のような部分抗原に結合していても良い。このようなペプチドを合成する方法は既に報告されている(両方の全体を本明細書において参考として援用する、Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963); Krstenansky, et al., F EBS Lett. 211: 10 (1987))。所望の抗体を産生できる融合細胞とともにポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を調製する方法も既に開示されている(これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、Campbell, *Monoclonal Antibodies technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1984); St. Groth, et al., J. Immunol. 35: 1-21 (1990); Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497 (1975)、trioma技術、ヒトB細胞融合細胞技術についてはKozbor, et al., Immunology Today 4: 72 (1983); Cole, et al., in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985))。

20

30

40

【0115】

抗体を産生できる任意の動物をKIRHy1ペプチドまたはポリペプチドで免疫化できる。免疫化の方法には、ポリペプチドの皮下注射および腹腔内注射が含まれる。免疫化に使用するKIRHy1ペプチドまたはポリペプチドの量は、免疫化する動物、ペプチドの抗原性、および注射する部位による。免疫原として使用するKIRHy1ペプチドまたはポリペプチドは、タンパク質の抗原性を増大させるために、補助剤とともに変性または投与することができる。タンパク質の抗原性を増大させる方法は当分野で周知されており、抗原の異種タンパク質(グロブリンまたは - ガラクトシダーゼ等)との結合または免疫化の際の補助剤の封入が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0116】

50

モノクローナル抗体に関しては、免疫化された動物から脾臓細胞が取り出され、S P 2 / O - A g 1 4 骨髓腫細胞等の骨髓腫細胞と融合され、モノクローナル抗体を産生する融合細胞となる。当分野で周知されている多くの方法のいずれか一つを、所望の特性を有する抗体を産生する融合細胞の同定に使用できる。これらの方法には、E L I S A アッセイによる融合細胞のスクリーニング、ウェスタンブロット分析法、または放射線免疫アッセイ（その全体を本明細書において参考として援用する、L u t z , e t a l . , E x p . C e l l R e s . 1 7 5 : 1 0 9 - 1 2 4 (1 9 8 8) ）が含まれる。所望の抗体を分泌する融合細胞はクローン化され、当分野で公知の方法を用いてクラスおよびサブクラスが決定される（その全体を本明細書において参考として援用する、C a m p b e l l , A . M . M o n o c l o n a l A n t i b o d y T e c h n o l o g y : L a b o r a t o r y T e c h n i q u e s i n B i o c h e m i s t r y a n d M o l e c u l a r B i o l o g y , E l s e v i e r S c i e n c e P u b l i s h e r s , A m s t e r d a m , T h e N e t h e r l a n d (1 9 8 4) ）。単鎖抗体の産生のために記述された技術（その全体を本明細書において参考として援用する、米国特許第 4 , 9 4 6 , 7 7 8 号）は、K I R H y 1 単鎖抗体の産生に適用できる。

10

【 0 1 1 7 】

ポリクローナル抗体に関しては、免疫化された動物から抗血清が取り出され、上記の手段の一つを用いて、所望の特異性を有する抗体がスクリーニングされる。

【 0 1 1 8 】

20

げっ歯類由来の抗体はヒトに投与した場合その抗体に対する強い免疫応答を誘発しやすいため、その種の抗体の本発明の治療方法における有効性は限定されている。投与された抗体に対する強い免疫応答を引き起こさない抗体の産生方法は当分野で周知されている。例えば、抗 K I R H y 1 抗体は非ヒト霊長類抗体であってよい。このような抗体をヒト内で調製する方法が P C T 出願国際公開第 9 1 / 1 1 4 6 5 号および L o s m a n e t a l . , I n t . J . C a n c e r 4 6 : 3 1 0 - 3 1 4 (1 9 9 0) に開示されており、その全体を本明細書において参考として援用する。一つの実施形態において、抗 K I R H y 1 抗体はヒト化されたモノクローナル抗体である。ヒト化された抗体を産生する方法は既に報告されている。（これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、米国特許第 5 , 9 9 7 , 8 6 7 号および第 5 , 9 8 5 , 2 7 9 号、J o n e s e t a l . , N a t u r e 3 2 1 : 5 2 2 (1 9 8 6) ; R i e c h m a n n e t a l . , N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 (1 9 8 8) ; V e r h o e y e n e t a l . , S c i e n c e 2 3 9 : 1 5 3 4 - 1 5 3 6 (1 9 8 8) ; C a r t e r e t a l . , P r o c . N a t ' l A c a d . S c i . U S A 8 9 : 4 2 8 5 - 4 2 8 9 (1 9 9 2) ; S a n d h u , C r i t . R e v . B i o t e c h . 1 2 : 4 3 7 - 4 6 5 (1 9 9 2) ; および S i n g e r , e t a l . , J . I m m u n . 1 5 0 : 2 8 4 4 - 2 8 5 7 (1 9 9 3) ）。他の実施形態において、抗 K I R H y 1 抗体はヒトモノクローナル抗体である。ヒト化された抗体は、ヒト抗体を産生するように形質転換されたトランスジェニックマウスによって産生される。そのようなマウス由来の融合細胞は、多量のヒトモノクローナル抗体を分泌する。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得る方法は、G r e e n , e t a l . , N a t u r e G e n e t . 7 : 1 3 - 2 1 (1 9 9 4) ; L o n b e r g , e t a l . , N a t u r e 3 6 8 : 8 5 6 (1 9 9 4) ; および T a y l o r , e t a l . , I n t . I m m u n . 6 : 5 7 9 (1 9 9 4) に記載されており、これらすべての全体を本明細書において参考として援用する。

30

40

【 0 1 1 9 】

本発明には抗 K I R H y 1 抗体フラグメントの使用も含まれる。抗体のフラグメントは、抗体のタンパク質加水分解または E . c o l i i におけるフラグメントをコードする D N A の発現によって調整することができる。抗体のフラグメントは、抗体全体をペプシン

50

またはパパインが消化することによって得られる。例えば、抗体のフラグメントは、ペプシンを用いて抗体を酵素的に開裂し、 $F(ab')_2$ と名づけられる5Sフラグメントとすることにより調製できる。このフラグメントは、チオール還元剤を用いてさらに開裂することができ、任意選択でジスルフィド結合の開裂により生じるスルフヒドリル基をブロックして3.5SFab'一価フラグメントとすることができる。あるいは、ペプシンを用いる酵素的開裂により、2つの一価FabフラグメントとFcフラグメントを直接調製できる。これらの方法は既に記載されている(これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、米国特許第4,036,945号および第4,331,647号、Nisonoff, et al., Arch Biochem. Biophys. 89: 230 (1960); Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959); Edelman, et al., Meth. Enzymol. 1: 422 (1967))。長い鎖を分離して一価の短鎖フラグメントを形成する、フラグメントをさらに開裂する、化学的方法または遺伝子的方法を用いる等の、抗体を開裂する他の方法も、完全な抗体によって認識される抗原にフラグメントが結合する限り、使用できる。例えば、 V_H 鎖と V_L 鎖の会合を含む F_V フラグメントは非共有結合性である可能性がある(その全体を本明細書において参考として援用する、Inbar et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69: 2659 (1972))。あるいは、可変鎖は、グルタルアルデヒド等の化学品による分子内ジスルフィド結合または架橋によって結合することができる。

10

20

30

40

50

【0120】

一つの実施形態において、 F_V フラグメントは、リンカーで結合された V_H 鎖と V_L 鎖を含む。タンパク質(sF_V)に結合したこれらの短鎖抗原は、オリゴヌクレオチドで連結された V_H ドメインと V_L ドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。構造遺伝子は発現ベクターに挿入され、次いでE. coli等の宿主細胞に導入される。組み換えられた宿主細胞は、リンカーペプチドによって2つのVドメインを橋架けするポリペプチド単鎖を合成する。 sF_V を調製する方法は既に記載されている(これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、米国特許第4,946,778号、Whitlow, et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 97 (1991); Bird, et al., Science 242: 423 (1988); Pack, et al., Bio/Technology 11: 1271 (1993))。

【0121】

別の形式の抗体フラグメントは、単一の相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドである。CDRペプチド(「最小認識単位」)は、問題の抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得られる。このような遺伝子は、例えば、抗体産生細胞のRNAからの可変領域を合成するポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって調製される(これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、Larrick, et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106 (1991); Courtenay-Luc k, pp. 166-179 in, Monoclonal Antibodies Production, Engineering and Clinical Applications, Eds. Ritter et al., Cambridge University Press (1995); Ward, et al., pp. 137-185 in, Monoclonal Antibodies Principles and Applications, Eds. Birch et al., Wiley-Liss, Inc. (1995))。

【0122】

本発明はさらに、上記の抗体を検知可能なようにラベルされた形で提供する。放射性同位元素、親和性ラベル(ビオチン、アビジン等)、酵素的ラベル(ホースラディッシュペ

ルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ等)、蛍光ラベル(FITCまたはローダミン等)、常磁性原子、その他を用いて抗体を検知可能なようにラベルすることができる。このようなラベリングを実施する方法は既に開示されている(これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、Sternberger, et al., J. Histochem. Cytochem. 18: 315 (1970); Bayer, et al., Meth. Enzym. 62: 308 (1979); Engval, et al., Immunol. 109: 129 (1972); Goding, J. Immunol. Meth. 13: 215 (1976))。

【0123】

ラベルされた抗体は、KIRHy1が発現された細胞または組織を同定するためのインビトロ、インビボ、およびインサイチュアッセイに使用できる。さらに、ラベルされた抗体は、血液、尿、唾液サンプル等の生物学的サンプル内に分泌されたKIRHy1の有無を確認するのに使用できる。

【0124】

(5.5.1 抗KIRHy1抗体抱合体)

本発明は、「裸の」抗KIRHy1抗体の使用のみならず免疫抱合体の使用も想定している。免疫抱合体は、細胞傷害剤等の治療薬を抗体構成要素に間接的に抱合することによって調製することができる。細胞毒性成分には、例えば、アブリン、リシン、モデシン、ビスクミン、アメリカヤマゴボウ抗ウイルス性タンパク質、サポリン、ゲロニン、モモリジン、トリコサンチン、大麦毒素等の植物性毒素; Diphtheria毒素、Pseudomonas菌体内毒素および菌体外毒素、Staphylococcal腸管毒等の細菌性毒素; -サルシン、レストリコトシン等の真菌毒; 細胞外臓臓リボヌクレアーゼ等の細胞傷害性リボヌクレアーゼ; デオキシリボヌクレアーゼI(その全体を本明細書において参考として援用する、Pastan, et al., Cell 47: 641 (1986); Goldenberg, Cancer Journal for Clinicians 44: 43 (1994))、カリーチアマイシン、ならびに³²P、⁶⁷Cu、⁷⁷As、¹⁰⁵Rh、¹⁰⁹Pd、¹¹¹Ag、¹²¹Sn、¹³¹I、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁹⁴Ir、¹⁹⁹Au等の放射性同位元素(その全体を本明細書において参考として援用する、Illidge and Brock, Curr. Pharm. Design 6: 1399 (2000))が含まれる。ヒトにおいて、B細胞リンパ腫用の抗CD20抗体に抱合されたイットリウム-90を用いた臨床試験が進行中である(その全体を本明細書において参考として援用する、Cancer Chemother Pharmacol 48 (Suppl 1): S91-S95 (2001))。

【0125】

一般的な技術が既に記載されている(これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、米国特許第6,306,393号および第5,057,313号、Shih, et al., Int. J. Cancer 41: 832-839 (1988); Shih, et al., Int. J. Cancer 46: 1101-1106 (1990))。一般的な方法には、酸化された糖質部分を有する抗体成分と、フリーなアミノ基を少なくとも一つ有し複数の薬剤、毒素、キレート剤、ホウ素追加物、または他の治療剤が付加されたキャリア高分子との反応が含まれる。この反応によってまずシッフ塩基(イミン)結合ができ、第二級アミンに還元されて安定化し、最終的に抱合体を形成する。

【0126】

キャリア高分子は好ましくはアミノデキストランまたは少なくとも50アミノ酸残基のポリペプチドであるが、他の実質的に等価な高分子キャリアも使用できる。治療で使用する際に投与を容易にし標的化を効率的にするため、最終的な免疫抱合体は、哺乳類の血清のような水性溶液に可溶であることが好ましい。したがって、キャリア高分子上に可溶化

10

20

30

40

50

基があれば、最終的な免疫抱合体の血清への溶解が促進される。具体的には、アミノデキストランが好ましい。

【0127】

通常、アミノデキストランキャリアから免疫抱合体を調製するプロセスは、デキストランポリマー、好適には平均分子量が約10,000~100,000のデキストランポリマーの調製から始まる。デキストランは酸化剤と反応し、制御化で糖質環部が酸化されてアルデヒド基になる。酸化は、従来からのやり方にしたがって、 NaIO_4 等の解糖剤を用いておこなうのが簡便である。酸化されたデキストランは次いでポリアミン、好ましくはジアミン、より好ましくはモノヒドロキシジアミンまたはポリヒドロキシジアミンと反応する。好適なアミンには、エチレンジアミン、プロピレンジアミン、または類似のポリメチレンジアミン、ジエチレントリアミンまたは類似のポリアミン、1,3-ジアミノ-2-ヒドロキシプロパン、あるいは他の類似のヒドロキシ化ジアミンまたはポリアミン、その他が含まれる。アルデヒド基を確実にシッフ塩基に変換するために、デキストランのアルデヒド基に対して過剰なアミンを使用する。得られるシッフ塩中間体を安定的に還元するために、 NaBH_4 、 NaBH_3CN 等の還元剤を使用する。得られた付加物は、従来からの分粒カラムまたは限外濾過膜を通して架橋したデキストランを除去して精製することができる。デキストランにアミノ基を導入するよう誘導する従来からの方法、例えば、臭化シアンと反応させ次いでアミンと反応させる方法も使用できる。

10

【0128】

次に、アミノデキストランは、活性化型の、好ましくは従来からの手段、例えばジシクロカルボジイミド(DCC)またはその水溶性変異体を用いて調製されたカルボキシ-活性型誘導体の形の負荷される、特定の薬剤、毒素、キレート剤、免疫調節剤、ホウ素追加物、または他の治療剤の誘導体と反応し、中間体付加物を形成する。別法で、アメリカヤマゴボウ抗ウイルス性タンパク質またはリジンA鎖等のポリペプチド毒素は、グルタルアルデヒド縮合すなわちタンパク質の活性化されたカルボキシル基とアミノデキストランのアミノ基との反応により、アミノデキストランに結合できる。

20

【0129】

放射性金属または磁気共鳴増強剤用のキレート剤は当分野で周知されている。代表的なキレート剤は、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)の誘導体およびジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)の誘導体である。一般にこれらのキレート剤は、側鎖上にキャリアと結合するための基を有している。そのような基には、例えば、それによりDTPAまたはEDTAがキャリアのアミノ基と結合できるベンジルイソチオシアネート基が含まれる。あるいは、キレート剤上のカルボキシル基またはアミノ基は、すべて周知されている手段による、活性化または事前誘導とそれに続く結合により、キャリアに結合できる。

30

【0130】

カルボラン等のホウ素追加物は、従来からの方法によって抗体成分に結合することができる。例えば、当分野で周知されているように、カルボランは側鎖上にカルボキシル基を有するように調製できる。このようなカルボランとキャリア、例えばアミノデキストランとの結合は、カルボランのカルボキシル基の活性化ならびにキャリア上のアミノ基との縮合により達成され、中間抱合体が生成される。このような中間抱合体は次いで抗体成分と結合され、以下に記載するように、薬理学的に有用な免疫抱合体となる。

40

【0131】

ポリペプチドキャリアをアミノデキストランの代わりに使用できるが、ポリペプチドキャリアは少なくとも50アミノ酸残基、好ましくは100~5000アミノ酸残基の鎖を有しなければならない。少なくともアミノ酸のいくつかはリジン残基またはグルタミン酸残基またはアスパラギン酸残基でなければならない。リジン残基の懸垂アミノ基ならびにグルタミン酸およびアスパラギン酸の懸垂カルボキシル基は、薬剤、毒素、キレート剤、免疫調節剤、ホウ素追加物、または他の治療剤との結合に有利である。好適なポリペプチドキャリアの例には、所望の溶解特性を得られる負荷されたキャリアおよび免疫抱合体に

50

付与する、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、これらの共重合体、ならびにこれらのアミノ酸および他のアミノ酸、例えばセリンの重合体の混合物が含まれる。

【0132】

中間抱合体と抗体成分との抱合は、抗体成分の糖質部分の酸化および生成するアルデヒド（ならびにケトン）のカルボニル基と、薬剤、毒素、キレート剤、免疫調節剤、ホウ素追加物、または他の治療剤の負荷後にキャリア上に残存しているアミノ基との間で反応させることによって実施される。あるいは、中間抱合体は、治療剤の負荷後に中間抱合体に導入されたアミノ基を介して酸化された抗体成分に結合できる。酸化は、例えば NaIO_4 または他の解糖剤を用いて化学的にあるいは例えばノイラミニダーゼおよびガラクトースオキシダーゼを用いて酵素的のいずれかでおこなうのが簡便である。アミノデキストランキャリアの場合、通常、アミノデキストランのアミノ基は必ずしもすべてが治療剤の負荷に使われない。残存するアミノデキストランのアミノ基は酸化された抗体成分と縮合してシッフ塩基付加物を形成し、次いでシッフ塩基付加物は、通常は水素化ホウ素還元剤により還元的に安定化される。

10

【0133】

本発明による他の免疫抱合体の調製には同様な方法が用いられる。負荷後のポリペプチドキャリアに抗体成分の酸化された糖質部分と縮合するためのフリーなリジン残基が残存していることが好ましい。ポリペプチドキャリア上のカルボキシル基は、必要な場合、例えば DCC による活性化と過剰のジアミンとの反応によってアミノ基に変換できる。

20

【0134】

最終的に免疫抱合体は、Sephacryl S-300 上の分粒クロマトグラフィーあるいは一つまたはそれ以上の KIRHy1 抗原部位を使用するアフィニティクロマトグラフィー等の従来からある技術を用いて精製される。

【0135】

別法で、免疫抱合体は、抗体成分を治療剤と直接抱合することによって調製できる。その一般的な手順は、治療剤が酸化された抗体成分に直接結合する点を除けば、間接的抱合方法に類似したものである。他の治療剤も本明細書に記載するキレート剤で置換できることがわかるはずである。当分野の技術者なら、過度に実験することなく抱合手順を決められるはずである。

30

【0136】

追加説明として、治療剤は、ジスルフィド結合形成によって、還元された抗体成分のヒンジ領域に結合できる。例えば、破傷風菌毒素ペプチドは、ペプチドを抗体成分に結合するのに使用されるシステイン残基一つを有するように構築できる。別法として、このようなペプチドを、N-スクシニル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸エステル (SPDP) (その全体を本明細書において参考として援用する、Yu, et al., Int. J. Cancer 56: 244 (1994)) 等のヘテロ二機能性架橋剤を用いて抗体成分に結合することができる。このような抱合の一般的な技術は既に記載されている (これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press (1991); Upeslakis, et al., pp. 187-230 in, Monoclonal Antibodies Principles and Applications, Eds. Birch et al., Wiley-Liss, Inc. (1995); Price, pp. 60-84 in, Monoclonal Antibodies Production, Engineering and Clinical Applications, Eds. Ritter et al., Cambridge University Press (1995))。

40

【0137】

上記のように、抗体の Fc 領域の糖質部は治療剤を抱合するのに使用できる。ただし、

50

免疫抱合体の抗体成分として抗体フラグメントが使用される場合、Fc領域がない可能性がある。しかし、糖質部を抗体または抗体フラグメントの軽鎖可変領域に導入することができる（両方の全体を本明細書において参考として援用する、Leung, et al., J. Immunol. 154: 5919-5926 (1995); 米国特許第5,443,953号）。導入された糖質部は治療剤との結合に使用される。

【0138】

さらに、当分野の技術者なら、抱合方法をさまざまに改変できることがわかるはずである。例えば、完全な抗体または抗体の抗原結合フラグメントの血液、リンパ液、または他の細胞外液における半減期を伸ばすために、糖質部を用いてポリエチレングリコールに結合することができる。さらに、治療剤を糖質部およびフリーのスルフヒドリル基に結合して「二価の免疫抱合体」を構築することが可能である。このようなフリーのスルフヒドリル基を抗体成分のヒンジ領域内に配置できる。

10

【0139】

(5.5.2 抗KIRHy1抗体融合タンパク質)

抗体に抱合される治療剤がタンパク質である場合、本発明は、1種またはそれ以上の抗KIRHy1抗体部と免疫調節剤または毒素部を含む融合タンパク質の使用を想定している。抗体融合タンパク質の調製方法は既に記載されている（その全体を本明細書において参考として援用する、米国特許第6,306,393号）。インターロイキン-2成分を含む抗体融合タンパク質も既に開示されている（これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、Boleti, et al., Ann. Oncol. 6: 945 (1995); Nicolet, et al., Cancer Gene Ther. 2: 161 (1995); Becker, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 93: 7826 (1996); Hank, et al., Clin. Cancer Res. 2: 1951 (1996); Hu, et al., Cancer Res. 56: 4998 (1996)）。さらに、その全体を本明細書において参考として援用する、Yang, et al., Hum. Antibodies Hybridomas 6: 129 (1995)には、F(ab')₂フラグメントおよび腫瘍壊死因子の成分を含む融合タンパク質が記載されている。

20

【0140】

1種またはそれ以上の抗体成分および毒素または化学療法剤を含む組換え分子をその中に有する抗体-毒素融合タンパク質を調製する方法も当分野で公知である。例えば、抗体-Pseudomonas菌体外毒素A融合タンパク質が記載されている（これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、Chaudhary, et al., Nature 339: 394 (1989); Brinkmann, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 88: 8616 (1991); Batra, et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89: 5867 (1992); Friedman, et al., J. Immunol. 150: 3054 (1993); Wells, et al., Int. J. Can. 60: 137 (1995); Fominaya, et al., J. Biol. Chem. 271: 10560 (1996); Kuan, et al., Biochemistry 35: 2872 (1996); Schimdt, et al., Int. J. Can. 65: 538 (1996)）。ジフテリア毒素成分を含む抗体-毒素融合タンパク質が記載されている（これらすべての全体を本明細書において参考として援用する、Kreitman, et al., Leukemia 7: 553 (1993); Nicholls, et al., J. Biol. Chem. 268: 5302 (1993); Thompson, et al., J. Biol. Chem. 270: 28037 (1995); およびVallera, et al., Blood 88: 2342 (1996)）。Deonaraian他(

30

40

50

Tumor Targeting 1: 177 (1995)) は、リボヌクレアーゼ成分を有する抗体 - 毒素融合タンパク質を記載しており、一方、Linardou他 (Cell Biophys. 24-25: 243 (1994)) は、デオキシヌクレアーゼ I 成分を含む抗体 - 毒素融合タンパク質を調製した。上記の文献はいずれもその全体を本明細書において参考として援用する。ゲロニンおよび Staphylococcal 腸管毒 - A は毒素成分として抗体 - 毒素融合タンパク質に使われている (両方ともその全体を本明細書において参考として援用する、Wang, et al., Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., Apr. 2-6, 1995, Part 1, BIOT005; Dohlsten, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91: 8945 (1994))。 10

【0141】

(5.5.3 Fabフラグメントおよび単鎖 KIRHy1 抗体)

本発明にしたがって、KIRHy1 に特異的な単鎖抗体の産生に技術を適合させることができる (例えば、米国特許第 4,946,778 号参照)。さらに、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、類似体または同族体に対して所望の特異性を有するモノクローナル Fab フラグメントの高速かつ効率的な同定を可能にする Fab 発現ライブラリー (例えば、Huse, et al., Science 246: 1275-1281 (1989) 参照) の構築に技術を適合させることができる。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントは、(i) 抗体分子のペプシン消化による Fab (ab')₂ フラグメントの調製; (ii) Fab (ab')₂ フラグメントのジスルフィド架橋の還元による Fab フラグメントの調製; (iii) 抗体分子のパパインおよび還元剤での処理による Fab フラグメントの調製; および (iv) Fv フラグメントを含め、当分野で公知の技術によって調製できるが、これらに限定されるものではない。 20

【0142】

(5.5.4 二特異的 KIRHy1 抗体)

二特異的抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に結合特異性を有する、モノクローナルな、好ましくはヒトのまたはヒト化された、抗体である。この場合、結合特異性の一つは本発明の抗原性タンパク質用である。二つ目の結合標的性は他の抗原のいずれか用であり、好適には細胞表面のタンパク質またはレセプターまたはレセプター下部単位である。 30

【0143】

二特異的抗体を調製する方法は当分野で公知である。伝統的に、二特異的抗体の組換え産生は、二つの免疫グロブリン重鎖 / 軽鎖対であって二つの重鎖が異なる特異性を有するものの共発現に基づいている (Milstein and Cuelllo, Nature, 305: 537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の組合せがランダムであるため、これらの融合細胞 (quadroma) は 10 種類の異なる抗体分子の混合物を産生する可能性があり、その内 1 種類だけが正しい二特異性構造である。正しい分子の精製は、通常、アフィニティクロマトグラフィーでおこなわれる。同様な手順が、国際公開第 93/08829 号 (公開 1993 年 5 月 13 日) および Trautnecker et al., 1991 EMBO J., 10, 3655-3659 に開示されている。 40

【0144】

所望の結合特異性 (抗体 - 抗原結合部位) を有する抗体の可変領域を、免疫グロブリン安定領域と融合させることができる。この融合は、好ましくは、少なくとも一部のヒンジ領域、CH2 領域、および CH3 領域を含む、免疫グロブリン重鎖安定領域でおこなわれる。少なくとも融合体の一つ内に存在する軽鎖の結合に必要な部位を含む、第一の重鎖安定領域 (CH1) を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖を、所望する場合は免疫グロブリン軽鎖も、コードする DNA は別々の発現ベクター内に挿入され、好適な宿主器官に共に導入される。二特異的抗体産生の詳細については、例えば Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (19 50

86)を参照されたい。

【0145】

国際公開第96/27011号に記載されている別の方法にしたがって、抗体分子対間の界面を、組換え細胞培養液から回収されるヘテロダイマーの割合が最大になるように、改変することができる。好ましい界面には、抗体の安定領域のCH3領域の少なくとも一部が含まれる。この方法において、第一の抗体分子の界面からの一つまたはそれ以上の小アミノ酸側鎖はより大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）によってと置換される。大きなアミノ酸側鎖が小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）に置き換えられて、第二の抗体分子の界面上に大きな側鎖と同一または類似した大きさの代償性「空洞」が形成される。これが、ホモダイマー等の所望しない最終生成物をしのでヘテロダイマーの収率が増大する機序である。 10

【0146】

二特異的抗体は抗体全長または抗体フラグメント（例えば、 $F(ab')_2$ 二特異的抗体）として調製することができる。抗体フラグメントから二特異的抗体を調製する技術は文献に記載されている。例えば、二特異的抗体は化学結合を用いて調製できる。Brennan et al., Science 229: 81 (1985)には、完全な抗体をタンパク質分解酵素で開裂して $F(ab')_2$ フラグメントを生成する方法が記載されている。これらのフラグメントは、隣接したジチオールを安定させ分子間ジスルフィド形成を防止するジチオール錯化剤であるヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。生成される Fab' フラグメントは次いでチオニトロ安息香酸(TNB)誘導体に変換される。 20
 $Fab' - TNB$ 誘導体の一つは、メルカプトエチルアミンで還元され、 $Fab' -$ チオールに変換され、当モルの他の $Fab' - TNB$ 誘導体と混合されて二特異的抗体を形成する。生成された二特異的抗体は酵素の選択的免疫化剤として使用できる。

【0147】

さらに、 Fab' フラグメントは、E. coli から直接回収することができ、化学的に結合されて二特異的抗体を形成する。Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)には、完全にヒト化された二特異的抗体 $F(ab')_2$ 分子の生成が記載されている。各 Fab' フラグメントは別々にE. coli から分泌され、インビトロ直接化学結合の対象となり、二特異的抗体を形成する。こうして形成された二特異的抗体は、Erbb2レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞と結合でき、その上ヒト乳腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性のトリガーとなることができる。 30

【0148】

組換え細胞培養液で二特異的抗体フラグメントを生成させ、直接単離するさまざまな技術も記載されている。例えば、ロイシンジッパーを用いて二特異的抗体が産生されている(Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992))。Fosタンパク質およびJunタンパク質からのロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって、二つの異なる抗体の Fab' 部に結合された。抗体のホモダイマーは、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、次いで再酸化されて抗体ヘテロダイマーを形成した。この方法は、抗体ホモダイマーの生成にも使用できる。 40
Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)に記載されている「二重特異性抗体」技術は二特異的抗体フラグメントを調製する別の機序を提供している。このフラグメントは、短すぎて同一鎖上の二つのドメインを対合させないリンカーによって軽鎖可変領域(V_L)と結合した重鎖可変領域(V_H)を有している。したがって、一つのフラグメントの V_H 領域と V_L 領域は別のフラグメントの相補的 V_L 領域および V_H 領域と対合せざるを得ず、これにより二つの抗原結合部位が形成される。単鎖 $F_v(sf_v)$ ダイマーを用いて二特異的抗体フラグメントを調製する別の方法も報告されている。Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994)を参照されたい。

【0149】

2以上の抗体結合価を有する抗体が想定される。例えば、三特異的抗体を調製できる (Tutt et al., J. Immunol., 147: 60 (1991))。

【0150】

典型的な二特異的抗体は二つの異なる抗原部位に結合でき、その少なくとも一つは本発明のタンパク質抗原に由来する。あるいは、細胞の防御機序を特定の抗原を発現する細胞に集中させるために、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、T細胞レセプター分子 (例えば、CD2、CD3、CD28、またはB7)等の白血球上のトリガー分子、あるいはFcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)用のFcレセプターと結合するアームと結合できる。二特異的抗体は、特定の抗原を発現する細胞に対する直接細胞傷害剤にも使用できる。これらの抗体は、抗原結合性アームおよび細胞傷害剤またはEOTUBE、DPTA、DOTA、またはTEETA等の放射性核種キレート剤と結合するアームを有している。別の二特異的抗体は、本明細書に記載するタンパク質抗原に結合し、さらに組織因子(TF)に結合する。

10

【0151】

(5.5.5 ヘテロ抱合KIRHy1抗体)

ヘテロ抱合抗体も本発明の範囲に含まれる。ヘテロ抱合抗体は、二つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を所望しない細胞に標的させる (米国特許第4,676,980号)、あるいはHIV感染を治療する (国際公開第91/00360号; 国際公開第92/200373号; 欧州特許第03089号)とされている。これらの抗体は架橋剤を用いるものも含め合成タンパク質化学の公知の方法を用いてインビトロで調製できると想定される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いてまたはチオエーテル結合を形成することによって構築できる。構築のための好適な試薬の例には、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデートならびに例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。

20

【0152】

(5.5.6 エフェクター機能工学)

例えば、癌治療における抗体の有効性を増強するために、本発明の抗体をエフェクター機能で改変することが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入でき、それによりこの領域で鎖間ジスルフィド結合を形成できる。このようにして生成されたホモダイマー性抗体は、改善された取り込み能力および/または増強された補体介在性細胞殺傷性と抗体依存性細胞傷害性(ADCC)を有することができる。Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992)およびShopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)を参照されたい。増強された抗腫瘍活性を有するホモダイマー性抗体は、Wolff et al., Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993)に記載のように、ヘテロ二機能性架橋剤を用いて調製することもできる。あるいは、抗体を二つのFc領域を有するように改変し、それによって補体溶解性およびADCC能力を増強することができる。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)を参照されたい。

30

40

【0153】

(5.6 KIRHy1ポリペプチド)

本発明の単離されたポリペプチドには、配列番号3~7, 11のいずれか一つで示されるアミノ酸配列または配列番号1~2のヌクレオチド配列のいずれか一つでコードされるアミノ酸配列あるいは対応するタンパク質の全長または成熟タンパク質を含むポリペプチドが含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明のポリペプチドには、好ましくは生物学的活性または免疫学的活性を有し、(a)配列番号1~2で示されるヌクレオ

50

チド配列のいずれか一つを有するポリヌクレオチドまたは (b) 配列番号 3 ~ 7, 11 で示されるアミノ酸配列のいずれか一つをコードするポリヌクレオチドまたは (c) 厳密なハイブリッド形成条件下で (a) または (b) のいずれかのポリヌクレオチドの補体とハイブリッドを形成するポリヌクレオチド、によってコードされるポリペプチドも含まれる。本発明は、配列番号 3 ~ 7, 11 で示されるポリペプチドアミノ酸配列のいずれか、または対応し、「実質的な等価性」(例えば、少なくとも約 65%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、または 89%、より一般的には少なくとも約 90%、91%、92%、93%、または 94%、さらにより一般的には少なくとも約 95%、96%、97%、98%、または 99%、最も一般的には少なくとも約 99% のアミノ酸同一性) を有し生物学的活性を保持するタンパク質の全長または成熟タンパク質、の生物学的にまたは免疫学的に活性な変異体も提供する。対立遺伝子変異体によってコードされるポリペプチドは、配列番号 3 ~ 7, 11 を有するポリペプチドに比べ、同一な、増大した、または低下した活性を有することができる。

10

【0154】

生物学的活性を示すことのできる、本発明のタンパク質のフラグメントも、本発明に含まれる。タンパク質のフラグメントは、直鎖状であってよく、公知の方法、例えば、H. U. Saragovi, et al., Bio/Technology 10: 773-778 (1992) および R. S. McDowell, et al., J. Amer. Chem. Soc. 114: 9245-9253 (1992) に記載の方法で環状化することもできる。両文献はその全体を本明細書において参考として援用する。このようなフラグメントは、タンパク質結合部位の結合価の増大を含め、多くの目的のために免疫グロブリンのようなキャリア分子に融合することができる。

20

【0155】

本発明は、開示するタンパク質の全長型と(例えば、信号配列または前駆体配列を欠く)成熟型の両方も提供する。タンパク質コード配列は、開示するポリヌクレオチド配列の翻訳により列挙した配列と同一である。このようなタンパク質の成熟型は、全長型ポリヌクレオチドの好適な哺乳類細胞またはまたは他の宿主細胞における発現によって入手できる。タンパク質の成熟型の配列も、全長型のアミノ酸配列から決定できる。本発明のタンパク質が細胞膜に結合する場合には、タンパク質の可溶型も提供される。可溶型においては、タンパク質を細胞膜に結合する領域の一部または全部が除去されており、タンパク質は発現された細胞からすべて分泌される。

30

【0156】

本発明のタンパク質組成物はさらに、親水性のキャリア、例えば薬剤学的に許容されるキャリア等の許容されるキャリアを含むことができる。

【0157】

本発明はさらに、本発明の核酸フラグメントまたは本発明の核酸フラグメントの縮重変異体によってコードされた、単離されたポリペプチドを提供する。「縮重変異体」は、本発明の核酸フラグメント(例えば、ORF)とは核酸配列が異なるが、遺伝子コードの縮重により、同一のポリペプチド配列をコードする核酸フラグメントを意味する。本発明の好ましい核酸フラグメントは、タンパク質をコードする ORFs である。

40

【0158】

本発明の単離されたポリペプチドまたはタンパク質のいずれか一つを入手するには、当分野で公知のさまざまな技術を使用することができる。最も単純なレベルにおいては、市販のペプチド合成機を用いてアミノ酸配列を合成できる。一次、二次、または三次構造および/または立体配座特性がタンパク質と同じに合成的に構築されたタンパク質配列は、タンパク質活性を含め、同じ生物学的特性を有することができる。この技術は、小さなペプチドおよび大きなポリペプチドのフラグメントの調製において特に有用である。フラグメントは、例えば、天然のポリペプチドに対する抗体の生成において、有用である。この

50

ように、治療用化合物のスクリーニングおよび抗体開発のための免疫学的プロセスにおいて、天然の、精製されたタンパク質の生物学的に活性な代用品または免疫学的代用品として、フラグメントを使用できる。

【0159】

本発明のポリペプチドおよびタンパク質は別法で、所望のポリペプチドまたはタンパク質を発現するように改変された細胞から精製することができる。本明細書で用いるように、遺伝子的操作によって細胞が通常は産生しないまたは産生しても低レベルのポリペプチドまたはタンパク質を産生するようにされた時、細胞は所望のポリペプチドまたはタンパク質を発現するように改変されたといわれる。当分野の技術者なら、本発明のポリペプチドまたはタンパク質の一つを産生する細胞を生成するために、原核性細胞または真核性細胞に組換え配列または合成配列を導入し発現させるための手順を容易に適応させることができる。

10

【0160】

本発明は、本発明の宿主細胞を好適な培養培地内で生育させ、細胞または細胞が成育した培養液から得たタンパク質を精製することを含む、ポリペプチドを生成するための方法にも関する。例えば、本発明の方法には、本発明のポリヌクレオチドを有する好適な発現ベクターを含む宿主細胞が、コードされたポリペプチドの発現を可能にする条件下で、培養される、ポリペプチドを生成するためのプロセスが含まれる。ポリペプチドは、培養液から、簡便には培養培地から、あるいは宿主細胞から調製された溶解液を精製して、回収できる。好ましい実施形態には、このようなプロセスで生成されたタンパク質が全長型または成熟型のタンパク質である実施形態が含まれる。

20

【0161】

別の方法において、ポリペプチドまたはタンパク質は、天然にポリペプチドまたはタンパク質を産生する細菌性細胞から精製される。当分野の技術者なら、本発明の単離されたポリペプチドまたはタンパク質の一つを得るために、既知の方法にしたがって容易にポリペプチドおよびタンパク質を単離することができる。単離方法には、免疫クロマトグラフィー、HPLC、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、および免疫アフィニティクロマトグラフィーが含まれるが、これらに限定されるものではない。例えば、Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag (1994); Sambrook, et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biologyを参照されたい。生物学的/免疫学的活性を保持しているポリペプチドフラグメントには、およそ100を超えるアミノ酸、またはおよそ200を超えるアミノ酸を含むフラグメント、ならびに特定のタンパク質ドメインをコードするフラグメントが含まれる。

30

【0162】

精製されたポリペプチドは、当分野で周知されている、ポリペプチドに結合する分子を同定するためのインビトロ結合アッセイで使うことができる。ポリペプチドに結合する分子には、例えば、低分子、組合せライブラリーの分子、抗体、または他のタンパク質が含まれるが、これらに限定されるものではない。結合アッセイで同定された分子に対して、次いで、当分野で周知されている、インビボ組織培養液内または動物モデル内の拮抗剤試験または拮抗剤活性度試験がおこなわれる。簡単には、分子は複数の細胞培養液または動物に滴定され、細胞/動物が死滅するかまたは動物細胞/細胞の寿命が延びるか試験される。

40

【0163】

さらに、本発明のペプチドまたはペプチドに結合できる分子を、毒素、例えばリジンまたはコレラ毒素、あるいは細胞に対し毒性の他の化合物と複合化することができる。毒素結合分子複合体を、配列番号3~7, 11に対する分子結合特異性によって、腫瘍または他の細胞に対して標的化することができる。

50

【0164】

本発明のタンパク質を、形質転換動物の産物、例えば、体細胞または生殖細胞が本発明のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、形質転換されたウシ、ヤギ、ブタ、またはヒツジのミルクの成分として、発現させることもできる。

【0165】

本明細書によって提供されるタンパク質には、そのアミノ酸配列は精製されたタンパク質のものと同一であるがその中に天然の改変または人工的改変が含まれていることを特徴とするタンパク質も含まれる。例えば、ペプチドまたはDNA配列における改変は、当分野の技術者が公知の技術を用いて実施できる。問題のタンパク質配列における改変には、コード配列内の選択されたアミノ酸残基の改変、置換、置き換え、挿入、または除去が含まれる。例えば、一つまたはそれ以上のシステイン残基を除去または他のアミノ酸で置き換えて、分子の立体構造を改変することができる。このような改変、置換、置き換え、挿入、または除去の技術は、当分野の技術者に周知されている（例えば、米国特許第4,518,584号参照）。このような改変、置換、置き換え、挿入、または除去の後にもタンパク質の所望の活性が保持されることが好ましい。タンパク質の機能にとって重要なタンパク質の領域は、当分野で公知なさまざまな方法で決定することができ、これには、1個または一続きのアミノ酸をアラニンで組織的に置き換え、得られた含アラニン変異体の生物学的活性を試験するアラニンスキャニング法も含まれる。この種の分析で、置き換えられたアミノ酸の生物学的活性における重要度が決定される。タンパク質の機能にとって重要なタンパク質の領域は、eMATRIXプログラムを用いて決定できる。

10

20

【0166】

全体または一部がタンパク質の活性を保持しかつスクリーニングその他の免疫学的手法に有用と考えられるタンパク質の配列の他のフラグメントおよび誘導体も、本明細書の開示があれば当分野の技術者は容易に調製できる。このような改変物も本発明に含まれる。

【0167】

タンパク質は、本発明の単離されたポリヌクレオチドを一つまたはそれ以上の昆虫の発現ベクターに操作可能に結合し、昆虫の発現系を使用することによっても生成することができる。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系の材料および方法は、例えば、Invitrogen, San Diego, Calif., U. S. A. (the MaxBacTM kit) からキットに形で購入でき、（その全体を本明細書において参考として援用する）Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) に記載のように、このような方法は当分野で周知されている。本明細書で使用するように、本発明のポリヌクレオチドを発現することのできる昆虫の細胞は「形質転換される」。

30

【0168】

本発明のタンパク質は、組換えタンパク質の発現に好適な培養条件下で、形質転換された宿主細胞を培養することによって生成できる。得られる発現されたタンパク質は次いで、ゲル濾過およびイオン交換クロマトグラフィー等の公知の精製方法を用いて培養液から（すなわち培養培地または細胞抽出物から）精製される。タンパク質の精製には、タンパク質に結合する試薬を含むアフィニティカラム；コンカナバリンA - アガロース、ヘパリン - toyopearl（商標）、またはCibacrom blue 3GA Sepharose（商標）等の親和性樹脂上の1段またはそれ以上のカラム段；フェニルエーテル、ブチルエーテル、またはプロピルエーテル等の樹脂を使用する、疎水性相互作用クロマトグラフィーを含む1段またはそれ以上のカラム段；または免疫親和性クロマトグラフィーも含まれる。

40

【0169】

あるいは、本発明のタンパク質は、精製が容易になる形で発現されてもよい。例えば、本発明のタンパク質は、麦芽糖結合タンパク質（MPB）、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ（GST）、またはチオレドキシン（TRX）等の融合タンパク質として、あ

50

るいはHisタグとして発現されることができる。このような融合タンパク質の発現および精製のためのキットは、それぞれNew England Biolab (Beverly, Mass.)、Pharmacia (Piscataway, N. J.)、およびInvitrogenから購入できる。タンパク質は、抗原部位をタグし、つづいてこのような抗原部位に向かう特異的な抗体を用いて精製することができる。このような抗原部位の一つ(「FLAG(登録商標)」)は、Kodak (New Haven, Conn.)から購入できる。

【0170】

最終的に、例えば、懸垂メチル基または他の懸垂脂肪族基を有するシリカゲルを媒体とする1段またはそれ以上の逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)を用いてタンパク質をさらに精製することができる。現行の精製手段のいくつかまたはすべてをさまざまな組合せで用いて、実質的に均質な単離組換えタンパク質を得ることができる。このように精製されたタンパク質には、実質的に他の哺乳類タンパク質が含まれておらず、本発明にしたがって「単離されたタンパク質」と定義される。

10

【0171】

本発明のポリペプチドには、類似体(変異体)が含まれる。本発明のポリペプチドには、KIRHy1類似体が含まれる。KIRHy1類似体には、KIRHy1のフラグメント、ならびに一つまたはそれ以上のアミノ酸が除去、挿入、または置換されたKIRHy1ポリペプチドが含まれる。また、KIRHy1の類似体には、KIRHy1ポリペプチドまたは類似体が他の単数または複数の成分、例えば標的化成分または別の治療剤と融合された、KIRHy1ポリペプチドの融合体またはKIRHy1ポリペプチドの変性体も含まれる。このような類似体は、活性および/または安定性等の改善された特性を示す。KIRHy1ポリペプチドまたは類似体と融合される成分の例には、例えば、ポリペプチドを造血細胞または癌細胞に送達する標的化成分が含まれる。

20

【0172】

(5.6.1 KIRHy1の造血調節活性)

KIRHy1は、造血の調節に関与することができ、したがって骨髓性細胞傷害またはリンパ性細胞傷害の治療に関与することができる。コロニー形成細胞または因子依存性細胞系を助ける周縁の生物学的活性は造血調節への関与を示す。例えば、赤芽球前駆細胞単独または他のサイトカインとの組合せの成長および増殖を助けることは、例えば赤芽球前駆細胞および/または赤芽球細胞の産生を刺激するための、さまざまな貧血の治療または放射線/化学療法との組合せにおいて有用である。顆粒球および単球/マクロファージ(すなわち、従来からのCSF活性)等の骨髓性細胞の成長および増殖を助けることは、例えば骨髓機能抑制を予防または治療するための化学療法との組合せにおいて有用である。後に血小板となる巨核細胞の成長および増殖を助けることは、血小板減少症等のさまざまな血小板障害の予防および治療を可能にし、一般に血小板輸血の代わりまたは補助となる。成熟して上記の造血細胞のいずれかまたはすべてとなる造血幹細胞の成長および増殖を助けることにより、(これらに限定されるものではない、再生不良性貧血および発作性夜間ヘモグロビン尿症を含む、通常は移植によって治療される)さまざまな幹細胞障害において、さらに放射線照射/化学療法後の、インビボまたはエキソビボで(すなわち、骨髓移植と同時に)あるいは正常な細胞または遺伝子治療のために改変された細胞としての(同種または異種の)末梢性前駆細胞の移植における幹細胞区画の再増殖において薬理学的有用性を見出すことができる。

30

40

【0173】

本発明の治療用組成物は以下に使用できる。：上に列挙したさまざまな造血系の増殖および分化の好適なアッセイ。

【0174】

(とりわけ、造血の胚性分化に影響するタンパク質の同定をおこなう)胚性幹細胞分化アッセイには、Johansson et al., Cell. Biol. 15: 141-151 (1995); Keller et al., Mol. and

50

Cell. Biol. 13: 473 - 486 (1993); McClanahan et al., Blood 81: 2903 - 2915 (1993)に記載のものが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0175】

(とりわけ、リンパ造血を調節するタンパク質の同定をおこなう)幹細胞の生存率と分化のアッセイには、メチルセルロースでのコロニー形成アッセイ、Freshney, M. G. in Culture of Hematopoietic Cells, R. I. Freshney, et al., eds. Vol pp. 265 - 268, Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. 1994; Hirayama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5907 - 5911, 1992; 高い増殖能力を有する原始造血コロニー形成細胞、McNiece, I. K. and Bridgell, R. A. In Culture of Hematopoietic Cells, R. I. Freshney, et al., eds. Vol pp. 23 - 39, Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. 1994; Neben et al., Exp. Hematol. 22: 353 - 359, 1994; 玉石状領域形成細胞アッセイ、Ploemacher, R. E. In Culture of Hematopoietic Cells, R. I. Freshney, et al., eds. Vol pp. 1 - 21, Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. 1994; 基質細胞存在下での長期間骨髓培養、Sponcer, E., Dexter, M. and Allen, T. In Culture of Hematopoietic Cells, R. I. Freshney, et al., eds. Vol pp. 163 - 179, Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. 1994; 長期間培養開始細胞アッセイ、Sutherland, H. I. in Culture of Hematopoietic Cells, R. I. Freshney, et al., eds. Vol pp. 139 - 162, Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. 1994; が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0176】

(5.6.2 KIRHy1の免疫刺激活性および免疫抑制活性)

KIRHy1は、そのアッセイを本明細書に記載するものを含め、免疫刺激活性および免疫抑制活性を示すことができるが、そのアッセイを本明細書に記載するものには限定されない。本発明のポリヌクレオチドは、そのような活性を示すポリペプチドをコードできる。このようなタンパク質は、(重症複合免疫不全症(SCID)を含め)さまざまな免疫不全症および免疫障害の治療に、例えばTリンパ球/Bリンパ球の成長および増殖の(上方および下方)制御、ならびにNK細胞および他の細胞集団の細胞溶解活性有効化において、有用である。これらの免疫不全症は、遺伝子性またはウイルス性(例えばHIV)さらには細菌または真菌感染によるものであってよく、自己免疫障害によるものであってもよい。具体的には、ウイルス、細菌、真菌、または他の感染による感染症が本発明のタンパク質を治療可能であり、これらの感染症には、HIV、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、マイコバクテリウム属、リーシュマニア属、マラリア属の感染症、およびカンジダ症等のさまざまな真菌感染症が含まれる。当然のことながら、これに関し、一般に免疫系への追加が必要な場合、すなわち癌の治療においても、本発明のタンパク質は有用である。

【0177】

本発明のタンパク質を用いて治療できる自己免疫障害には、例えば、結合組織病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、リウマチ様関節炎、自己免疫性肺炎症、ギラン-バレー症候群、自己免疫性甲状腺炎、インスリン依存性真性糖尿病、重症筋無力症、移植片対宿主病、および自己免疫性炎症性眼疾患が含まれる。本発明のタンパク質(またはその

抗体を含む拮抗物質)が治療において有用なものには、アレルギー反応および症状(例えば、過敏症、血清病、薬剤反応、食物アレルギー、昆虫毒液アレルギー、肥満細胞過剰増殖、アレルギー性鼻炎、過敏症肺炎、多形滲出性紅斑症、スティーヴンズ-ジョンソン症候群、アレルギー性結膜炎、アトピー性角結膜炎、性病性角結膜炎、巨大乳頭状結膜炎、および接触アレルギー)、喘息(特にアレルギー性喘息)、または他の呼吸性障害も含まれる。(例えば器官移植を含め)免疫の抑制が望ましい他の症状も本発明のタンパク質(その拮抗物質を含め)を用いて治療できる。本発明のポリペプチドまたはその拮抗物質の治療効果は、累積接触増強試験(Lastbom et al., Toxicology 125: 59-66, 1998)、皮膚針試験(Hoffmann et al., Allergy 54: 446-54, 1999)、モルモット皮膚感作試験(Vohr et al., Arch. Toxocol. 73: 501-9)、およびマウス局所リンパ節アッセイ(Kmber et al., J. Toxicol. Environ. Health 53: 563-79)等のインビボ動物モデル試験によって評価することができる。

10

20

30

40

50

【0178】

本発明のタンパク質を用いて、さまざまな方法で免疫応答を改変することも可能である。下方制御は、既に進行中の免疫応答を阻害またはブロックすることすなわち免疫応答の誘発の阻害に関与することである。活性化されたT細胞の機能は、T細胞応答を抑制することまたはT細胞に特異的寛容度を導入することまたはその両方によって阻害できる。一般にT細胞応答の免疫抑制は、T細胞の連続的な抑制剤への暴露を必要とする、能動的な、非抗原特異的プロセスである。T細胞の非応答化またはアネルギー化を含む、寛容度は、寛容度が一般に抗原特異的であり、寛容化剤への暴露が終了しても持続する点で、免疫抑制とは区別される。実用的には、寛容化剤の非存在下で特異的抗原に再暴露してもT細胞の応答がみられないことで、寛容度がわかる。

【0179】

下方制御すなわち一つまたはそれ以上の抗原機能の阻害(Bリンパ球の抗原機能(例えばB7等)を限定せずに)、例えば活性化されたT細胞による高レベルのリンホカイン合成の阻害は、組織、皮膚、および器官の移植ならびに移植片対宿主病(GVHD)において有用である。例えば、T細胞機能のブロックは組織移植における組織破壊の低下につながる。一般に組織移植において、移植拒絶反応は、T細胞が移植片を外來のものと認識することから始まり、移植片を破壊する免疫反応がこれに続く。本発明の治療用組成物の投与により、T細胞等の免疫細胞によるサイトカイン合成が阻害され、本発明の治療用組成物は免疫抑制剤として働くことができる。さらに、共刺激が欠如するため、T細胞がアネルギー化され、対象に寛容度が導入される。Bリンパ球抗原ブロック剤による長期間寛容度の導入によって、ブロック剤を繰り返し投与する必要がなくなる。対象内に十分な免疫抑制または寛容度をもたらすには、Bリンパ球抗原の組合せの機能をブロックすることも必要である。

【0180】

器官移植拒絶反応またはGVHDの阻止における特定の治療用組成物の有効性は、ヒトにおける有効性を予測できる動物モデルを用いて評価することができる。使用可能な好適なシステムの例には、ラットにおける同種心臓移植およびマウスにおける異種間膵臓ランゲルハンス島細胞移植が含まれ、Lenschow et al., Science 257: 789-792 (1992)およびTurka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 11102-11105 (1992)に記載のように、両方ともCTLA4Ig融合タンパク質のインビボでの免疫抑制効果を試験するのに使われている。さらにGVHDにおけるマウスモデル(Paul et al., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-847参照)を、本発明の治療用組成物のGVHD進行に対する効果を測定するのに使用できる。

【0181】

抗原機能をブロックすることも自己免疫性疾患の治療に薬理学的に有用である。多くの自己免疫性疾患は、自己の組織に対して活性であり、自己免疫性疾患の病状に係るサイトカインおよび抗体の産生を促進する、T細胞が不適切に活性化された結果である。自己反応性T細胞の活性化を阻害することにより、この疾病の症状を軽減または完治することができる。T細胞の刺激をブロックする薬剤の投与により、T細胞の活性化を阻害し、この疾病の進行に係る自己抗体またはT細胞由来のサイトカインの産生を阻害することができる。また、ブロック剤は、自己反応性T細胞への抗原特異的寛容度の導入、およびこの疾病からの長期間の開放を可能にする。自己免疫性疾患の予防または緩和におけるブロック剤の有効性は、ヒト自己免疫性疾患用の多くの十分研究済みの動物モデルを用いて決定することができる。その例には、マウスにおける実験的自己免疫性脳炎、MRL / lpr / lprマウスまたはNZBハイブリッドマウスにおける全身性エリテマトーデス、マウスにおける自己免疫性コラーゲン関節炎、NODマウスおよびBBラットにおける真性糖尿病、マウスにおける実験的重症筋無力症が含まれる(Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 840 - 846 参照)。

10

【0182】

免疫応答を上方制御する手段としての、抗原機能(例えば、Bリンパ球抗原の機能)の上方制御も治療に有用である。免疫応答の上方制御とは、既存の免疫応答を促進するまたは最初の免疫応答を誘発することである。例えば、免疫応答の促進は、インフルエンザ、普通感冒、および脳炎等の全身性ウイルス性疾患を含む、ウイルス感染症の場合に有用である。

20

【0183】

あるいは、感染した患者における抗ウイルス免疫応答は、T細胞を患者から除去し、本発明のペプチドを発現するまたは本発明の可溶性ペプチドの刺激型も併せて発現する、ウイルス性抗原を打ち込まれたAPCsと共にインビトロでT細胞を共刺激し、インビトロで活性化されたT細胞を患者に再導入することによって、促進することができる。抗ウイルス免疫応答を促進する別の方法は、患者から感染した細胞を取り出し、本明細書に記載のように、本発明のタンパク質をコードする核酸で、感染した細胞を細胞がその表面上に本発明のタンパク質の全体または一部を発現するように形質転換し、形質転換された細胞を患者に再導入することである。感染した細胞は、インビボで共刺激信号をT細胞に送達しT細胞を活性化することができる。

30

【0184】

KIRHy1ポリペプチドは、必要な刺激信号をT細胞に提供し、形質転換された腫瘍細胞に対するT細胞介在免疫応答を誘発することができる。さらに、MHCクラスI分子またはMHCクラスII分子を欠く、あるいはMHCクラスI分子またはMHCクラスII分子の十分な量の再発現ができない腫瘍細胞を、MHCクラスIタンパク質またはMHCクラスIIタンパク質を細胞表面上に発現する、MHCクラスI鎖タンパク質およびMHCクラスII鎖タンパク質あるいはMHCクラスII鎖タンパク質およびMHCクラスII鎖タンパク質の全体または一部(例えば、細胞質ドメイン短小化部分)をコードする核酸で形質転換することができる。Bリンパ球抗原(例えば、B7-1、B7-2、B7-3)の活性を有するペプチドに結合した好適なクラスIまたはクラスIIのMHCが発現することによって、形質転換された腫瘍細胞に対するT細胞介在性免疫応答が誘発される。任意選択で、非変異体鎖等のタンパク質に結合したMHCクラスIIの発現をブロックするアンチセンス構造をコードする遺伝子を、腫瘍結合抗原の提示を促進するBリンパ球抗原の活性を有するペプチドをコードするDNAで形質転換し、腫瘍特異的免疫を誘発させることができる。このようにして、対象における腫瘍特異的寛容を克服するのに十分なT細胞介在性免疫応答が対象のヒトに誘発される。

40

【0185】

本発明のタンパク質の活性は、とりわけ以下の方法で測定できる。

【0186】

50

胸腺細胞または脾細胞に対する細胞毒性の好適なアッセイには、Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, インビトロ assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann et al., J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa et al., J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bowman et al., J. Virology 61:1992-1998; Bertagnoli et al., Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Brown et al., J. Immunol. 153:3079-3092, 1994. が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0187】

T細胞依存性免疫グロブリン応答およびイソタイプ切り替えの(とりわけ、T細胞依存性抗体応答を変性するタンパク質およびTh1/Th2プロファイルに影響するタンパク質を同定する)アッセイには、Maliszewski, J. Immunol. 144:3028-3033, 1990に記載のものが含まれるが、それらに限定されるものではなく、そしてB細胞機能のアッセイは、Maliszewski, J. Immunol. 144:3028-3033, 1990; and Assays for B cell function: インビトロ antibody production, Mond, J. J. and Brunswick, M. In Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan eds. Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994に記載されている。

【0188】

(とりわけ、主にTh1応答およびCTL応答を引き起こすタンパク質を同定する)混合リンパ球反応(MLR)アッセイには、Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, インビトロ assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnoli et al., J. Immunol. 149:3778-3783, 1992に記載のものが含まれるが、それらに限定されるものではない。

【0189】

(とりわけ、天然のT細胞を活性化する樹状細胞によって発現されるタンパク質を同定する)樹状細胞依存性アッセイには、Guery et al., J. Immunol. 134:536-544, 1995; Inaba et al., J. Ex

p. Med. 173:549-559, 1991; Macatonia et al., J. Immunol. 154:5071-5079, 1995; Porgado et al., J. Exp. Med. 182:255-260, 1995; Nair et al., J. Virology 67:4062-4069, 1993; Huang et al., Science 264:961-965, 1994; Macatonia et al., J. Exp. Med. 169:1255-1264, 1989; Bhardwaj et al., J. Clin. Invest. 94:797-807, 1994; and Inaba et al., J. Exp. Med. 172:631-640, 1990に記載のものが含まれるが、それらに限定されるものではない。

10

【0190】

(とりわけ、超抗原誘発後のアポトーシスを防止するタンパク質およびリンパ球のホメオスタシスを調節するタンパク質を同定する)リンパ球生存率/アポトーシスアッセイには、Darzynkiewicz et al., Cytometry 13:795-808, 1992; Gorczyca et al., Leukemia 7:659-670, 1993; Gorczyca et al., Cancer Res. 53:1945-1951, 1993; Itoh et al., Cell 66:233-243, 1991; Zacharchuk, J. Immunol. 145:4037-4045, 1990; Zamai et al., Cytometry 14:891-897, 1993; Gorczyca et al., Int. J. Oncology 1:639-648, 1992に記載のものが含まれるが、それらに限定されるものではない。

20

【0191】

T細胞介入および成長の初期段階に影響するタンパク質のアッセイには、Antica et al., Blood 84:111-117, 1994; Fine et al., Cellular Immunology 155:111-122, 1994; Galy et al., Blood 85:2770-2778, 1995; Told et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88:7548-7551, 1991に記載のものが含まれるが、それらに限定されるものではない。

30

【0192】

(5.6.3 KIRHy1の抗炎症活性)

本発明の組成物は抗炎症活性を示すこともできる。抗炎症活性は、炎症応答に関与する細胞に刺激を与えることによって、細胞-細胞相互作用(例えば、細胞の接着等)を阻害または促進することによって、炎症進行に関与する細胞の化学走性を阻害または促進することによって、細胞の管外遊出を阻害または促進することによって、より直接的に炎症応答を阻害または促進する他の要因の産生を刺激または抑制することによって、達成される。このような活性を有する組成物は、慢性症状または急性症状を含め、炎症の治療に使用でき、炎症には、感染が関係する内膜炎(敗血症性ショック、敗血症、または全身性炎症応答症候群(SIRS))、虚血性再灌流障害、菌体内毒素性致死、関節炎、補体介在性超急性拒絶反応、腎炎、サイトキノンまたはケモキノン誘発性肺損傷、炎症性腸疾患、クローン病、またはTNFまたはIL-1等の過剰産生による炎症が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明の組成物は、抗原性物質または材料に対する過敏症または超過敏症の治療においても有用である。本発明の組成物は、敗血症、急性膵臓炎、菌体内毒素性ショック、サイトカイン誘発性ショック、リウマチ様関節炎、慢性炎症性関節炎、mellitus type 1糖尿病による膵臓細胞の損傷、移植片対宿主病、炎症性腸疾患、呼吸器疾病に関与した炎症、他の自己免疫性疾患または炎症性疾患、急性または慢性的の骨髄性白血病あるいは子宮感染に続く早期分娩等用の抗増殖剤等の症状の予防または治療に使用できるが、症状はこれらに限定されるものではない。

40

【0193】

50

本発明の組成物のリウマチ様関節炎に対する免疫抑制効果は、実験的な動物モデル系において決定される。実験的な動物モデル系は、ラットに補助剤で誘発した関節炎であって、そのプロトコルは、J. Holoshitz, et al., 1983, Science, 219: 56またはB. Waksman et al., 1963, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 23: 129に記載されている。疾病の誘発は、完全なFreund's adjuvant (CFA)内の死んだ結核菌の懸濁液を、通常は皮内に単回注射しておこなった。注射の経路は変えることができるが、ラットの場合、尾の基部に補助混合物と共に注射した。ペプチドは、リン酸塩緩衝液(PBS)として、用量およそ1~5mg/kgで投与した。対照にはPBSのみの投与をおこなった。

10

【0194】

試験化合物の効果の試験は、CFA内の死んだ結核菌の皮内注射、直後の試験化合物の投与、24日目までの一日おきの投与からなる。結核菌CFA注射後の14、15、18、20、22、および24日目に、上記のJ. Holshitzの文献のように、総合的関節炎スコアを取った。関節炎スコアの減少が測定されたように、データの分析から、試験化合物が関節の膨張に画期的に影響することがわかった。

【0195】

(5.7 ペプチド)

細胞外領域のフラグメント等のKIRHy1ペプチドは、腫瘍細胞または疾病細胞上に発現された本発明の細胞表面上の抗体と結合または相互作用することによって、インビボでの腫瘍細胞に対する標的毒素または放射性同位元素に使用できる。抗体と同様に、これらのフラグメントはこの抗原を発現した細胞を特異的に標的とすることができる。これらの細胞傷害剤の腫瘍細胞への標的化送達によって、細胞が死滅するまたは腫瘍の成長が抑制されることになる。特異抗体性結合によって完全なレセプターに結合しレセプターを活性化する細胞外フラグメントの能力の例は、CD84レセプターについて示されている(その全体を本明細書で参考として援用する、Martin et al., J. Immunol., 167: 3668-3676 (2001))。

20

【0196】

KIRHy1の細胞外フラグメントは、本発明のタンパク質を発現する免疫細胞を変性することにも使用できる。KIRHy1の細胞外領域フラグメントは、細胞表面上のそれ用のレセプターと結合しレセプターを活性化することができ、それによってサイトカイン(例えば、NK細胞、T細胞、B細胞、または脊髄細胞からのインターフェロン等)の放出が刺激されて、免疫系が強化または抑制される。さらに、本発明のKIRHy1を有する細胞へのこれらのフラグメントの結合により、これらの細胞が活性化され、増殖が刺激される。いくつかのフラグメントは完全なKIRHy1に結合し、免疫細胞からの活性化信号およびサイトカイン放出をブロックすることができる。したがって、これらのフラグメントは免疫抑制効果を有する。免疫系を活性化し刺激するフラグメントは、抗腫瘍特性を有することができる。これらのフラグメントには、免疫学的応答を刺激し、免疫介在性腫瘍細胞殺傷が可能である。同じフラグメントは、免疫系を刺激して、ウイルスおよび細菌等の外来性進入物に対する応答を増強することができる。免疫応答を抑制するフラグメントは、リンパ組織増殖性障害、自己免疫疾患、移植片対宿主病、および気腫等の炎症性疾患の治療において有用である。

30

40

【0197】

(5.8 他の結合性ペプチドまたは低分子)

有機化合物またはペプチドのライブラリーを組み替えられて発現された本発明のKIRHy1タンパク質でスクリーニングすることは、特異的にKIRHy1に結合しさらにはKIRHy1の活性を阻害する機能を有する治療用分子を同定する上で有用である。合成産物および天然産物は、当分野の技術者が日常作業とみなすさまざまな方法でスクリーニングすることができる。ランダムなペプチドのライブラリーは、ファージに関して表示され(ファージディスプレイ)、またはE. coli等の細菌に関して表示される。これ

50

らのランダムなペプチドの表示ライブラリーを使って、リガンドまたはレセプター、天然のまたは合成の巨大分子、有機または無機物質等のタンパク質またはポリペプチドであってよい公知の標的と相互作用するペプチドを表示することができる。例えば、ランダムなペプチドまたは組合せペプチドあるいは非ペプチドのライブラリー等の相違点ライブラリーをスクリーニングして、KIRHy 1 ポリペプチドに特異的に結合する分子を求めることができる。多くの使用できるライブラリー、すなわち、化学的合成ライブラリー、組換え（すなわちファージディスプレイライブラリー）、およびインビトロ翻訳ライブラリー、が当分野で公知である。このようなランダムペプチドディスプレイライブラリーの構築技術およびスクリーニング技術は当分野で公知であり（これらすべての全体を本明細書で参考として援用する、Ladner et al., U.S. Patent No. 5,223,409; Ladner et al., U.S. Patent No. 4,946,778; Ladner et al., U.S. Patent No. 5,403,484; Ladner et al., U.S. Patent No. 5,571,698）、ランダムペプチドディスプレイライブラリーおよびこのようなライブラリーをスクリーニングするためのキットは、例えば、Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA), and Pharmacia KLB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ) から購入できる。本明細書に開示するKIRHy 1の配列を用いてランダムペプチドディスプレイライブラリーをスクリーニングして、KIRHy 1に結合するタンパク質を同定することができる。

10

20

30

40

50

【0198】

化学的合成ライブラリーの例には、これらすべての全体を本明細書で参考として援用する、Fodor et al., Science 251:767-773 (1991); Houghten et al., Nature 354:84-86 (1991); Lam et al., Nature 354:82-84 (1991); Medynski, Bio/Technology 12:709-710 (1994); Gallop et al., J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994); Ohlmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10922-10926 (1993); Erb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-11426 (1994); Houghten et al., Biotechniques 13:412 (1992); Jayawickreme et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1614-1618 (1994); Salmon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11708-11712 (1993); International Publication No. WO 93/20242; Brenner and Lemer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5381-5383 (1992)に記載のものが含まれる。

【0199】

ファージディスプレイライブラリーの例には、これらすべての全体を本明細書で参考として援用する、Scott and Smith, Science 249:386-390 (1990); Devlin et al., Science 249:404-406 (1990); Christian et al., J. Mol. Biol. 227:711-718 (1992); Lenstra, J. Immunol Meth. 152:149-157 (1992); Kay et al., Gene 128:59-65 (1993); International Publication No. WO 94/18318に記載のものが含まれる。

【0200】

インビトロ翻訳ライブラリーには、その両方の全体を本明細書で参考として援用する、International Publication No. WO 91/05058, and Mattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-9026 (1994)に記載のものが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0201】

非ペプチドライブラリーの例として、ベンゾジアゼピンライブラリー（その全体を本明細書で参考として援用する、Bunin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712 (1994)参照）を使って
10 適合させることができる。ペプチドライブラリー（その全体を本明細書で参考として援用する、Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367-9371 (1992)）も使用できる。ペプチド内のアミド基が完全にメチル化されて化学的形質転換組合せライブラリーを構築している他の使用可能なライブラリーの例は、（その全体を本明細書で参考として援用する、Ostresh et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11138-11142 (1994))に記載されている。

【0202】

ライブラリーのスクリーニングは、さまざまな公知の方法のいずれによっても可能である。例えば、ペプチドライブラリーのスクリーニングを開示している以下のこれらすべての全体を本明細書で参考として援用する Parmley and Smith, Adv.
20 Exp. Med. Biol. 251:215-218 (1989); Scott and Smith, Science 249:386-390 (1990); Fowlkes et al., Biotechniques 13:422-427 (1992); Oldenburg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5393-5397 (1992); Yuet al., Cell 76:933-945 (1994); Staudt et al., Science 241:577-580 (1988); Bock et al., Nature 355:564-566 (1992); Tuerk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:
30 6988-6992 (1992); Ellington et al., Nature 355:850-852 (1992); Rebar and Pabo, Science 263:671-673 (1993); and International Publication No. WO 94/18318を参照されたい。

【0203】

特定の実施形態において、ライブラリーの構成物質を固相に固定された KIRHy1 タンパク質（または核酸または誘導体）に接触させ、KIRHy1 タンパク質（または核酸または誘導体）に結合したライブラリーの構成物質を回収することによって、スクリーニングを実施することができる。「パンニング」技術と呼ばれるスクリーニング法の例は、
40 これらすべての全体を本明細書で参考として援用する、Parmley and Smith, Gene 73:305-318 (1988); Fowlkes et al., Biotechniques 13:422-427 (1992); International Publication No. WO 94/18318および本明細書の上記の引用文献に記載されている。

【0204】

他の実施形態において、酵母菌内で相互作用するタンパク質を選択するための二つをハイブリッドさせたシステム（その両方の全体を本明細書で参考として援用する、Fields and Song, Nature 340:245-246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
50

88 : 9578 - 9582 (1991)) を、K I R H y 1 または K I R H y 1 誘導体に特異的に結合する分子の同定に使用することができる。

【0205】

K I R H y 1 ポリペプチドと相互作用する、これらの「結合性ポリペプチド」または低分子は、細胞のタグ化または標的化；親和性精製による同族体ポリペプチドの単離に使用でき、ポリペプチドまたは低分子は、薬剤、毒素、放射性核種、その他に直接的または間接的に結合することができる。これらの結合性ポリペプチドまたは低分子は、発現ライブラリーならびにリガンドとレセプターとの間の相互作用をブロックするための中性化活性、またはレセプターへのウイルスの結合等の分析法にも私用できる。これらの結合性ポリペプチドまたは低分子は、本発明の K I R H y 1 ポリペプチドの回転レベルの決定；その元となる病状または疾病のマーカーとしての可溶性 K I R H y 1 ポリペプチドの検知または定量的ための診断アッセイにも使用できる。これらの結合性ポリペプチドまたは低分子は、インビトロ およびインビボ での K I R H y 1 結合および信号伝送をブロックする、K I R H y 1 「拮抗剤」としても働くことができる。これらの結合性ポリペプチドまたは低分子は、K I R H y 1 活性すなわちタンパク質結合の阻害に有用である。

10

【0206】

結合性ポリペプチドは薬剤、毒素、放射性核種、その他に直接的にまたは間接的に結合することができ、これらの結合体はインビボ診断または治療用途に使用できる。結合性ポリペプチドを他のポリペプチド、例えば免疫グロブリン定常鎖またはその一部と融合させて結合性ポリペプチドの半減期を伸ばすことが可能で、結合性ポリペプチドを（例えば、分岐または繰り返し単位によって）多価にして、K I R H y 1 に対する結合親和性を増大させることができる。例えば、本発明の結合性ポリペプチドは、対応する抗相補性分子（例えば、それぞれレセプターまたは抗体）を発現する組織または器官の同定または治療に使用できる。より具体的には、結合性ポリペプチドまたはその生物学的に活性なフラグメントまたは一部を、切り離し可能な分子または細胞傷害性分子と結合させて、抗相補性分子を発現する細胞、組織、または器官を有する動物に送達することができる。

20

【0207】

好適な検知可能な分子は、直接的にまたは間接的に結合性ポリペプチドと結合することができ、さらに、放射性核種、酵素、物質、共因子、阻害剤、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁性粒子、その他を含むことができる。好適な細胞傷害性分子は、直接的にまたは間接的に結合性ポリペプチドと結合することができ、さらに、細菌性毒素または植物性毒素（例えば、ジフテリア毒素、Pseudomonas 菌体外毒素、リシン、アブリン、その他）、さらには（例えば、結合性ポリペプチドに直接結合する、あるいはキレート剤部分を介して間接的に結合性ポリペプチドと結合する）ヨウ素 - 131、レニウム - 188、またはイットリウム - 90 等の治療用放射性核種を含むことができる。結合性ポリペプチドは、アドリマイシン等の細胞傷害性薬剤と結合することもできる。切り離し可能な分子または細胞傷害性分子を間接的に結合するため、切り離し可能な分子または細胞傷害性分子は相補性 / 抗相補性対の成分と結合することができ、この場合、他の成分は結合性ポリペプチドに結合する。この目的のための相補性 / 抗相補性対の例は、ビオチン / ストレプトアビジンである。

30

40

【0208】

他の実施形態において、結合性ポリペプチド - 毒素融合タンパク質は、（例えば、癌細胞または組織を治療するための）標的細胞または組織の阻害または切除に使用できる。あるいは、結合性ポリペプチドが多機能ドメイン（すなわち、標的化ドメインの他の活性化ドメインまたはリガンド結合ドメイン）を有している場合、検知可能な分子、細胞傷害性分子、または相補性分子に問題の細胞または組織を指示するには、標的化ドメインのみを含む融合タンパク質が好適である。融合タンパク質が相補性分子のドメインのみを含む場合、抗相補性分子を検知可能な分子または細胞傷害性分子に結合することができる。このようなドメイン - 相補性分子融合タンパク質は、遺伝子的抗相補性検出可能 / 細胞傷害性分子結合体の細胞 / 組織特異的送達のための遺伝子的標的化手段を提供する。

50

【0209】

(5.9 抗KIRHy1標的化に適した疾病)

一つの態様において、本発明は、細胞がAML等のKIRHy1を発現する疾病または障害に係る、疾病および病状の治療に有用な薬剤および方法を提供する。さらに、これらの疾病には癌、ならびに過形成、乾癬、接触性皮膚炎、免疫学的障害、創傷治癒、関節炎、および自己免疫性疾患等の過剰増殖性病状が含まれる。細胞がKIRHy1を発現する疾病または病状に係っているかどうかは、本明細書に記載する診断方法を用いて決定することができる。

【0210】

KIRHy1 mRNAおよびタンパク質の発現レベルを病気の細胞、組織、または体液（血液、リンパ液、その他）と対応する正常なサンプルとを比較することによって、患者が本発明のKIRHy1抗原を標的とする療法に応答するかどうか決定される。KIRHy1 mRNAまたはタンパク質の発現を検知し定量する方法には、当分野で周知されている標準的な核酸およびタンパク質の検知ならびに定量技術が用いられ、これらの技術は、その両方の全体を本明細書で参考として援用する、Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989) or Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY (1989)に記載されている。KIRHy1 mRNAを検知し定量する方法には、ラベル化KIRHy1リボプローブを用いるインサイチュハイブリッド形成（その全体を本明細書で参考として援用する、Gemou-Engesaeth, et al., Pediatrics 109: E24-E32 (2002)、KIRHy1ポリヌクレオチドプローブを使用するノーザンブロットおよび関連技術（その全体を本明細書で参考として援用する、Kunzli, et al., Cancer 94: 228 (2002)、KIRHy1特異的プライマーを用いるRT-PCR分析（その全体を本明細書で参考として援用する、Angchaiskisir, et al., Blood 99: 130 (2002)、ならびに分岐鎖DNA溶液ハイブリッド形成アッセイ（その全体を本明細書で参考として援用する、Jardi, et al., J Viral Hepat. 8: 465-471 (2001)、転写介在性増幅（その全体を本明細書で参考として援用する、Kimura, et al., J Clin. Microbiol. 40: 439-445 (2002)、オリゴ、cDNAs、およびモノクローナル抗体等のマイクロアレイ産物、リアルタイムPCR（その全体を本明細書で参考として援用する、Simpson, et al., Molec. Vision, 6: 178-183 (2000)等の他の増幅検知方法が含まれる。KIRHy1タンパク質を検知し定量する標準的な方法には、ウェスタンブロット分析（Sambrook, 1989 supra, Ausubel, 1989 supra）、免疫細胞化学（その全体を本明細書で参考として援用する、Racila, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4589-4594 (1998)、酵素結合免疫吸着剤アッセイ（ELISA）、放射線免疫アッセイ（RIA）、および特異的酵素免疫アッセイ（EIA）（Sambrook, 1989 supra, Ausubel, 1989 supra）を含めたさまざまな免疫アッセイが含まれる。例えば、KIRHy1に特異的な免疫磁性ビーズ（Racila, 1998 supra）またはビオチニル化KIRHy1抗体（その全体を本明細書で参考として援用する、Soltys, et al., J Immunol. 168: 1903 (2002)）を使用する流動細胞計測法を用いて、末梢性血液細胞のKIRHy1発現を分析することもできる。

【0211】

本発明の他の関連した態様は、腫瘍細胞におけるKIRHy1タンパク質またはmRNAのレベルを対応する正常な細胞のレベルと比較し、腫瘍の攻撃性を評価する方法（その

全体を本明細書で参考として援用する、Orlandi, et al., Cancer Res. 62:567 (2002)を対象としている。一つの実施形態において、疾病または障害は癌である。

【0212】

本発明の方法により治療可能な疾病は、好ましくは哺乳類に起こるものである。哺乳類には、例えば、ヒトおよび他の霊長類、さらにイヌまたはネコ等のペットまたは愛玩動物、ラット、マウス、およびリス等の実験用動物、ウマ、ブタ、ヒツジ、およびウシ等の畜産動物が含まれる。

【0213】

腫瘍または新生物には、細胞の増殖が制御不能で進行性である、組織細胞の成長が含まれる。このような成長の内のいくつかは良性であるが、他は「悪性」と呼ばれ、生物体の死につながる可能性がある。悪性新生物すなわち癌は、攻撃的な細胞増殖を示す以外に周囲の組織を侵襲し転移できる点で良性成長とは区別される。さらに、悪性新生物は、それ自体同士および周囲の組織に比べて、分化の大幅な喪失（大幅な「脱分化」）および組織性の喪失を示す点で特徴付けられる。この特性は「退生」とも呼ばれる。

【0214】

本発明によって治療可能な新生物には、固形腫瘍/悪性すなわち癌腫、局所的に拡大した腫瘍、およびヒト軟組織の肉腫が含まれる。癌腫には、周囲の組織に浸透し（侵襲し）、リンパ性転移を含め転移性癌に変る上皮細胞由来の悪性新生物が含まれる。腺癌は、腺様組織すなわち腺様構造と認められ構成する組織由来の癌腫である。別の幅広いカテゴリーすなわち癌には、その細胞が胚結合組織様繊維状物質または均質物質に埋め込まれた腫瘍である、肉腫が含まれる。本発明は、一般的に腫瘍の塊としては存在せず、脈管系またはリンパ細網系に分散している、白血病、リンパ腫および他の癌を含め、骨髄系またはリンパ組織系の癌の治療も可能である。

【0215】

本発明による治療に適した癌または腫瘍の種類にはAMLが含まれる。KIRHy1標的化によって効果のある他の種類の癌には、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚T細胞リンパ腫、毛様細胞性白血病、赤白血病、慢性骨髄性（顆粒球）白血病、ホジキン病、および非ホジキンリンパ腫、食道癌、胃癌、結腸癌、結腸直腸癌、結腸直腸性新生物に関係するポリープ、膵臓癌および胆嚢癌、副腎皮質癌、ACTH産生型腫瘍、膀胱癌を含む胃腸の癌、脳内在性癌、神経芽腫、星状膠細胞性脳腫瘍、神経膠腫、転移性腫瘍細胞の中樞神経系への侵襲を含む脳の癌、転移性腫瘍細胞の中樞神経系侵襲、ユーイング腫瘍、口腔癌および咽頭癌を含む頭頸部癌、腎細胞癌を含む腎臓癌、肝臓癌、小細胞肺癌および非小細胞肺癌を含む肺癌、悪性悪性腹水、悪性腹膜水、悪性黒色腫、ヒト皮膚角化細胞の腫瘍化、上皮細胞癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌を含む皮膚癌、および血管周囲細胞腫、中皮腫、カボジ肉腫、繊維肉腫および骨肉腫等の骨腫および肉腫を含む骨癌、子宮癌、子宮内膜癌、卵巣癌、卵巣（胚細胞）癌、卵胞における固形腫瘍、陰癌、外陰部癌、子宮頸癌を含む女性生殖器官の癌、（小細胞および管の）乳癌、陰茎癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、精巣癌、甲状腺癌、栄養膜癌、およびウィルムス腫が含まれる。

【0216】

本発明は本明細書においてある種の実験的に規定された癌の治療を参照しながら具体的に説明される。これらの説明のための治療においては、標準的な現状のインビトロおよびインビボモデルが使用される。これらの方法を使用して、インビボ治療において有効と思われる薬剤を同定できる。しかし、本発明の方法はこれらの腫瘍種の治療に限定されるものではなく、いかなる生物系由来のいかなる癌にも及ぶことを理解すべきである。実施例に示すように、KIRHy1は、AMLおよび組織球性リンパ腫等の造血細胞関連障害において高度に発現される。白血病は、当初は骨髄内の無秩序なB細胞増殖に由来し、次いで末梢性血液、脾臓、リンパ節に散在し、最終的には他の組織に散在する。無秩序なB細胞増殖は、リンパ節内で発生し次いで血液および骨髄に広がる、リンパ腫の進行によっても引き起こされる。KIRHy1標的化は、悪性B細胞、白血病、リンパ腫、および多

10

20

30

40

50

発性骨髄腫を含むがそのみに限定されない骨髄腫、バーキットリンパ腫、皮膚B細胞リンパ腫、原発性濾胞性皮膚B細胞リンパ腫、B系統急性骨髄芽球性白血病（ALL）、B細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）、B細胞慢性リンパ性白血病（CLL）、急性骨髄芽球性白血病、毛様細胞性白血病（HCL）、急性骨髄性白血病、急性骨髄単球性白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ肉腫細胞白血病、脾臓辺縁域リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、B細胞大細胞型リンパ腫、悪性リンパ腫、前リンパ球白血病（PLL）、リンパ血漿細胞様リンパ腫、大脳皮質細胞リンパ腫、粘膜結合リンパ組織（MALT）リンパ腫、原発性甲状腺リンパ腫、血管内悪性リンパ腫症、脾臓リンパ腫、ホジキン病、および移植片内血管向性大細胞型リンパ腫の治療において有用である。実施例4には、急性単球性白血病、急性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、未分化大細胞型T細胞リンパ腫、B細胞リンパ腫、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、組織球性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、B細胞大細胞型リンパ腫、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、および形質細胞腫細胞系および組織でのKIRHy1の発現が示されているが、いずれもKIRHy1抗体で治療可能である。本発明の方法で治療可能な他の疾病には、多発性キャッスルマン病、原発性アミロイド症、フランクリン病、セリグマン病、原発性滲出性リンパ腫、[EBV感染に係る]移植後リンパ組織増加病（PTLD）、異所新生物性天疱瘡、慢性リンパ組織増殖性障害、伴性リンパ組織増殖性症候群（XLP）、獲得血管浮腫、異蛋白血症を伴う血管免疫芽細胞性リンパ節症、ヘルマン症候群、脾摘術後症候群、先天性赤血球生成障害性貧血タイプIII、リンパ腫関連食血細胞症候群（LAHS）、壊死性潰瘍性口内炎、キクチ病、リンパ球様肉芽腫症、リクター症候群、真性多血症（PV）、ゴーシュ病、Gougerot-Sjogren症候群、カボジ肉腫、大脳リンパ球形質細胞性増殖（BindおよびNeel症候群）、伴性リンパ組織増殖性障害、単核球増加症（エプスタイン-バーウイルス）等の病原体関連障害、リンパ血漿細胞性障害、移植後血漿細胞性障害、およびグッド症候群が含まれる。

【0217】

本発明の治療用組成物は、固形腫瘍/悪性、局所的に進行した腫瘍、ヒト軟組織肉腫を含む成人および小児の腫瘍；リンパ性転移を含む転移性癌；多発性骨髄腫、急性および慢性の白血病、およびリンパ腫を含む血液細胞の悪性化；口腔癌、咽頭癌、および甲状腺癌を含む頭頸部癌；小細胞癌腫および非小細胞癌腫を含む肺癌；小細胞癌腫および導管性癌腫を含む乳癌；食道癌、胃癌、結腸癌、結腸直腸癌、結腸直腸性新生物に係るポリープ、膵臓癌、肝臓癌を含む胃腸癌；膀胱癌および前立腺癌を含む泌尿器癌；卵巣癌、（子宮内膜癌を含め）子宮癌、卵胞における固形腫瘍を含む女性生殖器官の癌；腎細胞癌を含む腎臓癌；脳内在性腫瘍、神経芽腫、星状膠細胞性脳腫瘍、神経膠腫、転移性腫瘍細胞の中樞神経系への侵襲を含む脳の癌；骨肉腫を含む骨の癌；線維肉腫および骨肉腫を含む肉腫；悪性黒色腫、ヒト皮膚角化細胞の腫瘍化、上皮細胞癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌を含む皮膚癌；血管周囲細胞腫およびカボジ肉腫に有効である。

【0218】

自己免疫疾患は、自己抗体を産生する超活性なB細胞活性に係っている。さらに、自己免疫疾患は、無秩序なプロテアーゼ活性（Wernike et al., Arthritis Rheum. 46:64-74 (2002)）および異常なサイトキニン活性（療法全体を本明細書で参考として援用する、Rodenburg et al., Ann. Rheum. Dis. 58:648-652 (1999)）に係っている。自己抗体産生細胞の成育または増殖の阻害は、自己免疫性疾患における自己抗体のレベルを下げる上で薬理的に有効である。プロテアーゼ活性を阻害することにより、組織侵襲および自己免疫性疾患に係る炎症の程度を下げるのが可能であり、このような自己免疫疾患には、全身性エリテマトーデス、ハシモト甲状腺炎、シェーグレン症候群、心膜炎性紅斑、クローン病、移植片対宿主病、グレーブズ病、重症筋無力症、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、喘息、クリオグロブリン血症、原発性胆道硬化症、悪性貧血、ヴァルデンシュトロームマクログロブリン血症、高粘稠血症症候群、マクログロブリン血症、寒冷凝集性溶血性貧血、原因不明単クローン性免疫グロブリン

血症、斑状皮膚萎縮症および P O E M S 症候群（多発性神経障害、有機金属中毒、内分泌障害、M 成分、性格変化）、結合組織病、多発性硬化症、嚢胞性線維症、リウマチ様関節炎、自己免疫性肺炎症、乾癬、ギラン - バレー症候群、自己免疫性甲状腺炎、インスリン依存性真性糖尿病、自己免疫性炎症性眼疾患、グッドパスチャー病、ラスマッセン脳炎、疱疹状皮膚炎、胸腺腫、1 型自己免疫性多腺性症候群、原発性および二次性膜性腎症、癌関連網膜症、1 型自己免疫性肝炎、腎臓関与型混合クリオグロブリン血症、胞嚢様黄斑浮腫、子宮内膜症、（高免疫グロブリン血症を含む）免疫グロブリン多発性神経障害、脱髄疾患、血管腫症、および単クローン性免疫グロブリン血症が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0219】

K I R H y 1 標的化は、アレルギー反応および症状、例えば、過敏症、血清病、薬物反応、食物アレルギー、昆虫毒液アレルギー、肥満細胞過剰増殖、アレルギー性鼻炎、過敏性肺臓炎、蕁麻疹、血管浮腫、湿疹、アトピー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、多形滲出性紅斑、スティーヴンズ - ジョンソン症候群、アレルギー性結膜炎、アトピー性角結膜炎、性病性性角結膜炎、巨大乳頭状結膜炎、アレルギー性胃腸病、炎症性腸疾患（I B D）、ならびに、喘息（特にアレルギー性喘息）等の接触性アレルギー、または他の呼吸器障害の治療においても有用である。

【0220】

K I R H y 1 標的化は、幹細胞、組織、または器官の移植等の移植が必要な患者における移植拒絶反応の管理または予防にも有用である。したがって、本発明の一つの態様は、さまざまな疾病（これだけに限定されない、再生不良性貧血および発作性夜間ヘモグロビン尿症を含め、通常移植で治療するもの）、さらに放射線照射 / 化学療法後の、インビボまたはエキソビボで（すなわち、骨髄移植と同時に）あるいは正常な細胞または遺伝子治療のために改変された細胞としての（同種または異種の）末梢性前駆細胞の移植における幹細胞区画の再増殖において薬理学的有用性を見出すことができる。

【0221】

K I R H y 1 標的化は、さまざまなやり方で免疫応答を改変することも可能である。下方制御は、既に進行中の免疫応答を阻害またはブロックすることができ、あるいは免疫応答誘発の予防に介入することができる形式である。下方制御すなわち、これだけに限定されない、B リンパ球抗原機能、例えば、活性化された T 細胞による高レベルリンホカイン合成の変性または阻害を含む、一つまたはそれ以上の抗原機能の阻害は、組織、皮膚、および器官の移植、ならびに移植片対宿主病（G V H D）において有用である。例えば、T 細胞機能のブロックにより、組織移植における組織破壊を軽減できる。一般に、組織移植においては、T 細胞が移植片を外来のものと認識することから拒絶反応が始まり、移植片を破壊する免疫反応がそれに続く。本発明の治療用組成物の投与により、T 細胞等の免疫細胞によるサイトカイン合成が阻害され、本発明の治療用組成物は免疫抑制剤として働く。さらに、共刺激が欠如するため、T 細胞がアネルギー化され、対象が寛容になる。B リンパ球抗原ブロック剤による長期間寛容の導入によって、これらのブロック剤を繰り返し投与する必要がなくなる。対象における十分な免疫抑制すなわち寛容を達成するため、B リンパ球抗原との組合せの機能もブロックする必要がある可能性もある。

【0222】

器官移植拒絶反応または G V H D の阻害における特定の治療用組成物の有効性は、ヒトにおける有効性を予測できる動物モデルを用いて評価することができる。使用可能な好適なシステムの例には、ラットにおける同種の心臓移植、およびマウスにおける異種脾臓ランゲルハンス島細胞移植が含まれ、両方の全体を本明細書において参考として援用する、L e n s c h o w e t a l . , S c i e n c e 257:789-792 (1992) and T u r k a e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i U S A , 89:11102-11105 (1992) に記載のように、インビボでの C T L A 4 I g 融合タンパク質の免疫抑制効果の試験に両方とも使われている。さらに、G V H D のマウスモデル（その全体を本明細書において参考として援用する、P

10

20

30

40

50

aul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-847)を、GVHDの進行に対する本発明の治療用組成物の効果を測定するのに使用することができる。

【0223】

(5.10 投与)

本発明の方法を実施するため使用する抗KIRHy1モノクローナル抗体は、所望の送達方法に適したキャリアを含む治療用組成物に調製することができる。好適なキャリアには、抗KIRHy1抗体と結合されても抗体の抗腫瘍機能を保持し、対象の免疫システムと反応しない任意の材料が含まれる。好適なキャリアの例には、滅菌リン酸塩緩衝生理食塩水溶液、静菌性水、その他等の任意の多くの標準的な薬理学的キャリアが含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【0224】

抗KIRHy1抗体製剤は、腫瘍部位に抗体を送達できる任意の経路で投与することができる。投与の有効な経路には、静脈内、腹膜内、筋内、腫瘍内、皮内、その他が含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましい投与経路は静脈注射である。静脈注射のための好ましい製剤は、保存された静菌性水、滅菌非保存水に溶解された、および/または注射用のUSP製の0.9%滅菌食塩水を含むポリ塩化ビニルまたはポリエチレンのバッグ内で希釈された、抗KIRHy1mAbsを含む。抗KIRHy1mAbs生成物は、凍結乾燥し滅菌粉末として、好ましくは真空下で、保存され、注射に先立って、例えばベンジルアルコール保存料を含む静菌性水、または滅菌水に再溶解される。

20

【0225】

治療は一般に静脈注射等の許容される経路での投与による抗KIRHy1抗体製剤の繰り返し投与を含み、通常、およそ0.1mg/kg体重からおよそ10mg/kg体重までの用量であるが、0.01mg/kgからおよそ100mg/kgまでの範囲の用量例も想定される。1週間当たり10~500mgmAbの範囲の用量が効果的であり、よく寛容される。リツキシマブ(リツキサン(登録商標))、すなわちB細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、および再発無痛性リンパ腫に用いられるキメラCD20抗体は、通常、375mg/m²を静脈注射で週1回4~8用量投与される。これを2回繰り返すのが必要な場合もあるが、3回以上繰り返してはならない。リツキサン(登録商標)の効果的な用量範囲は50~500mg/m²である(両方の全体を本明細書で参考として援用する、Maloney, et al., Blood 84: 2457-2466 (1994); Davis, et al., J Clin. Oncol. 18: 3135-3143 (2000))。トラスツマブ(ハーセプチン(登録商標))、すなわちHER2(ヒト表皮性成長因子2)陽性の転移性乳癌の治療に用いられるヒト化モノクローナル抗体の臨床経験(その全体を本明細書で参考として援用する、Slamon, et al., Mol Cell Biol. 9: 1165 (1989))によると、抗KIRHy1mAb製剤を最初の負荷用量としておよそ4mg/kg患者体重を静脈注射で、次いで週1回およそ2mg/kgを静脈注射で投与するのが許容される投与方式である(その全体を本明細書で参考として援用する、(Slamon, et al., N. Engl. J. Med. 344: 783 (2001))。最初の負荷用量を90分またはそれ以上かけて投与することが好ましい。最初の用量がよく寛容された場合、定期的維持用量は30分またはそれ以上かけて投与する。ただし、当分野の技術者ならわかるように、具体的なケースにおいてはさまざまな要素が望ましい投与方式に影響する。このような要素には、例えば、mAbまたは使用したmAbの結合親和性および半減期、患者におけるKIRHy1過剰発現の程度、循環する排出されたKIRHy1抗原の程度、所望の安定状態の抗体の濃度レベル、治療の頻度、本発明の治療方法と組み合わせて使用される化学療法剤の影響が含まれる。

30

40

【0226】

治療には放射性同位元素に結合した抗KIRHy1抗体も含まれる。放射能標識化抗癌胚性抗原(抗CEA)モノクローナル抗体を用いた研究により、30~80mCi/m²

50

で2～3回注入場合の腫瘍の退行から用量の目安が与えられている(両方の全体を本明細書で参考として援用する、(Behr, et al., Clin. Cancer Res. 5(10 Suppl.): 3232s-3242s (1999), Juweid, et al., J. Nucl. Med. 39:34-42 (1998))。

【0227】

あるいは、KIRHy1をコードするmRNAで形質転換された樹状細胞を、T細胞介在性抗腫瘍応答を刺激するワクチンとして使用することができる。前立腺特異的抗原のmRNAで形質転換された樹状細胞を用いた研究によって、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 個の細胞の静脈注射を2～6週間おこない 10^7 個の細胞の皮内注射を併用するサイクルを3回繰り返すと、好適な用量となることことが示されている(両方の全体を本明細書で参考として援用する、(Heiser, et al., J. Clin. Invest. 109:409-417 (2002); Hadzantonis and O'Neill, Cancer Mother. Radiopharm. 1:11-22 (1999))。 1×10^5 から 1×10^9 個の細胞の間または 1×10^6 から 1×10^8 の間といった他の用量も想定できる。

10

【0228】

KIRHy1をコードするプラスミドを使用する裸のDNAワクチンは免疫学的抗腫瘍応答を誘発することができる。裸のDNAを皮内または筋肉内に直接注射し投与することは、有害な免疫反応の進行および挿入による変異誘発の危険性等のウイルスベクターを使用する場合に遭遇する制限とはかならずしも関係しない(その全体を本明細書で参考として援用する、(Hengge, et al., J. Invest. Dermatol. 116:979 (2001))。外因性cDNAの筋肉組織内への直接注射は強い免疫応答および防御免疫を誘発することが研究によって示されている(その全体を本明細書で参考として援用する、(Ilan, Curr Opin. Mol. Ther. 1:116-120 (1999))。物理的導入方法(遺伝子銃、電気穿孔法)および化学的導入方法(カチオン性脂質またはポリマー)は、プラスミドDNAによって遺伝子輸送の効率および標的細胞特異性が上がるように改良されている(その全体を本明細書で参考として援用する、(Nishikawa and Huang, Hum. Gene Aer. 12:861-870 (2001))。プラスミドDNAをエーロゾル送達法で肺に投与することもできる(Densmore, et al., Mol. Ther. 1:180-188 (2000))。裸のまたは脂質でコーティングしたプラスミドDNAの直接注射による遺伝子療法は、癌、後天性免疫不全症候群、嚢胞性線維症、脳血管症、および高血圧等の疾病の予防、治療、および治癒への使用が考えられている(両方の全体を本明細書で参考として援用する(Prazeres, et al., Trends Biotechnol. 17:169-174 (1999)); Wehl, et al., Neurosurgery 44:239-252 (1999))。HIV-1のDNAワクチンでの用量漸増法研究は、 $30 \sim 300 \mu\text{g}$ / 投与量の投与が好適であることを示している(その全体を本明細書で参考として援用する、(Weber, et al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20:800 (2001))。裸のDNAをマウス的大脑内に注射すると、レポータータンパク質が発現され、発現は用量依存性であり、最大の発現はDNA $150 \mu\text{g}$ の注射時であった(その全体を本明細書で参考として援用する、Schwartz, et al., Gene Ther. 3:405-411 (1996))。 - ガラクトシダーゼプラスミド $1 \mu\text{g}$ を含むナノ球を筋注射した後のマウスにおける遺伝子の発現は、同量の裸のDNAまたはDNAのリポフェクタミンとの複合体を注射した場合に比べ、高度かつ長期間であった(その全体を本明細書で参考として援用する、Truong, et al., Hunt. Gene Ther. 9:1709-1717 (1998))。インスリンの治療源を提供する手段として骨格筋肉内にプラスミド介在遺伝子を導入する研究においては、マウスのプリncD

20

30

40

50

N A 導入遺伝子およびラットのプロインスリン c D N A を含む 4 種類のプラスミド構造体がオス B a l b / c マウスのふくらはぎの筋肉に注射され、ほとんどの構造体において好適な用量は 1 0 0 μ g プラスミド D N A であった（その全体を本明細書で参考として援用する、K o n , e t a l . J G e n e M e d . 1 : 1 8 6 - 1 9 4 (1 9 9 9) ）。1 ~ 1 0 0 0 μ g / 投与量または 1 0 ~ 5 0 0 μ g / 投与量の他の用量も想定される。

【 0 2 2 9 】

最も効果的な投与方式および関連要因決定の参考データを提供するため、患者は血清中の循環する排出された K I R H y 1 抗原の濃度の評価を受けることが望ましい。このような評価は、治療期間を通してモニターリングにも使用でき、他のパラメーターの評価と併せて治療の成功度を評価する上でも有用である。

10

【 0 2 3 0 】

(5 . 1 0 . 1 K I R H y 1 標的化組成物)

K I R H y 1 発現細胞を標的化するための組成物は本発明の範囲に含まれる。抗体を含む薬理的組成物は、例えば、その全体を本明細書で参考として援用する、米国第特許 6 , 1 7 1 , 5 8 6 号に詳細に記載されている。このような組成物は、治療または予防に有効な量の抗体、またはフラグメント、変異体、誘導体、あるいはそれらの融合体、本明細書に記載のように、混合物としての薬理的に許容される薬剤を含んでいる。通常、K I R H y 1 標的化剤は、動物に投与するのに十分なだけ精製される。

【 0 2 3 1 】

薬理的組成物は、例えば、p H、容積モル浸透圧濃度、粘度、清澄度、色、等張性、匂い、滅菌性、安定性、溶解速度または放出速度、組成物の吸収または浸透を変性する、維持する、または保存するための調剤材料を含むことができる。好適な調剤材料には、アミノ酸（グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、アルギニン、またはリシン等）、抗菌物質、抗酸化剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム等）、緩衝剤（ホウ酸塩、重炭酸塩、トリス - H C l、クエン酸塩、リン酸塩、他の有機酸等）、増量剤（マンニトールまたはグリシン等）、キレート剤 [エチレンジアミンテトラ酢酸 (E D T A) 等]、複合化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル - β -シクロデキストリン等）、フィラー、モノサッカライド、ポリサッカライド、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリン等）、タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等）、着色剤、香料および希釈剤、懸濁剤、親水性ポリマー（ポリビニルピロリドン等）、低分子量ポリペプチド、塩形成用対イオン（ナトリウム等）、保存料（ベンズアルコニウムクロリド、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネシルアルコール、メツルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素等）、溶剤（グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール等）、糖アルコール（マンニトールまたはソルビトール等）、乳濁剤、界面活性剤または湿潤剤（プラロニクス、P E G、ソルビタン酸エステル、ポリソルベート 2 0、ポリソルベート 8 0 等のポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レクチン、コレステロール、チロキサポール等）、安定性増強剤（ショ糖またはソルビトール）、張性増強剤（アルカリ金属塩化物、好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトール、ソルビトール等）、送達剤、希釈剤、賦形剤および / または補助剤が含まれるが、これらに限定されるものではない（その全体を本明細書で参考として援用する、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 1 8 t h E d i t i o n , E d . A . R . G e n n a r o , M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y , (1 9 9 0) ）。

20

30

40

【 0 2 3 2 】

最適な医薬組成物は、例えば意図される投与の経路、送出フォーマット、および所望の投与量によって、当業者に決定される。例えば、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s、上記を参照。このような組成物は、K I R H y 1

50

標的剤の物理的状态、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボ・クリアランスの速度に影響を及ぼしうる。

【0233】

医薬組成物中の一次媒体または担体は、自然には水性または非水性のいずれかでありうる。例えば、適切な媒体または担体は、おそらく非経口投与のための組成物に共通の他の材料を補足した、注射用の水、生理学的食塩水または人工の脳脊髄流動体でありうる。天然の平衡生理食塩水または血清アルブミンと混合した生理食塩水は、別の例示の媒体である。他の例示の医薬組成物は、約 pH 7.0 - 8.5 のトリス緩衝液、または約 pH 4.0 - 5.5 の酢酸緩衝液を包含し、そしてそれは、さらに、そこにソルビトールまたは適切な代替物を含みうる。本発明の1つの実施態様で、KIRHy1 標的剤組成物は、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、所望の程度の純度を示す選択された組成物を任意の処方剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences、上記) と混合することによって、保存のために調製されうる。さらに、結合剤製品は、シヨ糖のような適切な賦形剤を使用して、凍結乾燥物として処方されうる。

10

【0234】

医薬組成物は、非経口放出のために選択されうる。代わりに、組成物は、吸入、または経口でのような消化管を通した送出として選択されうる。このような医薬上許容しうる組成物の製造は、当業界の範囲内にある。処方成分は、投与の部位に許容できる濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的 pH で、またはわずかに低い pH で、特に約 5 から約 8 までの pH 範囲内で、組成物を維持するために使用される。非経口投与が達成されるとき、本発明に使用するための治療用組成物は、医薬上許容しうる媒体中に KIRHy1 標的剤を包含し発熱原不含で、非経口的に許容しうる水性溶液の形態でありうる。非経口注射のための特に適切な媒体は、KIRHy1 標的剤が、適切に保存された滅菌、等張溶液として処方される滅菌蒸留水である。さらに別の製造は、その後デポット注射を介して送出されうる製品の制御または徐放を提供する、注射用マイクロスフェア、生物破壊性粒子、重合性化合物 (ポリ酢酸、ポリグリコール酸)、ビーズ、またはリポソームのような剤を用いた所望の分子の処方を含みうる。ヒアルロン酸も使用でき、そしてこれは、その周期の持続期間を推進する効果を示しうる。所望の分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬剤送出デバイスを含む。

20

【0235】

別の態様では、非経口投与のために適切な医薬用処方は、ハंक溶液、リンガー溶液、または生理学上平衡な生理食塩水のような水性溶液、好ましくは生理学上適合性のある緩衝液中で処方されうる。水性注射懸濁液は、ナトリウム・カルボキシメチルセルロース、ソルビトール、またはデキストランのような懸濁液の粘度を増大する物質を含みうる。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油状注射懸濁液として製造されうる。適切な親油性溶媒または媒体は、ゴマ油のような脂肪酸油、またはエチル・オレエート、トリグリセリド、またはリポソームのような合成脂肪酸エステルを含む。非脂肪ポリ陽イオンアミノ重合体も送出のために使用されうる。都合により、懸濁液は、適切な安定化剤、または化合物の溶解性を増大し、そして高濃度溶液の製造に対処する剤も含みうる。

30

【0236】

別の実施態様では、医薬組成物は、吸入のために処方されうる。例えば、KIRHy1 標的剤は、吸入のための乾燥粉末として処方されうる。ポリペプチドまたは核酸分子吸入溶液は、エアゾル送出のための噴出剤と共に処方されうる。さらに別の実施態様では、溶液は、霧状にされうる。肺投与は、その全体でここに組込まれる国際出願番号 PCT/US 94/001875 号でさらに記述され、そしてそれは、化学的に修飾されたタンパク質の肺送出を記述する。

40

【0237】

所定の処方は、経口で投与されうることも予想される。本発明の1つの実施態様では、この形態で投与される KIRHy1 標的剤は、錠剤およびカプセル剤のような固形投与形態のコンパウンド化で慣例上使用される担体と共に、またはなしに処方されうる。例えば

50

、カプセル剤は、生物利用性が最大にされ、そして予め全身の崩壊が最小にされるときに胃腸管で、その時点でその処方の活性部分を放出することが意図されうる。別の剤は、結合剤分子の吸収を促進するために包含されうる。希釈剤、風味剤、低融点ワックス、植物油、滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、およびバインダーも使用されうる。

【0238】

経口投与のための医薬組成物は、経口投与のために適切な投与量で、当業界に周知である医薬上許容しうる担体を使用しても処方されうる。このような担体は、患者による摂取のための錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方されることを可能にする。

【0239】

経口用途のための医薬製品は、活性化合物を、固形賦形剤と合わせ、そして顆粒の生成物混合物を加工して、錠剤または糖衣錠コアを得ることを通して得られうる。望まれる場合には、適切な補助剤を添加しうる。適切な賦形剤は、ラクトース、ショ糖、マンニトール、およびソルビトールを含めた糖；トウモロコシ、小麦、コメ、ジャガイモまたは他の植物から得られるスターチ；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはナトリウム・カルボキシメチルセルロースのようなセルロース；アラビアゴムおよびトラガカントを含めたゴム；およびゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質のような炭化水素またはタンパク質フィラーを含む。所望の場合、架橋ポリビニルピロリドン、寒天およびアルギン酸またはアルギン酸ナトリウムのようなその塩のような崩壊または安定化剤を添加しうる。

【0240】

糖衣錠コアは、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物も含みうる濃厚糖溶液のような適切な被覆剤に関連して使用されうる。染料または顔料を、製品識別のために、または活性化合物の量、すなわち、投与量の特徴づけるために、錠剤または糖衣錠被覆剤に添加しうる。

【0241】

経口で使用されうる医薬製品は、ゼラチンから製造されるプッシュ-フィットカプセル剤、並びに、ゼラチン、およびグリセロールまたはソルビトールのような被覆剤から製造される軟質封鎖カプセル剤も含む。プッシュ-フィットカプセル剤は、ラクトースまたはスタートのようなフィラーまたはバインダー；タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような滑剤、および都合により安定化剤と混合した活性成分を含みうる。軟質カプセル剤では、K I R H y 1 標的剤は、脂肪酸油、または液体ポリエチレングリコールのような適切な液体に、安定化剤と一緒にまたはなしに、溶解または懸濁されうる。

【0242】

別の医薬組成物は、錠剤の製造に適している非毒性賦形剤との混合物中に有効量の K I R H y 1 標的剤を含みうる。滅菌水、または他の適切な媒体中に錠剤を溶解させることによって、溶液は、単位用量形態で製造されうる。適切な賦形剤は、それに限定されないが、炭酸カルシウム、炭酸または重炭酸ナトリウム、ラクトースまたはリン酸カルシウムのような不活性希釈剤；スターチ、ゼラチン、またはアカシアのような結合剤；またはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクのような滑剤が挙げられる。

【0243】

持続または制御送出处方中に K I R H y 1 標的剤を含む処方を含めた別の医薬組成物は、当業者に明らかである。リポソーム担体、生物破壊微粒子または多孔性ビーズおよびデポット注射のような多様な他の持続または制御送出手段を処方する技術は、当業者にも周知である。例えば、ここに全体に組込まれる P C T / U S 9 3 / 0 0 8 2 9 号を参照し、そしてそれは、医薬組成物の送出のための多孔性重合体微粒子の制御放出を記述する。徐放製剤の別の例は、形状物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態にある半透過性重合体マトリックスを含む。徐放マトリックスは、ポリエステル、ハイドロゲル、ポリラクチド（米国特許番号第 3 , 7 7 3 , 9 1 9 号；欧州特許番号第 5 8 , 4 8 1 号）

10

20

30

40

50

、L-グルタミン酸とガンマ・エチル-L-グルタメートとの共重合体 (Sidman et al, Biopolymers 22:547-556 (1983))、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート) (Langer et al, J. Biomed Mater Res, 15:167-277 (1981)) and (Langer et al, Chem Tech, 12:98-105 (1982))、エチレンビニルアセテート (Langer et al、上記) またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (欧州特許番号 EP 133, 988 号、その全ては、ここに全体に組込まれる) を含みうる。徐放組成物は、当業界で知られるいくつかの方法のいずれかにより製造されるリボソームも包含する。例えば、Epstein et al, Proc Natl Acad Sci (USA), 82:3688-3692 (1985); 欧州特許番号 EP 36, 676 号、EP 88, 046 号および EP 143, 949 号を参照し、そしてその全ては、ここに全体に参照して組込まれる。

10

【0244】

インビボ投与のために使用されるべき医薬組成物は、一般に滅菌状態でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により達成されうる。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再編成の前、またはそれに続いてかのいずれかで行われうる。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥形態で、または溶液で保存されうる。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌評価ポート、例えば静脈溶液バッグ容器に、または皮下注入注射針による突刺ストッパーを有するバイアルを介して入れ替えられる。

20

【0245】

一度医薬組成物が処方されると、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固形物または脱水または凍結乾燥粉末として滅菌バイアルに保存されうる。このような処方は、即時使用形態で、または投与前の再編成を要求する形態 (例えば、凍結乾燥) でのいずれかで保存されうる。

【0246】

特別の実施態様では、本発明は、単回用量投与単位を生じるためのキットに向けられる。キットは、両方とも、乾燥 KIRHy 1 標的剤を有する第一の容器、および水性処方を有する第二の容器の両方を含みうる。さらに、本発明の範囲内に含まれるのは、単回および多チャンパー予備充填シリンジ (例えば、液体シリンジおよびリオシリンジ) を含有するキットである。

30

【0247】

(5.10.2 投与量)

使用されるべき有効量の医薬組成物は、治療上、例えば、治療含有量および対象による。当業者は、治療のための適切な投与量レベルが、部分的に、送出される分子、KIRHy 1 標的剤が使用される予定である指標、投与の経路、および患者のサイズ (体重、体表面または臓器サイズ) および症状 (年齢および全般的健康) によって変化することを識別する。したがって、医療従事者は、投与量を滴定し、そして投与の経路を修正して、最適な治療効果を得ることができる。典型的な投与量は、上に明記される因子によって、約 0.1 mg/kg から約 100 mg/kg まで、またはそれより多くの範囲にありうる。他の実施態様では、投与量は、0.1 mg/kg から約 100 mg/kg まで; または 0.01 mg/kg から 1 g/kg まで; または 1 mg/kg から約 100 mg/kg まで、または 5 mg/kg から約 100 mg/kg までの範囲にある。他の実施態様では、投与量は、放射性免疫療法については、用量当たり 10 mCi から 100 mCi までの範囲に、注射または注入当たり約 1×10^7 - 5×10^7 細胞まで、または約 1×10^5 から 1×10^9 細胞まで、または約 1×10^6 から 1×10^8 細胞まで、または上に列挙される因子により、用量当たり 30 μ g から 300 μ g まで、または 1 - 1000 μ g / 用量または 10 - 500 μ g / 用量の裸の DNA でありうる。

40

【0248】

あらゆる化合物については、治療上有効な用量は、細胞培養アッセイで、またはマウス

50

、ラット、ウサギ、イヌまたはブタのような動物モデルでのいずれかで、最初に概算されうる。動物モデルは、適切な濃度範囲または投与の経路を決定するためにも使用されうる。その後、このような情報は、ヒトにおける投与のための有用な用量および経路を決定するために使用されうる。

【0249】

正確な投与量は、治療を必要とする対象に関連した因子の点で決定される。投与量および投与は、十分なレベルの活性化合物を提供するか、または所望の効果を維持するために調節される。考慮されうる因子としては、疾患状態の重度、対象の全般的健康、対象の年齢、体重および性別、投与の時間および頻度、薬剤組合せ、反応感度、および治療に対する応答を含む。長期作用の医薬組成物は、特定の処方の半減期およびクレアランスによっ

10

【0250】

投与の頻度は、使用される処方中の K I R H y 1 標的剤の薬理学上のパラメーターによる。特に、所望の効果を達成する投与量に達するまで、組成物を投与する。したがって、その組成物は、単回用量、または複数回用量として、（同じまたは異なる濃度 / 投与量で）、時間をかけて、または持続注入として投与されうる。適切な投与量のさらなる精製は、日常的になされる。適切な投与量は、適切な用量応答データの使用を通して確認されうる。

【0251】

本発明に使用するために適切な医薬組成物は、活性成分が、その意図される目的を達成するために有効量で含まれる組成物を含む。さらに特定には、治療上有効な量は、処置されるべき対象の現存の徴候の発生を防止するか、またはその徴候を緩和するのに有用な量を意味する。有効な量の決定は、特にここに提供される詳細な開示の点で、十分に当業者の許容量の範囲内にある。発明の方法で使用されるあらゆる化合物については、治療上有効な用量は、インビトロアッセイで適切なものから最初に概算されうる。例えば、用量は、ヒトでの有用な用量をさらに正確に決定するために使用されうる周期的濃度範囲を達成するために、動物モデルに処方されうる。例えば、細胞培養で測定されるとおり I C₅₀ を含む周期的濃度範囲（すなわち、タンパク質の生物学上の活性の半分 - 最大阻害を達成する試験化合物の濃度）を達成するために、用量は、動物モデルに処方されうる。このような情報は、ヒトにおける有用な用量をいっそう厳密に決定するために使用されうる。

20

30

【0252】

治療上有効な用量は、徴候の緩和、または患者における生存の延長を生じる化合物の量に該当する。このような化合物の毒性および治療効率は、例えば L D₅₀（その集団の 50 % にとって致死の用量）および E D₅₀（その集団の 50 % に治療上有効な用量）を決定するために、細胞培養または実験動物での標準医薬手段によって決定されうる。毒性および治療効果の間の用量比は、治療指数であり、そしてそれは、L D₅₀ と E D₅₀ の間の比として表されうる。高治療指数を示す化合物が好まれる。これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトで使用するための多数の投与量を処方するために使用されうる。このような化合物の投与量は、好ましくは、ほとんどまたはまったく毒性を示さない E D₅₀ を含む周期的濃度の範囲内にある。投与量は、使用される投与量形態および利用される投与の経路によって、この範囲内で変化しうる。正確な処方、投与の経路および投与量は、患者の症状の観点で、個々の医師によって選択されうる。例えば、Finglet al., 1975, 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1 p. 1 を参照。投与量および間隔は、所望の効果、または最小有効濃度 (M E C) を維持するのに十分である活性部分の血漿中レベルを供するために個々に調節されうる。M E C は、各化合物について変化するが、しかしインビトロデータから概算されうる。M E C を達成するために必要な投与量は、個々の特徴および投与の経路による。しかし、H P L C アッセイまたはバイオアッセイは、血漿濃度を決定するために使用されうる。

40

【0253】

50

投与間隔は、MEC値を使用しても決定されうる。化合物は、その時点の10 - 90 %、好ましくは30 - 90 %の間、そして最も好ましくは50 - 90 %の間についてのMECより上の血漿レベルを維持する治療計画を用いて投与されるべきである。局所投与または選択的摂取の場合には、薬剤の有効な局所濃度は、血漿濃度に関連しない可能性がある。

【0254】

本発明のポリペプチドまたは他の組成物についての例示の投与計画は、毎日患者体重の約0.01 μ gから100 mg/kgの範囲内にあり、そして好ましい用量は、毎日、患者体重の約0.1 μ gから25 mg/kgまでであり、そして成人および子供で変化する。投与は、毎日1回、または等価の用量は、長いまたは短い間隔で送出されうる。

10

【0255】

投与される組成物の量は、もちろん、治療されるべき対象に、対象の年齢および体重、苦痛の重度、投与の手段、および処方する医師の判断に依存する。

【0256】

(5.10.3 投与の経路)

医薬組成物の投与の経路は、静脈内、腹腔内、脳内(実質内)、脳質内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、病巣内経路による注射を通して例えば経口で、硬膜腔内、脳室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻内、腸内、局所、舌下、尿道、膣、または直腸手段で、徐放系により、移植デバイスにより、または吸入を通したき既知方法と一致する。所望の場合、組成物は、ボーラス注射によるか、注入により持続的に、または移植デバイスにより投与されうる。

20

【0257】

代わりに、またはさらに、組成物は、膜、スポンジまたはKIRHy1標的剤が吸収または封入された別の適切な材料の移植を介して投与されうる。移植デバイスを使用する場合、デバイスは、あらゆる適切な組織または臓器に移植され得て、そしてKIRHy1標的剤の送出が、拡散、経時放出ボーラス、または持続投与を介しうる。

【0258】

いくつかの場合には、エキソビトロ手段で医療組成物を使用することが望ましい可能性がある。このような例では、患者から取出された細胞、組織または臓器は、その細胞、組織および/または臓器が続いて患者に移植し戻された後、医薬組成物にさらされる。

30

【0259】

他の場合には、KIRHy1標的剤は、ポリペプチドを発現しそして分泌するように遺伝子操作された所定の細胞を移植することによって送出されうる。このような細胞は、動物またはヒト細胞であり得て、そして同種由来、異種、または異種間でありうる。都合により、細胞は、不死化されうる。免疫学上の応答の機会を減少させるために、細胞は、周囲の組織の浸透を避けるために封入されうる。封入材料は、特に、タンパク質製品の放出を可能にするが、しかし患者の免疫系によるか、または周囲組織からの別の決定的因子による細胞の破壊を防止する生物適合性、半透性重合体封入物である。

【0260】

(5.11 組合せ療法)

本発明のKIRHy1標的剤は、他の治療剤と組み合わせて利用され得て、そして少ない毒性で、同じ治療効果を達成するために、投与の毎日の少ない量、少ない総量または減少した頻度が要求されるように、これらの他の治療剤の効果を増強しうる。癌については、これらの他の治療剤は、例えば、放射線療法、化学療法剤、並びに他の成長因子を含む。移植拒絶または自己免疫疾患については、これらの他の治療剤は、例えば、シクロスポリン、アザチオプリン副腎皮質ステロイド、タクロリムスまたはミコフェノール酸モフエチルのような免疫抑制剤を含む。

40

【0261】

1つの実施態様では、抗-KIRHy1抗体は、放射線増感剤として使用される。このような実施態様では、抗-KIRHy1抗体は、放射線増感剤と結合される。ここで使用

50

される場合、用語「放射線増感剤」は、分子、好ましくは低分子量分子と定義され、治療上有効な量で動物に投与されて、電磁照射に放射性敏感であるべき細胞の感度を増大させ、および／または電磁照射で治療可能である疾患の治療を促進する。電磁照射で治療可能である疾患は、新生物疾患、良性および悪性腫瘍、および癌性細胞を含む。

【0262】

ここで使用される場合、用語「電磁照射」および「照射」は、それに限定されないが、 10^{-20} から 100 メートルまでの波長を示す照射が挙げられる。本発明の好ましい実施態様は、ガンマ照射 (10^{-20} から 10^{-13} m まで)、X線照射 (10^{-12} から 10^{-9} m まで)、紫外線 (10 nm から 400 nm まで)、可視光 (400 nm から 700 nm まで)、赤外線照射 (700 nm から 1.0 mm まで)、およびマイクロ波照射 (1 mm から 30 cm まで)の電磁照射を使用する。

10

【0263】

放射線増感剤は、電磁照射の毒性効果に対する癌性細胞の感受性を増大することが知られている。多くの癌治療プロトコールは、現在、X線の電磁照射により活性化される放射線増感剤を使用する。X線活性化放射線増感剤の例としては、それに限定されないが、以下のものが挙げられる：メトロニダゾール、ミソニダゾール、デスメチルミソニダゾール、ピモニダゾール、エタニダゾール、ニモラゾール、マイトマイシンC、RSU1069、SR4233、EO9、RB6145、ニコチンアミン、5-プロモデオキシウリジン (BudR)、5-ヨードデオキシウリジン (IdR)、プロモデオキシシチジン、フルオロデオキシウリジン (FudR)、ヒドロキシウレア、シスプラチン、および治療上有効な類似体および同じものの誘導体。

20

【0264】

癌の光動的療法 (PDT) は、感受性剤の放射性アクチベーターとして可視光を使用する。光動的放射線増感剤の例としては、それに限定されないが、以下のものが挙げられる：ヘマトポルフィリン誘導体、フォトフリン (r)、ベンゾポルフェリン誘導体、NPe6、スズ・エチオポルフィリン (SnET2)、フェノボルビド-a、バクテリオクロロフィル-a、ナフタロシアニン、フタロシアニン、亜鉛フタロシアニン、およびその治療上有効な類似体および誘導体。

【0265】

化学療法は、例えば、メクロルエタミン、シクロホスホアミド、イホスファミド、メルファランおよびクロラムブシルのような窒素マスタード；カルムスチン (BCNU)、ロムスチン (CCNU)、およびセムスチン (メチル-CCNU) のようなニトロソウレア；トリエチレンメラミン (TEM)、トリエチレン、チオホスホルアミド (チオペタ)、ヘキサメチルメラニン (HMM、アルトレタミン) のようなエチレンイミン/メチルメラミン；ブスルファンのようなアルキルスルホネート；デカルバジン (DTIC) のようなトリアジン；メトトレキセートおよびトリメトトレキセートのような葉酸類似体を含めた抗代謝産物；5-フルオロウラシル、フルオロデオキシシチジン、ゲムシタビン、シトシン・アラビノシド (AraC、シタラビン)、5-アザシチジン、2, 2'-ジフルオロデオキシシチジンのようなピリミジン類似体；6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、アザチオプリン、2'-デオキシコホルマイシン (ペントスタチン)、エリスロヒドロキシノニルアデニン (EHNA)、フルダラビン・ホスフェート、および2-クロロデオキシアデノシン (クラドリビン、2-CD A) のようなプリン類似体；パクリタキセル、ビンブラスチン (VLB)、ビンクリスチンおよびビノレルピンを含めたビンカ・アルカロイド、タキソテラ、エストラムスチンおよびエストラムスチン・ホスフェートのような抗有糸分裂薬を含む天然産物；エトポシドおよびテニポシドのようなピポドフィロトキシン；アクチモマイシン (actinomycin) D、タウノマイシン (ルビドマイシン)、ドキソルビシン、ミトキサントロン、イダルビシン、プレオマイシン、プリカマイシン (ミスラマイシン)、マイトマイシンCおよびアクチノマイシンのような抗生物質；L-アスパラギナーゼのような酵素；インターフェロン-アルファ、IL-2、G-CSF および GM-CSF のような生物学上の応答改質剤；シスプラチンおよびカルボプラチンの

30

40

50

ようなプラチナ共役複合体を含めたミスセルロース性剤；ミトキサントロンのようなアントラセンジオン、ヒドロキシウレアのような置換ウレア、N - メチルヒドラジン（M I H）およびプロカルバジンを含めたメチルヒドラジン誘導体、マイトタン（o , p ' - D D D）およびアミノグルテチミドのような副腎皮質抑制剤；プレドニソンおよび等価物のような副腎皮質ステロイドアンタゴニストを含めたホルモンおよびアンタゴニスト；ヒドロキシプロゲステロン・カプロエート、メドロキシプロゲステロン・アセテートおよびメゲストロール・アセテートのようなプロゲスチン；ジエチルスチルベストロールおよびエチニル・エストラジオール等価物のようなエストロゲン；タモキシフェンのようなアンチエストロゲン；テストステロン・プロピオネートおよびフロキシメステロン / 等価物を含めたアンドロゲン；フルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモン類似体およびレウプロライドのようなアンチアンドロゲン；およびフルタミドのような非ステロイド性アンチアンドロゲンを含む、アルキル化剤を含めた抗 - 新生物剤を使用しうる。

10

【 0 2 6 6 】

成長因子を用いた組合せ療法は、M - C S F、G M - C S F、T N F、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 11、I L - 12、I L - 13、I L - 14、I L - 15、I L - 16、I L - 17、I L - 18、I F N、T N F 0、T N F 1、T N F 2、G - C S F、M e g - C S F、G M - C S F、スロンボポイエチン、幹細胞因子、およびエリスロポイエチンのようなサイトカイン、リンホカイン、成長因子、または他の造血因子を含みうる。他の組成物は、既知アンギオポイエチン、例えば血管内皮成長因子（V E G F）を含みうる。成長因子としては、アンギオゲニン、骨形態発生タンパク質 - 1、骨形態発生タンパク質 - 2、骨形態発生タンパク質 - 3、骨形態発生タンパク質 - 4、骨形態発生タンパク質 - 5、骨形態発生タンパク質 - 6、骨形態発生タンパク質 - 7、骨形態発生タンパク質 - 8、骨形態発生タンパク質 - 9、骨形態発生タンパク質 - 10、骨形態発生タンパク質 - 11、骨形態発生タンパク質 - 12、骨形態発生タンパク質 - 13、骨形態発生タンパク質 - 14、骨形態発生タンパク質 - 15、骨形態発生タンパク質レセプター I A、骨形態発生タンパク質レセプター I B、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、毛様体神経栄養因子レセプター、サイトカイン誘導好中球化学走性因子 1、サイトカイン誘導好中球化学走性因子 2、内皮細胞成長因子、エンドセリン 1、上皮成長因子、上皮由来好中球誘引物質、繊維芽細胞成長因子 4、繊維芽細胞成長因子 5、繊維芽細胞成長因子 6、繊維芽細胞成長因子 7、繊維芽細胞成長因子 8、繊維芽細胞成長因子 8 b、繊維芽細胞成長因子 8 c、繊維芽細胞成長因子 9、繊維芽細胞成長因子 10、酸性繊維芽細胞成長因子、塩基性繊維芽細胞成長因子、神経膠セルライン由来好中球因子レセプター 2、成長関連タンパク質、ヘパリン結合表皮成長因子、肝細胞成長因子、肝細胞成長因子レセプター、インスリン様成長因子 I、インスリン様成長因子レセプター、インスリン様成長因子 I I、インスリン様成長因子結合タンパク質、ケラチノサイト成長因子、白血病阻害因子、白血病阻害因子レセプター、神経成長因子、神経成長因子レセプター、ニュートロフィン - 3、ニュートロフィン - 4、胎盤成長因子、胎盤成長因子 2、血小板由来上皮成長因子、血小板由来上皮成長因子 A 鎖、血小板由来上皮成長因子 A A、血小板由来上皮成長因子 A B、血小板由来上皮成長因子 B 鎖、血小板由来上皮成長因子 B B、血小板由来上皮成長因子レセプター、プレ - B 細胞成長刺激因子、幹細胞因子、幹細胞因子レセプター、トランスフォーミング成長因子、トランスフォーミング成長因子 1、トランスフォーミング成長因子 1 . 2、トランスフォーミング成長因子 2、トランスフォーミング成長因子 3、トランスフォーミング成長因子 5、潜伏性トランスフォーミング成長因子 1、トランスフォーミング成長因子結合タンパク質 I、トランスフォーミング成長因子結合タンパク質 I I、トランスフォーミング成長因子結合タンパク質 I I I、I 型腫瘍壊死因子レセプター、I I 型腫瘍壊死因子レセプター、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターレセプター、血管内皮成長因子、およびキメラ・タンパク質およびその生物学上または免疫学上活性フラグメントが挙げられる。

20

30

40

【 0 2 6 7 】

50

(5 . 1 2 K I R H y 1 の診断用途)

(5 . 1 2 . 1 K I R H y 1 発現状態を決定するためのアッセイ)

個人 (個体) における K I R H y 1 発現パターンの状態を測定することは、癌を診断するために使用され、そして適切な治療選択肢を定義する上で予後情報を提供しうる。同様に、K I R H y 1 の発現状態は、特定の疾患段階、進行、および / または腫瘍攻撃性に対する罹患性を検出するのに有用な情報を提供しうる。本発明は、K I R H y 1 発現状態を測定し、そして K I R H y 1 を発現する癌を診断するための方法およびアッセイを提供する。

【 0 2 6 8 】

1 つの態様では、本発明は、使用可能な場合、K I R H y 1 m R N A での明らかな増加または減少、または対応の正常な細胞または組織での発現レベルに関連する試験細胞または組織または流動体サンプル中でのタンパク質発現を検出することを包含する、個人 (個体) における癌の存在を測定する上で有用なアッセイを提供する。1 つの実施態様では、K I R H y 1 m R N A の存在は、リンパ腫の組織サンプルで評価される。明らかな K I R H y 1 発現の存在は、リンパ腫が、本発明の標的組成物を使用して K I R H y 1 標的に敏感であるかどうかを示すのに有用でありうる。関連実施態様では、K I R H y 1 発現状態は、核酸レベルでよりむしろタンパク質レベルで測定されうる。例えば、このような方法またはアッセイは、試験組織サンプル中の細胞により発現される K I R H y 1 のレベルを測定し、そしてそのように測定されたレベルを、対応の正常なサンプル中で発現される K I R H y 1 のレベルと比較することを包含する。1 つの実施態様では、K I R H y 1 の存在は、例えば、免疫組織化学的方法を使用して評価される。K I R H y 1 発現を検出する能力のある K I R H y 1 抗体は、この目的のために当業界で周知な多様なアッセイフォーマットで使用されうる。

【 0 2 6 9 】

末梢血は、H I R H y 1 発現を検出する R T - P C R を使用して、リンパ腫および白血病を含めた癌細胞の存在について都合よく分析されうる。R T - P C R 増幅性 K I R H y 1 m R N A の存在は、これらの型の癌の内の 1 つの存在の指標を提供する。血中の癌細胞を検出および特徴づけるための敏感なアッセイが、使用されうる (R a c i l l a e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 5 : 4 5 8 9 - 4 5 9 4 (1 9 9 8) 、ここに全体的に参照して組込まれる) 。このアッセイは、多パラメーター・フロー血球計算および免疫組織化学的分析と、免疫磁性濃縮を合わせ、そして報告によれば 1 m l の末梢血中の 1 個の上皮細胞を検出する能力があるという血中の癌細胞の検出に非常に感度がある。

【 0 2 7 0 】

本発明の関連態様は、個体での癌を発生することに対する罹患性を検出することに向けられる。1 つの実施態様では、癌に対する罹患性を検出する方法は、組織サンプル中の K I R H y 1 m R N A または K I R H y 1 を検出することを包含し、そしてその存在は、K I R H y 1 m R N A 発現存在の程度が罹患性の程度に比例する癌に対する罹患性を示す。

【 0 2 7 1 】

本発明のさらに別の関連態様は、腫瘍攻撃性 (O r l a n d i , e t a l . , C a n c e r R e s . 6 2 : 5 6 7 (2 0 0 2) 、ここに全体的に参照して組込まれる) の評価の方法に向けられる。1 つの実施態様では、腫瘍の攻撃性を評価する方法は、腫瘍のサンプル中の細胞によって発現される K I R H y 1 m R N A または K I R H y 1 タンパク質のレベルを検出し、そのように測定されたレベルを、同じ個体から採取された対応の正常組織または正常な組織対照サンプル中で発現された K I R H y 1 m R N A または K I R H y 1 タンパク質のレベルと比較することを包含し、正常なサンプルに比した腫瘍サンプル中の K I R H y 1 m R N A または K I R H y 1 タンパク質の程度が、攻撃性の程度を示すものである。

【 0 2 7 2 】

10

20

30

40

50

KIRHy1 mRNAまたはタンパク質の発現を検出および定量する方法は、ここに記述され、そして当業界で周知の標準核酸およびタンパク質検出および定量技術を使用する。KIRHy1 mRNAの検出および定量の標準法は、標識KIRHy1 リボプローブ (Gemou - Engesaeth, et al., Pediatrics, 109: E24 - E32 (2002)) を使用したインサイチュ・ハイブリダイゼーション、KIRHy1 ポリヌクレオチドプローブを使用したノーザンブロットおよび関連技術 (Kunzli, et al., Cancer 94: 228 (2002))、KIRHy1 に特異的なプライマーを使用したRT-PCR分析 (Angchaiskisir, et al., Blood 99: 130 (2002))、および例えば分岐DNA (Jardi, et al., J. Viral Hepat. 8: 465 - 471 (2001))、SISBA、TMA (Kimura, et al., J. Clin. Microbiol. 40: 439 - 445 (2002))、およびオリゴ、cDNAおよびモノクローナル抗体のような多様な種類のマイクロアッセイ産物のような他の増幅型検出方法を含む。特定の実施態様では、実時間RT-PCRは、KIRHy1 mRNA発現を検出および定量するために使用されうる (Simpson, et al., Molec. Vision 6: 178 - 183 (2000))。タンパク質の検出および定量のための標準方法は、この目的のために使用されうる。特定の実施態様では、野生型KIRHy1 と特異的に反応性のあるポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、生検組織の免疫組織化学的アッセイで使用されうる (Ristimaki, et al., Cancer Res. 62: 632 (2002)、ここに全体的に参照して組込まれる)。

10

20

【0273】

(5.12.2 診断アッセイおよびキット)

本発明は、さらに、都合により接合されるか、またはそうでなければ適切な標識と結合した本発明の核酸プローブおよび抗体を使用した、試験サンプル中のKIRHy1、またはその相同体の存在または発現を同定する方法を提供する。

【0274】

一般に、KIRHy1 ポリヌクレオチドを検出する方法は、サンプルを、複合体を形成するのに十分な期間ポリヌクレオチドと複合体に結合または形成する化合物と接触させ、そしてその複合体を検出し、その結果、複合体が検出される場合には、本発明のポリヌクレオチドが、サンプル中に検出されることを包含しうる。このような方法は、緊縮ハイブリダイゼーション条件下でのサンプルを、このような条件下で本発明のポリヌクレオチドにアニールする核酸プライマーと接触させ、そしてアニールしたポリヌクレオチドを増幅させ、その結果ポリヌクレオチドが増幅される場合、本発明のポリヌクレオチドは、サンプル中に検出されることも包含しうる。

30

【0275】

一般に、本発明のポリペプチドを検出する方法は、サンプルを、複合体を形成するのに十分な期間、ポリペプチドと複合体に結合および形成する化合物と接触させ、そしてその複合体を検出し、その結果複合体が検出される場合、本発明のポリペプチドが、サンプル中に検出されることを包含しうる。

【0276】

詳細には、このような方法は、試験サンプルを、本発明の1つまたはそれより多くの抗体または1つまたはそれより多くの核酸プローブとインキュベートし、そして試験サンプル内の成分に対する核酸プローブまたは抗体の結合について分析することを包含する。

40

【0277】

核酸プローブまたは抗体を、試験サンプルとインキュベートする条件は変化する。インキュベーション条件は、アッセイに使用されるフォーマット、使用される検出方法、および本アッセイで使用される核酸プローブまたは抗体の型および特性による。当業者は、一般に利用可能なハイブリダイゼーション、増幅または免疫学的アッセイフォーマットのいずれか1つが、本発明の核酸プローブまたは抗体を使用するのに十分に適合されうることを認識する。このようなアッセイの例は、Chard, T., An Introd

50

ion to Radioimmunoassay and Related Techniques, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1986); Bullock, G. R. et al., Techniques in Immunocytochemistry, Academic Press, Orlando, FL, Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); Tijssen, P., Practice and Theory of immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands (1985)に見出されうる。本発明の試験サンプルは、細胞、細胞のタンパク質または膜抽出物、または唾液、血液、血清、血漿、または尿のような生物学的流動体を含む。上に記述される方法で使用する試験サンプルは、アッセイフォーマット、検出方法の特性、および分析されるべきサンプルとして使用される組織、細胞または抽出物に基づいて変化する。細胞のタンパク質抽出物または膜抽出物を製造する方法は、当業界で周知であり、そして利用される系に適合性があるサンプルを得るために、十分に適合されうる。

【0278】

本発明の別の実施態様では、本発明のアッセイを行うために必要な試薬を含有するキットが提供される。特に、本発明は、閉鎖抑制中に、(a)本発明のプローブまたは抗体の1つを包含する第一の容器；および(b)以下のもの：洗浄試薬、結合プローブまたは抗体の存在を検出する能力のある試薬の内の1つまたはそれより多くを包含する他の1つまたはそれより多くの容器を包含する1つまたはそれより多くの容器を受けるコンパートメントキットを提供する。

【0279】

詳細には、コンパートメントキットは、試薬が別個の容器に含まれるあらゆるキットを含む。このような容器は、小型ガラス容器、プラスチック製容器またはプラスチックまたは紙のストリップを含む。このような容器は、サンプルおよび試薬が交差混入されず、そして各容器の剤または溶液が、1つの区分から別のものに定量的形態で添加されるように、1つの区分から別の区分に試薬を十分に移動させるものを可能にする。このような容器は、試験サンプルを許容する容器、アッセイで使用する抗体を含む容器、洗浄試薬を含む容器（リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝液など）、および結合した抗体またはプローブを検出するために使用される試薬を含む容器を含む。検出試薬の型は、標識核酸プローブ、標識二次抗体、または代替で、一次抗体が標識される場合、標識抗体と反応する能力のある酵素的または抗体結合試薬を含む。当業者は、本発明の開示されるプローブおよび抗体が、当業界で周知である樹立されたキットフォーマットの内の1つに十分に組込まれることを十分に認識する。

【0280】

(5.12.3 医療用画像)

KIRHy1およびそのフラグメントを認識するKIRHy1抗体は、KIRHy1を発現する部位の医療用画像に有用である。このような方法は、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、²¹²Biを含めたラジオアイソトープのような標識または画像剤の化学的付着、医薬上許容しうる担体での対象に対する標識抗体およびフラグメントの投与、および標的部位でのインビボで標識抗体およびフラグメントを画像化することを含む。放射性標識抗-KIRHy1抗体またはそのフラグメントは、リンパ腫または白血病のようなKIRHy1発現癌のインビボ画像で、特に有用でありうる。このような抗体は、KIRHy1発現癌の転移を検出する高感度の方法を提供しうる。

【0281】

本開示を考慮する上で、当業者は、他の多くの実施態様および変形は、本発明の範囲内になされうることを評価する。したがって、本発明の広範な態様は、以下の実施例の開示

に限定されないことが意図される。

【実施例】

【0282】

(実施例1)

(ヒト細胞のcDNAライブラリーからのSEQ ID NO:1の単離)

SEQ ID NO:1の新規核酸を、標準のPCRを用いて種々のヒトcDNAライブラリーから得、ハイブリッド形成配列形成解析、およびSanger配列決定技術によって配列決定した。ライブラリーの挿入物を、挿入物に隣接しているベクター配列に対して特異的なプライマーを用いてPCRにて増幅した。これらの配列を、ナイロン膜上にスポットし、オリゴヌクレオチドプライマーで検索し、配列形跡を得た。クローンを、同様または同一の配列の群内で集め、単独の代表クローンを、ゲル配列決定のために、各群より選別した。増幅した挿入物の5'配列を、典型的なSanger配列決定プロトコールにて、リバースM13配列決定プライマーを用いて推定した。PCR産物を精製し、蛍光色素ターミネーターサイクル配列決定にかけた。単一ゲル通過配列決定を、377 Applied Biosystems (ABI) シークエンサーを用いて実施した。これらの挿入物は、このライブラリーからは先には得られておらず、好適なデータベースにて先には報告されていない新規の配列であった。この配列は、添付配列表にて、SEQ ID NO:1として指定されている。

10

【0283】

(実施例2)

(SEQ ID NO:2の集団)

本発明の新規核酸 (SEQ ID NO:2) を、上記実施例1にて記述した方法によって、種々のcDNAライブラリーから得、いくつかの場合は、1つまたはそれ以上の好適データベースより得た。最終配列を、シードとして、EST配列を用いてあわせた。ついで、再帰的アルゴリズムを用いて、この集団に帰属する異なるデータベース (すなわち、EST配列を含むHyseqのデータベース、dbEST、gbpri、およびUniGene) よりさらなる配列を引いてくることによって、シードを、拡張集団に広げた。集団を拡張しうる上記データベースより、さらなる配列がなくなった場合に、アルゴリズムを終了した。構成要素配列の、集団への包含は、300より大きなBLASTスコア、および95%以上のパーセント同一性を持つ、拡張集団に対するBLASTNヒットに基づいた。

20

30

【0284】

(表1)

【0285】

【表1】

配列番号	U.S.S.N.09/631, 451における対応する配列番号	U.S.S.N.09/491, 404における対応する配列番号	受託番号	記述	Smith-Watermanスコア	同一性パーセント
3	156	2882	AJ010101	Homo sapiens IRC1a (NK 細胞 IRC1a 遺伝子)	334	37

40

(実施例3)

(KIRHy1ポリヌクレオチドの組織発現解析およびクロモソーム局在)

ハイブリッド形成によるスクリーニングから確立されたHyseq独占データベースより、SEQ ID NO:2が、以下のヒト組織/細胞cDNAに発現していることがわかった。

【0286】

(表2)

【0287】

【表 2】

ライブラリー名	陽性クローンの数	ライブラリー内のクローンの総数	組織起源
LUC001	26	210372	白血球
ASP001	3	32114	成人脾臓
LUC003	2	30296	白血球
SPLc01	6	110573	脾臓
FLG001	1	28154	全器官
ALG001	1	28271	成人肺
CLN001	1	28708	結腸
UTR001	1	29595	子宮
ABR001	1	30163	成人脳
BMD002	2	75816	骨髄
LGT002	4	158948	肺腫瘍
PLA003	1	80877	胎盤
DGD004	1	91423	リンパ球／骨髄腫
THMc02	1	96791	胸腺
SIN001	1	142562	全器官
STM001	1	181899	骨髄
AOV010	1	259409	卵巣
FLS002	1	709733	胎児肝臓／脾臓

10

SEQ ID NO: 2 に相当する遺伝子は、ヒトゲノム配列での BLAST 解析によって、ヒトクロモソーム 17 にマップされた。

【0288】

20

(実施例 4)

(KIRHy1 mRNA は、B - 細胞系列および組織にて高く発現している)

図 3 は、B - 細胞系列、健康な組織、および B 細胞リンフォーマから由来する腫瘍組織、濾胞性リンパ腫、およびミエローマから由来した mRNA の相対的発現を示している。

【0289】

組織および細胞系列から由来したトータル mRNA を、定量的リアル - タイム PCR (TaqMan) (参考文献にて本明細書に組み込まれている、Simpson, et al., Molec. Vision, 6: 178 - 183 (2000)) にかき、KIRHy1 mRNA の相対的発現を決定した。細胞系列 (ATCC、Manassas, VA から得た) トータル mRNA を、標準のプロトコルを用いて単離した。細胞株は、急性骨髄性白血病 (AML193)、急性骨髄性白血病 (AM565)、急性骨髄性白血病 (KG1)、再生不良性巨大 T 細胞リンホーマ (L5664)、B 細胞リンホーマ (RA1)、慢性骨髄性白血病 (K562)、びまん性巨大 B 細胞リンホーマ (L22601)、びまん性リンパ腫グレード II / III (L5856)、組織球性リンホーマ (U937)、ホジキンスリンホーマ (HD5664)、巨大 B 細胞リンホーマ (DB)、非ホジキンスリンホーマ (RL)、および形質細胞腫から由来した。

30

【0290】

腫瘍組織から由来した mRNA を、腫瘍から単離した悪性 B 細胞から調製した。腫瘍試料は、B 細胞リンホーマ (H02 - 85T、H02 - 86T、H02 - 87T、H02 - 88T、H02 - 89T)、濾胞性リンホーマ (H02 - 74T、H02 - 75T、H02 - 76T、H02 - 77T、H02 - 78T)、およびミエローマ (H02 - 79T、H02 - 80T、H02 - 81T、H02 - 82T、H02 - 83T、H02 - 84T) を患っている異なる患者より得た。伸張因子 1 をコードしている DNA 配列を、全ての試料中の、陽性対照および標準化因子として使用した。全てのアッセイを、二重で行い、得られた値を平均化した。y - 軸は、KIRHy1 mRNA の相対発現を示しており、もっとも低い発現が、1 と等しく設定し、残りの値を、1 に対する相対値として表している。

40

【0291】

図 3 は、B リンホーマ、すなわちリンパ節および小腸によって産出されるか、または浸潤する、組織を除いて、健康な組織では、KIRHy1 遺伝子の発現は相対的にほとんど

50

ないことを示している。結果によって、K I R H y 1 は、A M L および 瀰漫性リンホーマにてもっとも高くアップレギュレートされていることが示され、このことは、K I R H y 1 が、これらの型の疾病に対する治療標的として、または診断標的として使用しうることを示唆している。

【0292】

(実施例5)

(K I R H y 1 - 特異的抗体の産出)

K I R H y 1 を発現している細胞を、K I R H y 1 に対する抗体を用いて同定する。ポリクローナル抗体は、ウサギまたは他の宿主への、D N A ワクチン化によって、またはペプチド抗原の注入によって産出される。ウサギのような動物を、B S A (ウシ血清アルブミン) または K L H (キーホール リンベット ヘモシアニン) のような担体タンパク質に共役した K I R H y 1 の細胞外領域からのペプチドで免疫する。このウサギを、まず、完全フロイトアジュバント中の共役ペプチドで免疫化し、続いて、非完全フロイトアジュバント中の共役ペプチドの注射によって、2週間ごとブースターショットする。抗 K I R H y 1 抗体を、A f f i - G e l 10 (バイオ・ラド (B i o - R a d) に共役した K I R H y 1 ペプチドを用いて、ウサギ血清よりアフィニティー精製し、0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水中で保存する。

10

【0293】

そのようなポリクローナル抗体の1つを、S E Q I D N O : 3 のアミノ酸残基 294 ~ 305 に相当する、アミノ酸配列 G l u - G l u - P r o - T h r - G l u - T y r - S e r - T h r - I l e - S e r - A r g - P r o (S E Q I D N O : 11) を持つ免疫原性 K I R H y 1 に共役した K L H を用いて作製した。抗 - K I R H y 1 ペプチドポリクローナル抗体を、本明細書では、10458a と呼ぶ。10458a が、K I R H y 1 - 特異的であることを決定するために、V5 / H i s タグ化 K I R H y 1 をコードしているベクター (p I n t r o n - K I R H y 1、N u v e l o I n c .) を、哺乳動物 C O S - 7 細胞内に導入した。非トランスフェクト細胞と、K I R H y - 1 含有細胞のタンパク質抽出物のウェスタンブロット解析を、10458a を第一抗体として、ホースラデュッシュペルオキシダーゼ - 標識化抗 - ウサギ抗体 (ドンキー抗 - ウサギ I g G) を第二抗体として用いて実施した。およそ 48 k D のバンドが、K I R H y 1 含有細胞にて検出され、対照細胞では検出されなかったことは、10458a が、K I R H y 1 に対して特異的であったことを示していた。

20

30

【0294】

モノクローナル抗体を、アジュバントあり、またはなしで、K I R H y 1 ペプチドをマウスに注射することによって産出する。つづいて、マウスを、適切な免疫応答が同定されるまで (典型的には 1 ~ 6 ヶ月)、2週間ごとにブーストし、免疫応答が同定された時点で、脾臓を取り出す。この脾臓を、細分化して、脾臓細胞を放出させ、齧歯類ミエローマ細胞と (ポリエチレングルコールの存在下で) 融合させる。得られた細胞 (ハイブリドーマ) を、培養液中で増殖させ、クローン選別にて抗体産出に関して選別する。抗体を、培養上清中に分泌させ、酵素免疫測定 (E L I S A) によるスクリーニングのような、スクリーニング工程を促進する。あるいは、ヒト化モノクローナル抗体を、齧歯類特異的抗体領域が、ヒトの対応物によって置換され、哺乳動物細胞内で産出される、キメラ齧歯類 / ヒトモノクローナル抗体を、遺伝子工学的に改変することによって、またはナイーブな抗体遺伝子を、ヒト抗体遺伝子で置換した、トランスジェニック「ノックアウト」マウスを用いて、上記のように、このトランスジェニックマウスを免疫することによって、のいずれかで、産出する。

40

【0295】

(実施例6)

(K I R H y 1 発現を検出するために K I R H y 1 - 特異的抗体を用いる診断方法)

白血病およびミエローマ細胞系列の発現を、抗 - K I R H y 1 ペプチドポリクローナル抗体 10458a を用いて、ウェスタンブロット解析によって検出した (ウェスタンの詳

50

細に関しては実施例 5 を参照のこと)。全ての A M L 試料および組織球性細胞系列が、K I R H y 1 発現に関して陽性であった(表 3 を参照のこと)。

【0296】

(表 3)

【0297】

【表 3 - 1】

細胞株	組織起源	KIRHy1 発現
リンパ細胞		
CA46	B リンパ球、パーキットリンパ腫	-
Daudi	B リンパ芽球、パーキットリンパ腫	+/-
GA10	B リンパ球、パーキットリンパ腫	-
HT	B リンパ芽球、びまん性混合型リンパ腫	-
Jurkat	急性 T 細胞白血病	-
Molt 4	T リンパ芽球、急性リンパ芽球性白血病	-
Ramos	B リンパ球、パーキットリンパ腫 (アメリカ人)	-

10

【0298】

【表 3 - 2】

細胞株	組織起源	KIRHy1 発現
RL	腹水症、B リンパ芽球、非ホジキンリンパ腫	-
RPMI 8226	末梢血、B リンパ球、プラズマ細胞腫、骨髄腫	+/-
U266	B リンパ球、プラズマ細胞腫、骨髄腫	+
骨髄性細胞		
AML-193	末梢血、単球、急性単球白血病 (AML FAB M5)	++++
CTV-1	ヒト急性骨髄性白血病 (AML FAB M5)	-
GDM-1	急性骨髄単芽球白血病	+++
HL60	急性前骨髄球性白血病	+
Kasumi-3	末梢血、リンパ芽球、急性骨髄芽球白血病	+++
KG-1	骨髄、急性骨髄性白血病	++++
K-562	慢性骨髄性白血病	-
ML-2	ヒト急性骨髄単球白血病 (AML FAB M4)	+
NB-4	急性前骨髄球性白血病	+
OCI-AML2	ヒト急性骨髄白血病 (AML FAB M4)	+++
THP-1	末梢血、単球、急性単球白血病	+/-
UT-7	ヒト急性骨髄性白血病 (AML FAB M7)	++
U937	組織球性リンパ腫	++++

20

30

結果は、K I R H y 1 が、急性骨髄性白血病 (A M L) および組織球性リンホーマにて高く発現されていることを示している。さらに、これらの結果は、K I R H y 1 m R N A の相対的発現と一致し (実施例 4 を参照のこと)、このことは、K I R H y 1 標的化が、これらの疾病に対する治療的処置または診断アッセイとして有用であることを示唆している。

【0299】

組織試料 (正常または急性骨髄性白血病 (A M L) 骨髄) 中での K I R H y 1 の発現を、抗 - K I R H y 1 ペプチドポリクローナル抗体、10458a を用いて検出した (実施例 5 を参照のこと)。試料を、10%ホルマリン中で組織を固定し、パラフィン包埋すること、および標準の技術で切断することによって、免疫組織化学 (I H C) 解析 (ライフ スパン バイオサイエンス社 (L i f e S p a n B i o s c i e n c e s , I n c . S e a t t l e , W A) のために調製した。切片を、10458a を用いて、続いて第二ホースラデュッシュペルオキシダーゼ (H R P) - 共役抗体とのインキュベーションを用いて染色し、H R P 酵素反応の産物によって視覚化した。表 4 で見られるように、データは、K I R H y 1 は、A M L 骨髄組織の細胞表面上で、高く発現している (5つの患者試料中5つ) を示している。正常骨髄試料の細胞表面上では、K I R H y 1 の発現は観察されなかった (5つの患者試料中5つ)。これらのデータは、K I R H y 1 発現が、A M L 組織中で見られ、K I R H y 1 m R N A の相対的発現と一致することを示している (実施例 4 を参照のこと)。

40

50

【 0 3 0 0 】

(表 4)

【 0 3 0 1 】

【 表 4 】

組織	陽性	合計
急性骨髄性白血病骨髄	5	5
正常骨髄	0	5

さらに、抗体ブロッキングアッセイを、I C Hによって実施し、解析した。正常および A M L 骨髄組織試料を、以上で言及したように、I H Cのために調製したが、しかし 1 0 4 5 8 a と試料をインキュベートする前に、1 0 4 5 8 a を、過剰な S E Q I D N O : 1 1 で前処理し、ついで上述したように処理した。試験した全ての試料 (5 中 5) において、S E Q I D N O : 1 1 が、A M L 骨髄試料中で、1 0 4 5 8 a の反応性を阻害した (表 5 を参照のこと) 。

【 0 3 0 2 】

(表 5)

【 0 3 0 3 】

【 表 5 】

組織	陽性	合計
AML骨髄	5	5
配列番号 1 1 によって阻害した A M L 骨髄	0	5
正常骨髄	0	5

血液試料中の細胞表面上の K I R H y 1 の発現を、フローサイトメトリーによって検出する。末梢血単核球 (P B M C) を、標準の技術を用いて血液試料から単離する。細胞を、氷冷 P B S で洗浄し、氷上で、K I R H y 1 - 特異的ポリクローナル抗体と、3 0 分間インキュベートする。細胞を穏やかにペレット化し、P B S で洗浄し、蛍光抗 - ウサギ抗体と共に 3 0 分間、氷上でインキュベートする。インキュベーションの後、細胞を穏やかにペレット化し、氷冷 P B S で洗浄し、0 . 1 % アジ化ナトリウムを含む P B S 中に再懸濁させ、解析まで氷上で保存する。試料を、F A C S c a l i b u r フローサイトメーター (B e c t o n D i c k i n s o n) および C E L L Q u e s t ソフトウェア ((B e c t o n D i c k i n s o n) を用いて解析する。器具の設定は、F A C S - B r i t e 検定ビーズ (B e c t o n D i c k i n s o n) を用いて決定する。

【 0 3 0 4 】

K I R H y 1 を発現している腫瘍を、^{1 2 3} I のような放射性核種に共役した K I R H y 1 - 特異的抗体を用いてイメージ化し、腫瘍を標的化するために患者に注射し、つづいて、X - 線または磁気共鳴イメージングする。

【 0 3 0 5 】

(実施例 7)

(インビトロ抗体 - 依存細胞障害性アッセイ)

K I R H y 1 - 特異的抗体の、抗体依存細胞仲介細胞傷害 (A D C C) を誘導する能力を、インビトロで決定する。A D C C は、C y t o T o x 9 6 N o n - R a d i o a c t i v e C y t o x i c i t y A s s a y (P r o m e g a , M a d i s o n , W I) (H o r n i c k e t a l . , B l o o d 8 9 : 4 4 3 7 - 4 4 4 7 , (1 9 9 7)) ならびにエフェクターおよび標的細胞を用いて実施する。末梢血単核細胞 (P B M C) または好中球多核白血球 (P M N) が、このアッセイで使用可能な、エフェクター細胞の 2 つの例である。P B M C を、F i c o l l - P a q u e 勾配遠心によって、健康な人ドナーより単離し、P M N を不連続パーコール勾配 (7 0 % および 6 2 %) を介した遠心、続いて残余赤血球を除去するための低張溶解によって精製する。A M L 細胞 (たとえば) を標的細胞として使用する。

【 0 3 0 6 】

A M L細胞を、2 %ウシ胎児血清を含むR P M I 1 6 4 0培地中に懸濁させ、 2×10^4 細胞/ウェルにて、96 - ウェルV - 底マイクロタイタープレート中にプレートする。K I R H y 1 - 特異的抗体を、個々のウェルに $1 \mu\text{g/ml}$ にて、三重に加え、エフェクター細胞を、種々のエフェクター：標的細胞比(12.5 : 1 ~ 50 : 1)で加える。プレートを、4時間37℃にてインキュベートする。ついで上清を回収し、乳酸デヒドロゲナーゼ放出を測定し、パーセント特異的溶解を、製造業者のプロトコルを用いて計算する。

【0307】

(実施例8)

(毒素 - 共役K I R H y 1 - 特異的抗体)

K I R H y 1に対する抗体を、毒素に共役させ、がんの動物モデルにおけるそのような共役物の効果を評価する。カリケアマイシンおよびカルボプラチンのような化学治療薬剤、またはリシン毒素のような毒性ペプチドを、本アプローチで使用する。抗体 - 毒素共役物を使用して、抗原を持つ細胞に特異的に、細胞障害性薬剤を標的化する。抗体 - 毒素は、これらの抗原含有細胞に結合し、レセプター仲介エンドサイトーシスによって内在化し、続いて標的化細胞を破壊する。この場合、抗体 - 毒素共役物は、A M L細胞のようなK I R H y 1 - 発現細胞を標的とし、細胞障害性薬剤を、腫瘍に伝達し、結果として腫瘍細胞の死となる。

【0308】

抗体に共役することが可能な毒素の1つの例は、カルボプラチンである。この毒素が、抗体に共役する機構は、O t a e t a l . , A s i a - O c e a n i a J . O b s t e t . G y n a e c o l . 19 : 449 - 457 (1993) に記述されている。カルボプラチン - 共役K I R H y 1 - 特異的抗体の細胞障害性を、たとえば、K I R H y 1 - 発現標的細胞(A M L細胞系列のような)を、種々の濃度の共役抗体、培地のみ、カルボプラチンのみ、または抗体のみとともにインキュベートすることによって、インビトロで評価する。抗体 - 毒素共役物は、特異的に、K I R H y 1抗原を持つ細胞を標的化し、殺し、一方で、抗原を持たない細胞、または培地のみ、カルボプラチンのみ、または抗体のみで処理した細胞は、細胞障害性を示さない。

【0309】

カルボプラチン - 共役K I R H y 1 - 特異的抗体の抗腫瘍有効性が、インビボ齧歯類腫瘍モデルで示される。5 ~ 6週齢、無胸腺ヌードマウスを、皮下に、または静脈注射を介して腫瘍を移植する。マウスを、K I R H y 1 - カルボプラチン共役物で、または非特異的抗体 - カルボプラチン共役物で処理する。K I R H y 1抗原を含むマウス中の腫瘍異種移植片が、K I R H y 1 - カルボプラチン共役物によって標的とされ、結合する。これにより、結果として、腫瘍壊死、腫瘍シュリンケージおよび処置したマウスの生存増加によって証明されるような、腫瘍細胞殺傷となる。

【0310】

他の毒素を、本技術分野にて公知の方法を用いて、K I R H y 1 - 特異的抗体に共役する。ヒト臨床試験での毒素共役抗体の例は、C M A - 676であり、カリキアミシン毒素と共役するA M L中のC D 33抗原に対する抗体である(L a r s o n , S e m i n . H e m a t o l . 38 (S u p p l 6) : 24 - 31 (2001))。

【0311】

(実施例9)

(K I R H y 1 - 特異的抗体を用いる放射免疫治療)

動物モデルを使用して、A M Lおよび組織球性リンホーマを処置するために、放射免疫治療にて、放射核種の伝達におけるベクターとして、K I R H y 1に対する抗体の効果を査定する。ヒト腫瘍を、カルシノーマ細胞株または腫瘍細胞を皮下に注射することによって、5 ~ 6週齢無胸腺マウス中で増殖させる。腫瘍を持つ動物に、(たとえば、 $30 \sim 40 \mu\text{Ci}$ の ^{131}I で標識した)放射標識抗 - K I R H y 1抗体を静脈内注射する(B e h r , e t a l . , I n t . J . C a n c e r 77 : 787 - 795 (1988))

10

20

30

40

50

。腫瘍サイズを、注射の前、および注射の後一定の基準で（すなわち毎週）測定し、処置を施さなかったマウス中の腫瘍と比較する。抗腫瘍有効性を、酸平均腫瘍容量と、誘導された増殖遅延の程度を相互に関連づけることによって計算する。腫瘍および器官の組織を確認するために、動物を、頸部脱臼によって犠牲死させ、検死する。器官を、10%ホルマリン中で固定し、パラフィン埋包し、薄く刻む。切片を、ヘマトキシリン - エオシンで染色する。

【0312】

（実施例10）

（KIRHy1 - 特異的抗体を用いる免疫治療）

動物モデルを使用して、モノクローナル抗体を用いる抗体に基づく免疫治療のための標的として、KIRHy1 - 特異的抗体の効果を評価する。ヒトAML細胞を、ナチュラルキラー細胞をなくした5～6週齢ヌードマウスの尾静脈に注射する。腫瘍増殖を防止することにおけるKIRHy1 - 特異的抗体の能力を評価するために、マウスに、腫瘍埋め込み後1または15日後いずれかで、KIRHy1 - 特異的抗体を、腹腔内注射で与え、続いて、毎日20μgまたは100μg、それぞれ1週間に1回または2回与える（Ozaki, et al., Blood 90:3179-3186 (1997)）。（ヒト腫瘍細胞によって引き起こされる免疫応答からの）ヒトIgGのレベルを、ELISAによって齧歯類血清中で測定する。

10

【0313】

AML細胞の増殖におけるKIRHy1 - 特異的抗体の効果を、³H - チミジン取り込みアッセイ（Ozaki et al., 上記）を用いて、インビトロにて試験する。細胞を、100μl / ウェル中、 1×10^5 細胞 / mlにて96 - ウェルプレート中で培養し、種々の量のKIRHy1抗体または対照IgG（～100μg / ml）と共に、24時間インキュベートする。細胞を、0.5μCi ³H - チミジン（New England Nuclear, Boston, MA）と共に18時間インキュベートし、自動細胞回収器（Packard, Meriden, CT）を用いて、ガラスフィルター上で回収する。取り込まれた放射活性を、液体シンチレーション計数器によって測定する。

20

【0314】

KIRHy1モノクローナル抗体の細胞毒性を、⁵¹Cr - 放出アッセイ（Ozaki et al., 上記）を用いて、AMLにおける補体の効果によって試験する。AML細胞を、0.1mCi ⁵¹Cr - ナトリウムクロメートによって、37℃にて1時間標識する。⁵¹Cr - 標識細胞を、種々の濃度のKIRHy1モノクローナル抗体または対照IgGと共に、氷上で30分間インキュベートする。未結合抗体を、培地で洗浄することによって除去する。細胞を、96 - ウェルプレートに分散させ、子ウサギ補体の連続希釈系列とともに、37℃にて2時間インキュベートする。上清を、各細胞より回収し、⁵¹Cr放出の量を、ガンマカウンターを用いて測定する。⁵¹Crの自然放出を、培地のみで細胞をインキュベートすることによって測定し、一方で、最大⁵¹Cr放出を、血漿膜を壊すために、1% NP - 40で細胞を処理することによって測定する。パーセント細胞障害性を、実験的および自然⁵¹Cr放出の差を、最大および自然⁵¹Cr放出の差で割ることによって測定する。

30

40

【0315】

KIRHy1モノクローナル抗体のための抗体依存細胞仲介細胞毒性（ADCC）を、標準の4時間⁵¹Cr - 放出アッセイ（Ozaki et al., 上記）を用いて測定する。SCIDマウスからの脾臓単核球細胞を、エフェクター細胞として使用し、（たとえば）組換え体インターロイキン - 2あり、またはなしで、6日間培養する。⁵¹Cr - 標識化標的AML細胞（ 1×10^4 細胞）を、種々の濃度の抗 - KIRHy1モノクローナル抗体または対照IgGと共に、96 - ウェルプレート中にプレートする。エフェクター細胞を、種々のエフェクター対標的比（12.5:1～50:1）でウェルに加える。4時間後、培養上清を除去し、ガンマカウンター中で計数する。細胞溶解のパーセンテージを以上のように決定する。

50

【0316】

(実施例11)

(免疫抑制剤としてのKIRHy1 - 特異的抗体)

動物モデルを用いて、KIRHy1 - 特異的抗体の、KIRHy1レセプターを介したシグナル伝達を阻害し、リウマチまたは他の炎症状態のような免疫疾患、または器官移植の拒絶を抑制する効果を査定する。免疫抑制を、ウマ赤血球細胞(HRBCs)とともにマウスに注射し、HRBC - 特異的抗体のレベルをアッセイすることによって試験する(Yang, et al., Int. Immunopharm. 2: 389 - 397 (2002))。動物を5つの群にわけ、そのうち三つの群に、10日間、抗-KIRHy1抗体を注射し、2群にはなんの処置もしない。2つの実験群と1つの対照群に、 $5 \sim 10 \times 10^7$ HRBCsを含むイーグルバランス塩溶液(RBSS)、またはEBSSのみのいずれかを注射する。抗-KIRHy1抗体処置を、1つの群で続け、一方で他の群には、抗体処置をおこなわない。6日後、全ての動物を、レトロオービタル穿刺出血させ、つづいて頸椎脱臼および脾臓除去する。脾臓細胞上清を調製し、解析のために遠心によって血清を除去する。

10

【0317】

免疫抑制を、HRBC - 特異的抗体を産出しているB細胞の数によって測定する。Igアイソタイプ(たとえばIgM、IgG1、IgG2など)を、IsotypeTM Isotyping キット(Stratagene, La Jolla, CA)を用いて決定する。一旦Igアイソタイプがわかったならば、HRBCsに対する齧歯類抗体を、ELISA手順を用いて測定する。96 - ウェルプレートに、HRBCsにてコートし、動物より単離した、抗-HRBC抗体 - 含有血清と共にインキュベートする。プレートを、アルカリホスファターゼ - 標識化第二抗体とともにインキュベートし、発色を、p - ニトロフェニルリン酸を基質として使用して、405 nmにて、マイクロプレートリーダー(SPECTRAMax 250, Molecular Devices)上で、測定する。

20

【0318】

リンパ球増殖を、それぞれTおよびB細胞活性物コンカナバリンAと、リポポリサッカライドに対する応答にて測定する(Jiang, et al., J. Immunol. 154: 3138 - 3146 (1995))。マウスを、2つの群に無作為にわけ、1つの群には、抗-KIRHy1抗体治療を7日間おこない、1つの群は対照とした。処置の終わりに、動物を頸椎脱臼によって犠牲死させ、脾臓を取り出し、脾臓細胞上清を上記のように調製する。エキソピボ試験のために、同数の脾臓細胞を使用し、一方で、インビボ試験のためには、抗-KIRHy1抗体を、実験の開始の時点で培養中に加える。細胞増殖をまた、上記の(Ozaki, et al., Blood 90: 3179 (1997))³ H - チミジン取り込みアッセイを用いてアッセイする。

30

【0319】

(実施例12)

(KIRHy1ペプチドフラグメントに対する応答での、サイトカイン分泌)

アッセイを、IgGドメインのようなKIRHy1タンパク質のフラグメントの、サイトカイン分泌を刺激する、およびNK細胞、B細胞、T細胞および骨髄細胞における免疫応答を刺激する活性を査定する。そのような免疫応答は、免疫系を刺激するため、腫瘍細胞殺傷または増殖の抑制を認識する、および/または仲介するために使用可能である。同様に、この免疫刺激は、細菌またはウイルス感染を標的とするために使用可能である。あるいは、KIRHy1レセプターを介した活性化を阻害する、KIRH1のフラグメントを、ナチュラルキラー(NK)、B、Tおよび骨髄細胞における免疫刺激を防止するために使用しうる。

40

【0320】

Igドメイン(KIRHy1 - Ig)のようなKIRHy1のフラグメントを含む融合タンパク質は、哺乳動物発現ベクター内へ、CD33リーダーペプチド、続いてヒトIg

50

G1のFc領域へ融合したKIRHy1ドメインを挿入することによって作製し、たとえば、NS-1細胞内に安定にトランスフェクトする。融合タンパク質を、培養上清内に分泌させ、これを、インターフェロン- (IFN-) 分泌アッセイ (Martin, et al., J. Immunol. 167: 3668-3676 (2001)) のような、サイトカインアッセイでの使用のために回収する。

【0321】

PBMCsを、次善濃度の可溶性CD3および種々の濃度の、精製、可溶性抗-KIRHy1モノクローナル抗体または対照IgGで活性化する。KIRHy1-Igサイトカインアッセイのために、5または20μg/mlでの抗-ヒトFc Igを、96-ウェルプレートに結合させ、4 にて一晚インキュベートする。過剰な抗体を除去し、KIRHy1-Igまたは対照Igいずれかを、20~50μg/mlで加え、4時間室温にてインキュベートする。細胞および抗CD-3を種々の濃度まで加える前に、プレートを洗浄して、過剰な融合タンパク質を除去する。上清を、培養の48時間後に回収し、IFN- レベルを、製造業者によって推奨されたように、第一およびビオチン化第二抗-ヒトIFN- 抗体を使用して、サンドイッチELISAによって測定する。

10

【0322】

(実施例13)

(KIRHy1-特異的抗体を用いる腫瘍イメージング)

KIRHy1-特異的抗体を、インビボでのKIRHy1-発現細胞をイメージングするために使用する。6週齢無胸腺ヌードマウスを、セシウム源から400radsで放射する。3日後に、放射マウスに、 4×10^7 RA1細胞および 4×10^6 ヒト胎児肺繊維芽細胞フィーダー細胞を、大腿部皮下にて埋め込む。腫瘍が直径およそ1cmに達した時に、マウスに、 $100 \mu\text{Ci} / 10 \mu\text{g}$ の ^{131}I -標識化KIRHy1-特異的抗体を含む接種材料を、静脈内に注射する。注射後1、3および5日の時点でマウスを、0.8mg ペントバルビタールナトリウムの皮下注射にて麻酔する。ついでマウスを固定し、Nuclear MAX Plusイメージ解析ソフトウェアパッケージ (MEDX Inc. Wood Dale, IL) を用いて、5,000~10,000カウントを記録するように設定した、ピンホールコリメーターを付属するSpectrum 91カメラ (Raytheon Medical Systems)、Melrose Park, IL) にて、腹臥位にてイメージする (Hornick, et al., Blood 89: 4437-4447 (1997))。

20

30

【0323】

(実施例14)

(インビボ腫瘍モデル)

KIRHy1標的化分子の腫瘍抑制活性を、4~10匹のヌード、無胸腺オスマウスに、 10^6 細胞の、対照 (M12pcDNA)、KIRHy1発現クローン、または低発現クローンいずれかを、皮下に注射することによって試験する (その全てが参考文献にて、本明細書に組み込まれている、Spenger et al., Cancer Research 59: 2370-2375 (1999))。もっとも低いレベルのKIRHy1のクローンを、比較ベンチマークとして使用する。マウスを、体重増加/減少および腫瘍形成に関して、8週間モニタする。腫瘍容量を、式 $(l \times w^2) / 2$ (式中 l = 腫瘍の長さ、および w = 腫瘍の幅) を用いて計算する (Id.)。

40

【0324】

腫瘍形成の比較のためにKruskal-Wallis法、腫瘍用量を比較するためにMann-Whitney U検定を用いる統計学的解析を実施して、群間で統計学的有意さを決定する。

【0325】

8週間後、マウスを犠牲死させ、腫瘍を除去し、0.1%コラゲナーゼ (I型) および50μg/ml DNase (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ) で消化する。分散した細胞を、ITS培地/5%FB

50

S 中、 $\% \text{CO}_2$ 、37 にて24時間プレートし、接着させる。24時間後、培養液を血清を含まない培地に変更する。細胞が分裂し、培地およびRNAを回収し、ウエスタン免疫ブロットおよびノザンブロットを実施して、KIRHy1を検出する。

【0326】

(実施例15)

(細胞増殖および遊走のインビトロアッセイ)

AML細胞の増殖における、KIRHy1 - 特異的抗体または治療ペプチドの効果を、³H - チミジン取り込みアッセイ(その全てが参考文献にて本明細書に組み込まれる、Ozakiet al., Blood 90:3179-3186(1997))を用いて、インビトロにて試験する。腫瘍細胞を、100 μ l/ウェル中、 1×10^5 細胞/mlにて、96 - ウェルプレート中で培養し、種々の量の抗体または対照IgG($\sim 100 \mu\text{g/ml}$)と共に、24時間インキュベートする。細胞を、0.5 μCi ³H - チミジン(New England Nuclear, Boston, MA)と共に、18時間インキュベートし、自動細胞回収期(Packard, Meriden, CT)を用いて、ガラスフィルター上で回収する。取り込まれた放射活性を、液体シンチレーション計数器を用いて測定する。

【0327】

細胞遊走を、24 - ウェル、6.5 - mm内部直径Transwell培養プレート(Corning Coastar, Cambridge, MA)中で実施する。簡単に記すと、 10^5 細胞/75 μ lを、フィブロネクチン(5 μM) - コートポリカーボネート膜(8 - μm ポアサイズ)上にのせ、トランスウェルの二つのチャンバーを分ける(その全てが参考文献にて本明細書に組み込まれる、Tai et al., Blood 99:1419-1427(2002))。抗-KIRHy1抗体あり、または無しの培地を、Transwell培養プレートの下チャンバーに加える。8~16時間後、下チャンバーに誘導する細胞を、CoulterカウンターZBI(Becton Dickinson Coulter)を用い、ヘマトサイトメーターによって計数する。

【0328】

(実施例16)

(AMLに関する臨床試験)

免疫治療を用いるAML臨床試験の例に関して、その全てが参考文献にて本明細書に組み込まれる、Larson, Semin. Hematol. 38(Suppl 6):24-31(2001)を参照のこと。低分子を用いる臨床試験の例に関しては、その全てが参考文献にて本明細書に組み込まれる、Fiedler et al., Blood 102:2763-2767(2003)、O'Farrell et al., Clin. Cancer Res. 9:5465-5476(2003)、Ohno et al., J. Clin. Oncol. 8:1907-1912(1990)を参照のこと。

【0329】

研究の最初に、十分な肝臓および腎臓機能を持つ、AMLと認められる患者を、KIRHy1 - 陽性であることを確認する。患者を、生理学的用量の抗-KIRHy1標的化薬剤で処置し、副作用、毒性に関して、および最終応答基準に関して試験する。末梢血数を示す完全血液数を、最初の4日間毎日、そして最初の2週間は2日ごと、そして、残りの研究の間は1週間に2回測定する。骨髓試験を、第一週の後、そして残りの研究の間、二週間ごとにおこなう。安全性査定には、副作用および致命的兆候の評価、血液学的試験、生化学的試験、尿検査、および身体検査が含まれる。毒性は、国立がん研究所(National Cancer Institute)のCommon Toxicity Criteriaにしたがってグレード分けする。応答基準には、従来の基準を用いる完全緩解、完全な血小板回復無しであるが、もはや血小板輸血に依存しない完全緩解が含まれる。基準には、5%芽球、末梢血フリー芽球、9g/dL以上または等しいヘモグロビン、 $1500/\mu\text{l}$ と等しいか、それ以上の好中球絶対数、輸血非イオン性、および $100,000/\mu\text{l}$ と等しいか、それ以上の血小板数からなる骨髓からなる。

【図面の簡単な説明】

【 0 3 3 0 】

【図１】図１は、配列番号２によってコードされるタンパク質、KIRHy 1のBLAST Pアミノ酸配列（すなわち配列番号３）とヒトナチュラルキラー（NK）抑制性レセプター前駆体（配列番号８）とを並べた図であり、配列番号３のアミノ酸配列全体に渡って、これら二つの配列が９４％の類似性および９４％の同一性を有していることを示している。

【図 2】図 2 は、配列番号 2 によってコードされるタンパク質、K I R H y 1 の B L A S T P アミノ酸配列（すなわち配列番号 3）とヒト C M R F 3 5 様タンパク質（C M R F 3 5 白血球様レセプターに類似）（配列番号 9）とを並べた図であり、配列番号 3 の 1 4 9 個のアミノ酸全体に渡って、これら二つの配列が 8 9 % の類似性および 8 9 % の同一性を有していることを示している。

【図 3】図 3 は、健常な組織、急性単球性白血病（AML193）、急性脊髄性白血病（AML565）、急性骨髄性白血病（KG1）、未分化大細胞型 T 細胞リンパ腫（L5664）、B 細胞リンパ腫（RA1）、慢性骨髄性白血病（K562）、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（L22601）、等級 II / III の濾胞性リンパ腫（L5856）、組織球性リンパ腫（U937）、ホジキンリンパ腫（HD5664）、大細胞型 B 細胞リンパ腫（DB）、非ホジキンリンパ腫（RL）、および形質細胞腫（RPMI）由来の細胞系、ならびに B 細胞リンパ腫（H02-85T、H02-86T、H02-87T、H02-88T、H02-89T）、濾胞性リンパ腫（H02-74T、H02-75T、H02-76T、H02-77T、H02-78T）、および骨髄腫（H02-79T、H02-80T、H02-81T、H02-82T、H02-83T、H02-84T）由来の腫瘍組織での（RT-PCR で決定した）KIRHy1 mRNA の発現を相対的に示す図である。

【 図 1 】

配列番号3キラー細胞1g様レセプター様ポリペプチド(KIRHy1)とヒトNK抑制性レセプター前駆体(配列番号8)のBLASTP配列

対象配列	KIR2P1 (数値 3)	対象配列	gi 20502982 NK 補助性T細胞-前駆体 (Homo sapiens)
番号配列	(配列番号 8)		
長さ	= 290		
スニア	= 574 ビット (1480), 類似性	= 61-63	
同一性	= 288/305 (94%),	隔行	= 288/305 (94%), ギャップ = 15/305 (4%)
融合配列	1	MLLLTLLFLFLFSLGYSIVQTQITPTVNLGRSGITVQCVCYRSWHTYLVKMCWCAINR	60
対象配列	1	MLLLTLLFLFLFSGYSTQITQPTTPTVNLGRSGITVQCVCYRSWHTYLVKMCWCAINR	
融合配列	61	DKCLIKVTSQSQRVKRDRSVIKKQNKRTPTVFMEDLNKTDADTYGCIKTKTNDGLVDT	120
対象配列	61	DKCLIKVTSQSQRVKRDRSVIKKQNKRTPTVFMEDLNKTDADTYGCIKTKTNDGLVDT	
融合配列	121	QVITDIPASTFAPPTPTVFSTTDFVPTQESTSSPTTGSHLDNRHLLKLKLSVLLPFTI	180
対象配列	121	QVITDIPA PVTEQTS PTTGSHLDNRHLLKLKLSVLLPFTI	
融合配列	181	LLLLLVAASLLARMKKYQCKAAGMSPQVLQFLPBGELCYADTLQLAGSPFRKATKLS	240
対象配列	166	LLLLLVAASLLARMKKYQCKAAGMSPQVLQFLPBGELCYADTLQLAGSPFRKATKLS	
融合配列	241	SAQDVQVVEVYVTASLPKRDYSVASITLGAARDGSPFTYCNMHLSSHLPGRGPPEPTYS	300
対象配列	226	SAQDVQVVEVYVTASLPKRDYSVASITLGAARDGSPFTYCNMHLSSHLPGRGPPEPTYS	
融合配列	301	TISRP 305	
対象配列	286	TISRP 290	

【 図 2 】

配列番号3キラー細胞1g様レセプター様ポリペプチド(KIRHy1)とヒトCMRF35様タンパク質(配列番号9)のBLASTP配列

```

対照配列: KIR1y1 ( 配列番号 3 )
対照位置: gl|213010138 CR2P15 白血球抗原/Dロビン1様レセプター [Homo sapiens] ( 配列番号 9 )に類似

長さ      = 194

スコア     = 272 ビット (695),      期待値     = 9e-72
同一性     = 133/149 (89%),      隔間性     = 133/149 (89%),      ギャップ   = 15/149 (10%)

対照位置: 15  GYSIVLTGPTVTWGLERGSILVQCVVRSGHETYLKWCRCRAIWRDKILVKTSGSGE 74
                  GYSI  TGPTVTWGLERGSILVQCVVRSGHETYLKWCRCRAIWRDKILVKTSGSGE
対照位置: 18  GYSIATIGPTVTWGLERGSILVQCVVRSGHETYLKWCRCRAIWRDKILVKTSGSGE 77
                  GYSIATIGPTVTWGLERGSILVQCVVRSGHETYLKWCRCRAIWRDKILVKTSGSGE

対照位置: 75  VKRDVRVSKNGKGRKTFVTVMEDLMDTADYVCGIEKTKNDLGVTVQVTDIPASTP 134
                  VKRDVRVSKNGKGRKTFVTVMEDLMDTADYVCGIEKTKNDLGVTVQVTDIP
対照位置: 78  VKRDVRVSKNGKGRKTFVTVMEDLMDTADYVCGIEKTKNDLGVTVQVTDIP----- 130
                  VKRDVRVSKNGKGRKTFVTVMEDLMDTADYVCGIEKTKNDLGVTVQVTDIP-----

対照位置: 135  TYSITFTAPVTQETSSSEPTLGHLDN 163
                  TYSITFTAPVTQETSSSEPTLGHLDN
対照位置: 131  -----APVTCETSSSEPTLGHLDN 151
                  -----APVTCETSSSEPTLGHLDN

```

FIGURE 2

FIGURE 1

【図 3】

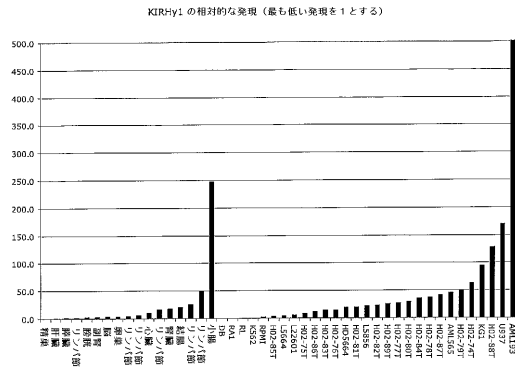


FIGURE 3

【配列表】

2007512836000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年3月16日(2007.3.16)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号11のポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】

DNA配列である、請求項1に記載のポリヌクレオチド。

【請求項3】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項4】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項5】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含むように遺伝子的に操作された、宿主細胞。

【請求項6】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含むように遺伝子的に操作された宿主細胞であって、該宿主細胞内のポリヌクレオチドの発現を調節する調節配列に作動可能に結合された、宿主細胞。

【請求項7】

配列番号 11 のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 8】

配列番号 11 に特異的に結合する、抗体。

【請求項 9】

前記抗体がモノクローナル抗体またはその抗体フラグメントである、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体がポリクローナル抗体またはその抗体フラグメントである、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

前記抗体が 12434a である、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 12】

急性骨髄性白血病 (AML) を引き起こす細胞に特異的な抗 KIRHy1 抗体を含み、該抗体が配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する、薬学的組成物。

【請求項 13】

前記抗体がモノクローナル抗 KIRHy1 抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

前記抗体が放射性同位体で標識された、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

前記抗体が毒素で標識された、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

前記抗体が AML を引き起こす細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害するのに有効な量である、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

AML を引き起こす細胞で KIRHy1 タンパク質を標的化するための組成物であって、該組成物は、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する抗 KIRHy1 抗体である、組成物。

【請求項 18】

AML を引き起こす KIRHy1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための組成物であって、該組成物は、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する抗 KIRHy1 抗体であり、ここで、該組成物は、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で該細胞に投与するのに適している、組成物。

【請求項 19】

AML を引き起こす KIRHy1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための組成物であって、該組成物は KIRHy1 抗原を含み、ここで、該組成物は、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で該細胞に投与するのに適している、組成物。

【請求項 20】

AML を引き起こす KIRHy1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための組成物であって、該組成物は、組換えベクター内に KIRHy1 またはその免疫原性フラグメントをコードする核酸を含み、ここで、該組成物は、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で該細胞に投与するのに適している、組成物。

【請求項 21】

AML を引き起こす KIRHy1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための組成物であって、該組成物は、組換えベクター内に KIRHy1 またはその免疫原性フラグメントをコードする核酸を含む抗原提示細胞を含み、ここで、該組成物は、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で該細胞に投与するのに適し

ている、組成物。

【請求項 22】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための組成物であって、該組成物は、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する低分子を含み、ここで、該組成物は、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で該細胞に投与するのに適している、組成物。

【請求項 23】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための組成物であって、該組成物は、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する非 K I R H y 1 ポリペプチドを含み、ここで、該組成物は、該癌細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するのに有効な量で該細胞に投与するのに適している、組成物。

【請求項 24】

請求項 17 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物であって、前記細胞が、第二の治療剤と接触する、組成物。

【請求項 25】

請求項 17 または 18 に記載の組成物であって、前記抗 K I R H y 1 抗体組成物が、約 0 . 1 m g / k g 体重 ~ 約 1 0 m g / k g 体重の投薬範囲を達成するのに有効な量で投与するのに適している、組成物。

【請求項 26】

請求項 17 ~ 23 のいずれか一項に記載の組成物であって、前記薬学的組成物が、薬学的に受容可能なキャリアとともに滅菌調製物で投与されるのに適している、組成物。

【請求項 27】

A M L からなる群より選択される癌を診断を補助する方法であって、以下：

- a) 細胞上の K I R H y 1 タンパク質の発現を検出または測定する工程；および
- b) 該発現を正常な組織と比較する工程、

を包含する、方法。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の方法であって、前記発現が K I R H y 1 m R N A の発現である、方法。

【請求項 29】

請求項 27 に記載の方法であって、前記発現が抗 K I R H y 1 抗体を使用して検出または測定される、方法。

【請求項 30】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における抗 K I R H y 1 抗体の使用であって、該抗体が、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する、使用。

【請求項 31】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における、K I R H y 1 抗原の使用。

【請求項 32】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における、組換えベクター内の、K I R H y 1 またはその免疫原性フラグメントをコードする核酸の使用。

【請求項 33】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における、K I R H y 1 またはその免疫原性フラグメントをコードする核酸を組換えベクター内に含む抗原提示細胞の使用。

【請求項 3 4】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する低分子の使用。

【請求項 3 5】

A M L を引き起こす K I R H y 1 発現細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害するための医薬の調製における、配列番号 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはその免疫原性フラグメントに特異的に結合する非 K I R H y 1 ポリペプチドの使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/11171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07H 21/02		
US CL : 536/23.1		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
U.S. : 536/23.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2002/0182671 A1 (LAL et al) 05 December 2002 (05.12.02).	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z"
"E"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&"
Date of the actual completion of the international search 05 May 2005 (05.05.2005)		
Date of mailing of the international search report 01 SEP 2005		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		
Authorized officer Sheila J. Huff Telephone No. 571272-1600		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/1171

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation 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.: 1-6
- Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/11171

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-6, drawn to polynucleotide encoding SEQ ID NO. 11.

Group II, claim(s) 7, drawn to SEQ ID NO. 11.

Group III, claim(s) 8-11, drawn to antibodies to SEQ ID NO. 11.

Group IV, claim(s) 12-18, 24-26, 30 (as they read on antibodies), drawn to methods of targeting/killing KIRHy1 on cells that cause AML using antibodies to KIRHy1 (SEQ ID NO. 3).

Group V, claim(s) 19, 24, 26, 31 (as they read on KIRHy1 antigen), drawn to method of killing the growth of KIRHy1-expressing cells that cause AML using a KIRHy1 antigen.

Group VI, claim(s) 20-21, 24, 26, 32-33 (as they read on vectors), drawn to method of killing the growth of KIRHy1-expressing cells that cause AML using a vector.

Group VII, claim(s) 22, 24, 26, 34 (as they read on small molecule), drawn to drawn to method of killing the growth of KIRHy1-expressing cells that cause AML using a small molecule.

Group VIII, claim(s) 23-24, 26, 35, drawn to drawn to method of killing the growth of KIRHy1-expressing cells that cause AML using a non-KIRHy1 peptide.

Group IX, claim(s) 27-28, drawn to method of diagnosing cancer by detecting the expression of KIRHy1 using mRNA.

Group X, claim(s) 27 and 29, drawn to method of diagnosing cancer by detecting the expression of KIRHy1 using anti-KIRHy1 antibodies.

The inventions listed as Groups I-X do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Each of the products of Groups I-III differ structurally and functionally and this lack the same or corresponding special technical feature. Each of the methods of Groups IV-X require the use of different products. The product required in Group IV is an antibody, in Group V is an KIRHy1 antigen, in Group VI a

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/42 (2006.01)	C 0 7 K 16/42	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	E
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 43/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
	G 0 1 N 33/574	D

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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

(72)発明者 エムテージ, ピーター シー. アール.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 7, サニーベイル, サウス ニッカーボッカー
ドライブ 8 7 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA61 BA63 BA80 CA04 CA09 CA12 CA20
DA01 DA02 DA05 DA11 DA12 GA11 HA13 HA14 HA20
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QQ91 QR08 QR32
QR35 QR40 QR42 QR48 QR55 QR56 QR62 QS16 QS25 QS33
QS34 QS36 QX01 QX02
4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA58X AA72X AA87X AA94X AA94Y AB01 BA01 BA30 CA24
CA43 CA44 CA46
4C084 AA02 AA12 AA13 BA02 BA22 CA18 NA14 ZB27
4C085 AA14 AA27 BB01 BB11 CC03 CC21 CC23 EE01
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20 EA28
EA50 FA71 FA72 FA74

专利名称(译)	使用表达杀伤细胞免疫球蛋白样受体样蛋白的细胞的靶向治疗和诊断方法		
公开(公告)号	JP2007512836A	公开(公告)日	2007-05-24
申请号	JP2006542548	申请日	2004-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	贝罗J公司		
申请(专利权)人(译)	Nubero公司		
[标]发明人	エムテージピーターシーアール		
发明人	エムテージ, ピーター シー. アール.		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 C07K14/46 C07K14/705 C07K16/00 C07K16/28 C07K16/18 C07K16/42 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N5/06 A61K39/395 A61P35/02 A61K51/00 A61K48/00 A61K38/00 G01N33/53 G01N33/574 C12N5/07 C12N5/077 C12N5/078 C12N5/09		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A C07K14/46 C07K14/705 C07K16/00 C07K16/28 C07K16/18 C07K16/42 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.E A61K39/395.T A61P35/02 A61K43/00 A61K48/00 A61K37/02 G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/574.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/GA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA12 4C084/AA13 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/NA14 4C084/ZB27 4C085/AA14 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	10/727012 2003-12-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

属于癌细胞类型的几种细胞如KIRHy等可以表达KIRHy的mRNA。提供了一种通过靶向KIRHy多肽，编码KIRHy多肽的核酸和抗KIRHy抗体来杀死或抑制表达KIRHy蛋白的癌细胞生长的方法。描述了治疗和诊断与表达KIRHy蛋白的细胞相关的疾病的方法，例如急性髓性白血病（AML）。

配列番号	U.S.S.N.09/631, 451における対応する配列番号	U.S.S.N.09/491, 404における対応する配列番号	受託番号	記述	Smith-Watermanスコア	同一性パーセント
3	156	2882	AJ010101	Homo sapiens TRC1a (NK細胞TRC1a遺伝子)	334	37