

(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2005-532256  
(P2005-532256A)

(43) 公表日 平成17年10月27日(2005.10.27)

(51) Int.C1.<sup>7</sup>

F 1

テーマコード(参考)

**A61K 45/00**

A 61 K 45/00

4 C 084

**A61K 39/395**

A 61 K 39/395

D

4 C 085

**A61K 45/06**

A 61 K 39/395

N

**A61P 29/00**

A 61 K 45/06

**A61P 43/00**

A 61 P 29/00 1 O 1

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-543537 (P2003-543537)	(71) 出願人	504108989 イミュネツクス・コーポレイション アメリカ合衆国、カリフォルニア・913 20-1799、サウザンド・オース、 ワン・アムジエン・センター・ドライブ
(86) (22) 出願日	平成14年11月12日 (2002.11.12)	(71) 出願人	305029852 アーム、ジヨナサン・ピー
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月12日 (2004.7.12)		アメリカ合衆国、マサチューーセツ・02 115、ボストン、ワン・ジミー・ファン ド・ウェイ、スマス・リサーチ・ビルディ ング、プリガム・アンド・ウイミンズ・ホ スピタル、ルーム・638・ピー
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/036372		
(87) 國際公開番号	W02003/041650		
(87) 國際公開日	平成15年5月22日 (2003.5.22)		
(31) 優先権主張番号	60/335,899		
(32) 優先日	平成13年11月14日 (2001.11.14)		
(33) 優先権主張國	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】慢性関節リウマチを治療するためのLIR機能の調節

## (57) 【要約】

本発明は、LIR-2、LIR-3及びLIR-7を特異的に標的とする薬剤1つ以上を投与することにより慢性関節リウマチ(RA)を治療する方法に関する。ここに開示された結果は、滑膜組織に浸潤する白血球の活性化の制御に、これらの3つのLIRが関係しているかもしれないことを示している。従って、RA患者の関節における炎症は、炎症を起こした関節に存在する単球又はマクロファージの活性化を減少させるかもしくは排除するため、又はそれらの炎症部位への動員を減少させるため、LIR-2及び/又はLIR-3及び/又はLIR-7の発現又は機能を調節する薬剤を投与することにより改善され得る。これは、刺激シグナルを伝達するLIR-7を調節することにより、かつ/又は誘起された場合に阻害効果を発揮するLIR-2及び/もしくはLIR-3を調整することにより、又はこれらのLIRのうちの2つもしくは3つ全てを同時に調節することにより、達成され得る。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

L I R - 2 及び / 又は L I R - 3 及び / 又は L I R - 7 の発現又は機能を調節する薬剤 1つ以上を治療的に有効な量患者に投与することを含む、慢性関節リウマチを有する患者を治療する方法。

**【請求項 2】**

該治療が、L I R - 7 の活性に拮抗する薬剤を該患者へ投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

該治療が、L I R - 2 に作用する薬剤を該患者へ投与することを含む、請求項 1 に記載 10 の方法。

**【請求項 4】**

該治療が、L I R - 3 に作用する薬剤を該患者へ投与することを含む、請求項 1 に記載 の方法。

**【請求項 5】**

該治療が、L I R - 3 に作用する薬剤と L I R - 7 に拮抗する薬剤； L I R - 2 に作用する薬剤と L I R - 7 に拮抗する薬剤； L I R - 2 に作用する薬剤と L I R - 2 に作用する薬剤； L I R - 2 に作用する薬剤と L I R - 2 に作用する薬剤と L I R - 7 に拮抗する薬剤：からなる群より選択される薬剤の組み合わせを該患者へ同時に投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。 20

**【請求項 6】**

該 L I R - 7 のアンタゴニストが、L I R - 7 と特異的に免疫反応性であるアンタゴニスト性抗体である、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 7】**

該 L I R - 2 のアゴニストが、L I R - 2 と特異的に免疫反応性であるアゴニスト性抗体である、請求項 3 に記載の方法。

**【請求項 8】**

該 L I R - 3 のアゴニストが、L I R - 3 と特異的に免疫反応性であるアゴニスト性抗体である、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 9】**

該患者が、T N F アンタゴニスト、I L - 1 アンタゴニスト、C D 4 に対する抗体、非ステロイド性抗炎症薬、鎮痛薬及び疾患修飾性抗リウマチ薬からなる群より選択される付加的な薬物少なくとも 1 つにより同時に治療される、請求項 1 に記載の方法。 30

**【請求項 10】**

L I R - 2 と特異的に免疫反応性であるアゴニスト性モノクローナル抗体、L I R - 3 と特異的に免疫反応性であるアゴニスト性モノクローナル抗体及び L I R - 7 と特異的に免疫反応性であるアンタゴニスト性モノクローナル抗体からなる群より選択される薬剤 1 つ以上を治療的に有効な量患者に投与することを含む、慢性関節リウマチを有する患者を治療する方法。

**【発明の詳細な説明】****【背景技術】****【0 0 0 1】**

慢性関節リウマチ (R A) は、関節周囲の軟骨及び骨の破壊を伴う、滑膜肥厚及び滑膜パンヌス形成を特徴とする慢性炎症性滑膜炎である (T a k , P P , A r t h r i t i s & R h e u m a t i s m 4 3 ( 1 2 ) : 2 6 1 9 - 3 3 ( 2 0 0 0 ) )。炎症部位に見出される優勢な炎症細胞は、マクロファージ (A型滑膜細胞) 及び纖維芽細胞様細胞 (B 型滑膜細胞)、並びに増加した数の好中球、肥満細胞、ナチュラルキラー細胞、形質細胞及びリンパ球である (Le i r i s a l o - R e p o ら、I n f l a m m a t i o n 1 7 ( 4 ) : 4 2 7 - 4 2 ( 1 9 9 3 ) ; G o t i s - G r a h a m I 及び M c N e i l H P , A r t h r i t i s & R h e u m a t i s m 4 0 ( 3 ) : 4 7 9 - 8 9 ( 1 9 50

97) ; Maloneら、Arthritis & Rheumatism 30(2) : 1  
 30 - 37 (1987) ; Bromley M及びWoolley DE, Arthritis & Rheumatism 27 : 857 - 63 (1984) ; Jeffreis R.、British Medical Bulletin 51(2) : 312 - 31 (1995) )。これらの細胞は、脂質メディエーター (Elmgreenら、Ann Rheum Dis 46 : 501 - 05 (1987) ; Moilanen E.、Pharmacol Toxicol 75 (Suppl 2) : 4 - 8 (1994) )、炎症前 (pro-inflammatory) サイトカイン (Firesteinら、J Immunol 144 : 3347 - 53 (1990) ; Westacottら、Ann Rheum Dis 49 : (9) 676 - 81 (1990) ; Alvaro-Graci 10  
 iaら、J Clin Invest 86 : 1790 - 98 (1990) ; Brennanら、Br J Rheumatol 30 (Suppl 1) : 76 - 80 (1991) ) 及び組織分解酵素 (Hembryら、Ann Rheum Dis 54 (1) : 25 - 32 (1995) ; Taylorら、Ann Rheum Dis 53 (1) : 768 - 72 (1994) ) のような多数の因子を放出することにより、炎症及び組織破壊を促進するようである。

## 【0002】

滑膜マクロファージは、インターロイキンIL-1 及び腫瘍壞死因子TNF (これらは、これらのサイトカインを標的とした疾患修飾療法の効力により立証されるように、RAの病原を中心とする) の優勢な起源である (Feldmann M及びMaini RN、Ann Rev Immunol 19 : 163 - 96 (2001) )。RAにおける関節破壊は、マクロファージ及び破骨細胞に由来するプロテアーゼによって媒介される可能性が高い。リウマチ滑膜における活性化された白血球の存在に関する証拠は豊富に存在するが、それらの活性化の (1つ以上の) メカニズム及び制御はよく理解されていない。

## 【0003】

「白血球免疫グロブリン様受容体 (leucocyte immunoglobulin-like receptors)」(LIR) 又は「免疫グロブリン様転写物 (immunoglobulin-like transcript)」(ILT) と名付けられた新しいタンパク質のファミリーは、炎症及び免疫応答に関与している様々な細胞の表面上に発現している。このファミリーのメンバーは、細胞質尾部に存在するイムノレセプターチロシンベースドインヒビトリーモチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) (ITIM) によって、又は「イムノレセプターチロシンベースドアクチベーションモチーフ (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)」すなわち「ITAMモチーフ」を含有している他のタンパク質との細胞膜における会合によって、細胞応答を調整することがインピトロで示されている (Armら、J Immunol 159 : 2342 (1997) ; Fangerら、Eur J Immunol 28 : 3423 - 34 (1998) ; Borgesら、J Immunol 159 : 5192 - 96 (1997) ; Samaridoss J 及び Colonna M, Eur J Immunol 27 : 660 - 65 (1997) ; WO98/48017 ; 米国特許第6,140,076号；及びWO00/68383)。

## 【0004】

LIRによって制御される細胞性応答の範囲は、インピトロで研究されている。LIR-1又はLIR-2によるMHCクラスI分子の認識は、NK細胞活性及びT細胞細胞障害性を阻害することが示された (例えば、Colonnaら、J Exp Med I 186 : 1809 - 18 (1997) ; Fangerら、1998を参照)。阻害性のLIR-1、LIR-2、LIR-3又はLIR-5のBCR、TCR、FcR又はMHCクラスI分子のような活性化受容体との同時ライゲーション (co-ligation) は、活性化分子によって誘発されるCa<sup>2+</sup>流動及び後続の下流イベントを阻害した (C 40  
 50

Cellaら、J Exp Med 185:1743-51; Colonnaら、1997; Colonnaら、1998; 及び Saverinoら、J Immunol 165:3742-55 (2000)。これらのイベントは、LIR-1のT細胞受容体との相互作用に関して最近解明された (Dietrichら、J Immunol 166:2514-21 (2001))。

## 【0005】

LIR及び関連分子が、炎症状態における白血球の活性化のしきい値及び/又は程度を決定するかもしれないことが示唆された。この概念は、LIRとの類似性を有するタンパク質であるgp49B1の破壊を有するマウスにおける最近の研究により支持されている (Daheshiaら、J Exp Med 189:309-318 (2001))。

10

## 【0006】

LIR-1、2、3、5及び8を含む阻害性LIRは、2個から4個のITIMを含有している長い細胞質ドメインを示す。「ILT4」又は「MIR10」としても既知のLIR-2は、3個のITIMモチーフを含有しており、HLA-A、HLA-B及びHLA-C対立遺伝子を含むMHCクラスIタンパク質の多様なアレイに結合する (Fangerら、1998)。LIR-1及びLIR-2は、広い特異性でクラスI分子と相互作用し、HLA-A、B、C及びHLA-G内の対立遺伝子を認識することが知られている (Colonnaら、1998; Cosmanら、Immunity 7:273-82 (1997); Banhamら、J Leukocyte Biol 65:841-45 (1999))。阻害性LIRが細胞活性化の阻害を媒介する1つの手段は、非受容体チロシンキナーゼカスケードを介するシグナリングを阻害するか又は終結させるため、srcホモロジー2 (SH2) ドメイン含有ホスファターゼ1 (SHP-1) を動員することによる (例えば、Cellaら、1997; Colonnaら、1997; Colonnaら、J Immunol 160:3096-3100 (1998); 及び Dietrichら、J Immunol 166:2514-21 (2001) を参照)。

20

## 【0007】

LIR-6a、LIR6b及びLIR-7を含む活性化LIRは、短い細胞質ドメイン、及びFc RIとの会合を容易にし得る膜貫通ドメイン内の正電荷を有するアルギニン残基を特徴とする。LIR-7は「ILT1」とも呼ばれる。LIR-7自体は、かなり短い細胞質尾部を含有しているが、細胞膜においてFc受容体ガンマ鎖 (Fc RI) と特異的に会合する (Nakajimaら、J Immunol 162:5-8 (1999))。このFc受容体ガンマ鎖は、ITAMを含有している細胞質尾部を有しており、従って刺激シグナルを伝達することができる。Fc RIは、他のタンパク質、即ちFc R及び活性化NK細胞受容体のためのシグナリングパートナーを務めることが知られている。ナカジマらは、LIR-7が、会合したタンパク質Fc RIを使用して、刺激シグナルを変換するよう細胞を活性化するということを提唱している。Fc RIとの会合を容易にし得るLIR-7の膜貫通ドメイン内の正電荷を有するアルギニン残基。ナカジマらは、トランスフェクトされたLIR-7を発現しているラット好塩基球性白血病細胞 (RBL細胞) におけるセロトニン放出をLIR-7が誘起し得ることを示すことにより、細胞活性化を媒介するLIR-7の能力を証明した。セロトニン放出は、細胞表面LIR-7を架橋する抗体に細胞を曝すことにより誘起された。さらに、このグループは、LIR-7の架橋が、初代単球、LIR-7発現ベクターにより形質転換されたP815細胞、及びトランスフェクトされたRBL細胞 (Nakajimaら、1999) を含むいくつかの細胞型において、細胞内カルシウム移動を誘発することを証明した。カルシウムの移動は、単球活性化における初期のイベントである。

30

## 【0008】

LIR-1、LIR-2、LIR-5及びLIR-7の細胞分布は、モノクローナル抗体を使用して詳細に研究されている。LIR-1は、全ての末梢血単球、インビトロで派生した樹状細胞及びマクロファージ、B細胞、並びにT細胞及びNK細胞のサブセットに発現している (Samaridisら、1997; Cosmanら、1997)。より限

40

50

定された細胞分布が、LIR-2及びLIR-5に関して報告されており、それらは単球及び樹状細胞において最も顕著である(Colonnaら、1998)。LIR-7は、全ての末梢血単球及び顆粒球、インビトロで派生したマクロファージ、並びに樹状細胞に発現している(Nakajimaら、1999)。mRNAレベルでは、LIR-3及びLIR-6の転写物は単球及びB細胞に検出され、LIR-4の転写物はB細胞、NK細胞及び単球に検出され、LIR-8の転写物はNK細胞にのみ検出された(Borgesら、1997; Armら、1998)。従って、LIR発現の治療的な調節は、有望な探求分野である。

#### 【発明の開示】

##### 【0009】

LIR-2、LIR-3及びLIR-7を特異的に標的とする薬剤1つ以上を投与することによりRAを治療する方法が、ここで提供される。ここに開示された結果は、これらの3つのLIRが、滑膜組織に浸潤する白血球の活性化の制御に関係しているかもしれないことを示している。従って、RA患者の関節における炎症は、炎症を起こした関節に存在する単球もしくはマクロファージの活性化を減少させるもしくは排除するため、又はそれらの炎症部位への動員を減少させるため、LIR-2及び/又はLIR-3及び/又はLIR-7の発現又は機能を調節する薬剤を投与することにより改善され得る。これは、刺激シグナルを伝達するLIR-7を調節することにより、かつ/もしくは誘起された場合に阻害効果を発揮するLIR-2及び/もしくはLIR-3を調節することにより、又はこれらのLIRのうちの2つもしくは3つ全てを同時に調節することにより、達成され得る。

##### 【0010】

RAを有する患者は、LIR-2又はLIR-3に結合するアゴニスト性薬剤を有効量投与するか、又はこれらのタンパク質の各々に結合するアゴニストを同時に投与し、それによりそれらの阻害活性を誘起することにより、本発明に従い治療される。LIR-2アゴニスト及び/又はLIR-3アゴニストのRA患者への投与は、患者における滑膜単球内のカルシウム移動を減少させる。本発明の好ましい実施形態において、その薬剤は、LIR-2と特異的に免疫反応性であるアゴニスト性抗体である。もう1つの好ましい実施形態において、その薬剤は、LIR-3と特異的に免疫反応性であるアゴニスト性抗体である。モノクローナル抗体が好ましい。好ましくは、モノクローナル抗体は、可変部がげつ歯動物由来し、残部がヒト由来するヒト化抗体である。より好ましくは、モノクローナル抗体は完全にヒトのものである。他の実施形態において、LIR-2又はLIR-3アゴニストは、小さい有機分子である。

##### 【0011】

本発明のもう1つの局面において、RA患者は、LIR-7の生物学的活性に拮抗する薬剤により治療される。そのような薬剤は、LIR-7が誘起されるのを部分的又は完全に阻止し、従って炎症を起こした関節の部位においてそれが単球又はマクロファージを活性化するのを防止する。RA患者へのLIR-7アンタゴニストの投与は、患者における滑膜単球から放出されるカルシウムの量を減少させる。本発明の1つの局面において、薬剤は、LIR-7と特異的に免疫反応性であるアンタゴニスト性抗体であり、即ち、その抗体はLIR-7に特有のエピトープと特異的に結合する。そのような抗体は、阻止抗体であり、LIR-7のそのリガンドとの結合を阻止する。好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。好ましい実施形態において、モノクローナル抗体はヒト化抗体であり、もう1つの好ましい実施形態において、モノクローナル抗体は完全にヒトのものである。もう1つの実施形態において、LIR-7アンタゴニストは、LIR-7の細胞外領域がヒト免疫グロブリンタンパク質のFc領域に連結されている融合タンパク質を含む、LIR-7の細胞外領域を含む可溶性ポリペプチドである。さらに他の実施形態において、LIR-7アンタゴニストは小さい有機分子である。LIR-7アンタゴニストは、単独で、又はLIR-2及び/もしくはLIR-3のアゴニストと一緒に投与され得る。

##### 【0012】

10

20

30

40

50

本発明の他の局面は、互いに同時に投与されるか、又は L I R - 7 に拮抗する薬剤と同時に投与される L I R - 2 及び / 又は L I R - 3 を誘起するアゴニスト性薬剤の様々な組み合わせによる R A の同時治療を含む治療法を提供する。これには、以下の組み合わせのうちの 1 つの同時投与を含む治療が含まれる： i ) L I R - 3 に作動する (agonize) 薬剤と L I R - 7 に拮抗する (antagonize) 薬剤； ii ) L I R - 2 に作動する薬剤と L I R - 3 に作動する薬剤； iii ) L I R - 2 に作動する薬剤と L I R - 3 に作動する薬剤； iv ) L I R - 2 に作動する薬剤と L I R - 3 に作動する薬剤と L I R - 7 に拮抗する薬剤。好ましくは、そのような薬剤は、ヒト化抗体又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。他の好ましい薬剤は、L I R - 2 及び / もしくは L I R - 3 に作動するか、又は L I R - 7 に拮抗する、小さい有機分子である。さらに、前記の L I R 調節剤を、慢性関節リウマチを治療するために使用される他の薬物療法の同時使用と組み合わせた治療法が、提供される。

10

20

30

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0013】

L I R - 2 、 L I R - 3 及び L I R - 7 が、 R A を有する患者の滑膜に浸潤している白血球にディファレンシャルに発現していることが、免疫組織化学的技術を使用して、ここで示される。R A 患者とは、1つ以上の炎症を起こした関節又は敏感な関節を有しており、血清がリウマチ因子陽性と判定された人々である。R A 患者に見られるもののような炎症応答は、阻害シグナル及び活性化シグナルの複雑なネットワークによって制御されている可能性が高い。従って、L I R - 2 、 L I R - 3 又は L I R - 7 の R A 滑膜における発現を調節する薬剤の投与を含む治療法が、ここで提供される。本発明の1つの実施形態において、開示された治療的処置は、非 R A 患者（対照組織）と比較して上昇したレベルの L I R - 2 、 L I R - 3 又は L I R - 7 を発現している滑膜組織を有する R A 患者に投与される。これらのタンパク質のレベルが上昇しているか否かを決定するためには、滑膜生検に由来する組織が、これらの L I R に対する抗体による染色により分析される。L I R - 2 、 L I R - 3 又は L I R - 7 の生物学的活性を阻害又は増強する薬剤は、ここで、「L I R 調節剤」と呼ばれる。

20

##### 【0014】

ここに開示された観察は、L I R - 2 、 L I R - 3 及び L I R - 7 が、 R A を有する患者の滑膜に浸潤している白血球には上昇したレベルで発現しているが、骨関節炎（O A ）を有している患者の滑膜においては上昇していないことを示している。R A は炎症を媒介する白血球の滑膜組織への広範な浸潤を特徴とするが、O A は通常炎症には関連していない慢性変性性状態である。開示された観察はまた、L I R - 2 、 L I R - 3 及び L I R - 7 の発現が、疾患の初期段階にある R A 患者より、確立された纖維症を有する R A 患者の方が低いことを示している。一般に、纖維症は、罹患年数が長い R A 患者においてのみ発症する。例えば、罹患年数が 8 年以上である者は、関節纖維症を発症している可能性が高い。本発明の1つの実施形態において、L I R 調節剤は、関節が纖維症になっていない R A 患者に投与される。

30

##### 【0015】

ここで使用されるように、L I R - 2 という用語には、配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びにこのタンパク質の生物学的特性を有している異型及びミューテイン（muttein）が包含される。配列番号 2 に示された L I R - 2 は、アミノ酸 1 ~ 16 に 16 アミノ酸のシグナルペプチドを含む 458 アミノ酸（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 458 ）の予想された細胞外領域を有している。この L I R - 2 は、配列番号 2 のアミノ酸 459 ~ 483 に膜貫通ドメイン、及び配列番号 2 のアミノ酸 484 ~ 598 を含む細胞質ドメインも含んでいる。細胞外ドメインは、4 個の免疫グロブリン様ドメインを含んでおり、細胞質ドメインはアミノ酸 531 ~ 536 、 560 ~ 565 及び 590 ~ 595 に 3 個の I T I M モチーフを含んでいる。

40

##### 【0016】

「L I R - 2 」という用語には、ここで使用されるように、配列番号 2 に示された L I

50

R - 2 のアミノ酸 17 ~ 458との少なくとも 90%のアミノ酸配列同一性、又はより好ましくは少なくとも 95%、又は最も好ましくは少なくとも 98%のアミノ酸配列同一性を有し、かつ配列番号 2 に示されたアミノ酸配列を有する LIR に関連した生物学的活性も有するポリペプチドも含まれる。そのような生物学的活性の一例は、MHC クラス I ポリペプチドとの結合能である。LIR - 2 ポリペプチドの MHC I との結合能は、細胞表面上に発現された MHC クラス I タンパク質との LIR - 2 ポリペプチドの結合を検出する アッセイ のような任意の便利なアッセイにより決定され得る。結合の特異性は、推定 LIR - 2 が、MHC I を発現していることが既知の細胞と結合するのを、MHC I に特異的な抗体が阻止し得るか否かをテストすることにより確認され得る。そのようなテストに使用され得る細胞及び細胞系には、CB23、HSB2、MP - 1、ジャーカット (Jurkat)、初代 T 細胞、初代 B 細胞又は初代 NK 細胞のような、MHC I を発現している任意の細胞が含まれる。

## 【0017】

LIR - 2 の MHC I との結合を検出するのに適しているアッセイは、参照して完全にここに組み込まれる WO98 / 48017 に記載された フローサイトメトリー アッセイ である。簡単に説明すると、このアッセイを実施するには、まず、MHC I を発現している細胞を、FACS バッファー (2% FCS を含む 0.2% アジ化物含有 PBS) により洗浄し、次いで、約  $10^5$  個に等分した細胞を、プロッキングバッファー (2% FCS、5% NG S、5% ウサギ血清を含む PBS) 100 μL 中で約 1 時間インキュベートする。各細胞試料に、増加する量 (例えば、0、2、5 又は 10 μg) の対照血清又は W6 / 32 (ATCC HB - 95) を含むプロッキングバッファー 100 μL を添加する。W6 / 32 とは、HLA - A、B 及び C ポリペプチドを含む MHC クラス I 重鎖に特異的な抗体であり、この抗体とのプレインキュベーションは、他のタンパク質の MHC I との特異的結合を競合的に阻止する。W6 / 32 又は対照血清の添加の後、試料を約 1 時間氷上でインキュベートし、次いで、FACS バッファー 200 μL で約 3 回洗浄する。次に、LIR - 2 ポリペプチド約 5 μg を添加する。このアッセイのための LIR - 2 ポリペプチドは、ヒト IgG 免疫グロブリンタンパク質の Fc 領域に連結された LIR - 2 の細胞外領域を含む可溶性融合タンパク質 (sLIR - 2 / Fc) である。sLIR - 2 / Fc ポリペプチドを含むプロッキングバッファーを各試料に添加し、その混合物を約 1 時間氷上でインキュベートする。sLIR - 2 / Fc とのインキュベーションの後、細胞を FACS バッファーで数回洗浄し、ヒト IgG の Fc 領域と特異的に免疫反応性であるビオチン標識マウス抗体 (Jackson Research Laboratories より入手可能) 及び SAPE (ストレプトアビジン - フィコエリトリン; Molecular Probes より入手可能) により約 45 分間処理する。SAPE は、抗ヒト Fc / ビオチンのビオチン部分と結合し、適切な励起条件及び放射条件に曝された場合に蛍光を発する蛍光性化合物である。従って、ビオチン化抗ヒト Fc が、細胞と結合した sLIR - 2 / Fc と反応し、代わって SAPE が抗ヒト Fc のビオチン部分と結合する。sLIR - 2 / Fc が結合した細胞を検出するため、LIR - 2 / Fc、抗ヒト Fc 及び SAPE に曝された細胞を FACS バッファーで洗浄し、SAPE 標識細胞を検出するためフローサイトメトリーに供する。sLIR - 2 / Fc が細胞と結合するが、それが W6 / 32 によって競合的に防止される場合、このことは、sLIR - 2 / Fc が MHC I との特異的結合が可能であることを示す。

## 【0018】

ここで使用されるようなアミノ酸配列同一率は、同一である整列化されたアミノ酸の数を、比較される 2 つの配列のより短い方のアミノ酸の総数によって割ることにより決定される。配列を整列化し配列の同一性及び可変性を決定するための多数のコンピュータプログラムが、商業的に入手可能である。これらのプログラムは、前述の同一性の定義に基づく同一性情報を提供する。1 つの適切なコンピュータプログラムは、Devereuxら (Nucleic Acids Res. 12 : 387, 1984) によって記載された、ウィスコンシン大学ジェネティクスコンピューターグループ (University of

10

20

30

40

50

Wisconsin Genetics Computer Group) (UWGCG) より入手可能なGAPプログラム(バージョン6.0)である。GAPプログラムは、Smith及びWaterman(Adv. Appl. Math 2:482, 1981)によって改訂されたような、Needleman及びWunsch(J. Mol. Biol. 48:443, 1970)の整列化法を利用する。GAPプログラムのための好ましいデフォルトパラメータは、以下のものを含む：(1)アミノ酸のための単項比較マトリックス(同一に対する1及び非同一に対する0の値を含有)及びSchwartz及びDayhoff編，Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, 353~358頁, 1979によって記載されたようなGribskov及びBurgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986の加重比較マトリックス；(2)各ギャップに対する3.0のペナルティ及び各ギャップ内の各シンボルに対するさらに0.10のペナルティ；並びに(3)エンドギャップに対するペナルティなし。配列操作のための、GCGコンピュータパッケージの一部としてやはりウィスコンシン大学より入手可能である、BESTFITと呼ばれるもう1つの類似のプログラムも、これらの比較に有用である。

## 【0019】

ここで使用されるような「LIR-2」という用語は、さらに、配列番号1に示されたヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされたポリペプチドを指す。そのような核酸分子には、一本鎖DNA及び二本鎖DNAが含まれる。等価であるが、「T」が「U」に置換されている配列を有するRNA分子も含まれる。そのような核酸によってコードされたLIR-2ポリペプチドは、MHC Iとの結合能を有する。

## 【0020】

「LIR-2」という用語には、配列番号2に示されたLIR-2によって示される生物学的活性を保有しており、かつ中程度にストリンジエント又は高度にストリンジエントな条件の下で配列番号1に示されたヌクレオチド配列を有する核酸分子とハイブリダイズすることができる相補鎖を有する核酸分子によってコードされるポリペプチドも含まれる。高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件は、不適正な塩基対の形成を最小限に抑えるために設計されている。ハイブリダイゼーション条件のストリンジエンサーに影響する基本パラメータ及び適切な条件を考案するための案内は、Sambrook, J.、E. F. Fritsch及びT. Maniatis(1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., チャプター9及び11；並びにCurrent Protocols in Molecular Biology, 1995, F. M. Ausubelら編, John Wiley & Sons, Inc., セクション2.10及び6.3~6.4)に記述されている。ハイブリダイゼーションは、溶液中で、又はニトロセルロースもしくはナイロンフィルターのような固体表面へ標的核酸を固定することにより実施され得る。テストすべきDNAが、標識され、変性させられ、ハイブリダイゼーション反応におけるプローブとして使用される。所望のストリンジエンサーの程度の条件は、例えばDNAの長さ及び/又は塩基組成に基づき、当業者によって容易に決定され得る。フィルターに結合した標的DNAのための中程度にストリンジエントな条件を達成する1つの様式は、5×SSC、0.5%SDS、1.0mM EDTA(pH 8.0)を含有している予備洗浄溶液、6×SSCを含有しているハイブリダイゼーションバッファー、及び約68のハイブリダイゼーション温度を使用し(又は、50%ホルムアミド及び6×SSCを含有しているハイブリダイゼーションバッファー、並びに約42のハイブリダイゼーション温度を使用し)、次いで、0.5×SSC及び0.1%SDSを含有しているバッファー中で約60でフィルターを洗浄することを含む。「SSC」(1×)とは、0.15M NaCl、0.015M クエン酸Na(pH 7.0)である。一般に、高度にストリンジエントな条件は、約68で0.2×SSC/0.1%SDS中で洗浄工程が

10

20

30

40

50

実施されることを除き、前記と同様に定義される。所望により、S S P E (  $1 \times$  S S P E は、 $0.15\text{M}$  NaCl、 $10\text{mM}$  NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 及び $1.25\text{mM}$  EDTA ( pH 7.4 ) )が、上記ハイブリダイゼーションバッファー及び洗浄バッファー中のSSCの代わりに使用されてもよく、SDSは、ストリンジエンシーに影響することなく、増加させられてもよいし、又はハイブリダイゼーションバッファーもしくは洗浄バッファーのいずれかから省略されてもよい。これらの核酸によってコードされたLIR-2タンパク質が保有している生物学的活性には、以下のうちの1つ以上が含まれる：MHCクラスIタンパク質と結合する能力；誘起時に、活性化された単球における細胞内カルシウム流動を減少させる能力；及び誘起時に、活性化された単球における細胞内リン酸化チロシンのレベルを減少させる能力。

10

## 【0021】

さらに、本発明に係るLIR-2ポリペプチドには、MHC Iに結合することができ、かつ配列番号2に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチドと特異的に免疫反応性である抗体と免疫反応性であるタンパク質が含まれる。LIR-2と特異的に免疫反応性の抗体とは、他のタンパク質との認め得る程度の結合を示さないものである。例えば、LIR-2に特異的な抗体は、LIR-3又はLIR-7とは結合しない。特異的抗体を作製する方法は、この技術分野において周知であり、後述の方法のような任意の適切な方法が、そのような抗体を作製するために使用され得る。一般に、そのような抗体と反応するLIR-2ポリペプチドは、配列番号1に示されたヌクレオチド配列を有する核酸とストリンジエントな条件の下でハイブリダイズすることができる核酸によってコードされる。

20

## 【0022】

ここで使用されるように、「LIR-3」という用語には、配列番号4に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びにこのタンパク質の生物学的特性を有する異型及びミューテインが含まれる。配列番号4のLIR-3ポリペプチドは、例えば、配列番号3に示されたヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされ得る。「LIR-3」という用語には、少なくとも90%、又はより好ましくは少なくとも95%、又は最も好ましくは少なくとも98%の配列番号4とのアミノ酸配列同一性を有しており、さらに配列番号4に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチドによって発現される生物学的活性を保有している異型も含まれる。そのような生物学的活性には、活性化された単球における細胞内カルシウム流動を減少させる能力、及び活性化された単球に存在するタンパク質内のリン酸化チロシンの量を減少させる能力が含まれる。同一率は、前記のようにして決定される。配列番号4に提示されたLIR-3アミノ酸配列は、アミノ酸1～16のシグナルペプチドを含む、アミノ酸1～443を含有している細胞外ドメイン；アミノ酸444～464を含む膜貫通ドメイン；及びアミノ酸465～631を有する細胞質ドメインを有している。配列番号4のLIR-3ポリペプチドの細胞外領域は、4つの免疫グロブリン様(Ig様)ドメインを含有しており、その細胞質領域は2つのITIMモチーフ対を含有している。配列番号4において、最初のITIMモチーフ対は、アミノ酸512～517、541～546に位置しており、第二の対は、アミノ酸593～598及び623～628に位置している。従って、ここで使用されるように、「LIR-3」という用語には、細胞外領域に4個のIg様ドメイン、細胞質尾部に4個のITIMモチーフを有しており、かつ配列番号4に示されたアミノ酸配列を有するLIR-3によって示される生物学的活性を少なくとも1つ有しているポリペプチドが含まれる。本発明に係るLIR-3ポリペプチドは、このタンパク質を発現している単球におけるカルシウム放出を抑制する阻害性の刺激を伝達することができる。

30

## 【0023】

LIR-2及びLIR-3は、阻害性タンパク質である。これらのタンパク質の生物学的活性には、活性化された単球を阻害する能力が含まれる。LIR-2又はLIR-3のこの活性をアッセイするための1つの方法においては、まず、単球を抗CD64抗体に曝すことにより活性化する。この活性化には、これらの細胞における細胞内カルシウム放出及びタンパク質上のチロシン残基のリン酸化が伴う。LIR-2及びLIR-3は活性化

40

50

された単球の表面上に発現される。これらの単球上の L I R - 2 又は L I R - 3 の誘起は、例えば、L I R - 2 又は L I R - 3 のいずれかに特異的なアゴニスト性抗体に細胞を曝すことにより達成され得る。いくつかの場合において、誘起は、細胞表面上に発現された L I R の架橋をもたらす、抗 L I R 抗体と反応する二次抗体を添加することも含む。この架橋は、L I R - 2 又は L I R - 3 の阻害機能を誘起し、それにより、下記のようにしてアッセイされ得る、減少したカルシウム流動をもたらす。

#### 【 0 0 2 4 】

「L I R - 7」という用語には、配列番号 6 に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びにこのタンパク質の生物学的特性を有する異型及びミューテインが包含される。10 配列番号 6 に提示されたアミノ酸配列は、アミノ酸 1 ~ 4 4 9 を含む細胞外ドメイン、アミノ酸 1 ~ 1 6 のシグナルペプチド、アミノ酸 4 5 2 の電荷を有するアルギニン残基を含むアミノ酸 4 5 0 ~ 4 6 8 を含む膜貫通ドメイン及びアミノ酸 4 6 9 ~ 4 8 3 の短い細胞質ドメインを有している。細胞外ドメインは、4 個の免疫グロブリン様ドメインを含んでいる。

#### 【 0 0 2 5 】

本発明の 1 つの局面において、L I R - 7 ポリペプチドは、配列番号 5 に示されたヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされる。さらに、「L I R - 7」という用語には、番号 5 に示されたヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖と中程度にストリンジエント又は高度にストリンジエントな条件の下でハイブリダイズすることができる核酸によってコードされ、さらに、配列番号 6 に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質が保有している生物学的活性を有しているポリペプチドが包含される。20 ハイブリダイゼーション条件は、前記と同様に定義される。

#### 【 0 0 2 6 】

本発明に係る L I R - 7 ポリペプチドは、刺激能を保有している（例えば、N a k a j i m a ら、1 9 9 9 参照）。L I R - 7 ポリペプチドの誘起は、ラット好塩基球性白血病細胞からのセロトニン放出を刺激し、このタンパク質を発現している初代単球又は他の細胞からのカルシウム放出を刺激する。カルシウム放出は、単球活性化の測定可能な指標であり、例えば個々の細胞における細胞質カルシウムレベルをモニタリングするためのナカジマらのアッセイ（1 9 9 9）を使用して検出され得る。このアッセイを実施するためには、細胞に、I n d o - 1 AM 色素（S i g m a , S t . L o u i s , M O ）を負荷し、以前に記載されたような（C o l o n n a ら、1 9 9 7 及びN a k a j i t a ら、30 1 9 9 9 参照）フローサイトフルオロメーターで分析する。簡単に説明すると、L I R - 7 を架橋する抗体の添加のために分析を休止する前に、基線を取得する。架橋は、一般に、L I R - 7 に対するモノクローナル抗体、及び抗 L I R - 7 抗体を生成させた動物種に由来する I g G に対する抗体を添加することを必要とする。分析は、フローサイトメトリーによって、負荷された I n d o - 1 色素の 4 0 5 / 5 2 5 スペクトル放射比率を測定することからなる。

#### 【 0 0 2 7 】

セロトニン放出は、L I R - 7 活性を測定するために使用され得るもう 1 つの指標である。セロトニン放出は、C o l o n n a ら、1 9 9 7 に以前に記載されたようにしてアッセイされる。簡単に説明すると、細胞を、H<sup>3</sup> - セロトニン（5 - ヒドロキシトリプタミン）でパルス処理し、洗浄し、次いでセロトニンに対する抗体及び細胞表面上の L I R - 7 を架橋する抗体又は自発的放出に関して補正するための対照抗体のいずれかと接触させる。セロトニン放出は、以下の式に従い計算される：セロトニン放出率（%） = 1 0 0 × ([ c p m 試料 ] - [ c p m 自発的放出 ]) / ( c p m 全)。40

#### 【 0 0 2 8 】

ここで使用されるような「L I R - 2」という用語には、配列番号 2 によるアミノ酸配列を有するポリペプチドと特異的に結合する抗体と免疫反応性であり、さらに、配列番号 2 に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質に特徴的な生物学的活性を保有しているポリペプチドも包含される。ここで使用されるような「L I R - 3」という用語には、配列50

番号4によるアミノ酸配列を有するポリペプチドと特異的に結合する抗体と免疫反応性であり、さらに、配列番号4に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質に特徴的な生物学的活性を保有しているポリペプチドも包含される。「LIR-7」という用語には、配列番号6によるアミノ酸配列を有するポリペプチドと特異的に結合する抗体と免疫反応性であり、さらに、配列番号6に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質に特徴的な生物学的活性を保有しているポリペプチドが包含される。

### 【0029】

#### 治療剤

開示された治療法のために有用な治療剤には、LIR-2又はLIR-3の発現又は機能のレベルを増加させ得る非毒性の薬剤、及びLIR-7の発現又は機能のレベルを減少させ得る非毒性の薬剤が含まれる。この目的のための例示的な薬剤には、LIR-2又はLIR-3と特異的に免疫反応性のアゴニスト性抗体及びLIR-7と特異的に免疫反応性のアンタゴニスト性抗体が含まれる。他の実施形態において、治療剤は、LIR-7の細胞外領域がヒトIgG免疫グロブリンのFc領域に連結されている融合タンパク質(sLIR-7:Fc)を含む、LIR-7の細胞外領域の一部又は全部を含む可溶性ポリペプチドである。S1ir-7:Fcは、天然LIR-7の競合的阻害剤として作用する。本発明の1つの局面において、治療剤は、配列番号6のアミノ酸1~449又は17~449が前記のようなIgG1Fc領域と融合しているポリペプチドである。

### 【0030】

LIRのうちの1つに特異的な抗体を生成させるためには、完全LIR、又はLIR-2、LIR-3もしくはLIR-7の細胞外領域を含むポリペプチド、又はそれらの抗原性副次部分を抗原性刺激として使用することが可能である。LIR-2、LIR-3及びLIR-7の細胞外領域は、それぞれ、配列番号2のアミノ酸1~458、配列番号4のアミノ酸1~443及び配列番号6のアミノ酸1~449に相当する。配列番号2、4及び6のアミノ酸1~16は、LIRの成熟中に開裂されるシグナル配列に相当する。全長LIR-2、LIR-3もしくはLIR-7、又はシグナル配列を含む、もしくは含まないそれらの細胞外領域が、抗体を生成させるために使用され得る。シグナルペプチドを欠くLIR-2、LIR-3及びLIR-7の細胞外領域は、それぞれ、配列番号2のアミノ酸17~458、配列番号4の17~443又は配列番号6の17~449に相当する。さらに、そのLIRに特有の抗原性エピトープを少なくとも1つ含有しているLIR-2、LIR-3又はLIR-7の副次部分を使用して抗体を生成させることもできる。

### 【0031】

治療剤として使用するためのポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、従来の技術によって調製され得る(例えば、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennethら編, Plenum Press, New York 1980; 及びAntibodies: A Laboratory Manual, Harlow及びLand編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988参照; 米国特許第4,411,993号も参照のこと)。モノクローナル抗体を作成するための1つの例示的なプロトコルは、WO98/48017に記載されたものである。簡単に説明すると、BALB-Cマウスを、抗原性LIRポリペプチド10μgで、0週目、2週目及び6週目に免疫感作する。初回免疫感作はバキセル社(Vaxcell, Inc.)のタイターマックス(TITERMAX)アジュvantを利用し、後続の免疫感作は不完全フロイントアジュvant(IFNA)を使用する。11週目に、3μgから4μgの抗原性タンパク質を含むPBSの静脈内投与によってマウスを追加免疫する。静脈内追加免疫の3日後に、脾細胞を採取し、50%PEG1500水溶液を使用して、Ag8.653骨髄腫融合パートナーと融合させる。ハイブリドーマ細胞をスクリーニングするため、ハイブリドーマ細胞の個々のコロニーからの上清を、抗体を生成させているLIRでトランスフェクトされたCOS-1細胞に対するELISAによってスクリーニングする。このスクリー

10

20

30

40

50

ニングのためには、トランスフェクトされたCOS-1細胞 $2 \times 10^3$ 個を含むPBSを、ポリスチレン96穴マイクロタイタープレートの個々のウェルに添加し、プレートコート抗原として細胞をプレートに乾燥させる。続いて、陽性上清を、FACS分析及びLIRでトランスフェクトされたCOS-1細胞を使用したRIPによって確認する。ハイブリドーマをクローニングし、同アッセイを使用して追跡する。モノクローナル培養物を増殖し、上清を Bioread プロテインAアガロースを使用したアフィニティーコロマトグラフィーによって精製する。上記の手法の変形物は、この技術分野において既知であり、所望により、ハイブリドーマを作成又はスクリーニングするために使用され得る。

## 【0032】

本発明のモノクローナル抗体には、マウス又はラットのモノクローナル抗体のヒト化バージョンも含まれる。そのようなヒト化抗体は、既知の技術により調製され得、ヒトに投与された場合、減少した免疫原性という利点を与える。1つの実施形態において、ヒト化モノクローナル抗体は、マウス又はラットの抗体の可変部（又はその抗原結合部位のみ）、及びヒト抗体に由来する定常部を含む。あるいは、ヒト化抗体断片は、マウス又はラットのモノクローナル抗体の抗原結合部位、並びにヒト抗体に由来する（抗原結合部位を欠く）可変部断片及び定常部を含み得る。キメラモノクローナル抗体及びさらに改変されたモノクローナル抗体の作製のための手法には、リーチマン (Riechmann) ら (Nature 332: 323, 1988)、リウ (Liu) ら (PNAS 84: 3439, 1987)、ラリック (Larrick) ら (Bio/Technology 7: 934, 1989)、並びにウィンター (Winter) 及びハリス (Harris) (TIPS 14: 139, Can, 1993) に記載されたものが含まれる。抗体をヒト化するための有用な技術は、米国特許第6,054,297号にも論じられている。トランスジェニックに抗体を製造する手法は、GB2,272,440、米国特許第5,569,825号及び第5,545,806号、並びに関連特許に見出され得る。好ましくは、ヒトで使用するため、抗体はヒトのもの又はヒト化したものであり；そのようなヒト抗体又はヒト化抗体を作出するための技術も周知であり、例えばメダレックス社 (Medarex Inc.) (Princeton, NJ) 及びアブジェニクス社 (Abgenix Inc.) (Fremont, CA) より商業的に入手可能である。もう1つの好ましい実施形態において、ヒトで使用するための完全にヒトの抗体は、ヒト抗体可変ドメインのファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることにより作製される (Vaughanら、1998, Nat Biotechnol. 16 (6): 535-539；及び米国特許第5,969,108号)。

## 【0033】

LIR特異的抗体がアゴニスト性であるか又はアンタゴニスト性であるかを決定するため、スクリーニング手法が使用される。LIR-2又はLIR-3に特異的なアゴニスト性抗体は、RAを治療するための治療剤として有用であり、例えば、LIR-2又はLIR-3を発現している活性化された単球におけるカルシウム流動又はチロシンリン酸化をダウンレギュレートする能力によって特定され得る。そのようなアッセイのためには、単球を活性化し、スクリーニングされるLIR-2特異的又はLIR-3特異的な抗体の存在下又は非存在下で、前記のようにしてカルシウム流動を測定する。活性化された単球を、分析中、推定アゴニスト性抗体に曝す。RAの治療剤として有用なLIR-7に対するアンタゴニスト性抗体は、LIR-7と結合することができ、かつ単球におけるカルシウム流動を誘起し得ないことにより特定され得る。

## 【0034】

本発明の1つの局面において、治療剤として使用するためのLIR特異的抗体を生成するために使用される抗原性刺激は、ヒトIgGのFc部分及び標的LIRの細胞外領域を含む融合タンパク質である。この目的に適している1つのFcポリペプチドは、参照してここに組み込まれるPCT特許出願WO93/10151に記載されているヒトIgG1に由来する天然Fc領域ポリペプチドである。融合タンパク質を構築するためのもう1つの有用なFcポリペプチドは、米国特許第5,457,035号に記載されたFcミユ

10

20

30

40

50

ーテインである。このミューテインのアミノ酸配列は、アミノ酸 19 が L e u から A l a に変化し、アミノ酸 20 が L e u から G l u に変化し、アミノ酸 22 が G l y から A l a に変化している点を除き、WO 93 / 10151 に提示された天然 F c 配列のものと同一である。このミューテイン F c は、免疫グロブリン受容体に対する減少した親和性を示す。

### 【 0 0 3 5 】

L I R : F c 融合タンパク質を作成する 1 つの適切な手段は、WO 98 / 48017 に記載されたものである。この方法を適用するためには、L I R - 2 、 L I R - 3 又は L I R - 7 の細胞外領域の全部又は一部をコードする c D N A を、ヒト I g G F c 領域をコードする D N A と融合させる。L I R - 2 : F c 融合体を作成するためには、細胞外領域全体（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 458 ）又は M H C I と結合し得るその一部を使用することができる。L I R の細胞外領域をコードする c D N A は、細胞外領域をコードするヌクレオチド配列の両側に隣接する P C R プライマーを使用することにより得られる。この目的のためには、例えば、配列番号 1 、番号 3 又は番号 5 に示されるようなヌクレオチド配列を有する c D N A のような全長 L I R c D N A が、 P C R のための鑄型として使用され得る。本発明の 1 つの実施形態において、增幅産物が増幅された D N A 断片の 5' 及び 3' 末にそれぞれ S a l I 及び N o t I I 制限部位を導入するよう、5' 及び 3' 末端に S a l I 及び N o t I I 制限部位が挿入されたプライマーが合成される。これらの制限部位は、増幅された D N A の発現ベクターへの付着を容易にする。あるいは、他の制限部位が、増幅された D N A の末端に挿入されてもよい。本発明の好ましい実施形態において、融合タンパク質の発現のためのベクター構築物を調製するため、I g G 1 のミューテインヒト F c 領域をコードする D N A を、L I R - 2 、 L I R - 3 又は L I R - 7 の細胞外領域をコードする D N A にライゲートさせる。本発明の 1 つの実施形態において、これは、L I R 細胞外領域が融合タンパク質のアミノ末端に位置するようなされる。次いで、融合 D N A 構築物を、P D C 409 のような適切な発現ベクターとライゲートさせ、C V 1 - E B N A 又は C O S 細胞 ( A T C C C T L - 1650 ) のような適切な宿主細胞において発現させる。サル細胞株 C O S - 1 は、融合タンパク質の発現を確証するために使用され得る。融合タンパク質を精製するため、C O S - 1 培養物からの上清を遠心分離によって清浄化し、例えば Bio Cad システム及び Per Se p t i v e Biosystems の P O R O S 20A カラムを使用することにより、又は当業者に既知の他の比較可能な方法により精製する。プールされた溶出したタンパク質は、発現を確認し、発現された組換えタンパク質が予想された分子量を有していることを立証するため、銀染色と共に S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用して分析され得る。

### 【 0 0 3 6 】

#### 同時治療

L I R - 2 、 L I R - 3 又は L I R - 7 の調節剤の 1 つ以上が、R A を治療するために使用される他の薬物 1 つ以上と同時に投与される組み合わせ治療が、ここで提供される。そのような治療法において、L I R 調節剤は、R A を治療するために使用される 1 つ、 2 つ、 3 つ又はそれ以上の他の薬物療法と同時に投与され得る。付加的な薬物療法は、L I R 調節剤と同時期的に又は交互に投与され得る。あるいは、例えば腫瘍壞死因子 (T N F ) のアンタゴニスト又は I L - 1 のアンタゴニストのような R A を治療するために使用される他の何らかの薬剤による継続的な治療の背景に対して、L I R 調節剤が断続的に投与されてもよい。L I R 調節剤及びその他の R A 治療は、同時に、交互に、又は連続的に投与され得、また、それらの投与の頻度は同じであってもよいし、又は異なっていてよい。

### 【 0 0 3 7 】

R A の治療における L I R 調節剤との同時使用に適している T N F アンタゴニストには、T N F に対する抗体が含まれる。そのような抗体には、ヒト化モノクローナル抗体及び完全にヒトのモノクローナル抗体が含まれる。L I R 調節剤との同時投与のための例示的なヒト化抗体は、レミケード ( R E M I C A D E ) (登録商標) として C e n t o c

10

20

30

40

50

o r より販売されているインフリキシマブ ( i n f l i x i m a b ) と呼ばれるキメラ Ig G 1 モノクローナル抗体である。インフリキシマブは、ヒト定常部及びマウス可変部から構成されており、ヒト TNF と特異的に結合する。その他の適切な抗 TNF 抗体には、ヒト化抗体 D 2 E 7 及び C D P 5 7 1 、並びに E P 0 5 1 6 7 8 5 B 1 、米国特許第 5 , 6 5 6 , 2 7 2 号、 E P 0 4 9 2 4 4 8 A 1 に記載された抗体が含まれる。

#### 【 0 0 3 8 】

L I R 調節剤は、 I L - 1 の阻害剤、 T 細胞表面タンパク質に対する抗体、及び TNF 、 TNF 受容体又は TNF の合成のための代謝経路の酵素の翻訳に干渉するアンチセンスオリゴヌクレオチド又はリボザイムを含む、 RA を治療するために使用される様々な種類の薬剤と併せて投与され得る。 L I R 調節剤との同時投与に適しているアンチセンスオリゴヌクレオチドには、米国特許第 6 , 2 2 8 , 6 4 2 号に記載されたものが含まれる。米国特許第 5 , 6 4 1 , 7 5 1 号及び米国特許第 5 , 5 1 9 , 0 0 0 号に開示されたペプチド TNF 阻害剤、並びに米国特許第 5 , 7 5 3 , 6 2 8 号に記載された D - アミノ酸含有ペプチドも、 L I R 調節剤との同時投与に適している。さらに、ここに記載された状態は、 TNF 変換酵素の阻害剤により治療され得る。

#### 【 0 0 3 9 】

好みしい組み合わせには、可溶型 TNF 受容体 ( s T N F R ) である TNF 阻害剤と同時に L I R 調節剤の投与が含まれる。 s T N F R には、単量体、融合タンパク質（「キメラタンパク質とも呼ばれる」）、二量体、三量体又はより高次の多量体が含まれ得る。本発明のある種の実施形態において、 s T N F R 誘導体は、 7 5 k D a T N F R 又は 5 5 k D a T N F R を模倣し、かつ患者体内で TNF と結合するものである。本発明の s T N F R 模倣体は、 T N F R p 5 5 もしくは p 7 5 又はそれらの断片に由来し得る。例えば、 W O 9 9 / 0 4 0 0 1 に記載された T N F R のような、 p 5 5 及び p 7 5 以外の T N F R も、ここに記載された様々な医学的障害の治療用の可溶性化合物を導出するのに有用である。 T N F R 模倣体を構築するために使用される s T N F R 分子には、例えば、天然 T N F R の膜貫通領域を欠き、かつ TNF に結合し得る、少なくとも 2 0 個のアミノ酸を有する天然 T N F R の類似体又は断片が含まれる。 s T N F R の TNF との結合は、 E L I S A 又はその他の任意の便利なアッセイを使用して分析され得る。

#### 【 0 0 4 0 】

本発明の s T N F R ポリペプチド又は断片は、キメラタンパク質を形成するよう第 2 のポリペプチドと融合させられ得る。第 2 のポリペプチドは、 TNF 又は L T 分子に結合し、それが細胞結合受容体と結合することを防止することができる二量体、三量体又はより高次の多量体の、キメラタンパク質による自発的な形成を促進し得る。アンタゴニストとして使用されるキメラタンパク質には、例えば、抗体分子の定常部及び T N F R の細胞外部分に由来する分子が含まれる。そのような分子は、ここで、 T N F R - I g 融合タンパク質と呼ばれる。ヒト及びその他の哺乳動物における疾患を治療するのに適している好みしい T N F R - I g 融合タンパク質は、組換え T N F R : F c である。この用語は、ここで使用されるように、 p 7 5 TNF 受容体の細胞外部分の分子（各分子は、ヒト I g G 1 の 2 3 2 アミノ酸 F c 部分と融合した 2 3 5 アミノ酸 T N F R 由来ポリペプチドからなる） 2 個の二量体である「エタネルセプト ( e t a n e r c e p t ) 」を指す。エタネルセプトは、現在、エンブレル ( E N B R E L ) ( 登録商標 ) という商品名でイムネックスコーポレーション ( ImmuneX Corporation ) より販売されている。 I g G の F c 部分と融合した 5 5 k D a T N F R の細胞外部分を含む化合物と、 L I R 調節剤を組み合わせた治療、並びにそのような治療剤を含有している組成物及び組み合わせも、本発明に包含される。さらに、適切な TNF 阻害剤は、例えば、 W O 9 9 / 0 4 0 0 1 に記載された T N F R ( この T N F R に由来する T N F R - I g を含む ) のような、 p 5 5 及び p 7 5 T N F R 以外の TNF 受容体分子の細胞外領域に由来してもよい。

#### 【 0 0 4 1 】

10

20

30

40

50

さらに、本発明の L I R 調節剤は、例えば R A N K : F c 又はオステオプロテジェリン（米国特許第 6,017,729 号及び WO 98/46751 参照）のような可溶型 R A N K を含む、関節炎関節における骨破壊を減じる薬剤と同時に R A 患者に投与され得る。

#### 【 0 0 4 2 】

L I R 調節剤との同時投与に適しているその他の薬物には、以下に限定はされないが、アセトアミノフェン、コデイン、プロポキシフェンナフシレート ( p r o p o x y p h e n e n a p s y l a t e ) 、オキシコドン塩酸塩、ヒドロコドン重酒石酸塩及びトラマドールを含む鎮痛剤が含まれる。さらに、L I R 調節剤は、以下に限定はされないが、メトトレキサート、スルファサラジン、金塩、アザチオプリン、シクロスボリン、抗マラリア薬、ステロイド（例えば、プレドニゾン）及びコルヒチンを含む疾患修飾性抗リウマチ薬（D M A R D ）と併せて投与され得る。10

#### 【 0 0 4 3 】

抗炎症薬も、L I R 調節剤と共に投与され得る。そのような抗炎症薬には、以下に限定はされないが、アスピリン；イブプロフェン；インドメタシン；セレコキシブ；ロフェコキシブ；ケトロラック；ナムブメトン（n a m b u m e t o n e ）；ピロキシカム；ナプロキセン；オキサプロジン；スリンダク；ケトプロフェン；ジクロフェナク；並びに新たに開発された関節炎関節の治療に有効な抗炎症薬を含む、その他の C O X - 1 及び C O X - 2 の阻害剤、サリチル酸誘導体、プロピオン酸誘導体、酢酸誘導体、フェナム酸誘導体、カルボン酸誘導体、酪酸誘導体、オキシカム系、ピラゾール系並びにピラゾロン系が含まれる。20

#### 【 0 0 4 4 】

L I R 調節剤との同時使用に適している I L - 1 阻害剤には、遺伝学的に修飾されたミューテイン、多量体型及び徐放性製剤を含む、I L - 1 の受容体結合性ペプチド断片、I L - 1 又は I L - 1 ベータ又は I L - 1 受容体 I 型に対する抗体、及び I L - 1 の受容体又は修飾されたその異型の全部又は一部を含む組換えタンパク質が含まれる。特定のアンタゴニストには、I L - 1 r a ポリペプチド、I L - 1 ベータ変換酵素（I C E ）阻害剤、アンタゴニスト性 I 型 I L - 1 受容体抗体、I L - 1 結合型の I 型 I L - 1 受容体及び I I 型 I L - 1 受容体、I L - 1 アルファ及び I L - 1 ベータ及びその他の I L - 1 ファミリーメンバーを含む I L - 1 に対する抗体、並びに I L - 1 トラップとして既知の治療薬が含まれる。I L - 1 r a ポリペプチドには、米国特許第 5,075,222 号に記載された型の I L - 1 r a 、並びに米国特許第 5,922,573 号、WO 91/17184 、 WO 92/16221 及び WO 96/09323 に記載されたものを含む修飾型及び異型が含まれる。I L - 1 ベータ変換酵素（I C E ）阻害剤には、P C T 特許出願 WO 91/15577 ； WO 93/05071 ； WO 93/09135 ； WO 93/14777 及び WO 93/16710 ；及び欧州特許出願 0 547 699 に記載されたものを含む、ペプチジル I C E 阻害剤及び低分子 I C E 阻害剤が含まれる。非ペプチジル化合物には、P C T 特許出願 WO 95/26958 、米国特許第 5,552,400 号、米国特許第 6,121,266 号、D o l l e ら、J . M e d . C h e m . , 39 : 2438 - 2440 ( 1996 ) に記載されたものが含まれる。さらなる I C E 阻害剤は、米国特許第 6,162,790 号、第 6,204,261 号、第 6,136,787 号、第 6,103,711 号、第 6,025,147 号、第 6,008,217 号、第 5,973,111 号、第 5,874,424 号、第 5,847,135 号、第 5,843,904 号、第 5,756,466 号、第 5,656,627 号、第 5,716,929 号に記載されている。3040

#### 【 0 0 4 5 】

L I R 調節剤との同時投与に適している I L - 1 結合型の I 型 I L - 1 受容体及び I I 型 I L - 1 受容体は、米国特許第 4,968,607 号、第 4,968,607 号、第 5,081,228 号、R e 35,450 、第 5,319,071 号及び第 5,350,683 号に記載されている。I L - 1 トラップは、W O 0 1 8 9 3 2 に記載されている。

#### 【 0 0 4 6 】

L I R 調節剤との同時投与に適している適切な I L - 1 アンタゴニストには、抗体分子及び I L - 1 アンタゴニスト分子の両方の一部を含んでいるキメラタンパク質がさらに含まれる。そのようなキメラ分子は、単量体、二量体又はより高次の多量体を形成し得る。その他の適切な I L - 1 アンタゴニストには、I L - 1 シグナリング受容体、I L - 1 R I 型と競合的に結合し得る I L - 1 由来するペプチドが含まれる。

#### 【 0 0 4 7 】

さらに、L I R 調節剤は、サリドマイド又はサリドマイド類似体、ペントキシフィリン、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) 阻害剤又はその他の低分子のような低分子と共に R A を治療するために使用され得る。適切な MMP 阻害剤には、例えば、米国特許第 5, 883, 131 号、第 5, 863, 949 号及び第 5, 861, 510 号に記載されたもの、並びに米国特許第 5, 872, 146 号に記載されたメルカプトアルキルペプチジル化合物が含まれる。同時投与に適しているその他の低分子は、L I R 調節剤と組み合わせて投与され得る、米国特許第 5, 508, 300 号、第 5, 596, 013 号及び第 5, 563, 143 号に記載されたものを含む TNF 産生を減少させることができる分子である。L I R 調節剤と共同で R A を治療するのに有用な付加的な低分子には、米国特許第 5, 747, 514 号又は米国特許第 5, 691, 382 号に記載された MMP 阻害剤、並びに米国特許第 5, 821, 262 号に記載されたヒドロキサム酸誘導体、並びに置換されたオキシム誘導体 (WO 96/00215)、キノリンスルホンアミド (米国特許第 5, 834, 485 号)、アリールフラン誘導体 (WO 99/18095) 及びヘテロ二環式誘導体 (WO 96/01825; GB 2 291422 A) のような、ホスホジエステラーゼ IV 及び TNF の産生を阻害する低分子、TNF 及び IFN を抑制するチアゾール誘導体 (WO 99/15524)、並びに TNF 及びその他の炎症前サイトカインを抑制するキサンチン誘導体 (例えば、米国特許第 5, 118, 500 号、米国特許第 5, 096, 906 号及び米国特許第 5, 196, 430 号参照) が含まれる。

#### 【 0 0 4 8 】

##### 医薬調製物

生理学的に許容される希釈剤、担体又は賦形剤のような他の成分と組み合わされた、(制限はされないが組換え起源及び非組換え起源を含む、あらゆる起源に由来する) 本発明の L I R 調節剤を有効量含む医薬組成物が、ここで提供される。「医薬適合性の」という用語は、(1つ以上の) 活性成分の生物学的活性の有効性に干渉しない、非毒性の材料を意味する。投与に適している製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び製剤をレシピエントの血液と等張にする溶質を含有していてもよい水性及び非水性の無菌の注射用溶液；並びに懸濁化剤又は増粘剤を含んでいてもよい水性及び非水性の無菌の懸濁液が含まれる。本発明に係る治療剤は、唯一の活性材料として、又は所定の適応症に適している他の既知の活性材料と共に、医薬適合性の希釈剤 (例えば、生理食塩水、トリス-HCl、酢酸緩衝溶液及びリン酸緩衝溶液)、保存剤 (例えば、チメロサール、ベンジルアルコール、パラベン)、乳化剤、可溶化剤、佐剤及び/又は担体と混和され組み合わされ得る。医薬組成物に適している製剤には、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版 1980, Mack Publishing Company, Easton, PA に記載されたものが含まれる。さらに、医薬組成物のための L I R 調節剤は、ポリエチレン glycole (PEG)、金属イオンと複合体化されてもよいし、又はポリ酢酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲル、デキストラン等のような重合体化合物に取り込まれてもよいし、又はリポソーム、ミクロエマルジョン、ミセル、単層もしくは多層の小胞、赤血球ゴースト又はスフェロblast (spheroblasts) に取り込まれてもよい。リポソーム製剤に適している脂質には、制限はされないが、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サボニン、胆汁酸等が含まれる。例えば、米国特許第 4, 235, 871 号；第 4, 501, 728 号；第 4, 837, 028 号；及び第 4, 737, 323 号に開示されるように、そのようなリポソーム製剤の調製は、この技術分野における技術の範囲内にある。そのような組成物は、

10

20

30

40

50

物理学的状態、溶解度、安定性、インビポ放出速度及びインビポクリアランス速度に影響を及ぼし、従って意図された適用に依って選択され、そのため、担体の特徴は選択された投与経路に依存する。

#### 【0049】

本発明の1つの好ましい実施形態において、徐放型のLIR調整ポリペプチドが使用される。開示された方法において使用するのに適している徐放型には、以下に制限はされないが、(米国特許第6,036,978号に記載されたアルギン酸塩微粒子のような)徐々に溶解する生体適合性ポリマーに封入され、(局所的に適用されるヒドロゲルを含む)そのようなポリマーと混和され、かつ/又は生体適合性半透性インプラントに被包されたLIR調節剤が含まれる。1つ以上の治療剤が組み込まれている注射に適している微粒子の製剤も、含まれる。血中半減期を増加させるために修飾された治療用LIR調節剤も、含まれる。例えば、LIR調節剤は、既知の方法を使用して、注射のためポリエチレンリコールと結合体化され得る。10

#### 【0050】

##### 投与計画

ここで使用されるように、LIR-7に拮抗するか、又はLIR-2もしくはLIR-3に作動する薬剤を「治療的に有効な量投与する」という語句は、障害の重度を反映する少なくとも1つの指標の改善、好ましくは持続性の改善を誘導するのに十分な量及び時間で、患者が治療剤により治療されることを意味する。患者が、1日以上、又はより好ましくは1週以上の間隔の少なくとも2つの時点で改善を示した場合、その改善は「持続性」であると見なされる。改善の程度は、兆候又は症状に基づき決定され、決定は、生活の質に関する質問調査票のような患者に与えられる質問調査票を利用してよい。患者の疾病的程度を反映する様々な指標が、治療の量及び時間が十分であるか否かを決定するために査定され得る。選択された1つ以上の指標の基線値は、治療剤の初回投与の前に、患者を調査することにより確立される。好ましくは、基線調査は、初回投与の約60日以内に行われ、初回投与と同じ日までの任意の時点において実施され得る。改善は、患者が選択された1つ以上の指標の基線に対する改善を明示するまで、本発明に係る治療剤を投与することにより誘導される。これに関して、「基線」とは、治療を受ける患者における初回投与前の選択された指標の測定値を指す。20

#### 【0051】

本発明の1つの実施形態において、治療が、フェルソン(Felson)ら(Felsonら、Arthritis Rheum 6:727-735, 1995)によって改定されたような米国リウマチ学会(American College of Rheumatology)(ACR)基準による改善を誘導した場合、十分な量及び時間のRAの治療が起こる。ACR基準が使用される場合、患者が、敏感な関節の数(tender joint count)(約78の関節が査定される)及び腫大した関節の数(swollen joint count)(約76の関節が査定される)の両方に關して少なくとも20%(ACR20)又は少なくとも50%(ACR50)改善され、かつ以下の5つのうち3つの改善を示す場合、その治療は十分であると見なされる:1)対象による疼痛の査定(subject pain assessment);2)対象による総体的な査定(subject global assessment);3)医師による総体的な査定(physician global assessment);4)対象により自己査定された能力障害(subject self-assessed disability);5)急性期反応物質(acute-phase reactant)(ウェステルグレン(Westergreen)赤血球沈降速度又はC反応性タンパク質レベル)。先の5つの基準のうち、最初の4つはリカート尺度でスコア化される。対象による査定及び総体的な査定(subject and global assessments)は、患者の疾患の全体的な状態に基づき決定される。40

#### 【0052】

本発明のもう1つの実施形態において、治療が十分であるか否かは、患者による自己査

10

20

30

40

50

定又は医師による査定により査定される。患者による自己査定又は医師による査定は、例えば、尺度の一端が「疾患なし」を表し、他方の端が「重篤な疾患」を示すような主観的な数的尺度（即ち、「リカート」尺度）で測定され得る。尺度のいずれかの端が、「疾患なし」を表すために使用され得る。そのような尺度は、任意の所望の数値範囲、例えば、0～3、0～4、0～5、0～6、0～7等を有することができ、基線時の患者の状態との比較のための基礎を提供する。例えば、0～3点数制は、以下のカテゴリーを含み得る：0 = 疾患なし；1 = 軽度の疾患；2 = 中程度の疾患；3 = 重篤な疾患。この例において、スコアが1カテゴリー低下した場合、患者は「改善された」と考えられる。ここで使用されるように、「リカート尺度」という用語は、患者又は医師が測定されるパラメーターに関して患者の状態を最もよく表すと感じる数字に丸を付ける視覚的アナログ尺度（VAS）を含むものと理解される。基線スコアと比較して患者のスコアが悪化した場合、そのリカットスコアの変化には負の値が割り当てられる。

10

20

#### 【0053】

適切な投薬量は、治療される障害の性質及び重度、患者の体重、年齢、全身状態及び過去の疾病及び／又は治療、並びに投与経路のような要因に依って変動する。予備用量は、動物テストに従って決定され得、ヒトへの投与のための投薬量の概算は、標準的な投薬試験のようなこの技術分野において認められている実務に従って実施される。毒性を最小限に抑えつつ、細胞培養において決定されるようなIC<sub>50</sub>（即ち、症状の最大の半分の阻害を達成するテスト化合物の濃度）を含む循環血漿中濃度範囲を達成するための用量が、動物モデルにおいて公式化され得る。そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。最終的には、主治医が、個々の各患者を治療するための本発明の治療剤の量を決定し、個々の患者の必要に応じて投与の用量及び頻度を調整することができる。

30

30

#### 【0054】

任意の効果的な投与経路が、本発明の治療法のためのLIR調節剤を治療的に投与するために使用され得る。注射される場合、LIRのアゴニスト又はアンタゴニストは、例えば、ボーラス注射又は連続注入により、関節内、静脈内、筋肉内、病巣内、腹腔内又は皮下の経路を介して投与され得る。その他の適切な投与手段には、インプラントからの徐放、エアロゾル吸入、点眼剤、錠剤、シロップ剤、ロゼンジ剤（lozenges）又はチューインガム剤を含む経口調製物、並びにローション剤、ゲル剤、スプレー剤、軟膏剤又はその他の適切な技術のような局所調製物が含まれる。あるいは、タンパク質性LIR調節剤は、そのタンパク質を発現する培養細胞を移植することにより、例えば、調整タンパク質、即ちLIR-7のアンタゴニスト、LIR-2のアゴニスト又はLIR-3のアゴニストを発現する細胞を移植することにより、投与され得る。1つの実施形態において、患者自身の細胞が、調整剤をコードするDNAによるインビボ又はエクスピボでのransferによってLIR調節剤を産生するよう誘導される。このDNAは、例えば、調整剤をコードする裸のDNAもしくはリポソームに封入されたDNAの注射、DNAを発現するウイルスベクターの感染、又はこの技術分野において既知のその他の手段により、患者の細胞へ導入され得る。LIR調節剤が、1つ以上の他の生物学的に活性な化合物と組み合わせて投与される場合、これらは、同じ経路により投与されてもよいし、又は異なる経路により投与されてもよく、また、同時期的に、別々に、又は連続的に投与され得る。

40

50

#### 【0055】

LIR-2、LIR-3又はLIR-7の調節剤であるタンパク質を含む注射用の医薬組成物は、体重1kg当たり約0.01ng～約100mg（好ましくは約0.1ngから約10mg、より好ましくは約0.1マイクログラム～約1mg）の用量の治療用ポリペプチドを含有しているべきである。本発明の1つの実施形態において、そのような組成物は、ここに開示された様々な医学的障害を治療するために1ヶ月に1回投与され、もう1つの実施形態においては、少なくとも1週間に1回投与され、もう1つの実施形態においては、少なくとも1週間に2回以上投与される。

50

## 【0056】

投与経路が注射又は静脈内注入である場合、成人の1回当たりのLIR調節剤の有効量は、体表面積に基づき計算され得る。治療用抗体又はタンパク質を含むその他の治療剤の好ましい用量範囲は、 $1 \sim 20 \text{ mg} / \text{m}^2$ 、より好ましくは $5 \sim 12 \text{ mg} / \text{m}^2$ である。あるいは、 $5 \sim 100 \text{ mg} / \text{回}$ の範囲であり得る均一(flat)用量が投与されてもよい。皮下注射によって投与される均一用量の例示的な用量範囲は、 $5 \sim 25 \text{ mg} / \text{回}$ 、 $25 \sim 50 \text{ mg} / \text{回}$ 及び $50 \sim 100 \text{ mg} / \text{回}$ である。本発明の1つの実施形態において、医学的障害は、1、5、10、25又は $50 \text{ mg}$ を含有している均一用量の治療用ポリペプチドを含有している注射用に許容される調製物を投与することにより治療される。治療剤は、8週間に1回、7週間に1回、6週間に1回、5週間に1回、4週間に1回、3週週間に1回、2週間に1回、1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、1週間に4回、1週間に5回、1週間に6回、又は毎日という頻度で、繰り返し投与され得る。注射以外の投与経路が使用される場合、その用量は、標準的な医学的実務に従い適切に調節される。

10

## 【0057】

抗体がLIR-7アンタゴニスト又はLIR-2もしくはLIR-3のアゴニストとして使用される場合、1つの好ましい用量範囲は $1 \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ であり、もう1つの好ましい用量範囲は、体重 $1 \text{ kg}$ 当たり $0.75 \sim 7.5 \text{ mg} / \text{kg}$ である。ヒト化抗体、即ち抗体分子の抗原結合部分のみが非ヒト起源に由来する抗体が、好ましい。そのような抗体は皮下、筋肉内に注射されてもよいし、又は静脈内に投与されてもよく、また、治療剤に対する宿主抗体の発生を減少させるためにメトトレキサートと同時に使用されてもよい。

20

## 【0058】

治療の期間は、患者の応答に依って変動し得る。所望の程度の改善を誘導するために、より長期間の治療が必要である場合もあり得るが、多くの場合、患者の状態の改善は、少なくとも3週間にわたり治療用量を注射することにより得られる。患者の医師によって必要であると考えられた場合には、計画は、用量及び頻度を調節しながら、無期限に継続され得る。小児科患者(4歳から17歳)の場合、1つの適切な計画は、皮下注射によって1週当たり1回以上投与される、 $0.4 \text{ mg} / \text{kg}$ 、最高で $25 \text{ mg}$ の用量のポリペプチドLIR調節剤の皮下注射を含む。

30

## 【0059】

慢性状態であるRAの治療において、患者の状態の改善は、少なくとも1週間以上、又はより好ましくは1ヶ月以上、又は1ヶ月、2ヶ月もしくは3ヶ月以上の期間にわたり、又は無期限に、この医薬品を繰り返し投与することにより得られる。治療は、治療の最初の月と同じ用量及び頻度で、又は縮小された用量もしくは頻度で、無期限に継続されてもよいし、又は所定の患者のための一次治療として使用されている他の何らかの治療と共同で断続的に投与されてもよい。投与の用量又は頻度が縮小又は中止された場合、症状が悪化するようであれば、後にそれは元のレベルで再開され得る。そのような決定は、標準的な医学的実務に従い患者の医師によってなされる。

40

## 【0060】

前述の薬物療法に対する個々の患者による応答が変動し得ること、並びに各患者にとって最も効果的な薬物の組み合わせ及び投薬計画が、その患者の医師によって決定されることが理解される。

## 【0061】

以下の実施例は、制限のためではなく例示のために提示される。当業者であれば、特にここで引用された様々な参考の教示を考慮して、この実施例において具現化された本発明を変形させ得ることを認識する。

## 【実施例】

## 【0062】

この研究は、RA、骨関節炎(OA)を有している患者及び正常患者の滑膜における、

50

いくつかのLIRのインビオ発現及び細胞分布を比較した。RAとは対照的に、OAにおける滑膜組織中の炎症反応は、パンヌス形成及び組織侵襲の非存在下で起こるため、OA滑膜をこの研究に含めた(Ehrlichら、Moskowitzら編, Osteoarthritis: diagnosis and management, Philadelphia, W.B. Saunders, 199-211(1984); Dieppeら、Moskowitzら編, Osteoarthritis: diagnosis and medical/surgical management. 第2版, Philadelphia, W.B. Saunders, 399-412(1992))。免疫組織化学を使用して、阻害性LIR及び活性化LIRの発現を、RA患者6人、骨関節炎患者3人及び対照対象3人の滑膜において研究した。特異的抗体による染色を、LIR-2、LIR-3及びLIR-7の発現を検出するために使用し、細胞系統特異的抗体による連続切片の染色を、発現されたLIRの細胞局在を評価するために使用した。

10

#### 【0063】

2つの阻害性LIRポリペプチドLIR-2及びLIR-3、並びに1つの活性化LIRポリペプチドLIR-7の発現を、この実験セットにおいて調査した。一般に、これらの3つのLIRは、RAにおけるサイトカイン及びプロテアーゼの重要な起源である骨髄起源の細胞における比較的限定された発現を有している。LIR-2は、MHCクラスI分子を認識することが既知であり、ヒト組織に広範囲に分布している。

20

#### 【0064】

2歳から14歳の範囲のRAの履歴を有する患者6人、及び3歳から13歳の範囲のOAの履歴を有する患者3人が、全身麻酔下で膝関節からの滑膜組織の切除を受けた。正常滑膜組織は、外傷性半月板破裂のための再建膝手術中に3人の対象から得られた。滑膜組織はOCT化合物で包埋され、液体窒素(Tissue-Tek, Miles, Elkhart, IN)で急速凍結させられ、組織病理学的分析及び免疫組織化学的研究のため2μmから4μmに切片化された。

20

#### 【0065】

LIR-2、LIR-3及びLIR-7に対する特異的マウスIgG1モノクローナル抗体は、記載されたようにして(Cosmanら、Immunity 7:273-282(1997)参照)、ヒトIgG1のFc領域と融合したLIR細胞外ドメインを含んでいるLIR/Fc融合タンパク質による免疫感作により、BALB/cマウスにおいて生成させた。その抗体を、LIR/Fc融合タンパク質のパネルに対するELISA、及び全長LIR cDNAによりトランスクレクトされたCOS-1細胞を使用したFACS分析により、特異的免疫反応性に関してスクリーニングした。無関係なマウスIgG1抗体(Biosource International, Camarillo, CA)を、陰性対照として使用した。

30

#### 【0066】

これらの抗体を、参考して完全にここに組み込まれるTedlaら、Am J Pathol 148(5):1367-73(1996)に記載されたような3段階アルカリホスファターゼ染色技術において使用した。簡単に説明すると、アセトン固定された切片を、トリス緩衝生理食塩水(TBS)により平衡化し、室温で20分間、未希釈のウマ血清によりブロッキングした。次いで、4度一晩5μg/mlの一次抗体と共に切片をインキュベートした。TBSによる4回の洗浄の後、室温で1時間、ビオチン化ウマ抗マウスIgG(Vector laboratories, Burlingame, CA)と共に切片をインキュベートした。TBSによる4回の洗浄の後、室温で45分間、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼ結合体(Vector laboratories)と共に切片をインキュベートした。熱量測定用アルカリホスファターゼ基質((ベクターレッド(vector red)、Vector laboratories)及びヘマトキシリンによる短時間対比染色を使用して、免疫反応性を検出した。各抗LIR抗体の使用のための最適条件は、皮膚、胸腺、リンパ節及び脾細胞を含む、LIR発現細胞を含有している可能性が高い正常組織のパネルを使用して最初に定義した。

40

50

## 【0067】

抗 L I R 抗体により分析されたものに隣接している切片も、L I R に特異的な抗体と免疫反応性の特異的細胞型を決定するために分析した。これは、参照してここに組み込まれる T e d l a r a 、 C y t o k i n e 11(7) : 531 - 40 (1999) 及び T e d l a r a 、 1996 に記載された方法を使用して行った。この作業は、マクロファージ（マウス Ig G 1 抗 CD 68 ）、T 細胞（ウサギポリクローナル抗 CD 3 ）、内皮細胞（マウス Ig G 1 抗フォンビルプラント因子）、好中球カテプシン G （ウサギポリクローナル）及び肥満細胞トリプターゼ（マウス Ig G 1 ）を検出するための抗体を使用した。これらの抗体は、 D A K O ( G l o s t r u p , D e n m a r k ) より購入した。使用した染色手法は、前記の抗 L I R 抗体による染色と本質的に同様であった。特異的抗体による免疫組織化学的染色に加え、標準的なヘマトキシリン及びエオシンによる染色を、各切片の質及び組織学を評価するために使用した。

## 【0068】

免疫組織化学的研究からの組織切片を、切片全体を横切る連続的な視野に見られる細胞を計数することにより査定した。簡単に説明すると、各切片について  $250 \times$  倍率の平均 18 個の視野を、系統的な抽出手法で選択した。アイソタイプ対照抗体により染色された対照切片が有意な免疫反応性を示さないことを保証した後に、1 視野当たりの陽性細胞（赤色染色）の数を数えた。有意な領域間の染色の変動が観察されたが、切片全体についての数の中央値を、各抗体に関する染色の保存的な測定値として報告した。

## 【0069】

観察された滑膜組織試料の組織学的特質及び 3 つの L I R の発現を、表 1 に要約した。比較的短い疾病期間（2 年から 5 年）を有していた 2 人の R A 患者（ R A 1 及び R A 2 ）に由来する切片は、 C D 68 陽性マクロファージ、カテプシン G 陽性好中球、中程度の数のトリプターゼ陽性肥満細胞及び C D 3 陽性 T 細胞のクラスターを含む炎症細胞による広範な浸潤を示した。罹患年数 8 年から 14 年の残りの 4 人の R A 患者においては、炎症細胞浸潤の程度は一様でなく、これらの患者においては組織纖維症が明白であった。 O A を有する患者のうちの 2 人に由来する切片には、限定された数の T 細胞及び肥満細胞と共に有意なマクロファージ浸潤が存在した（表 1 ）。 3 人目の O A 患者は、滑膜の外側の端部にマクロファージを含む広範な纖維症を有していた。正常対象から得られた切片には、炎症細胞がほとんど又は全く観察されなかった。

## 【0070】

表 1 に示されるように、疾病期間が初期～中程度の 3 人の R A 患者（患者 R A 1 、 R A 2 及び R A 3 ）から得られた切片には、 L I R - 2 及び L I R - 7 の広範な発現が存在した。 L I R - 2 は、リウマチ滑膜に浸潤している好中球及びマクロファージに L I R - 7 と共に局在していた。 L I R - 2 及び L I R - 7 の発現は、初期リウマチ様疾患においては特に顕著であったが（表 1 ）、 R A の期間が長い（8 年以上）患者については非常に限定されていた。 R A の期間が増加するにつれ、滑膜組織はより多くの纖維症性変化を示し、 L I R - 2 及び L I R - 7 を発現する細胞の数は劇的に減少した。 O A を有する患者から得られた滑膜組織には、活性化 L I R 及び阻害性 L I R 両方の無視し得る程度の発現が見出された。正常ドナーに由来する滑膜組織には、 L I R 発現が検出されなかった。

## 【0071】

L I R - 3 は、 3 人の初期 R A 患者のうち 2 人のリウマチ様滑膜中の浸潤マクロファージに発現していたが、後期 R A 患者には発現していなかった。正常対象から得られた対照組織には、 L I R - 2 、 L I R - 3 又は L I R - 7 の発現が検出されなかった。

## 【0072】

表 2 は、 L I R 特異的抗体、並びにマクロファージ、内皮細胞、好中球、肥満細胞及び C D 3 + T 細胞に特異的な抗体による滑膜組織試料の連続切片の染色により得られた結果を示す。 L I R は C D 3 + T 細胞には検出されなかった。表 2 に示されるように、 R A 患者の滑膜において、炎症性白血球への L I R - 2 及び L I R - 3 発現の制限とは対照的に、 L I R - 7 は、好中球、マクロファージ、肥満細胞、纖維芽細胞様細胞（細胞形態学に

10

20

30

40

50

よって決定)及び内皮細胞に様々に発現していた。LIR-2及びLIR-7の細胞分布は炎症細胞浸潤物の性質の差を反映して、RA患者間で異なっていた。患者RA1においては好中球がLIR-2の主な細胞起源であったが、患者RA2においてはマクロファージがLIR-2の主な細胞起源であった。一般に、RA患者において、LIR-7の発現はLIR-2のものより幾分低く、LIR-7の細胞分布はLIR-2のものより広範囲であった。LIR-7は、患者RA1においては、好中球、マクロファージ、肥満細胞及び内皮細胞によって発現されており、患者RA2においては、マクロファージ、内皮細胞及び纖維芽細胞様滑膜細胞によって発現されていた。残りの全てのRA患者において、LIR-2及びLIR-7の細胞起源は、マクロファージと、程度は低かったが内皮細胞であった。OAにおいて観察されたLIR-2の限定された発現は、主としてCD68+マクロファージに見出された。RAを有する患者において、LIR-3は、マクロファージ及び纖維芽細胞様滑膜細胞によって排他的に発現されていた。アイソタイプ一致陰性対照抗体は、いずれかの患者においても免疫染色を与えなかった。

10

20

#### 【0073】

上に提示された結果は、初期RAを有する患者に由来する滑膜が、MHCクラスI分子を認識しそれと会合することができる阻害性LIR-2の上昇した発現を示したことを明らかにしている。上昇したLIR-3の発現も、RA患者において観察された。細胞を活性化する能力を有するLIR-7の広範な発現も、RA患者に由来するマクロファージ及び好中球に観察された。さらに、LIR-7発現は肥満細胞及び内皮細胞で観察された。OAを有する患者に由来する滑膜、対照対象、又は纖維症を伴う長期のRAを有する2人の患者には、LIR発現がほとんど観察されなかった。従って、これらの結果は、LIRが、RAにおける炎症性浸潤物中のプロテアーゼ及びサイトカインの発現を制御し、それによりパンヌス形成及び関節破壊の過程に寄与しているかもしれないことを示唆している。

#### 【0074】

【表1】

表1  
RA、OA及び正常な滑膜における白血球免疫グロブリン様受容体の発現

対象	疾病期間(年)	組織学	LIR の免疫組織化学生検現(細胞数中央値/HPF)		
			LIR-2	LIR-3	LIR-7
慢性関節リウマチ					
RA1	2	広範な好中球の浸潤及び中程度の数のマクロファージ及び肥満細胞。	39	6	18
RA2	5	広範なマクロファージ浸潤及び小さなリンパ球凝集のエリア。	25	1	13
RA3	8	マクロファージ及びリンパ球の凝集。肥満細胞浸潤を含む中程度の纖維症。	15	7	8.5
RA4	8	広範な纖維症及びCD68+マクロファージ浸潤のいくつかのエリアを含む内皮増殖。	5	2	3
RA5	10	少数のマクロファージを含む広範な纖維症。	0	0.5	0.5
RA6	14	少数のマクロファージを含む広範な纖維症。	0.5	0.5	0.5
骨関節炎					
OA1	3~5	中程度のマクロファージ及びリンパ球の浸潤。	0.5	1	0
OA2	9	中程度のマクロファージ及びリンパ球の浸潤。限定された数の肥満細胞。	0	2.5	0
OA3	13	広範な纖維症。	2	7	1
対照					
N1	-		0	0	0
N2	-		0	0	0
N3	-		0	0	0

【0075】

【表2】

表2  
慢性関節リウマチ及び骨髄炎を有する患者に由来する滑膜中のLIR-2、LIR-3及びLIR-7の細胞起源  
ND 限られたLIR発現のために実施しなかった

対象	LIR-2	LIR-3	LIR-7
慢性関節リウマチ			
RA 1	好中球	マクロファージ	好中球、マクロファージ、肥満細胞、内皮細胞
RA 2	マクロファージ	マクロファージ及び繊維芽細胞様細胞	マクロファージ、内皮細胞、繊維芽細胞様細胞
RA 3	マクロファージ、内皮細胞	マクロファージ及び繊維芽細胞様細胞	マクロファージ、肥満細胞、内皮細胞
RA 4	マクロファージ	繊維芽細胞様細胞、マクロファージ	マクロファージ、内皮細胞
RA 5	ND	繊維芽細胞様細胞	内皮細胞
RA 6	ND	ND	繊維芽細胞様細胞
骨髄炎			
OA 1	マクロファージ	マクロファージ	マクロファージ
OA 2	ND	マクロファージ	ND
OA 3	繊維芽細胞様細胞	繊維芽細胞様細胞	内皮細胞

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> IMMUNEX CORPORATION  
 ARM, Jonathan P.  
 BORGES, Luis G.  
 TEDLA, Nicodemus

<120> MODULATION OF LIR FUNCTION TO TREAT RHEUMATOID ARTHRITIS

<130> 3364-WO

<140> -- to be assigned --

<141> 2002-11-12

<150> 60/335,988

<151> 2001-11-14

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2221

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (184) .. (1977)

<223>

<400> 1  
 gtcactgcc acacgcagct cagoctgggc ggcacagcca gatgcgagat gcgtctctgc 60  
 tgatctgagt ctgcctgcag catggacctg ggtcttccct gaagcatctc cagggctgga 120  
 gggacgactg ccatgcaccc agggctcata catccgcaga gcagggcagt gggaggagac 180  
 gcc atg acc ccc atc gtc aca gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg 228  
 Met Thr Pro Ile Val Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 ggc ccc agg acc cac gtg cag aca ggg acc atc ccc aag ccc acc ctg 276  
 Gly Pro Arg Thr His Val Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu  
 20 25 30  
 tgg gct gag cca gac tct gtg atc acc cag ggg agt ccc gtc acc ctc 324  
 Trp Ala Glu Pro Asp Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu  
 35 40 45  
 agt tgt cag ggg agc ctt gaa gcc cag gag tac cgt cta tat agg gag 372  
 Ser Cys Gln Gly Ser Leu Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu  
 50 55 60

aaa aaa tca gca tct tgg att aca cgg ata cga cca gag ctt gtg aag Lys Lys Ser Ala Ser Trp Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys 65 70 75	420	
aac ggc cag ttc cac atc cca tcc atc acc tgg gaa cac aca ggg cga Asn Gly Gln Phe His Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg 80 85 90 95	468	
tat ggc tgt cag tat tac agc cgc gct cgg tgg tct gag ctc agt gac Tyr Gly Cys Gln Tyr Tyr Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp 100 105 110	516	
ccc ctg gtg ctg gtg atg aca gga gcc tac cca aaa ccc acc ctc tca Pro Leu Val Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser 115 120 125	564	10
gcc cag ccc agc cct gtg gtc acc tca gga gga agg gtg acc ctc cag Ala Gln Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln 130 135 140	612	
tgt gag tca cag gtg gca ttt ggc ggc ttc att ctg tgt aag gaa gga Cys Glu Ser Gln Val Ala Phe Gly Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly 145 150 155	660	
gaa gat gaa cac cca caa tgc ctg aac tcc cag ccc cat gcc cgt ggg Glu Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly 160 165 170 175	708	
tcg tcc cgc gcc atc ttc tcc gtg ggc ccc gtg agc ccg aat cgc agg Ser Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg 180 185 190	756	20
tgg tcg cac agg tgc tat ggt tat gac ttg aac tat ccc tat gtg tgg Trp Ser His Arg Cys Tyr Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp 195 200 205	804	
tct tca ccc agt gat ctc ctg gag ctc ctg gtc cca ggt gtt tct aag Ser Ser Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys 210 215 220	852	
aag cca tca ctc tca gtg cag ccg ggt cct gtc gtg gcc cct ggg gaa Lys Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu 225 230 235	900	
agc ctg acc ctc cag tgt gtc tct gat gtc ggc tat gac aga ttt gtt Ser Leu Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val 240 245 250 255	948	30
ctg tac aag gag ggg gaa cgt gac ctt cgc cag ctc cct ggc cgg cag Leu Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln 260 265 270	996	
ccc cag gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg ggc cct gtg agc Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser 275 280 285	1044	

cgc tcc tac ggg ggc cag tac aga tgc tac ggt gca tac aac ctc tcc Arg Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala Tyr Asn Leu Ser 290 295 300	1092	
tcc gag tgg tcg gcc ccc agc gac ccc ctg gac atc ctg atc aca gga Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly 305 310 315	1140	
cag atc cat ggc aca ccc ttc atc tca gtg cag cca ggc ccc aca gtg Gln Ile His Gly Thr Pro Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val 320 325 330 335	1188	
gcc tca gga gag aac gtg acc ctg ctg tgt cag tca tgg cgg cag ttc Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe 340 345 350	1236	10
cac act ttc ctt ctg acc aag gcg gga gca gct gat gcc cca ctc cgt His Thr Phe Leu Leu Thr Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg 355 360 365	1284	
cta aga tca ata cac gaa tat cct aag tac cag gct gaa ttc ccc atg Leu Arg Ser Ile His Glu Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met 370 375 380	1332	
agt cct gtg acc tca gcc cac gcg ggg acc tac agg tgc tac ggc tca Ser Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser 385 390 395	1380	
ctc aac tcc gac ccc tac ctg ctg tct cac ccc agt gag ccc ctg gag Leu Asn Ser Asp Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu 400 405 410 415	1428	20
ctc gtg gtc tca gga ccc tcc atg ggt tcc agc ccc cca ccc acc ggt Leu Val Val Ser Gly Pro Ser Met Gly Ser Ser Pro Pro Pro Thr Gly 420 425 430	1476	
ccc atc tcc aca cct gca ggc cct gag gac cag ccc ctc acc ccc act Pro Ile Ser Thr Pro Ala Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr 435 440 445	1524	
ggg tcg gat ccc caa agt ggt ctg gga agg cac ctg ggg gtt gtg atc Gly Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile 450 455 460	1572	
ggc atc ttg gtg gcc gtc cta ctg ctc ctc ctc ctc ctc ctc Gly Ile Leu Val Ala Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu 465 470 475	1620	30
ttc ctc atc ctc cga cat cga cgt cag ggc aaa cac tgg aca tcg acc Phe Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr 480 485 490 495	1668	
cag aga aag got gat ttc caa cat cct gca ggg gct gtg ggg cca gag Gln Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu 500 505 510	1716	

ccc aca gac aga ggc ctg cag tgg agg tcc agc cca gct gcc gac gcc Pro Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala 515 520 525	1764	
cag gaa gaa aac ctc tat gct gcc gtg aag gac aca cag cct gaa gat Gln Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys Asp Thr Gln Pro Glu Asp 530 535 540	1812	
ggg gtg gag atg gac act cgg gct gct gca tct gaa gcc ccc cag gat Gly Val Glu Met Asp Thr Arg Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp 545 550 555	1860	
gtg acc tac gcc cag ctg cac agc ttg acc ctc aga cgg aag gca act Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Lys Ala Thr 560 565 570 575	1908	10
gag cct cct cca tcc cag gaa agg gaa cct cca gct gag ccc agc atc Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Arg Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile 580 585 590	1956	
tac gcc acc ctg gcc atc cac tagccccggag ggtacgcaga ctccacactc Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His 595	2007	
agttagaaggaa gactcaggac tgctgaaggc acgggagctg ccccccagtgg acaccaatga accccccagtca gcctggaccc ctaacaaaaga ccatgaggag atgctggaa ctttgggact cacttgattc tgcagtcgaa ataactaata tccctacatt ttttaattaa agcaacagac ttctcaataa aaggcaggctcg tctcggttcca atct	2067 2127 2187 2221	
<210> 2 <211> 598 <212> PRT <213> Homo sapiens		
<400> 2		
Met Thr Pro Ile Val Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly 1 5 10 15		
Pro Arg Thr His Val Gln Thr Gly Thr Ile Pro Lys Pro Thr Leu Trp 20 25 30	30	
Ala Glu Pro Asp Ser Val Ile Thr Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Ser 35 40 45		
Cys Gln Gly Ser Leu Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Tyr Arg Glu Lys 50 55 60		

Lys Ser Ala Ser Trp Ile Thr Arg Ile Arg Pro Glu Leu Val Lys Asn  
 65 70 75 80

Gly Gln Phe His Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Thr Gly Arg Tyr  
 85 90 95

Gly Cys Gln Tyr Tyr Ser Arg Ala Arg Trp Ser Glu Leu Ser Asp Pro  
 100 105 110

Leu Val Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Pro Lys Pro Thr Leu Ser Ala  
 115 120 125

10

Gln Pro Ser Pro Val Val Thr Ser Gly Gly Arg Val Thr Leu Gln Cys  
 130 135 140

Glu Ser Gln Val Ala Phe Gly Gly Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu  
 145 150 155 160

Asp Glu His Pro Gln Cys Leu Asn Ser Gln Pro His Ala Arg Gly Ser  
 165 170 175

Ser Arg Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Asn Arg Arg Trp  
 180 185 190

20

Ser His Arg Cys Tyr Gly Tyr Asp Leu Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser  
 195 200 205

Ser Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys  
 210 215 220

Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Val Val Ala Pro Gly Glu Ser  
 225 230 235 240

Leu Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu  
 245 250 255

30

Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Leu Arg Gln Leu Pro Gly Arg Gln Pro  
 260 265 270

Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Arg  
 275 280 285

Ser Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala Tyr Asn Leu Ser Ser  
290 295 300

Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gin  
 305 310 315 320

Ile His Gly Thr Pro Phe Ile Ser Val Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala  
325 330 335

Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Arg Gln Phe His  
 340 345 350

10

Thr Phe Leu Leu Thr Lys Ala Gly Ala Ala Asp Ala Pro Leu Arg Leu  
 355                    360                    365

Arg Ser Ile His Glu Tyr Pro Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser  
370 375 380

Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Leu  
 385 390 395 400

Asn Ser Asp Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu  
405 410 415

20

Val Val Ser Gly Pro Ser Met Gly Ser Ser Pro Pro Pro Thr Gly Pro  
420 425 430

Ile Ser Thr Pro Ala Gly Pro Glu Asp Gln Pro Leu Thr Pro Thr Gly  
435 440 445

Ser Asp Pro Gln Ser Gly Leu Gly Arg His Leu Gly Val Val Ile Gly  
450 455 460

Ile Leu Val Ala Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Phe  
465 470 475 480

30

Leu Ile Leu Arg His Arg Arg Gln Gly Lys His Trp Thr Ser Thr Gln  
485 490 495

Arg Lys Ala Asp Phe Gln His Pro Ala Gly Ala Val Gly Pro Glu Pro  
500 505 510

Thr Asp Arg Gly Leu Gln Trp Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Ala Gln  
 515 520 525

Glu Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys Asp Thr Gln Pro Glu Asp Gly  
 530 535 540

Val Glu Met Asp Thr Arg Ala Ala Ala Ser Glu Ala Pro Gln Asp Val  
 545 550 555 560

Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Lys Ala Thr Glu  
 565 570 575

10

Pro Pro Pro Ser Gln Glu Arg Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile Tyr  
 580 585 590

Ala Thr Leu Ala Ile His  
 595

<210> 3  
 <211> 2194  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (67) .. (1959)  
 <223>

20

<400> 3  
 tctctgtcct gccagcactg agggctcatc cctctgcaga gcgcgggtc accgaaagga 60

gacgcc atg acg ccc gcc ctc aca gcc ctg ctc tgc ctt ggg ctg agt  
 Met Thr Pro Ala Leu Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser  
 1 5 10

ctg ggc ccc agg acc cgc gtg cag gca ggg ccc ttc ccc aaa ccc acc  
 Leu Gly Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Gly Pro Phe Pro Lys Pro Thr  
 15 20 25 30

30

ctc tgg gct gag cca ggc tct gtg atc agc tgg ggg agc ccc gtg acc  
 Leu Trp Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Ser Pro Val Thr  
 35 40 45

atc tgg tgt cag ggg agc ctg gag gcc cag gag tac caa ctg gat aaa  
 Ile Trp Cys Gln Gly Ser Leu Glu Ala Gln Glu Tyr Gln Leu Asp Lys  
 50 55 60

gag gga agc cca gag ccc ttg gac aga aat aac cca ctg gaa ccc aag  
 Glu Gly Ser Pro Glu Pro Leu Asp Arg Asn Asn Pro Leu Glu Pro Lys

300

65	70	75	
aac aag gcc aga ttc tcc atc cca tcc atg aca cag cac cat gca ggg Asn Lys Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Gln His His Ala Gly 80 85 90			348
aga tac cgc tgc cac tat tac agc tct gca ggc tgg tca gag ccc agc Arg Tyr Arg Cys His Tyr Tyr Ser Ser Ala Gly Trp Ser Glu Pro Ser 95 100 105 110			396
gac ccc ctg gag ctg gtg atg aca gga gcc tat agc aaa ccc acc ctc Asp Pro Leu Glu Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu 115 120 125			444
tca gcc ctg ccc agc cct gtg gtg gcc tca ggg ggg aat atg acc ctc Ser Ala Leu Pro Ser Pro Val Val Ala Ser Gly Gly Asn Met Thr Leu 130 135 140			492
cga tgt ggc tca cag aag aga tat cac cat ttt gtt ctg atg aag gaa Arg Cys Gly Ser Gln Lys Arg Tyr His His Phe Val Leu Met Lys Glu 145 150 155			540
gga gaa cac cag ctc ccc cgg acc ctg gac tca cag cag ctc cac agt Gly Glu His Gln Leu Pro Arg Thr Leu Asp Ser Gln Gln Leu His Ser 160 165 170			588
ggg ggg ttc cag gcc ctg ttc cct gtg ggc ccc gtg aac ccc agc cac Gly Gly Phe Gln Ala Leu Phe Pro Val Gly Pro Val Asn Pro Ser His 175 180 185 190			636
agg tgg agg ttc aca tgc tat tac tat tat atg aac acc ccc cgg gtg Arg Trp Arg Phe Thr Cys Tyr Tyr Tyr Met Asn Thr Pro Arg Val 195 200 205			684
tgg tcc cac ccc agt gac ccc ctg gag att ctg ccc tca ggc gtg tct Trp Ser His Pro Ser Asp Pro Leu Glu Ile Leu Pro Ser Gly Val Ser 210 215 220			732
agg aag ccc tcc ctc ctg acc ctg cag ggc cct gtc ctg gcc cct ggg Arg Lys Pro Ser Leu Leu Thr Leu Gln Gly Pro Val Leu Ala Pro Gly 225 230 235			780
cag agt ctg acc ctc cag tgt ggc tct gat gtc ggc tac gac aga ttt Gln Ser Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe 240 245 250			828
gtt ctg tat aag gag ggg gaa cgt gac ttc ctc cag cgc cct ggc cag Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln 255 260 265 270			876
cag ccc cag gct ggg ctc tcc cag gcc aac ttc acc ctg ggc cct gtg Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val 275 280 285			924
agc ccc tcc aat ggg ggc cag tac agg tgc tac ggt gca cac aac ctc Ser Pro Ser Asn Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu			972

10

20

30

40

290	295	300	
tcc tcc gag tgg tcg gcc ccc agc gac ccc ctg aac atc ctg atg gca Ser Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asn Ile Leu Met Ala 305 310 315			1020
gga cag atc tat gac acc gtc tcc ctg tca gca cag ccg ggc ccc aca Gly Gln Ile Tyr Asp Thr Val Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr 320 325 330			1068
gtg gcc tca gga gag aac gtg acc ctg ctg tgt cag tca tgg tgg cag Val Ala Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Trp Gln 335 340 345 350			1116
ttt gac act ttc ctt ctg acc aaa gaa ggg gca gcc cat ccc cca ctg Phe Asp Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His Pro Pro Leu 355 360 365			1164
cgt ctg aga tca atg tac gga gct cat aag tac cag got gaa ttc ccc Arg Leu Arg Ser Met Tyr Gly Ala His Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro 370 375 380			1212
atg agt cct gtg acc tca gcc cac gcg ggg acc tac agg tgc tac ggc Met Ser Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly 385 390 395			1260
tca cgc agc tcc aac ccc tac ctg ctg tct cac ccc agt gag ccc ctg Ser Arg Ser Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu 400 405 410			1308
gag ctc gtg gtc tca gga cac tct gga ggc tcc agc ctc cca ccc aca Glu Leu Val Val Ser Gly His Ser Gly Ser Ser Leu Pro Pro Thr 415 420 425 430			1356
ggg ccc tcc aca cct ggt ctg gga aga tac ctg gag gtt ttg att Gly Pro Pro Ser Thr Pro Gly Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Val Leu Ile 435 440 445			1404
ggg gtc tcc gtg gcc ttc gtc ctg ctg ttc ctc ctc ctc ttc ctc Gly Val Ser Val Ala Phe Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Phe Leu 450 455 460			1452
ctc ctc cga cgt cgt cac agc aaa cac agg aca tct gac cag aga Leu Leu Arg Arg Gln Arg His Ser Lys His Arg Thr Ser Asp Gln Arg 465 470 475			1500
aag act gat ttc cag cgt cct gca ggg gct ggc gag aca gag ccc aag Lys Thr Asp Phe Gln Arg Pro Ala Gly Ala Ala Glu Thr Glu Pro Lys 480 485 490			1548
gac agg ggc ctg ctg agg agg tcc agc cca gct gct gac gtc cag gaa Asp Arg Gly Leu Leu Arg Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Val Gln Glu 495 500 505 510			1596
gaa aac ctc tat gct gcc gtg aag gac aca cag tct gag gac ggg gtg Glu Asn Leu Tyr Ala Ala Val Lys Asp Thr Gln Ser Glu Asp Gly Val			1644

10

20

30

515	520	525	
gag ctg gac agt cag agc cca cac gat gaa gac ccc cac gca gtg acg Glu Leu Asp Ser Gln Ser Pro His Asp Glu Asp Pro His Ala Val Thr			1692
530	535	540	
tat gcc ccg gtg aaa cac tcc agt cct agg aga gaa atg gcc tct cct Tyr Ala Pro Val Lys His Ser Ser Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro			1740
545	550	555	
cct tcc cca ctg tct ggg gaa ttc ctg gac aca aag gac aga cag gca Pro Ser Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln Ala			1788
560	565	570	
gaa gag gac aga cag atg gac act gag gct gca tct gaa gcc tcc Glu Glu Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ser Glu Ala Ser			1836
575	580	585	
cag gat gtg acc tac gcc cag ctg cac agc ttg acc ctt aga cgg aag Gln Asp Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Lys			1884
595	600	605	
gca act gag cct cca tcc cag gaa ggg gaa cct cca gct gag ccc Ala Thr Glu Pro Pro Ser Gln Glu Gly Glu Pro Pro Ala Glu Pro			1932
610	615	620	
agc atc tac gcc act ctg gcc atc cac tagccccggg ggtacgcaga Ser Ile Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His			1979
625	630		
ccccacactc agcagaagga gactcaggac tgctgaagga cgggagctgc ccccagtgg caccagtcaa ccccagtca cctggacccc taacacagac catgaggaga cgctggaaac			2039
ttgtggact cacctgactc aaagatgact aatatcgccc cattttggaa ataaaagcaac			2099
agacttctca agcaggtcgt ctctttccaa gatct			2159
			2194
<210> 4			
<211> 631			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 4			30
Met Thr Pro Ala Leu Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Gly Pro Phe Pro Lys Pro Thr Leu Trp			
20	25	30	
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Ser Pro Val Thr Ile Trp			
35	40	45	

Cys Gln Gly Ser Leu Glu Ala Gln Glu Tyr Gln Leu Asp Lys Glu Gly  
 50                    55                    60

Ser Pro Glu Pro Leu Asp Arg Asn Asn Pro Leu Glu Pro Lys Asn Lys  
 65                    70                    75                    80

Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Gln His His Ala Gly Arg Tyr  
 85                    90                    95

Arg Cys His Tyr Tyr Ser Ser Ala Gly Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro  
 100                    105                    110

Leu Glu Leu Val Met Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala  
 115                    120                    125

Leu Pro Ser Pro Val Val Ala Ser Gly Gly Asn Met Thr Leu Arg Cys  
 130                    135                    140

Gly Ser Gln Lys Arg Tyr His His Phe Val Leu Met Lys Glu Gly Glu  
 145                    150                    155                    160

His Gln Leu Pro Arg Thr Leu Asp Ser Gln Gln Leu His Ser Gly Gly  
 165                    170                    175

Phe Gln Ala Leu Phe Pro Val Gly Pro Val Asn Pro Ser His Arg Trp  
 180                    185                    190

Arg Phe Thr Cys Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asn Thr Pro Arg Val Trp Ser  
 195                    200                    205

His Pro Ser Asp Pro Leu Glu Ile Leu Pro Ser Gly Val Ser Arg Lys  
 210                    215                    220

30  
 Pro Ser Leu Leu Thr Leu Gln Gly Pro Val Leu Ala Pro Gly Gln Ser  
 225                    230                    235                    240

Leu Thr Leu Gln Cys Gly Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu  
 245                    250                    255

Tyr Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Gln Pro  
 260                    265                    270

Gln Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro  
 275                    280                    285

Ser Asn Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Gly Ala His Asn Leu Ser Ser  
 290                    295                    300

Glu Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asn Ile Leu Met Ala Gly Gln  
 305                    310                    315                    320

Ile Tyr Asp Thr Val Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Ala  
 325                    330                    335

10

Ser Gly Glu Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Trp Trp Gln Phe Asp  
 340                    345                    350

Thr Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Ala His Pro Pro Leu Arg Leu  
 355                    360                    365

Arg Ser Met Tyr Gly Ala His Lys Tyr Gln Ala Glu Phe Pro Met Ser  
 370                    375                    380

Pro Val Thr Ser Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Gly Ser Arg  
 385                    390                    395                    400

20

Ser Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser His Pro Ser Glu Pro Leu Glu Leu  
 405                    410                    415

Val Val Ser Gly His Ser Gly Gly Ser Ser Leu Pro Pro Thr Gly Pro  
 420                    425                    430

Pro Ser Thr Pro Gly Leu Gly Arg Tyr Leu Glu Val Leu Ile Gly Val  
 435                    440                    445

Ser Val Ala Phe Val Leu Leu Phe Leu Leu Phe Leu Leu Leu  
 450                    455                    460

30

Arg Arg Gln Arg His Ser Lys His Arg Thr Ser Asp Gln Arg Lys Thr  
 465                    470                    475                    480

Asp Phe Gln Arg Pro Ala Gly Ala Ala Glu Thr Glu Pro Lys Asp Arg  
 485                    490                    495

Gly Leu Leu Arg Arg Ser Ser Pro Ala Ala Asp Val Gln Glu Glu Asn  
 500 505 510

Leu Tyr Ala Ala Val Lys Asp Thr Gln Ser Glu Asp Gly Val Glu Leu  
 515 520 525

Asp Ser Gln Ser Pro His Asp Glu Asp Pro His Ala Val Thr Tyr Ala  
 530 535 540

Pro Val Lys His Ser Ser Pro Arg Arg Glu Met Ala Ser Pro Pro Ser  
 545 550 555 560

10

Pro Leu Ser Gly Glu Phe Leu Asp Thr Lys Asp Arg Gln Ala Glu Glu  
 565 570 575

Asp Arg Gln Met Asp Thr Glu Ala Ala Ser Glu Ala Ser Gln Asp  
 580 585 590

Val Thr Tyr Ala Gln Leu His Ser Leu Thr Leu Arg Arg Lys Ala Thr  
 595 600 605

Glu Pro Pro Pro Ser Gln Glu Gly Glu Pro Pro Ala Glu Pro Ser Ile  
 610 615 620

20

Tyr Ala Thr Leu Ala Ile His  
 625 630

<210> 5  
<211> 1725  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (40)..(1488)  
<223>

30

<400> 5  
ctcatccatc cgcagagcag ggcagtggga ggagacgcc atg acc ccc atc ctc 54  
Met Thr Pro Ile Leu  
1 5

acg gtc ctg atc tgt ctc ggg ctg agt ctg ggc ccc agg acc cac gtg 102  
Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly Pro Arg Thr His Val

10	15	20	
cag gca ggg cac ctc ccc aag ccc acc ctc tgg gct gag cca ggc tct Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp Ala Glu Pro Gly Ser 25 30 35			150
gtg atc atc cag gga agt cct gtg acc ctc agg tgt cag ggg agc ctt Val Ile Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg Cys Gln Gly Ser Leu 40 45 50			198
cag gct gag gag tac cat cta tat agg gaa aac aaa tca gca tcc tgg Gln Ala Glu Glu Tyr His Leu Tyr Arg Glu Asn Lys Ser Ala Ser Trp 55 60 65			246
gtt aga cgg ata caa gag cct ggg aag aat ggc cag ttc ccc atc cca Val Arg Arg Ile Gln Glu Pro Gly Lys Asn Gly Gln Phe Pro Ile Pro 70 75 80 85			294
tcc atc acc tgg gaa cac gca ggg cgg tat cac tgt cag tac tac agc Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr His Cys Gln Tyr Tyr Ser 90 95 100			342
cac aat cac tca tca gag tac agt gac ccc ctg gag ctg gtg gtg aca His Asn His Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr 105 110 115			390
gga gcc tac agc aaa ccc acc ctc tca gct ctg ccc agc cct gtg gtg Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala Leu Pro Ser Pro Val Val 120 125 130			438
acc tta gga ggg aac gtg acc ctc cag tgt gtc tca cag gtg gca ttt Thr Leu Gly Asn Val Thr Leu Gln Cys Val Ser Gln Val Ala Phe 135 140 145			486
gac ggc ttc att ctg tgt aag gaa gga gaa gat gaa cac cca caa cgc Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Asp Glu His Pro Gln Arg 150 155 160 165			534
ctg aac tcc cat tcc cat gca cgt ggg tgg tcc tgg gcc atc ttc tcc Leu Asn Ser His Ser His Ala Arg Gly Trp Ser Trp Ala Ile Phe Ser 170 175 180			582
gtg ggc ccc gtg agc ccg agt cgc agg tgg tcg tac agg tgc tat gct Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg Trp Ser Tyr Arg Cys Tyr Ala 185 190 195			630
tat gac tcg aac tct ccc tat gtg tgg tct cta ccc agt gat ctc ctg Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Leu Pro Ser Asp Leu Leu 200 205 210			678
gag ctc ctg gtc cca ggt gtt tct aag aag cca tca ctc tca gtg cag Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro Ser Leu Ser Val Gln 215 220 225			726
cca ggt cct atg gtg gcc ccc ggg gag agc ctg acc ctc cag tgt gtc Pro Gly Pro Met Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu Thr Leu Gln Cys Val			774

10

20

30

230	235	240	245	
tct gat gtc ggc tac gac aga ttt gtt ctg tat aag gag gga gaa cgt Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly Glu Arg 250                    255                    260				822
gac ttc ctc cag cgc cct ggt tgg cag ccc cag gct ggg ctc tcc cag Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Trp Gln Pro Gln Ala Gly Leu Ser Gln 265                    270                    275				870
gcc aac ttc acc ctg ggc cct gtg agc ccc tcc cac ggg ggc cag tac Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro Ser His Gly Gly Gln Tyr 280                    285                    290				918
aga tgc tac agt gca cac aac ctc tcc gag tgg tcg gcc ccc agt Arg Cys Tyr Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Trp Ser Ala Pro Ser 295                    300                    305				966
gac ccc ctg gac atc ctg atc aca gga cag ttc tat gac aga ccc tct Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Phe Tyr Asp Arg Pro Ser 310                    315                    320				1014
ctc tcg gtg cag ccg gtc ccc aca gta gcc cca gga aag aac gtg acc Leu Ser Val Gln Pro Val Pro Thr Val Ala Pro Gly Lys Asn Val Thr 330                    335                    340				1062
ctg ctg tgt cag tca cgg ggg cag ttc cac act ttc ctt ctg acc aag Leu Leu Cys Gln Ser Arg Gly Gln Phe His Thr Phe Leu Leu Thr Lys 345                    350                    355				1110
gag ggg gca ggc cat ccc cca ctg cat ctg aga tca gag cac caa gct Glu Gly Ala Gly His Pro Pro Leu His Leu Arg Ser Glu His Gln Ala 360                    365                    370				1158
cag cag aac cag gct gaa ttc cgc atg ggt cct gtg acc tca gcc cac Gln Gln Asn Gln Ala Glu Phe Arg Met Gly Pro Val Thr Ser Ala His 375                    380                    385				1206
gtg ggg acc tac aga tgc tac agc tca ctc agc tcc aac ccc tac ctg Val Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ser Leu Ser Ser Asn Pro Tyr Leu 390                    395                    400                    405				1254
ctg tct ctc ccc agt gac ccc ctg gag ctc gtg gtc tca gaa gca gct Leu Ser Leu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Ser Glu Ala Ala 410                    415                    420				1302
gag acc ctc agc cca tca caa aac aag aca gac tcc acg act aca tcc Glu Thr Ile Ser Pro Ser Gln Asn Lys Thr Asp Ser Thr Thr Ser 425                    430                    435				1350
cta ggc caa cac ccc cag gat tac aca gtg gag aat ctc atc cgc atg Leu Gly Gln His Pro Gln Asp Tyr Thr Val Glu Asn Leu Ile Arg Met 440                    445                    450				1398
ggt gtg gct ggc ttg gtc ctg gtg gtc ctc ggg att ctg cta ttt gag Gly Val Ala Gly Leu Val Val Val Leu Gly Ile Leu Leu Phe Glu				1446

10

20

30

40

455

460

465

gct cag cac agc cag aga agc cta caa gat gca gcc ggg agg  
 Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Leu Gln Asp Ala Ala Gly Arg  
 470 475 480

tgaacagcag agaggacaat gcattttca gcgtgggaa gcgtcaggga cagatctgat 1488  
 gatcccagga ggctctggag gacaatctag gacctacatt atctggactg tatgtggtc 1548  
 atttcttagag acagcaatca atatttgagt gtaaggaaac tgtctgggt gattcctaga 1608  
 agatcattaa actgtggtac attttttgt ctaaaaagca ggtcgctcg ttccaag 1668  
 1725

10

<210> 6  
 <211> 483  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

Met Thr Pro Ile Leu Thr Val Leu Ile Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Pro Arg Thr His Val Gln Ala Gly His Leu Pro Lys Pro Thr Leu Trp  
 20 25 30

20

Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ile Gln Gly Ser Pro Val Thr Leu Arg  
 35 40 45

Cys Gln Gly Ser Leu Gln Ala Glu Glu Tyr His Leu Tyr Arg Glu Asn  
 50 55 60

Lys Ser Ala Ser Trp Val Arg Arg Ile Gln Glu Pro Gly Lys Asn Gly  
 65 70 75 80

Gln Phe Pro Ile Pro Ser Ile Thr Trp Glu His Ala Gly Arg Tyr His  
 85 90 95

30

Cys Gln Tyr Tyr Ser His Asn His Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Pro Leu  
 100 105 110

Glu Leu Val Val Thr Gly Ala Tyr Ser Lys Pro Thr Leu Ser Ala Leu  
 115 120 125

Pro Ser Pro Val Val Thr Leu Gly Gly Asn Val Thr Leu Gln Cys Val  
 130 135 140

40

Ser Gln Val Ala Phe Asp Gly Phe Ile Leu Cys Lys Glu Gly Glu Asp  
145 150 155 160

Glu His Pro Gln Arg Leu Asn Ser His Ser His Ala Arg Gly Trp Ser  
165 170 175

Trp Ala Ile Phe Ser Val Gly Pro Val Ser Pro Ser Arg Arg Trp Ser  
180 185 190

Tyr Arg Cys Tyr Ala Tyr Asp Ser Asn Ser Pro Tyr Val Trp Ser Leu  
195 200 205 10

Pro Ser Asp Leu Leu Glu Leu Leu Val Pro Gly Val Ser Lys Lys Pro  
210 215 220

Ser Leu Ser Val Gln Pro Gly Pro Met Val Ala Pro Gly Glu Ser Leu  
225 230 235 240

Thr Leu Gln Cys Val Ser Asp Val Gly Tyr Asp Arg Phe Val Leu Tyr  
245 250 255

Lys Glu Gly Glu Arg Asp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Trp Gln Pro Gln  
260 265 270 20

Ala Gly Leu Ser Gln Ala Asn Phe Thr Leu Gly Pro Val Ser Pro Ser  
275 280 285

His Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Tyr Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu  
290 295 300

Trp Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Leu Ile Thr Gly Gln Phe  
305 310 315 320

Tyr Asp Arg Pro Ser Leu Ser Val Gln Pro Val Pro Thr Val Ala Pro  
325 330 335 30

Gly Lys Asn Val Thr Leu Leu Cys Gln Ser Arg Gly Gln Phe His Thr  
340 345 350

Phe Leu Leu Thr Lys Glu Gly Ala Gly His Pro Pro Leu His Leu Arg  
355 360 365

Ser Glu His Gln Ala Gln Gln Asn Gln Ala Glu Phe Arg Met Gly Pro  
 370 375 380

Val Thr Ser Ala His Val Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Ser Leu Ser  
 385 390 395 400

Ser Asn Pro Tyr Leu Leu Ser Leu Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val  
 405 410 415

Val Ser Glu Ala Ala Glu Thr Leu Ser Pro Ser Gln Asn Lys Thr Asp  
 420 425 430

10

Ser Thr Thr Ser Leu Gly Gln His Pro Gln Asp Tyr Thr Val Glu  
 435 440 445

Asn Leu Ile Arg Met Gly Val Ala Gly Leu Val Leu Val Val Leu Gly  
 450 455 460

Ile Leu Leu Phe Glu Ala Gln His Ser Gln Arg Ser Leu Gln Asp Ala  
 465 470 475 480

Ala Gly Arg

20

### 【手続補正書】

【提出日】平成15年5月6日(2003.5.6)

### 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

### 【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

### 【背景技術】

### 【0001】

本発明は、補助金番号R01 AI31599に従い、米国保健省、国立衛生研究所からの支援を少なくとも一部受けて、為された。従って、米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

### 【0002】

慢性関節リウマチ(RA)は、関節周囲の軟骨及び骨の破壊を伴う、滑膜肥厚及び滑膜パンヌス形成を特徴とする慢性炎症性滑膜炎である(Tak, PP, Arthritis & Rheumatism 43(12):2619-33(2000))。炎症部位に見出される優勢な炎症細胞は、マクロファージ(A型滑膜細胞)及び纖維芽細胞様細胞(B型滑膜細胞)、並びに増加した数の好中球、肥満細胞、ナチュラルキラー細胞、形質細胞及びリンパ球である(Leirisalo-Repoloら、Inflammation 17(4):427-42(1993); Gotis-Graham I及びMcNeil HP, Arthritis & Rheumatism 40(3):479-89(1997); Maloneら、Arthritis & Rheumatism 30(2):130-37(1987); Bromley M及びWooley DE, Arthritis & Rheumatism 27:857-63(1984); Jeffreiss R.、British Medical Bulletin 51(2):312-31(

1995)。これらの細胞は、脂質メディエーター (Elmgreenら、Ann Rheum Dis 46:501-05 (1987); Moilanen E.、Pharmacol Toxicol 75 (Suppl 2):4-8 (1994))、炎症前 (pro-inflammatory) サイトカイン (Firesteinら、J Immunol 144:3347-53 (1990); Westacottら、Ann Rheum Dis 49: (9) 676-81 (1990); Alvaro-Graciaら、J Clin Invest 86:1790-98 (1990); Brennanら、Br J Rheumatol 30 (Suppl 1):76-80 (1991)) 及び組織分解酵素 (Hembryら、Ann Rheum Dis 54 (1):25-32 (1995); Taylorら、Ann Rheum Dis 53 (1):768-72 (1994)) のような多数の因子を放出することにより、炎症及び組織破壊を促進するようである。

#### 【0003】

滑膜マクロファージは、インターロイキンIL-1 及び腫瘍壞死因子TNF (これらは、これらのサイトカインを標的とした疾患修飾療法の効力により立証されるように、RAの病原の中心である) の優勢な起源である (Feldmann M及びMaini RN、Ann Rev Immunol 19:163-96 (2001))。RAにおける関節破壊は、マクロファージ及び破骨細胞に由来するプロテアーゼによって媒介される可能性が高い。リウマチ滑膜における活性化された白血球の存在に関する証拠は豊富に存在するが、それらの活性化の(1つ以上の)メカニズム及び制御はよく理解されていない。

#### 【0004】

「白血球免疫グロブリン様受容体 (leucocyte immunoglobulin-like receptors)」(LIR) 又は「免疫グロブリン様転写物 (immunoglobulin-like transcript)」(ILT) と名付けられた新しいタンパク質のファミリーは、炎症及び免疫応答に関与している様々な細胞の表面上に発現している。このファミリーのメンバーは、細胞質尾部に存在するイムノレセプターチロシンベースドインヒビトリームチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs) (ITIM) によって、又は「イムノレセプターチロシンベースドアクチベーションモチーフ (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)」すなわち「ITAMモチーフ」を含有している他のタンパク質との細胞膜における会合によって、細胞応答を調整することがインピトロで示されている (Armら、J Immunol 159:2342 (1997); Fangerら、Eur J Immunol 128:3423-34 (1998); Borgesら、J Immunol 159:5192-96 (1997); Samaridis J及びColonna M, Eur J Immunol 27:660-65 (1997); WO98/48017; 米国特許第6,140,076号; 及びWO00/68383)。

#### 【0005】

LIRによって制御される細胞性応答の範囲は、インピトロで研究されている。LIR-1又はLIR-2によるMHCクラスI分子の認識は、NK細胞活性及びT細胞細胞障害性を阻害することが示された(例えば、Colonnaら、J Exp Med 186:1809-18 (1997); Fangerら、1998を参照)。阻害性のLIR-1、LIR-2、LIR-3又はLIR-5のBCR、TCR、Fc R又はMHCクラスI分子のような活性化受容体との同時ライゲーション (co-ligation) は、活性化分子によって誘発されるCa<sup>2+</sup>流動及び後続の下流イベントを阻害した(Cellaら、J Exp Med 185:1743-51; Colonnaら、1997; Colonnaら、1998; 及びSaverinoら、J Immunol 165:3742-55 (2000))。これらのイベントは、LIR-1のT細胞受容体との相互作用に関して最近解明された(Dietrichら、J Immunol 166

: 2 5 1 4 - 2 1 ( 2 0 0 1 ) ) 。

【 0 0 0 6 】

L I R 及び関連分子が、炎症状態における白血球の活性化のしきい値及び／又は程度を決定するかもしれないことが示唆された。この概念は、L I R との類似性を有するタンパク質である g p 4 9 B 1 の破壊を有するマウスにおける最近の研究により支持されている (Daheshiaら、J Exp Med 189 : 309 - 318 (2001)) 。

【 0 0 0 7 】

L I R - 1 、 2 、 3 、 5 及び 8 を含む阻害性 L I R は、 2 個から 4 個の I T I M を含有している長い細胞質ドメインを示す。「 I L T 4 」又は「 M I R 1 0 」としても既知の L I R - 2 は、 3 個の I T I M モチーフを含有しており、 H L A - A 、 H L A - B 及び H L A - C 対立遺伝子を含む M H C クラス I タンパク質の多様なアレイに結合する (Fangerら、1998) 。 L I R - 1 及び L I R - 2 は、 広い特異性でクラス I 分子と相互作用し、 H L A - A 、 B 、 C 及び H L A - G 内の対立遺伝子を認識することが知られている (Colonnaら、1998 ; Cosmanら、Immunology 7 : 273 - 82 (1997) ; Banhamら、J Leukocyte Biol 65 : 841 - 45 (1999) ) 。阻害性 L I R が細胞活性化の阻害を媒介する 1 つの手段は、 非受容体チロシンキナーゼカスケードを介するシグナリングを阻害するか又は終結させるため、 s r c ホモロジー 2 ( S H 2 ) ドメイン含有ホスファターゼ 1 ( S H P - 1 ) を動員することによる ( 例えば、 Cell a ら、 1997 ; Colonna ら、 1997 ; Colonna ら、 J Immunol 160 : 3096 - 3100 ( 1998 ) ；及び Dietrich ら、 J Immunol 166 : 2514 - 21 ( 2001 ) を参照 ) 。

【 0 0 0 8 】

L I R - 6 a 、 L I R 6 b 及び L I R - 7 を含む活性化 L I R は、 短い細胞質ドメイン、 及び F c R I との会合を容易にし得る膜貫通ドメイン内の正電荷を有するアルギニン残基を特徴とする。 L I R - 7 は「 I L T 1 」とも呼ばれる。 L I R - 7 自体は、 かなり短い細胞質尾部を含有しているが、 細胞膜において F c 受容体ガンマ鎖 ( F c R I ) と特異的に会合する ( Nakajima ら、 J Immunol 162 : 5 - 8 ( 1999 ) ) 。この F c 受容体ガンマ鎖は、 I T A M を含有している細胞質尾部を有しており、 従って刺激シグナルを伝達することができる。 F c R I は、 他のタンパク質、 即ち F C R 及び活性化 N K 細胞受容体のためのシグナリングパートナーを務めていることが知られている。ナカジマらは、 L I R - 7 が、 会合したタンパク質 F c R I を使用して、 刺激シグナルを変換するよう細胞を活性化するということを提唱している。 F c R I

との会合を容易にし得る L I R - 7 の膜貫通ドメイン内の正電荷を有するアルギニン残基。ナカジマらは、 トランスフェクトされた L I R - 7 を発現しているラット好塩基球性白血病細胞 ( R B L 細胞 ) におけるセロトニン放出を L I R - 7 が誘起し得ることを示すことにより、 細胞活性化を媒介する L I R - 7 の能力を証明した。セロトニン放出は、 細胞表面 L I R - 7 を架橋する抗体に細胞を曝すことにより誘起された。さらに、 このグループは、 L I R - 7 の架橋が、 初代単球、 L I R - 7 発現ベクターにより形質転換された P 8 1 5 細胞、 及びトランスフェクトされた R B L 細胞 ( Nakajima ら、 1999 ) を含むいくつかの細胞型において、 細胞内カルシウム移動を誘発することを証明した。カルシウムの移動は、 単球活性化における初期のイベントである。

【 0 0 0 9 】

L I R - 1 、 L I R - 2 、 L I R - 5 及び L I R - 7 の細胞分布は、 モノクローナル抗体を使用して詳細に研究されている。 L I R - 1 は、 全ての末梢血単球、 インビトロで派生した樹状細胞及びマクロファージ、 B 細胞、 並びに T 細胞及び N K 細胞のサブセットに発現している ( Samardiidis ら、 1997 ; Cosman ら、 1997 ) 。より限定された細胞分布が、 L I R - 2 及び L I R - 5 に関して報告されており、 それらは単球及び樹状細胞において最も顕著である ( Colonna ら、 1998 ) 。 L I R - 7 は、 全ての末梢血単球及び顆粒球、 インビトロで派生したマクロファージ、 並びに樹状細胞に発現している ( Nakajima ら、 1999 ) 。 m R N A レベルでは、 L I R - 3 及び

LIR-6 の転写物は単球及びB細胞に検出され、LIR-4 の転写物はB細胞、NK細胞及び単球に検出され、LIR-8 の転写物はNK細胞にのみ検出された (Borgesら、1997；Armら、1998)。従って、LIR発現の治療的な調節は、有望な探究分野である。

#### 【発明の開示】

##### 【0010】

LIR-2、LIR-3 及び LIR-7 を特異的に標的とする薬剤 1 つ以上を投与することにより RA を治療する方法が、ここで提供される。ここに開示された結果は、これらの 3 つの LIR が、滑膜組織に浸潤する白血球の活性化の制御に関するかもしれないことを示している。従って、RA 患者の関節における炎症は、炎症を起こした関節に存在する単球もしくはマクロファージの活性化を減少させるかもしくは排除するため、又はそれらの炎症部位への動員を減少させるため、LIR-2 及び / 又は LIR-3 及び / 又は LIR-7 の発現又は機能を調節する薬剤を投与することにより改善され得る。これは、刺激シグナルを伝達する LIR-7 を調節することにより、かつ / もしくは誘起された場合に阻害効果を発揮する LIR-2 及び / もしくは LIR-3 を調節することにより、又はこれらの LIR のうちの 2 つもしくは 3 つ全てを同時に調節することにより、達成され得る。

##### 【0011】

RA を有する患者は、LIR-2 又は LIR-3 に結合するアゴニスト性薬剤を有効量投与するか、又はこれらのタンパク質の各々に結合するアゴニストを同時に投与し、それによりそれらの阻害活性を誘起することにより、本発明に従い治療される。LIR-2 アゴニスト及び / 又は LIR-3 アゴニストの RA 患者への投与は、患者における滑膜単球内のカルシウム移動を減少させる。本発明の好ましい実施形態において、その薬剤は、LIR-2 と特異的に免疫反応性であるアゴニスト性抗体である。もう 1 つの好ましい実施形態において、その薬剤は、LIR-3 と特異的に免疫反応性であるアゴニスト性抗体である。モノクローナル抗体が好ましい。好ましくは、モノクローナル抗体は、可変部がげつ歯動物に由来し、残部がヒトに由来するヒト化抗体である。より好ましくは、モノクローナル抗体は完全にヒトのものである。他の実施形態において、LIR-2 又は LIR-3 アゴニストは、小さい有機分子である。

##### 【0012】

本発明のもう 1 つの局面において、RA 患者は、LIR-7 の生物学的活性に拮抗する薬剤により治療される。そのような薬剤は、LIR-7 が誘起されるのを部分的又は完全に阻止し、従って炎症を起こした関節の部位においてそれが単球又はマクロファージを活性化するのを防止する。RA 患者への LIR-7 アンタゴニストの投与は、患者における滑膜単球から放出されるカルシウムの量を減少させる。本発明の 1 つの局面において、薬剤は、LIR-7 と特異的に免疫反応性であるアンタゴニスト性抗体であり、即ち、その抗体は LIR-7 に特有のエピトープと特異的に結合する。そのような抗体は、阻止抗体であり、LIR-7 のそのリガンドとの結合を阻止する。好ましくは、抗体はモノクローナル抗体である。好ましい実施形態において、モノクローナル抗体はヒト化抗体であり、もう 1 つの好ましい実施形態において、モノクローナル抗体は完全にヒトのものである。もう 1 つの実施形態において、LIR-7 アンタゴニストは、LIR-7 の細胞外領域がヒト免疫グロブリンタンパク質の Fc 領域に連結されている融合タンパク質を含む、LIR-7 の細胞外領域を含む可溶性ポリペプチドである。さらに他の実施形態において、LIR-7 アンタゴニストは小さい有機分子である。LIR-7 アンタゴニストは、単独で、又は LIR-2 及び / もしくは LIR-3 のアゴニストと一緒に投与され得る。

##### 【0013】

本発明の他の局面は、互いに同時に投与されるか、又は LIR-7 に拮抗する薬剤と同時に投与される LIR-2 及び / 又は LIR-3 を誘起するアゴニスト性薬剤の様々な組み合わせによる RA の同時治療を含む治療法を提供する。これには、以下の組み合わせのうちの 1 つの同時投与を含む治療が含まれる： i ) LIR-3 に作動する (agoniz

e) 薬剤と LIR - 7 に拮抗する (antagonize) 薬剤; ii) LIR - 2 に作用する薬剤と LIR - 7 に拮抗する薬剤; iii) LIR - 2 に作用する薬剤と LIR - 3 に作用する薬剤; iv) LIR - 2 に作用する薬剤と LIR - 3 に作用する薬剤と LIR - 7 に拮抗する薬剤。好ましくは、そのような薬剤は、ヒト化抗体又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。他の好ましい薬剤は、LIR - 2 及び / もしくは LIR - 3 に作用するか、又は LIR - 7 に拮抗する、小さい有機分子である。さらに、前記の LIR 調節剤を、慢性関節リウマチを治療するために使用される他の薬物療法の同時使用と組み合わせた治療法が、提供される。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0014】

LIR - 2、LIR - 3 及び LIR - 7 が、RA を有する患者の滑膜に浸潤している白血球にディファレンシャルに発現していることが、免疫組織化学的技術を使用して、ここで示される。RA 患者とは、1つ以上の炎症を起こした関節又は敏感な関節を有しており、血清がリウマチ因子陽性と判定された人々である。RA 患者に見られるもののような炎症応答は、阻害シグナル及び活性化シグナルの複雑なネットワークによって制御されている可能性が高い。従って、LIR - 2、LIR - 3 又は LIR - 7 の RA 滑膜における発現を調節する薬剤の投与を含む治療法が、ここで提供される。本発明の1つの実施形態において、開示された治療的処置は、非 RA 患者（対照組織）と比較して上昇したレベルの LIR - 2、LIR - 3 又は LIR - 7 を発現している滑膜組織を有する RA 患者に投与される。これらのタンパク質のレベルが上昇しているか否かを決定するためには、滑膜生検に由来する組織が、これらの LIR に対する抗体による染色により分析される。LIR - 2、LIR - 3 又は LIR - 7 の生物学的活性を阻害又は増強する薬剤は、ここで、「LIR 調節剤」と呼ばれる。

##### 【0015】

ここに開示された観察は、LIR - 2、LIR - 3 及び LIR - 7 が、RA を有する患者の滑膜に浸潤している白血球には上昇したレベルで発現しているが、骨関節炎（OA）を有している患者の滑膜においては上昇していないことを示している。RA は炎症を媒介する白血球の滑膜組織への広範な浸潤を特徴とするが、OA は通常炎症には関連していない慢性変性性状態である。開示された観察はまた、LIR - 2、LIR - 3 及び LIR - 7 の発現が、疾患の初期段階にある RA 患者より、確立された纖維症を有する RA 患者の方が低いことを示している。一般に、纖維症は、罹患年数が長い RA 患者においてのみ発症する。例えば、罹患年数が 8 年以上ある者は、関節纖維症を発症している可能性が高い。本発明の1つの実施形態において、LIR 調節剤は、関節が纖維症になっていない RA 患者に投与される。

##### 【0016】

ここで使用されるように、LIR - 2 という用語には、配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びにこのタンパク質の生物学的特性を有している異型及びミューテイン (muttein) が含まれる。配列番号 2 に示された LIR - 2 は、アミノ酸 1 ~ 16 に 16 アミノ酸のシグナルペプチドを含む 458 アミノ酸（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 458）の予想された細胞外領域を有している。この LIR - 2 は、配列番号 2 のアミノ酸 459 ~ 483 に膜貫通ドメイン、及び配列番号 2 のアミノ酸 484 ~ 598 を含む細胞質ドメインも含んでいる。細胞外ドメインは、4 個の免疫グロブリン様ドメインを含んでおり、細胞質ドメインはアミノ酸 531 ~ 536、560 ~ 565 及び 590 ~ 595 に 3 個の ITIM モチーフを含んでいる。

##### 【0017】

「LIR - 2」という用語には、ここで使用されるように、配列番号 2 に示された LIR - 2 のアミノ酸 17 ~ 458との少なくとも 90% のアミノ酸配列同一性、又はより好ましくは少なくとも 95%、又は最も好ましくは少なくとも 98% のアミノ酸配列同一性を有し、かつ配列番号 2 に示されたアミノ酸配列を有する LIR に関連した生物学的活性も有するポリペプチドも含まれる。そのような生物学的活性の一例は、MHC クラス I ポ

リペプチドとの結合能である。LIR-2ポリペプチドのMHC Iとの結合能は、細胞表面上に発現されたMHCクラスIタンパク質とのLIR-2ポリペプチドの結合を検出するアッセイのような任意の便利なアッセイにより決定され得る。結合の特異性は、推定LIR-2が、MHC Iを発現していることが既知の細胞と結合するのを、MHC Iに特異的な抗体が阻止し得るか否かをテストすることにより確認され得る。そのようなテストに使用され得る細胞及び細胞系には、CB23、HSB2、MP-1、ジャーカット(Jurkat)、初代T細胞、初代B細胞又は初代NK細胞のような、MHC Iを発現している任意の細胞が含まれる。

#### 【0018】

LIR-2のMHC Iとの結合を検出するのに適しているアッセイは、参照して完全にここに組み込まれるWO98/48017に記載されたフローサイトメトリーアッセイである。簡単に説明すると、このアッセイを実施するには、まず、MHC Iを発現している細胞を、FACSバッファー(2%FCSを含む0.2%アジ化物含有PBS)により洗浄し、次いで、約 $10^5$ 個に等分した細胞を、ブロッキングバッファー(2%FCS、5%NGS、5%ウサギ血清を含むPBS)100μL中で約1時間インキュベートする。各細胞試料に、増加する量(例えば、0、2、5又は10μg)の対照血清又はW6/32(ATCC HB-95)を含むブロッキングバッファー100μLを添加する。W6/32とは、HLA-A、B及びCポリペプチドを含むMHCクラスI重鎖に特異的な抗体であり、この抗体とのプレインキュベーションは、他のタンパク質のMHC Iとの特異的結合を競合的に阻止する。W6/32又は対照血清の添加の後、試料を約1時間氷上でインキュベートし、次いで、FACSバッファー200μLで約3回洗浄する。次に、LIR-2ポリペプチド約5μgを添加する。このアッセイのためのLIR-2ポリペプチドは、ヒトIgG免疫グロブリンタンパク質のFc領域に連結されたLIR-2の細胞外領域を含む可溶性融合タンパク質(sLIR-2/Fc)である。sLIR-2/Fcポリペプチドを含むブロッキングバッファーを各試料に添加し、その混合物を約1時間氷上でインキュベートする。sLIR-2/Fcとのインキュベーションの後、細胞をFACSバッファーで数回洗浄し、ヒトIgGのFc領域と特異的に免疫反応性であるビオチン標識マウス抗体(Jackson Research Laboratoriesより入手可能)及びSAPE(ストレプトアビジン-フィコエリトリン; Molecular Probesより入手可能)により約45分間処理する。SAPEは、抗ヒトFc/ビオチンのビオチン部分と結合し、適切な励起条件及び放射条件に曝された場合に蛍光を発する蛍光性化合物である。従って、ビオチン化抗ヒトFcが、細胞と結合したsLIR-2/Fcと反応し、代わってSAPEが抗ヒトFcのビオチン部分と結合する。sLIR-2/Fcが結合した細胞を検出するため、LIR-2/Fc、抗ヒトFc及びSAPEに曝された細胞をFACSバッファーで洗浄し、SAPE標識細胞を検出するためフローサイトメトリーに供する。sLIR-2/Fcが細胞と結合するが、それがW6/32によって競合的に防止される場合、このことは、sLIR-2/FcがMHC Iとの特異的結合が可能であることを示す。

#### 【0019】

ここで使用されるようなアミノ酸配列同一率は、同一である整列化されたアミノ酸の数を、比較される2つの配列のより短い方のアミノ酸の総数によって割ることにより決定される。配列を整列化し配列の同一性及び可変性を決定するための多数のコンピュータプログラムが、商業的に入手可能である。これらのプログラムは、前述の同一性の定義に基づく同一性情報を提供する。1つの適切なコンピュータプログラムは、Devereuxら(Nucleic Acids Res. 12:387, 1984)によって記載された、ウィスコンシン大学ジェネティクスコンピューターグループ(University of Wisconsin Genetics Computer Group)(UWGCG)より入手可能なGAPプログラム(バージョン6.0)である。GAPプログラムは、Smith及びWaterman(Adv. Appl. Math. 2:482, 1981)によって改訂されたような、Needleman及びWunsch(J. Mol. Bi-

o l . 4 8 : 4 4 3 , 1 9 7 0 ) の整列化法を利用する。G A P プログラムのための好ましいデフォルトパラメータは、以下のものを含む：( 1 ) アミノ酸のための単項比較マトリックス（同一に対する 1 及び非同一に対する 0 の値を含有）及び Schwartz 及び Dayhoff 編, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, 353 ~ 358 頁, 1979 によって記載されたような Gribskov 及び Burgess, Nucl. Acids Res. 14 : 6745, 1986 の加重比較マトリックス；( 2 ) 各ギャップに対する 3 . 0 のペナルティ及び各ギャップ内の各シンボルに対するさらに 0 . 1 0 のペナルティ；並びに( 3 ) エンドギャップに対するペナルティなし。配列操作のための、G C G コンピュータパッケージの一部としてやはりウィスコンシン大学より入手可能である、B E S T F I T と呼ばれるもう 1 つの類似のプログラムも、これらの比較に有用である。

#### 【 0 0 2 0 】

ここで使用されるような「 L I R - 2 」という用語は、さらに、配列番号 1 に示されたヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされたポリペプチドを指す。そのような核酸分子には、一本鎖 D N A 及び二本鎖 D N A が含まれる。等価であるが、「 T 」が「 U 」に置換されている配列を有する R N A 分子も含まれる。そのような核酸によってコードされた L I R - 2 ポリペプチドは、M H C I との結合能を有する。

#### 【 0 0 2 1 】

「 L I R - 2 」という用語には、配列番号 2 に示された L I R - 2 によって示される生物学的活性を保有しており、かつ中程度にストリンジェント又は高度にストリンジェントな条件の下で配列番号 1 に示されたヌクレオチド配列を有する核酸分子とハイブリダイズすることができる相補鎖を有する核酸分子によってコードされるポリペプチドも含まれる。高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、不適正な塩基対の形成を最小限に抑えるために設計されている。ハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーに影響する基本パラメータ及び適切な条件を考案するための案内は、Sambrook, J. 、E. F. Fritsch 及び T. Maniatis ( 1 9 8 9 , M o l e c u l a r Cloning: A Laboratory Manual , Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor , N. Y. , チャプター 9 及び 11 ; 並びに Current Protocols in Molecular Biology , 1 9 9 5 , F. M. Ausubel ら編 , John Wiley & Sons , Inc. , セクション 2 . 1 0 及び 6 . 3 ~ 6 . 4 ) に記述されている。ハイブリダイゼーションは、溶液中で、又はニトロセルロースもしくはナイロンフィルターのような固体表面へ標的核酸を固定することにより実施され得る。テストすべき D N A が、標識され、変性させられ、ハイブリダイゼーション反応におけるプローブとして使用される。所望のストリンジエンシーの程度の条件は、例えば D N A の長さ及び / 又は塩基組成に基づき、当業者によって容易に決定され得る。フィルターに結合した標的 D N A のための中程度にストリンジエントな条件を達成する 1 つの様式は、5 × S S C 、 0 . 5 % S D S 、 1 . 0 m M E D T A ( p H 8 . 0 ) を含有している予備洗浄溶液、 6 × S S C を含有しているハイブリダイゼーションバッファー、及び約 6 8 のハイブリダイゼーション温度を使用し ( 又は、 5 0 % ホルムアミド及び 6 × S S C を含有しているハイブリダイゼーションバッファー、並びに約 4 2 のハイブリダイゼーション温度を使用し ) 、次いで、 0 . 5 × S S C 及び 0 . 1 % S D S を含有しているバッファー中で約 6 0 でフィルターを洗浄することを含む。「 S S C 」 ( 1 × ) とは、 0 . 1 5 M N a C l 、 0 . 0 1 5 M クエン酸 N a ( p H 7 . 0 ) である。一般に、高度にストリンジエントな条件は、約 6 8 で 0 . 2 × S S C / 0 . 1 % S D S 中で洗浄工程が実施されることを除き、前記と同様に定義される。所望により、 S S P E ( 1 × S S P E は、 0 . 1 5 M N a C l 、 1 0 m M N a H 2 P O 4 及び 1 . 2 5 m M E D T A ( p H 7 . 4 ) ) が、上記ハイブリダイゼーションバッファー及び洗浄バッファー中の S S C の代わりに使用されてもよく、 S D S は、ストリンジエンシーに影響することなく、増加

させられてもよいし、又はハイブリダイゼーションバッファーもしくは洗浄バッファーのいずれかから省略されてもよい。これらの核酸によってコードされた L I R - 2 タンパク質が保有している生物学的活性には、以下のうちの 1 つ以上が含まれる：M H C クラス I タンパク質と結合する能力；誘起時に、活性化された単球における細胞内カルシウム流動を減少させる能力；及び誘起時に、活性化された単球における細胞内リン酸化チロシンのレベルを減少させる能力。

#### 【 0 0 2 2 】

さらに、本発明に係る L I R - 2 ポリペプチドには、M H C I に結合することができ、かつ配列番号 2 に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチドと特異的に免疫反応性である抗体と免疫反応性であるタンパク質が含まれる。L I R - 2 と特異的に免疫反応性の抗体とは、他のタンパク質との認め得る程度の結合を示さないものである。例えば、L I R - 2 に特異的な抗体は、L I R - 3 又は L I R - 7 とは結合しない。特異的抗体を作製する方法は、この技術分野において周知であり、後述の方法のような任意の適切な方法が、そのような抗体を作製するために使用され得る。一般に、そのような抗体と反応する L I R - 2 ポリペプチドは、配列番号 1 に示されたヌクレオチド配列を有する核酸とストリージェントな条件の下でハイブリダイズすることができる核酸によってコードされる。

#### 【 0 0 2 3 】

ここで使用されるように、「L I R - 3」という用語には、配列番号 4 に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びにこのタンパク質の生物学的特性を有する異型及びミューテインが包含される。配列番号 4 の L I R - 3 ポリペプチドは、例えば、配列番号 3 に示されたヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされ得る。「L I R - 3」という用語には、少なくとも 9 0 %、又はより好ましくは少なくとも 9 5 %、又は最も好ましくは少なくとも 9 8 % の配列番号 4 とのアミノ酸配列同一性を有しており、さらに配列番号 4 に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチドによって発現される生物学的活性を保有している異型も含まれる。そのような生物学的活性には、活性化された単球における細胞内カルシウム流動を減少させる能力、及び活性化された単球に存在するタンパク質内のリン酸化チロシンの量を減少させる能力が含まれる。同一率は、前記のようにして決定される。配列番号 4 に提示された L I R - 3 アミノ酸配列は、アミノ酸 1 ~ 1 6 のシグナルペプチドを含む、アミノ酸 1 ~ 4 4 3 を含有している細胞外ドメイン；アミノ酸 4 4 4 ~ 4 6 4 を含む膜貫通ドメイン；及びアミノ酸 4 6 5 ~ 6 3 1 を有する細胞質ドメインを有している。配列番号 4 の L I R - 3 ポリペプチドの細胞外領域は、4 つの免疫グロブリン様 (I g 様) ドメインを含有しており、その細胞質領域は 2 つの I T I M モチーフ対を含有している。配列番号 4 において、最初の I T I M モチーフ対は、アミノ酸 5 1 2 ~ 5 1 7、5 4 1 ~ 5 4 6 に位置しており、第二の対は、アミノ酸 5 9 3 ~ 5 9 8 及び 6 2 3 ~ 6 2 8 に位置している。従って、ここで使用されるように、「L I R - 3」という用語には、細胞外領域に 4 個の I g 様ドメイン、細胞質尾部に 4 個の I T I M モチーフを有しており、かつ配列番号 4 に示されたアミノ酸配列を有する L I R - 3 によって示される生物学的活性を少なくとも 1 つ有しているポリペプチドが包含される。本発明に係る L I R - 3 ポリペプチドは、このタンパク質を発現している単球におけるカルシウム放出を抑制する阻害性の刺激を伝達することができる。

#### 【 0 0 2 4 】

L I R - 2 及び L I R - 3 は、阻害性タンパク質である。これらのタンパク質の生物学的活性には、活性化された単球を阻害する能力が含まれる。L I R - 2 又は L I R - 3 のこの活性をアッセイするための 1 つの方法においては、まず、単球を抗 C D 6 4 抗体に曝すことにより活性化する。この活性化には、これらの細胞における細胞内カルシウム放出及びタンパク質上のチロシン残基のリン酸化が伴う。L I R - 2 及び L I R - 3 は活性化された単球の表面上に発現される。これらの単球上の L I R - 2 又は L I R - 3 の誘起は、例えば、L I R - 2 又は L I R - 3 のいずれかに特異的なアゴニスト性抗体に細胞を曝すことにより達成され得る。いくつかの場合において、誘起は、細胞表面上に発現された L I R の架橋をもたらす、抗 L I R 抗体と反応する二次抗体を添加することも含む。この

架橋は、LIR-2又はLIR-3の阻害機能を誘起し、それにより、下記のようにしてアッセイされ得る、減少したカルシウム流動をもたらす。

#### 【0025】

「LIR-7」という用語には、配列番号6に示されたアミノ酸配列を有するポリペプチド、並びにこのタンパク質の生物学的特性を有する異型及びミューテインが含まれる。配列番号6に提示されたアミノ酸配列は、アミノ酸1～449を含む細胞外ドメイン、アミノ酸1～16のシグナルペプチド、アミノ酸452の電荷を有するアルギニン残基を含むアミノ酸450～468を含む膜貫通ドメイン及びアミノ酸469～483の短い細胞質ドメインを有している。細胞外ドメインは、4個の免疫グロブリン様ドメインを含んでいる。

#### 【0026】

本発明の1つの局面において、LIR-7ポリペプチドは、配列番号5に示されたヌクレオチド配列を有する核酸分子によってコードされる。さらに、「LIR-7」という用語には、番号5に示されたヌクレオチド配列を有する核酸の相補鎖と中程度にストリンジエント又は高度にストリンジエントな条件の下でハイブリダイズすることができる核酸によってコードされ、さらに、配列番号6に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質が保有している生物学的活性を有しているポリペプチドが含まれる。ハイブリダイゼーション条件は、前記と同様に定義される。

#### 【0027】

本発明に係るLIR-7ポリペプチドは、刺激能を保有している（例えば、Nakajimaら、1999参照）。LIR-7ポリペプチドの誘起は、ラット好塩基球性白血病細胞からのセロトニン放出を刺激し、このタンパク質を発現している初代単球又はその他の細胞からのカルシウム放出を刺激する。カルシウム放出は、単球活性化の測定可能な指標であり、例えば個々の細胞における細胞質カルシウムレベルをモニタリングするためのナカジマラのアッセイ（1999）を使用して検出され得る。このアッセイを実施するためには、細胞に、Indo-1 AM色素（Sigma, St. Louis, MO）を負荷し、以前に記載されたような（Colonnaら、1997及びNakajitaら、1999参照）フローサイトフルオロメーターで分析する。簡単に説明すると、LIR-7を架橋する抗体の添加のために分析を休止する前に、基線を取得する。架橋は、一般に、LIR-7に対するモノクローナル抗体、及び抗LIR-7抗体を生成させた動物種に由来するIgGに対する抗体を添加することを必要とする。分析は、フローサイトメトリーによって、負荷されたIndo-1色素の405/525スペクトル放射比率を測定することからなる。

#### 【0028】

セロトニン放出は、LIR-7活性を測定するために使用され得るもう1つの指標である。セロトニン放出は、Colonnaら、1997に以前に記載されたようにしてアッセイされる。簡単に説明すると、細胞を、H<sup>3</sup>-セロトニン（5-ヒドロキシトリプタミン）でパルス処理し、洗浄し、次いでセロトニンに対する抗体及び細胞表面上のLIR-7を架橋する抗体又は自発的放出に関して補正するための対照抗体のいずれかと接触させる。セロトニン放出は、以下の式に従い計算される：セロトニン放出率（%）= 100 × ([cpm試料] - [cpm自発的放出]) / (cpm全)。

#### 【0029】

ここで使用されるような「LIR-2」という用語には、配列番号2によるアミノ酸配列を有するポリペプチドと特異的に結合する抗体と免疫反応性があり、さらに、配列番号2に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質に特徴的な生物学的活性を保有しているポリペプチドも含まれる。ここで使用されるような「LIR-3」という用語には、配列番号4によるアミノ酸配列を有するポリペプチドと特異的に結合する抗体と免疫反応性があり、さらに、配列番号4に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質に特徴的な生物学的活性を保有しているポリペプチドも含まれる。「LIR-7」という用語には、配列番号6によるアミノ酸配列を有するポリペプチドと特異的に結合する抗体と免疫反応性で

あり、さらに、配列番号6に示されたアミノ酸配列を有するタンパク質に特徴的な生物学的活性を保有しているポリペプチドが含まれる。

### 【0030】

#### 治療剤

開示された治療法のために有用な治療剤には、LIR-2又はLIR-3の発現又は機能のレベルを増加させ得る非毒性の薬剤、及びLIR-7の発現又は機能のレベルを減少させ得る非毒性の薬剤が含まれる。この目的のための例示的な薬剤には、LIR-2又はLIR-3と特異的に免疫反応性のアゴニスト性抗体及びLIR-7と特異的に免疫反応性のアンタゴニスト性抗体が含まれる。他の実施形態において、治療剤は、LIR-7の細胞外領域がヒトIgG免疫グロブリンのFc領域に連結されている融合タンパク質(sLIR-7:Fc)を含む、LIR-7の細胞外領域の一部又は全部を含む可溶性ポリペプチドである。S1ir-7:Fcは、天然LIR-7の競合的阻害剤として作用する。本発明の1つの局面において、治療剤は、配列番号6のアミノ酸1~449又は17~449が前記のようなIgG1Fc領域と融合しているポリペプチドである。

### 【0031】

LIRのうちの1つに特異的な抗体を生成させるためには、完全LIR、又はLIR-2、LIR-3もしくはLIR-7の細胞外領域を含むポリペプチド、又はそれらの抗原性副次部分を抗原性刺激として使用することが可能である。LIR-2、LIR-3及びLIR-7の細胞外領域は、それぞれ、配列番号2のアミノ酸1~458、配列番号4のアミノ酸1~443及び配列番号6のアミノ酸1~449に相当する。配列番号2、4及び6のアミノ酸1~16は、LIRの成熟中に開裂されるシグナル配列に相当する。全長LIR-2、LIR-3もしくはLIR-7、又はシグナル配列を含む、もしくは含まないそれらの細胞外領域が、抗体を生成させるために使用され得る。シグナルペプチドを欠くLIR-2、LIR-3及びLIR-7の細胞外領域は、それぞれ、配列番号2のアミノ酸17~458、配列番号4の17~443又は配列番号6の17~449に相当する。さらに、そのLIRに特有の抗原性エピトープを少なくとも1つ含有しているLIR-2、LIR-3又はLIR-7の副次部分を使用して抗体を生成させることもできる。

### 【0032】

治療剤として使用するためのポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、従来の技術によって調製され得る(例えば、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennethら編, Plenum Press, New York 1980; 及びAntibodies: A Laboratory Manual, Harlow及びLand編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988参照; 米国特許第4,411,993号も参照のこと)。モノクローナル抗体を作成するための1つの例示的なプロトコルは、WO98/48017に記載されたものである。簡単に説明すると、BALB-Cマウスを、抗原性LIRポリペプチド10μgで、0週目、2週目及び6週目に免疫感作する。初回免疫感作はバキセル社(Vaxcelle, Inc.)のタイターマックス(TITERMAX)アジュバントを利用し、後続の免疫感作は不完全フロイントアジュバント(IFNA)を使用する。11週目に、3μgから4μgの抗原性タンパク質を含むPBSの静脈内投与によってマウスを追加免疫する。静脈内追加免疫の3日後に、脾細胞を採取し、50%PEG1500水溶液を使用して、Ag8.653骨髄腫融合パートナーと融合させる。ハイブリドーマ細胞をスクリーニングするため、ハイブリドーマ細胞の個々のコロニーからの上清を、抗体を生成させているLIRでトランスフェクトされたCOS-1細胞に対するELISAによってスクリーニングする。このスクリーニングのためには、トランスフェクトされたCOS-1細胞 $2 \times 10^3$ 個を含むPBSを、ポリスチレン96穴マイクロタイプレートの個々のウェルに添加し、プレートコート抗原として細胞をプレートに乾燥させる。続いて、陽性上清を、FACS分析及びLIRでトランスフェクトされたCOS-1細胞を使用したRIPによって確認する。ハイブ

リドーマをクローニングし、同アッセイを使用して追跡する。モノクローナル培養物を増殖し、上清を Bio Rad プロテイン A アガロースを使用したアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。上記の手法の変形物は、この技術分野において既知であり、所望により、ハイブリドーマを作成又はスクリーニングするために使用され得る。

#### 【0033】

本発明のモノクローナル抗体には、マウス又はラットのモノクローナル抗体のヒト化バージョンも含まれる。そのようなヒト化抗体は、既知の技術により調製され得、ヒトに投与された場合、減少した免疫原性という利点を与える。1つの実施形態において、ヒト化モノクローナル抗体は、マウス又はラットの抗体の可変部（又はその抗原結合部位のみ）、及びヒト抗体に由来する定常部を含む。あるいは、ヒト化抗体断片は、マウス又はラットのモノクローナル抗体の抗原結合部位、並びにヒト抗体に由来する（抗原結合部位を欠く）可変部断片及び定常部を含み得る。キメラモノクローナル抗体及びさらに改変されたモノクローナル抗体の作製のための手法には、リーチマン（Riechmann）ら（Nature 332:323, 1988）、リウ（Liu）ら（PNAS 84:3439, 1987）、ラリック（Larrick）ら（Bio/Technology 7:934, 1989）、並びにウィンター（Winter）及びハリス（Harris）（TIPS 14:139, Can, 1993）に記載されたものが含まれる。抗体をヒト化するための有用な技術は、米国特許第6,054,297号にも論じられている。トランスジェニックに抗体を製造する手法は、GB2,272,440、米国特許第5,569,825号及び第5,545,806号、並びに関連特許に見出され得る。好ましくは、ヒトで使用するため、抗体はヒトのもの又はヒト化したものであり；そのようなヒト抗体又はヒト化抗体を作出するための技術も周知であり、例えばメダレックス社（Medarex Inc.）（Princeton, NJ）及びアブジェニクス社（Abgenix Inc.）（Fremont, CA）より商業的に入手可能である。もう1つの好ましい実施形態において、ヒトで使用するための完全にヒトの抗体は、ヒト抗体可変ドメインのファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることにより作製される（Vaughanら、1998, Nat Biotechnol. 16(6):535-539；及び米国特許第5,969,108号）。

#### 【0034】

LIR 特異的抗体がアゴニスト性であるか又はアンタゴニスト性であるかを決定するため、スクリーニング手法が使用される。LIR-2 又は LIR-3 に特異的なアゴニスト性抗体は、RA を治療するための治療剤として有用であり、例えば、LIR-2 又は LIR-3 を発現している活性化された単球におけるカルシウム流動又はチロシンリン酸化をダウンレギュレートする能力によって特定され得る。そのようなアッセイのためには、単球を活性化し、スクリーニングされる LIR-2 特異的又は LIR-3 特異的な抗体の存在下又は非存在下で、前記のようにしてカルシウム流動を測定する。活性化された単球を、分析中、推定アゴニスト性抗体に曝す。RA の治療剤として有用な LIR-7 に対するアンタゴニスト性抗体は、LIR-7 と結合することができ、かつ単球におけるカルシウム流動を誘起し得ないことにより特定され得る。

#### 【0035】

本発明の1つの局面において、治療剤として使用するための LIR 特異的抗体を生成させるために使用される抗原性刺激は、ヒト IgG の Fc 部分及び標的 LIR の細胞外領域を含む融合タンパク質である。この目的に適している1つのFc ポリペプチドは、参照してここに組み込まれる PCT 特許出願 WO 93/10151 に記載されているヒト IgG 1 に由来する天然 Fc 領域ポリペプチドである。融合タンパク質を構築するためのもう1つの有用な Fc ポリペプチドは、米国特許第5,457,035号に記載された Fc ミューテインである。このミューテインのアミノ酸配列は、アミノ酸 19 が Leu から Ala に変化し、アミノ酸 20 が Leu から Glu に変化し、アミノ酸 22 が Gly から Ala に変化している点を除き、WO 93/10151 に提示された天然 Fc 配列のものと同一である。このミューテイン Fc は、免疫グロブリン受容体に対する減少した親和性を示す

。

### 【0036】

LIR : Fc 融合タンパク質を作成する 1 つの適切な手段は、WO 98 / 48017 に記載されたものである。この方法を適用するためには、LIR - 2 、 LIR - 3 又は LIR - 7 の細胞外領域の全部又は一部をコードする cDNA を、ヒト IgG Fc 領域をコードする DNA と融合させる。 LIR - 2 : Fc 融合体を作成するためには、細胞外領域全体（配列番号 2 のアミノ酸 1 ~ 458 ）又は MHC I と結合し得るその一部を使用することができる。 LIR の細胞外領域をコードする cDNA は、細胞外領域をコードするヌクレオチド配列の両側に隣接する PCR プライマーを使用することにより得られる。この目的のためには、例えば、配列番号 1 、番号 3 又は番号 5 に示されるようなヌクレオチド配列を有する cDNA のような全長 LIR cDNA が、 PCR のための鑄型として使用され得る。本発明の 1 つの実施形態において、增幅産物が増幅された DNA 断片の 5' 及び 3' 末にそれぞれ SalI 及び NotI 制限部位を導入するよう、 5' 及び 3' 末端に SalI 及び NotI 制限部位が挿入されたプライマーが合成される。これらの制限部位は、増幅された DNA の発現ベクターへの付着を容易にする。あるいは、その他の制限部位が、増幅された DNA の末端に挿入されてもよい。本発明の好ましい実施形態において、融合タンパク質の発現のためのベクター構築物を調製するため、 IgG1 のミューテインヒト Fc 領域をコードする DNA を、 LIR - 2 、 LIR - 3 又は LIR - 7 の細胞外領域をコードする DNA にライゲートさせる。本発明の 1 つの実施形態において、これは、 LIR 細胞外領域が融合タンパク質のアミノ末端に位置するようなされる。次いで、融合 DNA 構築物を、 PDC409 のような適切な発現ベクターとライゲートさせ、 CV1 - EBNA 又は COS 細胞 (ATCC C TL - 1650) のような適切な宿主細胞において発現させる。サル細胞株 COS - 1 は、融合タンパク質の発現を確証するために使用され得る。融合タンパク質を精製するため、 COS - 1 培養物からの上清を遠心分離によって清浄化し、例えば Bio Cad システム及び PerSeptive Biosystems の POROS 20A カラムを使用することにより、又は当業者に既知の他の比較可能な方法により精製する。プールされた溶出したタンパク質は、発現を確認し、発現された組換えタンパク質が予想された分子量を有していることを立証するため、銀染色と共に SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用して分析され得る。

### 【0037】

#### 同時治療

LIR - 2 、 LIR - 3 又は LIR - 7 の調節剤の 1 つ以上が、 RA を治療するために使用される他の薬物 1 つ以上と同時に投与される組み合わせ治療が、ここで提供される。そのような治療法において、 LIR 調節剤は、 RA を治療するために使用される 1 つ、 2 つ、 3 つ又はそれ以上の他の薬物療法と同時に投与され得る。付加的な薬物療法は、 LIR 調節剤と同時期的に又は交互に投与され得る。あるいは、例えば腫瘍壊死因子 (TNF) のアンタゴニスト又は IL - 1 のアンタゴニストのような RA を治療するために使用される他の何らかの薬剤による継続的な治療の背景に対して、 LIR 調節剤が断続的に投与されてもよい。 LIR 調節剤及びその他の RA 治療は、同時に、交互に、又は連続的に投与され得、また、それらの投与の頻度は同じであってもよいし、又は異なっていてもよい。

### 【0038】

RA の治療における LIR 調節剤との同時使用に適している TNF アンタゴニストには、 TNF に対する抗体が含まれる。そのような抗体には、ヒト化モノクローナル抗体及び完全にヒトのモノクローナル抗体が含まれる。 LIR 調節剤との同時投与のための例示的なヒト化抗体は、レミケード (REMIKADE) (登録商標) として Centocor より販売されているインフリキシマブ (infliximab) と呼ばれるキメラ IgG1 モノクローナル抗体である。インフリキシマブは、ヒト定常部及びマウス可変部から構成されており、ヒト TNF と特異的に結合する。その他の適切な抗 TNF 抗体には、ヒト化抗体 D2E7 及び CD P571 、並びに EPO 516785 B1 、

米国特許第5,656,272号、E P 0 492 448 A1に記載された抗体が含まれる。

【0039】

LIR調節剤は、IL-1の阻害剤、T細胞表面タンパク質に対する抗体、及びTNF、TNF受容体又はTNFの合成のための代謝経路の酵素の翻訳に干渉するアンチセンスオリゴヌクレオチド又はリボザイムを含む、RAを治療するために使用される様々な種類の薬剤と併せて投与され得る。LIR調節剤との同時投与に適しているアンチセンスオリゴヌクレオチドには、米国特許第6,228,642号に記載されたものが含まれる。米国特許第5,641,751号及び米国特許第5,519,000号に開示されたペプチドTNF阻害剤、並びに米国特許第5,753,628号に記載されたD-アミノ酸含有ペプチドも、LIR調節剤との同時投与に適している。さらに、ここに記載された状態は、TNF変換酵素の阻害剤により治療され得る。

【0040】

好ましい組み合わせには、可溶型TNF受容体(sTNFR)であるTNF阻害剤と同時にLIR調節剤の投与が含まれる。sTNFRには、単量体、融合タンパク質(「キメラタンパク質とも呼ばれる)、二量体、三量体又はより高次の多量体が含まれ得る。本発明のある種の実施形態において、sTNFR誘導体は、75kDa TNFR又は55kDa TNFRを模倣し、かつ患者体内でTNFと結合するものである。本発明のsTNFR模倣体は、TNFR p55もしくはp75又はそれらの断片に由来し得る。例えば、WO99/04001に記載されたTNFRのような、p55及びp75以外のTNFRも、ここに記載された様々な医学的障害の治療用の可溶性化合物を導出するのに有用である。TNFR模倣体を構築するために使用されるsTNFR分子には、例えば、天然TNFRの膜貫通領域を欠き、かつTNFに結合し得る、少なくとも20個のアミノ酸を有する天然TNFRの類似体又は断片が含まれる。sTNFRのTNFとの結合は、ELISA又はその他の任意の便利なアッセイを使用して分析され得る。

【0041】

本発明のsTNFRポリペプチド又は断片は、キメラタンパク質を形成するよう第2のポリペプチドと融合させられ得る。第2のポリペプチドは、TNF又はLT分子に結合し、それが細胞結合受容体と結合することを防止することができる二量体、三量体又はより高次の多量体の、キメラタンパク質による自発的な形成を促進し得る。アンタゴニストとして使用されるキメラタンパク質には、例えば、抗体分子の定常部及びTNFRの細胞外部分に由来する分子が含まれる。そのような分子は、ここで、TNFR-Ig融合タンパク質と呼ばれる。ヒト及びその他の哺乳動物における疾患を治療するのに適している好ましいTNFR-Ig融合タンパク質は、組換えTNFR:Fcである。この用語は、ここで使用されるように、p75 TNF受容体の細胞外部分の分子(各分子は、ヒトIgG<sub>1</sub>の232アミノ酸Fc部分と融合した235アミノ酸TNFR由来ポリペプチドからなる)2個の二量体である「エタネルセプト(etanercept)」を指す。エタネルセプトは、現在、エンブレル(ENBREL)(登録商標)という商品名でイムネックスコーポレーション(ImmuneX Corporation)より販売されている。IgGのFc部分と融合した55kDa TNFRの細胞外部分を含む化合物と、LIR調節剤を組み合わせた治療、並びにそのような治療剤を含有している組成物及び組み合わせも、本発明に包含される。さらに、適切なTNF阻害剤は、例えば、WO99/04001に記載されたTNFR(このTNFRに由来するTNFR-Igを含む)のような、p55及びp75 TNFR以外のTNF受容体分子の細胞外領域に由来してもよい。

【0042】

さらに、本発明のLIR調節剤は、例えばRANK:Fc又はオステオプロテジェリン(米国特許第6,017,729号及びWO98/46751参照)のような可溶型RANKを含む、関節炎関節における骨破壊を減じる薬剤と同時にRA患者に投与され得る。

【0043】

LIR調節剤との同時投与に適しているその他の薬物には、以下に限定はされないが、アセトアミノフェン、コデイン、プロポキシフェンナフシレート( propoxyphe ne napsylate)、オキシコドン塩酸塩、ヒドロコドン重酒石酸塩及びトラマドールを含む鎮痛剤が含まれる。さらに、LIR調節剤は、以下に限定はされないが、メトトレキサート、スルファサラジン、金塩、アザチオプリン、シクロスボリン、抗マラリア薬、ステロイド(例えば、プレドニゾン)及びコルヒチンを含む疾患修飾性抗リウマチ薬(DMARD)と併せて投与され得る。

#### 【0044】

抗炎症薬も、LIR調節剤と共に投与され得る。そのような抗炎症薬には、以下に限定はされないが、アスピリン；イブプロフェン；インドメタシン；セレコキシブ；ロフェコキシブ；ケトロラック；ナムブメトン(nambumetone)；ピロキシカム；ナプロキセン；オキサプロジン；スリンダク；ケトプロフェン；ジクロフェナク；並びに新たに開発された関節炎関節の治療に有効な抗炎症薬を含む、その他のCOX-1及びCOX-2の阻害剤、サリチル酸誘導体、プロピオン酸誘導体、酢酸誘導体、フェナム酸誘導体、カルボン酸誘導体、酪酸誘導体、オキシカム系、ピラゾール系並びにピラゾロン系が含まれる。

#### 【0045】

LIR調節剤との同時使用に適しているIL-1阻害剤には、遺伝学的に修飾されたミューテイン、多量体型及び徐放性製剤を含む、IL-1の受容体結合性ペプチド断片、IL-1又はIL-1ベータ又はIL-1受容体I型に対する抗体、及びIL-1の受容体又は修飾されたその異型の全部又は一部を含む組換えタンパク質が含まれる。特定のアンタゴニストには、IL-1raポリペプチド、IL-1ベータ変換酵素(ICE)阻害剤、アンタゴニスト性I型IL-1受容体抗体、IL-1結合型のI型IL-1受容体及びII型IL-1受容体、IL-1アルファ及びIL-1ベータ及びその他のIL-1ファミリーメンバーを含むIL-1に対する抗体、並びにIL-1トラップとして既知の治療薬が含まれる。IL-1raポリペプチドには、米国特許第5,075,222号に記載された型のIL-1ra、並びに米国特許第5,922,573号、WO91/17184、WO92/16221及びWO96/09323に記載されたものを含む修飾型及び異型が含まれる。IL-1ベータ変換酵素(ICE)阻害剤には、PCT特許出願WO91/15577；WO93/05071；WO93/09135；WO93/14777及びWO93/16710；及び欧州特許出願0 547 699に記載されたものを含む、ペプチジルICE阻害剤及び低分子ICE阻害剤が含まれる。非ペプチジル化合物には、PCT特許出願WO95/26958、米国特許第5,552,400号、米国特許第6,121,266号、Dolleら、J.Med.Chem., 39:2438-2440(1996)に記載されたものが含まれる。さらなるICE阻害剤は、米国特許第6,162,790号、第6,204,261号、第6,136,787号、第6,103,711号、第6,025,147号、第6,008,217号、第5,973,111号、第5,874,424号、第5,847,135号、第5,843,904号、第5,756,466号、第5,656,627号、第5,716,929号に記載されている。

#### 【0046】

LIR調節剤との同時投与に適しているIL-1結合型のI型IL-1受容体及びII型IL-1受容体は、米国特許第4,968,607号、第4,968,607号、第5,081,228号、Re35,450、第5,319,071号及び第5,350,683号に記載されている。IL-1トラップは、WO018932に記載されている。

#### 【0047】

LIR調節剤との同時投与に適している適切なIL-1アンタゴニストには、抗体分子及びIL-1アンタゴニスト分子の両方の一部を含んでいるキメラタンパク質がさらに含まれる。そのようなキメラ分子は、単量体、二量体又はより高次の多量体を形成し得る。その他の適切なIL-1アンタゴニストには、IL-1シグナリング受容体、IL-1R

I型と競合的に結合し得るIL-1に由来するペプチドが含まれる。

#### 【0048】

さらに、LIR調節剤は、サリドマイド又はサリドマイド類似体、ペントキシフィリン、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)阻害剤又はその他の低分子のような低分子と共にRAを治療するために使用され得る。適切なMMP阻害剤には、例えば、米国特許第5,883,131号、第5,863,949号及び第5,861,510号に記載されたもの、並びに米国特許第5,872,146号に記載されたメルカプトアルキルペプチジル化合物が含まれる。同時投与に適しているその他の低分子は、LIR調節剤と組み合わせて投与され得る、米国特許第5,508,300号、第5,596,013号及び第5,563,143号に記載されたものを含むTNF産生を減少させることができる分子である。LIR調節剤と共にRAを治療するのに有用な付加的な低分子には、米国特許第5,747,514号又は米国特許第5,691,382号に記載されたMMP阻害剤、並びに米国特許第5,821,262号に記載されたヒドロキサム酸誘導体、並びに置換されたオキシム誘導体(WO96/00215)、キノリンスルホンアミド(米国特許第5,834,485号)、アリールフラン誘導体(WO99/18095)及びヘテロ二環式誘導体(WO96/01825; GB2 291422 A)のような、ホスホジエステラーゼIV及びTNFの産生を阻害する低分子、TNF及びIFNを抑制するチアゾール誘導体(WO99/15524)、並びにTNF及びその他の炎症前サイトカインを抑制するキサンチン誘導体(例えば、米国特許第5,118,500号、米国特許第5,096,906号及び米国特許第5,196,430号参照)が含まれる。

#### 【0049】

##### 医薬調製物

生理学的に許容される希釈剤、担体又は賦形剤のような他の成分と組み合わされた、(制限はされないが組換え起源及び非組換え起源を含む、あらゆる起源に由来する)本発明のLIR調節剤を有効量含む医薬組成物が、ここで提供される。「医薬適合性の」という用語は、(1つ以上の)活性成分の生物学的活性の有効性に干渉しない、非毒性の材料を意味する。投与に適している製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、及び製剤をレシピエントの血液と等張にする溶質を含有していてもよい水性及び非水性の無菌の注射用溶液;並びに懸濁化剤又は増粘剤を含んでいてもよい水性及び非水性の無菌の懸濁液が含まれる。本発明に係る治療剤は、唯一の活性材料として、又は所定の適応症に適している他の既知の活性材料と共に、医薬適合性の希釈剤(例えば、生理食塩水、トリス-HCl、酢酸緩衝溶液及びリン酸緩衝溶液)、保存剤(例えば、チメロサール、ベンジルアルコール、パラベン)、乳化剤、可溶化剤、佐剤及び/又は担体と混和され組み合わされ得る。医薬組成物に適している製剤には、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版 1980, Mack Publishing Company, Easton, PAに記載されたものが含まれる。さらに、医薬組成物のためのLIR調節剤は、ポリエチレンゴリコール(PEG)、金属イオンと複合体化されてもよいし、又はポリ酢酸、ポリグリコール酸、ヒドロゲル、デキストラン等のような重合体化合物に取り込まれてもよいし、又はリポソーム、ミクロエマルジョン、ミセル、単層もしくは多層の小胞、赤血球ゴースト又はスフェロblast(s)に取り込まれてもよい。リポソーム製剤に適している脂質には、制限はされないが、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸等が含まれる。例えば、米国特許第4,235,871号; 第4,501,728号; 第4,837,028号; 及び第4,737,323号に開示されるように、そのようなリポソーム製剤の調製は、この技術分野における技術の範囲内にある。そのような組成物は、物理学的状態、溶解度、安定性、インビボ放出速度及びインビボクリアランス速度に影響を及ぼし、従って意図された適用に依って選択され、そのため、担体の特徴は選択された投与経路に依存する。

#### 【0050】

本発明の1つの好ましい実施形態において、徐放型のLIR調整ポリペプチドが使用される。開示された方法において使用するのに適している徐放型には、以下に制限はされないが、(米国特許第6,036,978号に記載されたアルギン酸塩微粒子のような)徐々に溶解する生体適合性ポリマーに封入され、(局所的に適用されるヒドロゲルを含む)そのようなポリマーと混和され、かつ/又は生体適合性半透性インプラントに被包されたLIR調節剤が含まれる。1つ以上の治療剤が組み込まれている注射に適している微粒子の製剤も、含まれる。血中半減期を増加させるために修飾された治療用LIR調節剤も、含まれる。例えば、LIR調節剤は、既知の方法を使用して、注射のためポリエチレンゴリコールと結合体化され得る。

#### 【0051】

##### 投与計画

ここで使用されるように、LIR-7に拮抗するか、又はLIR-2もしくはLIR-3に作用する薬剤を「治療的に有効な量投与する」という語句は、障害の重度を反映する少なくとも1つの指標の改善、好ましくは持続性の改善を誘導するのに十分な量及び時間で、患者が治療剤により治療されることを意味する。患者が、1日以上、又はより好ましくは1週以上の間隔の少なくとも2つの時点で改善を示した場合、その改善は「持続性」であると見なされる。改善の程度は、兆候又は症状に基づき決定され、決定は、生活の質に関する質問調査票のような患者に与えられる質問調査票を利用してよい。患者の疾病的程度を反映する様々な指標が、治療の量及び時間が十分であるか否かを決定するために査定され得る。選択された1つ以上の指標の基線値は、治療剤の初回投与の前に、患者を調査することにより確立される。好ましくは、基線調査は、初回投与の約60日以内に行われ、初回投与と同じ日までの任意の時点において実施され得る。改善は、患者が選択された1つ以上の指標の基線に対する改善を明示するまで、本発明に係る治療剤を投与することにより誘導される。これに関して、「基線」とは、治療を受ける患者における初回投与前の選択された指標の測定値を指す。

#### 【0052】

本発明の1つの実施形態において、治療が、フェルソン(Felson)ら(Felsonら、Arthritis Rheum 6:727-735, 1995)によって改定されたような米国リウマチ学会(American College of Rheumatology)(ACR)基準による改善を誘導した場合、十分な量及び時間のRAの治療が起こる。ACR基準が使用される場合、患者が、敏感な関節の数(tender joint count)(約78の関節が査定される)及び腫大した関節の数(swollen joint count)(約76の関節が査定される)の両方に関して少なくとも20%(ACR20)又は少なくとも50%(ACR50)改善され、かつ以下の5つのうち3つの改善を示す場合、その治療は十分であると見なされる:1)対象による疼痛の査定(subject pain assessment);2)対象による総体的な査定(subject global assessment);3)医師による総体的な査定(physician global assessment);4)対象により自己査定された能力障害(subject self-assessed disability);5)急性期反応物質(acute-phase reactant)(ウェステルグレン(Westergreen)赤血球沈降速度又はC反応性タンパク質レベル)。先の5つの基準のうち、最初の4つはリカート尺度でスコア化される。対象による査定及び総体的な査定(subject and global assessment)は、患者の疾患の全体的な状態に基づき決定される。

#### 【0053】

本発明のもう1つの実施形態において、治療が十分であるか否かは、患者による自己査定又は医師による査定により査定される。患者による自己査定又は医師による査定は、例えば、尺度の一端が「疾患なし」を表し、他方の端が「重篤な疾患」を示すような主観的な数的尺度(即ち、「リカート」尺度)で測定され得る。尺度のいずれかの端が、「疾患なし」を表すために使用され得る。そのような尺度は、任意の所望の数値範囲、例えば、

0～3、0～4、0～5、0～6、0～7等を有することができ、基線時の患者の状態との比較のための基礎を提供する。例えば、0～3点数制は、以下のカテゴリーを含み得る：0＝疾患なし；1＝軽度の疾患；2＝中程度の疾患；3＝重篤な疾患。この例において、スコアが1カテゴリー低下した場合、患者は「改善された」と考えられる。ここで使用されるように、「リカート尺度」という用語は、患者又は医師が測定されるパラメーターに関して患者の状態を最もよく表すと感じる数字に丸を付ける視覚的アナログ尺度（VAS）を含むものと理解される。基線スコアと比較して患者のスコアが悪化した場合、そのリカートスコアの変化には負の値が割り当てられる。

#### 【0054】

適切な投薬量は、治療される障害の性質及び重度、患者の体重、年齢、全身状態及び過去の疾病及び／又は治療、並びに投与経路のような要因に依って変動する。予備用量は、動物テストに従って決定され得、ヒトへの投与のための投薬量の概算は、標準的な投薬試験のようなこの技術分野において認められている実務に従って実施される。毒性を最小限に抑えつつ、細胞培養において決定されるようなIC<sub>50</sub>（即ち、症状の最大の半分の阻害を達成するテスト化合物の濃度）を含む循環血漿中濃度範囲を達成するための用量が、動物モデルにおいて公式化され得る。そのような情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。最終的には、主治医が、個々の各患者を治療するための本発明の治療剤の量を決定し、個々の患者の必要に応じて投与の用量及び頻度を調整することができる。

#### 【0055】

任意の効果的な投与経路が、本発明の治療法のためのLIR調節剤を治療的に投与するために使用され得る。注射される場合、LIRのアゴニスト又はアンタゴニストは、例えば、ボーラス注射又は連続注入により、関節内、静脈内、筋肉内、病巣内、腹腔内又は皮下の経路を介して投与され得る。その他の適切な投与手段には、インプラントからの徐放、エアロゾル吸入、点眼剤、錠剤、シロップ剤、ロゼンジ剤（lozenges）又はチューインガム剤を含む経口調製物、並びにローション剤、ゲル剤、スプレー剤、軟膏剤又はその他の適切な技術のような局所調製物が含まれる。あるいは、タンパク質性LIR調節剤は、そのタンパク質を発現する培養細胞を移植することにより、例えば、調整タンパク質、即ちLIR-7のアンタゴニスト、LIR-2のアゴニスト又はLIR-3のアゴニストを発現する細胞を移植することにより、投与され得る。1つの実施形態において、患者自身の細胞が、調整剤をコードするDNAによるインビボ又はエクスピボでのトランスフェクションによってLIR調節剤を産生するよう誘導される。このDNAは、例えば、調整剤をコードする裸のDNAもしくはリポソームに封入されたDNAの注射、DNAを発現するウイルスベクターの感染、又はこの技術分野において既知の他の手段により、患者の細胞へ導入され得る。LIR調節剤が、1つ以上の他の生物学的に活性な化合物と組み合わせて投与される場合、これらは、同じ経路により投与されてもよいし、又は異なる経路により投与されてもよく、また、同時期的に、別々に、又は連続的に投与され得る。

#### 【0056】

LIR-2、LIR-3又はLIR-7の調節剤であるタンパク質を含む注射用の医薬組成物は、体重1kg当たり約0.01ng～約100mg（好ましくは約0.1ngから約10mg、より好ましくは約0.1マイクログラム～約1mg）の用量の治療用ポリペプチドを含有しているべきである。本発明の1つの実施形態において、そのような組成物は、ここに開示された様々な医学的障害を治療するために1ヶ月に1回投与され、もう1つの実施形態においては、少なくとも1週間に1回投与され、もう1つの実施形態においては、少なくとも1週間に2回以上投与される。

#### 【0057】

投与経路が注射又は静脈内注入である場合、成人の1回当たりのLIR調節剤の有効量は、体表面積に基づき計算され得る。治療用抗体又はタンパク質を含む他の治療剤の好ましい用量範囲は、1～20mg/m<sup>2</sup>、より好ましくは5～12mg/m<sup>2</sup>である。

あるいは、5～100mg／回の範囲であり得る均一(flat)用量が投与されてもよい。皮下注射によって投与される均一用量の例示的な用量範囲は、5～25mg／回、25～50mg／回及び50～100mg／回である。本発明の1つの実施形態において、医学的障害は、1、5、10、25又は50mgを含有している均一用量の治療用ポリペプチドを含有している注射用に許容される調製物を投与することにより治療される。治療剤は、8週間に1回、7週間に1回、6週間に1回、5週間に1回、4週間に1回、3週週間に1回、2週間に1回、1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、1週間に4回、1週間に5回、1週間に6回、又は毎日という頻度で、繰り返し投与され得る。注射以外の投与経路が使用される場合、その用量は、標準的な医学的実務に従い適切に調節される。

#### 【0058】

抗体がLIR-7アンタゴニスト又はLIR-2もしくはLIR-3のアゴニストとして使用される場合、1つの好ましい用量範囲は1～10mg/kgであり、もう1つの好ましい用量範囲は、体重1kg当たり0.75～7.5mg/kgである。ヒト化抗体、即ち抗体分子の抗原結合部分のみが非ヒト起源に由来する抗体が、好ましい。そのような抗体は皮下、筋肉内に注射されてもよいし、又は静脈内に投与されてもよく、また、治療剤に対する宿主抗体の発生を減少させるためにメトトレキサートと同時に使用されてもよい。

#### 【0059】

治療の期間は、患者の応答に依って変動し得る。所望の程度の改善を誘導するために、より長期間の治療が必要である場合もあり得るが、多くの場合、患者の状態の改善は、少なくとも3週間にわたり治療用量を注射することにより得られる。患者の医師によって必要であると考えられた場合には、計画は、用量及び頻度を調節しながら、無期限に継続され得る。小児科患者(4歳から17歳)の場合、1つの適切な計画は、皮下注射によって1週当たり1回以上投与される、0.4mg/kg、最高で25mgの用量のポリペプチドLIR調節剤の皮下注射を含む。

#### 【0060】

慢性状態であるRAの治療において、患者の状態の改善は、少なくとも1週間以上、又はより好ましくは1ヶ月以上、又は1ヶ月、2ヶ月もしくは3ヶ月以上の期間にわたり、又は無期限に、この医薬品を繰り返し投与することにより得られる。治療は、治療の最初の月と同じ用量及び頻度で、又は縮小された用量もしくは頻度で、無期限に継続されてもよいし、又は所定の患者のための一次治療として使用されている他の何らかの治療と共同で断続的に投与されてもよい。投与の用量又は頻度が縮小又は中止された場合、症状が悪化するようであれば、後にそれは元のレベルで再開され得る。そのような決定は、標準的な医学的実務に従い患者の医師によってなされる。

#### 【0061】

前述の薬物療法に対する個々の患者による応答が変動し得ること、並びに各患者にとって最も効果的な薬物の組み合わせ及び投薬計画が、その患者の医師によって決定されることが理解される。

#### 【0062】

以下の実施例は、制限のためではなく例示のために提示される。当業者であれば、特にここで引用された様々な参考の教示を考慮して、この実施例において具現化された本発明を変形させ得ることを認識する。

#### 【実施例】

#### 【0063】

この研究は、RA、骨関節炎(OA)を有している患者及び正常患者の滑膜における、いくつかのLIRのインビオ発現及び細胞分布を比較した。RAとは対照的に、OAにおける滑膜組織中の炎症反応は、パンヌス形成及び組織侵襲の非存在下で起こるため、OA滑膜をこの研究に含めた(Ehrlichら、Moskowitzら編, Osteoarthritis: diagnosis and management, Philadelphia

l p h i a , W . B . S a u n d e r s , 1 9 9 - 2 1 1 ( 1 9 8 4 ) ; D i e p p e ら、M o s k o w i t z ら編, O s t e o a r t h r i t i s : d i a g n o s i s a n d m e d i c a l / s u r g i c a l m a n a g e m e n t . 第2版, P h i l a d e l p h i a , W . B . S a u n d e r s , 3 9 9 - 4 1 2 ( 1 9 9 2 ) ) 。免疫組織化学を使用して、阻害性L I R 及び活性化L I R の発現を、R A 患者6人、骨関節炎患者3人及び対照対象3人の滑膜において研究した。特異的抗体による染色を、L I R - 2 、L I R - 3 及びL I R - 7 の発現を検出するために使用し、細胞系統特異的抗体による連続切片の染色を、発現されたL I R の細胞局在を評価するために使用した。

#### 【 0 0 6 4 】

2つの阻害性L I R ポリペプチドL I R - 2 及びL I R - 3 、並びに1つの活性化L I R ポリペプチドL I R - 7 の発現を、この実験セットにおいて調査した。一般に、これらの3つのL I R は、R A におけるサイトカイン及びプロテアーゼの重要な起源である骨髄起源の細胞における比較的限定された発現を有している。L I R - 2 は、M H C クラスI分子を認識することが既知であり、ヒト組織に広範囲に分布している。

#### 【 0 0 6 5 】

2歳から14歳の範囲のR A の履歴を有する患者6人、及び3歳から13歳の範囲のO A の履歴を有する患者3人が、全身麻酔下で膝関節からの滑膜組織の切除を受けた。正常滑膜組織は、外傷性半月板破裂のための再建膝手術中に3人の対象から得られた。滑膜組織はO C T 化合物で包埋され、液体窒素( T i s s u e - T e k , M i l e s , E l k h a r t , I N ) で急速凍結させられ、組織病理学的分析及び免疫組織化学的研究のため2 $\mu$ mから4 $\mu$ mに切片化された。

#### 【 0 0 6 6 】

L I R - 2 、L I R - 3 及びL I R - 7 に対する特異的マウスI g G 1 モノクローナル抗体は、記載されたようにして( C o s m a n ら、I mm u n i t y 7 : 2 7 3 - 2 8 2 ( 1 9 9 7 ) 参照) 、ヒトI g G 1 のF c 領域と融合したL I R 細胞外ドメインを含有しているL I R / F c 融合タンパク質による免疫感作により、B A L B / c マウスにおいて生成させた。その抗体を、L I R / F c 融合タンパク質のパネルに対するE L I S A 、及び全長L I R c D N A によりトランスクレプトされたC O S - 1 細胞を使用したF A C S 分析により、特異的免疫反応性に関してスクリーニングした。無関係なマウスI g G 1 抗体( B i o s o u r c e I n t e r n a t i o n a l , C a m a r i l l o , C A ) を、陰性対照として使用した。

#### 【 0 0 6 7 】

これらの抗体を、参照して完全にここに組み込まれるT e d l a ら、A m J P a t h o l 1 4 8 ( 5 ) : 1 3 6 7 - 7 3 ( 1 9 9 6 ) に記載されたような3段階アルカリホスファターゼ染色技術において使用した。簡単に説明すると、アセトン固定された切片を、トリス緩衝生理食塩水( T B S ) により平衡化し、室温で20分間、未希釈のウマ血清によりブロッキングした。次いで、4度一晩5 $\mu$ g / mlの一次抗体と共に切片をインキュベートした。T B S による4回の洗浄の後、室温で1時間、ビオチン化ウマ抗マウスI g G ( V e c t o r l a b o r a t o r i e s , B u r l i n g a m e , C A ) と共に切片をインキュベートした。T B S による4回の洗浄の後、室温で45分間、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼ結合体( V e c t o r l a b o r a t o r i e s ) と共に切片をインキュベートした。熱量測定用アルカリホスファターゼ基質((ベクターレッド( v e c t o r r e d ) 、V e c t o r l a b o r a t o r i e s ) 及びヘマトキシリンによる短時間対比染色を使用して、免疫反応性を検出した。各抗L I R 抗体の使用のための最適条件は、皮膚、胸腺、リンパ節及び脾細胞を含む、L I R 発現細胞を含有している可能性が高い正常組織のパネルを使用して最初に定義した。

#### 【 0 0 6 8 】

抗L I R 抗体により分析されたものに隣接している切片も、L I R に特異的な抗体と免疫反応性の特異的細胞型を決定するために分析した。これは、参照してここに組み込まれるT e d l a ら、C y t o k i n e 1 1 ( 7 ) : 5 3 1 - 4 0 ( 1 9 9 9 ) 及びT e d

1 あら、1996に記載された方法を使用して行った。この作業は、マクロファージ（マウス IgG1 抗 CD68）、T 細胞（ウサギポリクローナル抗 CD3）、内皮細胞（マウス IgG1 抗フォンビルプラント因子）、好中球カテプシン G（ウサギポリクローナル）及び肥満細胞トリプターゼ（マウス IgG1）を検出するための抗体を使用した。これらの抗体は、DAKO（Glostrup, Denmark）より購入した。使用した染色手法は、前記の抗 LIR 抗体による染色と本質的に同様であった。特異的抗体による免疫組織化学的染色に加え、標準的なヘマトキシリン及びエオシンによる染色を、各切片の質及び組織学を評価するために使用した。

#### 【0069】

免疫組織化学的研究からの組織切片を、切片全体を横切る連続的な視野に見られる細胞を計数することにより査定した。簡単に説明すると、各切片について  $250 \times$  倍率の平均 18 個の視野を、系統的な抽出手法で選択した。アイソタイプ対照抗体により染色された対照切片が有意な免疫反応性を示さないことを保証した後に、1 視野当たりの陽性細胞（赤色染色）の数を数えた。有意な領域間の染色の変動が観察されたが、切片全体についての数の中央値を、各抗体に関する染色の保存的な測定値として報告した。

#### 【0070】

観察された滑膜組織試料の組織学的特質及び 3 つの LIR の発現を、表 1 に要約した。比較的短い疾病期間（2 年から 5 年）を有していた 2 人の RA 患者（RA1 及び RA2）に由来する切片は、CD68 陽性マクロファージ、カテプシン G 陽性好中球、中程度の数のトリプターゼ陽性肥満細胞及び CD3 陽性 T 細胞のクラスターを含む炎症細胞による広範な浸潤を示した。罹患年数 8 年から 14 年の残りの 4 人の RA 患者においては、炎症細胞浸潤の程度は一様でなく、これらの患者においては組織纖維症が明白であった。OA を有する患者のうちの 2 人に由来する切片には、限定された数の T 細胞及び肥満細胞と共に有意なマクロファージ浸潤が存在した（表 1）。3 人目の OA 患者は、滑膜の外側の端部にマクロファージを含む広範な纖維症を有していた。正常対象から得られた切片には、炎症細胞がほとんど又は全く観察されなかった。

#### 【0071】

表 1 に示されるように、疾病期間が初期～中程度の 3 人の RA 患者（患者 RA1、RA2 及び RA3）から得られた切片には、LIR-2 及び LIR-7 の広範な発現が存在した。LIR-2 は、リウマチ滑膜に浸潤している好中球及びマクロファージに LIR-7 と共に局在していた。LIR-2 及び LIR-7 の発現は、初期リウマチ様疾患においては特に顕著であったが（表 1）、RA の期間が長い（8 年以上）患者については非常に限定されていた。RA の期間が増加するにつれ、滑膜組織はより多くの纖維症性変化を示し、LIR-2 及び LIR-7 を発現する細胞の数は劇的に減少した。OA を有する患者から得られた滑膜組織には、活性化 LIR 及び阻害性 LIR 両方の無視し得る程度の発現が見出された。正常ドナーに由来する滑膜組織には、LIR 発現が検出されなかった。

#### 【0072】

LIR-3 は、3 人の初期 RA 患者のうち 2 人のリウマチ様滑膜中の浸潤マクロファージに発現していたが、後期 RA 患者には発現していなかった。正常対象から得られた対照組織には、LIR-2、LIR-3 又は LIR-7 の発現が検出されなかった。

#### 【0073】

表 2 は、LIR 特異的抗体、並びにマクロファージ、内皮細胞、好中球、肥満細胞及び CD3+T 細胞に特異的な抗体による滑膜組織試料の連続切片の染色により得られた結果を示す。LIR は CD3+T 細胞には検出されなかった。表 2 に示されるように、RA 患者の滑膜において、炎症性白血球への LIR-2 及び LIR-3 発現の制限とは対照的に、LIR-7 は、好中球、マクロファージ、肥満細胞、纖維芽細胞様細胞（細胞形態学によって決定）及び内皮細胞に様々に発現していた。LIR-2 及び LIR-7 の細胞分布は炎症細胞浸潤物の性質の差を反映して、RA 患者間で異なっていた。患者 RA1 においては好中球が LIR-2 の主な細胞起源であったが、患者 RA2 においてはマクロファージが LIR-2 の主な細胞起源であった。一般に、RA 患者において、LIR-7 の発現

は L I R - 2 のものより幾分低く、 L I R - 7 の細胞分布は L I R - 2 のものより広範囲であった。 L I R - 7 は、患者 R A 1 においては、好中球、マクロファージ、肥満細胞及び内皮細胞によって発現されており、患者 R A 2 においては、マクロファージ、内皮細胞及び纖維芽細胞様滑膜細胞によって発現されていた。残りの全ての R A 患者において、 L I R - 2 及び L I R - 7 の細胞起源は、マクロファージと、程度は低かったが内皮細胞であった。 O A において観察された L I R - 2 の限定された発現は、主として C D 6 8 + マクロファージに見出された。 R A を有する患者において、 L I R - 3 は、マクロファージ及び纖維芽細胞様滑膜細胞によって排他的に発現されていた。アイソタイプ一致陰性対照抗体は、いずれかの患者においても免疫染色を与えなかった。

#### 【 0 0 7 4 】

上に提示された結果は、初期 R A を有する患者に由来する滑膜が、 M H C クラス I 分子を認識しそれと会合することができる阻害性 L I R - 2 の上昇した発現を示したことを明らかにしている。上昇した L I R - 3 の発現も、 R A 患者において観察された。細胞を活性化する能力を有する L I R - 7 の広範な発現も、 R A 患者に由来するマクロファージ及び好中球に観察された。さらに、 L I R - 7 発現は肥満細胞及び内皮細胞で観察された。 O A を有する患者に由来する滑膜、対照対象、又は纖維症を伴う長期の R A を有する 2 人の患者には、 L I R 発現がほとんど観察されなかった。従って、これらの結果は、 L I R が、 R A における炎症性浸潤物中のプロテアーゼ及びサイトカインの発現を制御し、それによりパンヌス形成及び関節破壊の過程に寄与しているかもしれないことを示唆している。

#### 【 0 0 7 5 】

【表1】

表1  
RA、OA及び正常な滑膜における白血球免疫グロブリン様受容体の発現

対象	疾病期間(年)	組織学	LIR の免疫組織化学的発現(細胞数中央値/HPF)		
			LIR-2	LIR-3	LIR-7
慢性関節リウマチ					
RA1	2	広範な好中球の浸潤及び中程度の数のマクロファージ及び肥満細胞。	39	6	18
RA2	5	広範なマクロファージ浸潤及び小さなリンパ球凝集のエリア。	25	1	13
RA3	8	マクロファージ及びリンパ球の凝集。肥満細胞浸潤を含む中程度の纖維症。	15	7	8.5
RA4	8	広範な纖維症及びCD68+マクロファージ浸潤のいくつかのエリアを含む内皮増殖。	5	2	3
RA5	10	少数のマクロファージを含む広範な纖維症。	0	0.5	0.5
RA6	14	少数のマクロファージを含む広範な纖維症。	0.5	0.5	0.5
骨関節炎					
OA1	3~5	中程度のマクロファージ及びリンパ球の浸潤。	0.5	1	0
OA2	9	中程度のマクロファージ及びリンパ球の浸潤。限定された数の肥満細胞。	0	2.5	0
OA3	13	広範な纖維症。	2	7	1
対照					
N1	-		0	0	0
N2	-		0	0	0
N3	-		0	0	0

【0076】

【表2】

慢性関節リウマチ及び骨関節炎を有する患者に由来する滑膜中のLIR-2、LIR-3及びLIR-7の細胞起源  
ND 限られたLIR発現のため実施しなかった

対象	LIR-2	LIR-3	LIR-7
慢性関節リウマチ			
RA 1	好中球	マクロファージ	好中球、マクロファージ、肥満細胞、内皮細胞
RA 2	マクロファージ	マクロファージ及び繊維芽細胞様細胞	マクロファージ、内皮細胞、繊維芽細胞様細胞
RA 3	マクロファージ、内皮細胞	マクロファージ及び繊維芽細胞様細胞	マクロファージ、肥満細胞、内皮細胞
RA 4	マクロファージ	繊維芽細胞様細胞、マクロファージ	マクロファージ、内皮細胞
RA 5	ND	繊維芽細胞様細胞	内皮細胞
RA 6	ND	ND	繊維芽細胞様細胞
骨関節炎			
OA 1	マクロファージ	マクロファージ	マクロファージ
OA 2	ND	マクロファージ	ND
OA 3	繊維芽細胞様細胞	繊維芽細胞様細胞	内皮細胞

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/36372												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 45/00, 39/395; C07K 16/28 US CL : 424/85.1, 143.1, 153.1; 530/388.22, 388.23, 288.7 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/85.1, 143.1, 153.1; 530/388.22, 388.23, 288.7														
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) STN, MEDLINE, WEST														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Category *</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>TEDLA N. et al. The co-expression of activating and inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in rheumatoid synovium. American J. Pathol. February 2002, Vol. 160, No.2, pages 425-431</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>YEN JH. et al. Major histocompatibility complex class I-recognition receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. J Exp Med. 21 May 2001 (21.5.201), Vol. 193, No.10, pages 1159-1167.</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KOLLNERBERGER S. et al. Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. Arthritis Rheum. November 2002, Vol. 46, No.11, pages 2972-2982.</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	TEDLA N. et al. The co-expression of activating and inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in rheumatoid synovium. American J. Pathol. February 2002, Vol. 160, No.2, pages 425-431	1-10	A	YEN JH. et al. Major histocompatibility complex class I-recognition receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. J Exp Med. 21 May 2001 (21.5.201), Vol. 193, No.10, pages 1159-1167.	1-10	A	KOLLNERBERGER S. et al. Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. Arthritis Rheum. November 2002, Vol. 46, No.11, pages 2972-2982.	1-10
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	TEDLA N. et al. The co-expression of activating and inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors in rheumatoid synovium. American J. Pathol. February 2002, Vol. 160, No.2, pages 425-431	1-10												
A	YEN JH. et al. Major histocompatibility complex class I-recognition receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. J Exp Med. 21 May 2001 (21.5.201), Vol. 193, No.10, pages 1159-1167.	1-10												
A	KOLLNERBERGER S. et al. Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. Arthritis Rheum. November 2002, Vol. 46, No.11, pages 2972-2982.	1-10												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 06 March 2003 (06.03.2003)	Date of mailing of the international search report <b>08 AUG 2003</b>													
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No.	Authorized officer Maher M. Haddad  Telephone No. 703 308-0196													

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT US02/36372

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/55335 A2 (HYSEQ, INC) 2 August 2001 (2.8.2001), page 65-66	1
~~		-----
Y	LEPIN EJ, et al. Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. Eur J Immunol. December 2000. Vol. 30, No. 12, pages 3552-3561.	3, 5, 7, 9-10

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード(参考)

A 61 P 43/00 111

(81) 指定国 AP(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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,N0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(71) 出願人 305029863

テドラ , ニコデムス

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02115、ボストン、フランシス・ストリート・75

(71) 出願人 305029874

ボルゲス , ルイス・ジエー

アメリカ合衆国、ワシントン・98117、シアトル、トゥエンティエイトス・アベニュー・ノース・ウエスト・7753

(74) 代理人 100062007

弁理士 川口 義雄

(74) 代理人 100113332

弁理士 一入 章夫

(74) 代理人 100114188

弁理士 小野 誠

(74) 代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74) 代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72) 発明者 アーム , ジヨナサン・ピー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02115、ボストン、ワン・ジミー・ファンド・ウエイ、スミス・リサーチ・ビルディング、ブリガム・アンド・ウイミング・ホスピタル、ルーム・638・ピー

(72) 発明者 テドラ , ニコデムス

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・02115、ボストン、フランシス・ストリート・75

(72) 発明者 ボルゲス , ルイス・ジエー

アメリカ合衆国、ワシントン・98117、シアトル、トゥエンティエイトス・アベニュー・ノース・ウエスト・7753

F ターム(参考) 4C084 AA17 AA20 NA14 ZA96 ZB15

4C085 AA13 AA14 BB17 CC21 DD88 EE01