

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4527394号
(P4527394)

(45) 発行日 平成22年8月18日(2010.8.18)

(24) 登録日 平成22年6月11日(2010.6.11)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 07 K 16/18	(2006.01) C 07 K 16/18
C 07 K 19/00	(2006.01) C 07 K 19/00
C 12 N 5/10	(2006.01) C 12 N 5/00 1 O 2
C 12 P 21/08	(2006.01) C 12 P 21/08

請求項の数 15 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2003-502040 (P2003-502040)
(86) (22) 出願日	平成14年5月31日 (2002.5.31)
(65) 公表番号	特表2005-505256 (P2005-505256A)
(43) 公表日	平成17年2月24日 (2005.2.24)
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/017402
(87) 国際公開番号	W02002/098920
(87) 国際公開日	平成14年12月12日 (2002.12.12)
審査請求日	平成17年5月26日 (2005.5.26)
(31) 優先権主張番号	60/295, 449
(32) 優先日	平成13年6月1日 (2001.6.1)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	60/295, 907
(32) 優先日	平成13年6月4日 (2001.6.4)
(33) 優先権主張国	米国(US)

微生物の受託番号 ATCC 3350

(73) 特許権者	592221528 バイオジエン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 142, ケンブリッジ, ケンブリッジ センター 14
(73) 特許権者	592017633 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 114, ボストン, フルーツ ストリート 55
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K I M - 1 の分断を阻害するための分子および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 のうちのアミノ酸配列 D G L W N N N Q T Q L 内のエピトープにおけるヒト K I M - 1 の細胞外ドメインに結合する、抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

受託番号 P T A - 3 3 5 0 の下で A T C C に寄託されたハイブリドーマにより生成される抗体。

【請求項 3】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 4】

前記抗体は、ポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

前記抗体は、ヒト化抗体である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

前記抗体は、完全ヒト抗体である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

20

前記抗体は、一本鎖抗体である、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項8】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、キメラ抗体、 F_{a_b} フラグメント、 $F_{(a_b')_2}$ フラグメント、 $F_{a_b'}$ フラグメント、 F_{s_c} フラグメント、または F_v フラグメントである、請求項1に記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項9】

検出可能な標識に連結されている、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、結合体。

【請求項10】

請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントおよび毒素部分を含む、結合体または融合ポリペプチド。

10

【請求項11】

受託番号PTA-3350の下でATCCに寄託されたハイブリドーマABE3。

【請求項12】

請求項11に記載のハイブリドーマによって生成されるモノクローナル抗体をコードする核酸。

【請求項13】

細胞からの可溶性形態のKIM-1ポリペプチドの放出を阻害するためのインビトロでの方法であって、該方法は、KIM-1細胞表面ポリペプチドを発現する細胞と、請求項1～8のいずれかに記載の単離された抗体またはその抗原結合フラグメントとを接触させる工程を包含する、方法。

20

【請求項14】

KIM-1ポリペプチドのタンパク質分解を阻害するためのインビトロでの方法であって、該方法は、KIM-1細胞表面ポリペプチドを発現する細胞と、請求項1～8のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントとを接触させる工程を包含する、方法。

【請求項15】

請求項13または14に記載のインビトロでの方法であって、前記細胞は腎細胞である、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、損傷または罹患した腎臓細胞において発現されるポリペプチドに結合する抗体、ならびにそのような抗体の产生および使用のための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

腎臓損傷分子-1(「KIM-1」)遺伝子は、その発現が、損傷していないラット腎臓細胞における遺伝子発現と比較して虚血後のラット腎臓細胞においてアップレギュレートされる遺伝子として特定されている。このKIM-1遺伝子は、I型細胞膜糖タンパク質をコードする。この遺伝子の2つの形態が、ヒトにおいて記載されている。第一の形態は、KIM-1(a)と名付けられており、そしてこれは334アミノ酸長である。第二の形態は、KIM-1(b)と名付けられており、そしてこれは359アミノ酸長である。これら2つのヒトホモログは、それらのアミノ末端の323アミノ酸配列を通して同一であるが、これらのカルボキシル末端アミノ酸における配列が異なる。KIM-1遺伝子は、損傷した領域における脱分化した近位尿細管上皮(tubular epithelial)細胞において発現される。高レベルの発現が、髓質外層の外側細片における近位尿細管のS3セグメントにおいて観察される。この領域は、虚血または毒素の結果として

40

50

非常に損傷されやすい。

【0003】

KIM-1タンパク質のアミノ鎖末端領域は、KIM-1タンパク質の細胞外部分を含む。この領域は、ムチン様O-グリコシル化タンパク質の特徴を有する6つのシステイン免疫グロブリン様ドメインおよび1つのT/SPリッチドメインを含む。免疫グロブリン様ドメインは、(特に、これらが細胞-細胞の相互作用および細胞-細胞外マトリクスの相互作用について応答性である細胞表面での)タンパク質-タンパク質相互作用の媒介において広範に関連する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

10

【0004】

本発明は、ヒトKIM-1細胞外ドメインに対して惹起されたモノクローナル抗体が、可溶性KIM-1ポリペプチドの、膜結合形態のKIM-1タンパク質からのタンパク質分解性放出(分断(shedding))を阻害し得るという発見に一部基づく。

【0005】

一般的に、本発明は、可溶性KIM-1ポリペプチドの、KIM-1を発現する細胞からのタンパク質分解性放出を阻害する抗体、抗体誘導体、または抗原結合ポリペプチドの特徴とする。この抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。この抗体は、ヒト化モノクローナル抗体または完全なヒトモノクローナル抗体であり得る。この抗体は、例えば、IgGポリペプチドを含み得る。

20

【0006】

この抗体は、全長KIM-1ポリペプチドの細胞外ドメインに結合する。いくつかの実施形態において、この抗体は、KIM-1ポリペプチドの細胞外ドメインにおけるアミノ酸配列SSDG LWNNNQ TQLFL EH S(配列番号1)内に位置するエピトープに結合する。

【0007】

また、検出可能な標識に連結された、タンパク質分解を阻害するKIM-1抗体、抗体誘導体または抗原結合ポリペプチドを含む結合体も、本発明により提供される。検出可能な標識は、例えば、放射標識または蛍光標識であり得る。

【0008】

30

本発明はまた、KIM-1タンパク質の分解を阻害する抗体、抗体誘導体、または抗体結合ポリペプチドおよび毒素部分を含む結合体または融合ポリペプチドを含む。

【0009】

また、登録番号PTA-3350の下でATCCに寄託されているハイブリドーマにより産生される抗体と同じエピトープ特異性を有する抗体も、本発明の範囲内である。

【0010】

本発明はさらに、登録番号PTA-3350の下でATCCに寄託されているハイブリドーマにより産生される抗体の結合をクロスブロック(crossblock)する抗体も、提供する。いくつかの実施形態において、この抗体は、登録番号PTA-3350の下でATCCに寄託されているハイブリドーマにより産生される。また、このハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体をコードする核酸も、本発明の特徴である。

40

【0011】

本発明はまた、登録番号PTA-3350の下でATCCに寄託されているハイブリドーマも特徴とする。

【0012】

本発明は、本明細書中に記載されるKIM-1タンパク質分解を阻害する抗体、抗体誘導体、または抗原結合ポリペプチドと薬学的に受容可能なキャリアとを含む組成物を特徴とする。

【0013】

本発明はまた、可溶性形態のKIM-1ポリペプチドの、細胞からの放出を阻害する方

50

法も含む。この方法は、KIM-1細胞表面ポリペプチドを発現する細胞と、KIM-1タンパク質分解を阻害する抗体、抗体誘導体、または抗原結合ポリペプチドの有効量とを接觸させる工程を包含する。この細胞は、例えば、腎臓細胞であり得る。いくつかの実施形態において、この腎臓細胞は、腎臓癌細胞である。

【0014】

この細胞は、インビトロまたはインビボで提供され得る。好ましくは、抗体の有効量は、約0.1mg/kg～約100mg/kgの間であり、より好ましくは、約0.5mg/kg～約50mg/kgの間であり、そしてなおより好ましくは、約1mg/kg～約20mg/kgの間である。細胞がインビボで提供される場合、有効量の抗体が、1～6時間の注入期間の間、被験体への静脈注入により投与され得る。いくつかの実施形態において、可溶性形態のKIM-1ポリペプチドは、ポリペプチド配列VKVGGEAGP(配列番号2)を含む。実施例3からのデータは、膜貫通ドメインの近位の部位でタンパク質分解性切断によって細胞外環境へと放出された可溶性形態のKIM-1が、配列番号2により与えられるアミノ酸配列を含むことを明らかにした。

10

【0015】

また、KIM-1ポリペプチドフラグメントを含むKIM-1ポリペプチドを発現する細胞と、有効量のKIM-1タンパク質の分解を阻害する抗体、抗体誘導体、または抗原結合ポリペプチドとを接觸させることにより、このフラグメントのタンパク質分解性分断を阻害する方法も、本発明により提供される。

20

【0016】

本発明はまた、腎臓の疾患または損傷を処置または予防する方法を含む。この方法は、KIM-1タンパク質分解を阻害する抗体、抗体誘導体、または抗原結合ポリペプチドを、それを必要とする哺乳動物(例えば、ヒト)に投与する工程を包含する。処置され得る腎臓の疾患の例は、腎臓癌(例えば、腎臓癌腫)である。

【0017】

本明細書中に使用される場合、用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分(すなわち、抗原に特異的に結合する(免疫反応する))抗原結合部位を含む分子)をいう。そのような抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、FabフラグメントおよびF(ab')₂フラグメント、ならびにFab発現ライブリが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0018】

本明細書中に使用される場合、用語「誘導体」とは、通常はその分子の一部でないか、または通常その分子の一部である部分より少ない部分を含むかのいずれかの追加の化学部分を含む分子をいう。ある部分の追加または除去は、その分子の可溶性、吸収、もしくは生物学的半減期を改善し得るか、またはその分子の毒性を減少させ得る。

【0019】

本明細書中に使用される場合、用語「抗原結合ポリペプチド」とは、その抗体の抗原結合特性を保持する抗体フラグメント、変形体、アナログ、または化学誘導体をいう。

【0020】

本明細書中に使用される場合、用語「モノクローナル抗体」(Mab)とは、特有の軽鎖遺伝子産物および特有の重鎖遺伝子産物からなる、1つの分子種の抗体分子のみを含む抗体分子の集団をいう。詳細には、このモノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)は、その集団の全ての分子において同一である。従って、Mabは、それに対する特有の結合親和性により特徴付けられる抗原の特定のエピトープと免疫反応し得る抗原結合部位を含む。

40

【0021】

本明細書中に使用される場合、用語「KIM-1タンパク質分解を阻害する抗体」とは、可溶性KIM-1ポリペプチドのタンパク質分解性放出を阻害する抗体をいう。

【0022】

本明細書中に使用される場合、用語「クロスブロッキング抗体」とは、この抗体の非存

50

在下でエピトープに抗 KIM-1 抗体が結合する量に対して、KIM-1 ポリペプチド上のエピトープへの抗 KIM-1 抗体が結合する量を低下させる抗体をいう。

【0023】

本明細書中で使用される場合、用語「結合体」とは、第二の部分に共有結合された抗体をいう。第二の抗体は、例えば、標識であり得る。

【0024】

本明細書中で使用される場合、用語「標識」とは、検出可能な分子の部分をいう。標識は、例えば、放射性同位体、酵素、蛍光試薬、または色素であり得る。

【0025】

本明細書中で使用される場合、用語「融合ポリペプチド」とは、非抗 KIM-1 抗体分子に作動可能に連結された抗 KIM-1 抗体分子をいう。 10

【0026】

他に規定されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および専門用語は、本発明の属する分野における当業者により一般的に理解される用語と同じ意味を有すると考えられる。本明細書中に記載される方法および物質に類似するかまたは等価である方法および物質が本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および物質が以下に記載される。全ての刊行物、特許出願、特許、および本明細書中で言及される他の参考文献は、その全体が、本明細書中に参考として援用される。矛盾する場合、定義を含め、本明細書が支配する。さらに、物質、方法および実施例は、例示のみであり、限定することを意図しない。 20

【0027】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲により明らかになる。

【0028】

(発明の詳細な説明)

本発明は、KIM-1 ポリペプチドに特異的に結合し、そして可溶性形態の KIM-1 がタンパク質分解的に KIM-1 発現細胞から放出されることを阻害する、抗体を特徴とする。

【0029】

KIM-1 は、可溶性(短縮型)形態でもまた存在する、多くの膜タンパク質の 1 つである。これらの可溶性形態は、選択的スプライシングから生じ得るが、これらは、よりしばしば、膜形態のタンパク質分解から生じる。この切断は、膜貫通ドメインの近くで生じ、生理学的に活性なタンパク質の放出を生じる。 30

【0030】

本明細書中に記載される抗体は、KIM-1 ポリペプチドを発現する細胞(例えば、腎細胞)を検出するために使用され得る。KIM-1 ポリペプチドは、虚血後の腎細胞または疾患腎細胞において高レベルで発現されるので、本明細書中で開示された抗体は、被験体において、損傷腎細胞または疾患腎細胞を検出するために有用である。この抗体はまた、KIM-1 ポリペプチドのタンパク質分解による切断を阻害し、それによって、可溶性形態の KIM-1 ポリペプチドによって媒介される機能またはプロセスを阻害するために使用され得る。この抗体はまた、被験体における腎疾患または腎損傷を処置または予防するために、被験体に投与され得る。 40

【0031】

(可溶性 KIM-1 ポリペプチドのタンパク質分解による放出を阻害する抗 KIM-1 抗体)

タンパク質分解阻害性 KIM-1 ポリペプチドを調製するために、KIM-1 ポリペプチドの細胞外ドメインを含む免疫原が使用される。細胞外ドメインは、ヒト KIM-1 ポリペプチドのアミノ酸 1 ~ 290 までにわたる。ヒト KIM-1 ポリペプチドおよびラット KIM-1 ポリペプチドのアミノ酸配列、ならびにこれらのポリペプチドをコードする核酸は、1997年11月27日に公開されたWO97/44460号およびIchim 50

uraら(1998)J. Biol. Chem. 273:4135-42に提供される。

【0032】

適切な抗体としては、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、 F_{ab} 、 $F_{ab'}$ 、 F_{sc} 、 F_v 、および $F_{(ab')_2}$ フラグメント、ならびに F_{ab} 発現ライブラリーが挙げられる。一般的に、ヒトから得られた抗体分子は、免疫グロブリンクラス IgG、IgM、IgA、IgE および IgD の 1 つに分類され得、これらは、分子に存在する重鎖の性質によって互いに異なる。特定のクラスは、サブクラス(例えば、IgG₁、IgG₂など)もまた有する。さらに、ヒトにおいて、軽鎖は、鎖または鎖であり得る。本明細書中の抗体についての言及は、ヒト抗体種のこのようないくつかのクラス、サブクラスおよび型についての言及を含む。

10

【0033】

KIM-1 ポリペプチドの細胞外ドメイン、またはその部分もしくはそのフラグメントは、抗原として作用し得、さらに、ポリクローナル抗体調製およびモノクローナル抗体調製のための標準的な技術を使用して、抗原に免疫特異的に結合する抗体を生成するための免疫原として使用され得る。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも 10 アミノ酸残基、または少なくとも 15 アミノ酸残基、または少なくとも 20 アミノ酸残基、または少なくとも 30 アミノ酸残基を含む。好ましい抗 KIM-1 抗体は、KIM-1 中のアミノ酸配列 S S D G L W N N N Q T Q L F L E H S (配列番号 1) 内のエピトープか、そのアミノ酸配列と重複するエピトープか、またはそのアミノ酸配列に非常に近いエピトープに結合する。実施例 2 において得られた結果は、KIM-1 ポリペプチドに対する抗 KIM-1 抗体 ABE3 の結合エピトープが、配列番号 1 によって与えられる KIM-1 ポリペプチドのアミノ酸配列の部分の周辺に存在することを示唆した。

20

【0034】

当該分野で公知である種々の手順は、可溶性の KIM-1 ポリペプチドをタンパク質分解によって KIM-1 発現細胞から放出させることを阻害するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の產生のために使用され得る。例えば、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Harlow および Lane (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY を参考のこと。これらの抗体のいくつかは、以下で考察される。KIM-1 ポリペプチドに対して惹起された抗体は、以下の実施例 2 に記載される方法を含む、当該分野で公知の方法を使用して、これらの結合エピトープを同定するために特徴付けられ得る。抗体は、以下の実施例 4 に記載される方法のような方法を使用して、可溶性形態の KIM-1 のタンパク質分解による放出を阻害する抗体を同定するためにスクリーニングされ得る。

30

【0035】

いくつかのタンパク質分解阻害抗体は、モノクローナル抗体 ABE3 を產生するハイブリドーマによって產生される抗体と同一のエピトープ特異性を有する。モノクローナル抗体 ABE3 の KIM-1 ポリペプチド上に存在するエピトープに対する結合を交差ブロック(cross block)する抗体もまた、企図される。交差ブロック抗体は、KIM-1 ポリペプチドに対するモノクローナル抗体 ABE3 の結合を、試験抗体の存在下と非存在下とで比較することによって同定され得る。試験抗体の非存在下での ABE3 モノクローナル抗体の結合と比べて減少している、試験抗体の存在下での ABE3 モノクローナル抗体の結合は、その試験抗体が交差ブロック抗体であることを示す。

40

【0036】

(ポリクローナル抗体)

ポリクローナル抗体の產生のために、任意の適切な動物(例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物)は、KIM-1 エクトドメイン(ectodomain)を含むポリペプチドの 1 回以上の注射によって免疫され得る。このポリペプチドは、例えば、天然に存在する KIM-1、エクトドメインを表す化学的に合成されたポリペプチド、または組換え発現された融合タンパク質であり得る。融合部分または化学的に結合された部分

50

は、免疫された哺乳動物において免疫原性であることが既知である第2のタンパク質であり得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリンおよびダイズトリプシンインヒビターが挙げられるがこれらに限定されない。

【0037】

調製物は、さらにアジュバントを含み得る。免疫学的応答を増加するために使用される種々のアジュバントとしては、フロイントアジュバント（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノール、など）ヒトにおいて有用なアジュバント（例えば、*Bacille Calmette-Guerin* 10 および *Corynebacterium Parvum*、または類似する免疫刺激剤）が挙げられるがこれらに限定されない。使用され得るアジュバントのさらなる例としては、MPL-TDMアジュバント（モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコレート（*dicorynomycolate*））が挙げられる。

【0038】

免疫原性タンパク質に対して指向されるポリクローナル抗体分子は、哺乳動物から（例えば、血液）から単離され得、さらに周知技術（例えば、免疫血清のIgG画分を主として提供する、プロテインAまたはプロテインGを使用するアフィニティクロマトグラフィー）によって精製され得る。その後、または代替的に、その免疫グロブリンの標的であると考えられる特定の抗原またはそのエピトープが、カラム上に固定され、免疫アフィニティクロマトグラフィーによって免疫特異的抗体を精製し得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、*Wilkinson* 20によって考察される。*Wilkinson (2000) The Scientist 14: 25-28.*

【0039】

（モノクローナル抗体およびハイブリドーマ）

モノクローナル抗体は、*Kohler* および *Milstein* (1975) *Nature* 256: 495によって記載される方法のような、ハイブリドーマ法を使用して調製され得る。ハイブリドーマ法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物が、代表的に免疫剤で免疫され、この免疫剤と特異的に結合する抗体を産生するかまたは産生し得るリンパ球を誘発する。

【0040】

免疫剤は代表的に、タンパク質抗原、そのフラグメントまたはその融合タンパク質を含む。一般的に、ヒト起源の細胞が所望される場合には、末梢血リンパ球が使用されるか、または非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合には、脾臓細胞またはリンパ節細胞が使用されるかのいずれかである。次いで、リンパ球は、適切な融合剤（例えば、ポリエチレンギリコール）を使用して、不死化細胞株と融合され、ハイブリドーマ細胞を形成する。*Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE, Academic Press, (1986) 59頁~103頁。* 不死化細胞株は、通常、トランスフォームされた哺乳動物細胞（特に、齧歯類、ウシ、およびヒト起源の骨髄腫細胞）である。通常、ラットまたはマウス骨髄腫細胞株が、使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合していない不死化細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含む、適切な培養培地で培養され得る。例えば、親細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（*HGPRT* 40 または *HPT*）を欠損する場合、ハイブリドーマに対する培養培地は、代表的に、ヒポキサンチングアミノブテリン、およびチミジン（「HAT培地」）を含有し、これらの物質は、*HGPRT* 欠損細胞の増殖を阻害する。

【0041】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支持し、そしてHAT培地のような培地に対して感受性である細胞株である。より好ましい不死化細胞株は、マウス骨髄腫株であり、これらは、例えば、*Sa* 50

l k Institute Cell Distribution Center, San Diego, CaliforniaおよびAmerican Type Culture Collection, Manassas, Virginiaから得られ得る。ヒト骨髓腫細胞株およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている(Kozbor (1984) J. Immunol. 133: 3001; Brodeurら、MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) 51頁～63頁)。

【0042】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、抗原に対して指向されるモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ(例えば、放射免疫アッセイ(RIA)または酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA))によって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、MunsonおよびPolar (1980) Anal. Biochem. 107: 220のスキヤッチャード分析によって決定され得る。好ましくは、標的抗原に対して高度の特異性および高い結合親和性を有する抗体が、単離される。

【0043】

所望されるハイブリドーマ細胞が同定された後、このクローンは、限界希釈手順によってサブクローニングされ得、標準的な方法によって増殖され得る。この目的のために適切な培養培地としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地およびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物中において腹水として、インビオで増殖され得る。

【0044】

モノクローナル抗体サブクローンABE3.16を産生するハイブリドーマは、2001年5月2日に米国メリーランド州20852ロックビル、パークローン ドライブ12301のAmerican Type Culture Collectionに寄託され、受託番号PTA-3350を割り当てられた。ABE3.16は、ABE3のサブクローンである。

【0045】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、培養培地または腹水から、従来の免疫グロブリン精製手順(例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなど)によって単離または精製され得る。

【0046】

モノクローナル抗体はまた、組換えDNA方法(例えば、米国特許第4,816,567号に記載される)によって作製され得る。目的のモノクローナル抗体をコードするDNAは、容易に単離され得、そして従来の手順を使用して(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に対して特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用する免疫グロブリン可変領域遺伝子のクローニングは、確立された技術である。例えば、Kettl eboroughら、1993, Eur. J. Immunol. 23: 206-211を参照のこと。一旦、単離されると、DNAは、発現ベクター中に配置され、次いで、この発現ベクターは、宿主細胞(例えば、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または免疫グロブリンタンパク質をさもなくば産生しない骨髓腫細胞)にトランسفектされ、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成が得られる。

【0047】

DNAはまた、例えば、相同マウス配列に代えて重鎖ヒト定常ドメインおよび軽鎖ヒト

10

20

30

40

50

定常ドメインについてのコード配列で置換することによって(米国特許第4,816,567号; Morrison (1994) *Nature* 368: 812-13)、または、非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列の全部または一部分と免疫グロブリンコード配列を共有結合することによって改変され得る。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに代わって置換され得るか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変領域について置換され得て、キメラ二価抗体を作製し得る。

【0048】

(ヒト化抗体)

本発明のタンパク質抗原に対して指向される抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体をさらに包含し得る。これらの抗体は、投与される免疫グロブリンに対するヒトによる強力な免疫応答を生じることなく、ヒトへの投与について適切である。抗体のヒト化形態は、ヒト免疫グロブリンの配列を原則として含む、免疫グロブリンの鎖またはそれらのフラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合部分配列)であり、かつ、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含む。ヒト化は、げっ歯類のCDR配列をヒト抗体の対応する配列について置換することによって、Winterおよびその共同研究者の方法(Jonesら(1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmannら(1988) *Nature*, 332: 323-327; Verhoevenら(1988) *Science*, 239: 1534-1536)に従い実施され得る(米国特許第5,225,539号もまた参考のこと)。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応するヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても移植されたCDRまたはフレームワーク配列においても見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つでありそして代表的には2つである可変領域を実質的に含み、ここで、全てまたは実質的に全てのCDR領域は、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応するか、または実質的に全てのフレームワーク領域は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のヒトのフレームワーク領域に対応する。ヒト化抗体はまた、最適には、少なくとも、一部分の免疫グロブリン定常領域(Fc)を含み、代表的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域を含む(Jonesら, 1986; Riechmannら, 1988; and Presta(1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596)。

【0049】

(ヒト抗体)

完全ヒト抗体とは、軽鎖および重鎖の両方の本質的に配列全体(CDRを含む)がヒト遺伝子から得られる抗体分子をいう。このような抗体は、本明細書中で「ヒト抗体」または「完全ヒト抗体」と呼ばれている。ヒトモノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体を产生するための、トリオーマ技術;ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら(1983) *Immunol Today* 4: 72)およびEBVハイブリドーマ技術(Coleら. 1985 *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参考のこと)によって調製され得る。ヒトモノクローナル抗体は、ヒトハイブリドーマを使用すること(Coteら(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030)によってか、またはB細胞をEpstein Barr Virusをインビトロで使用して形質転換すること(Coleら. (1985) *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参考のこと)によって產生され得る。

【0050】

さらに、ヒト抗体はまた、さらなる技術(ファージディスプレイライブラリーを含む)を使用して產生され得る。Hoogenboom and Winter(1991) *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Marksら(1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581。同様に、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジ

10

20

30

40

50

エニックマウス（例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化され得る）に導入することによって作成され得る。チャレンジの際に、全ての点（遺伝子再配置、アセンブリおよび抗体レパートリー）でヒトにおいて見られる抗体産生と非常に似ているヒト抗体産生が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、ならびにMarksら（Bio/Technology 10,779783(1992)）；Lonbergら（Nature 368,856-859(1994)）；Morrison（Nature 368,812-13(1994)）；Fishwildら（Nature Biotechnology 14,845-51(1996)）；Neubergere（Nature Biotechnology 14,826(1996)）；およびLonberg and Huszar（Intern. Rev. Immunol. 13,65-93(1995)）において記載されている。
10

【0051】

ヒト抗体は、抗原によるチャレンジに応答してその動物の内因性抗体よりも完全ヒト抗体を産生するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を使用してさらに産生され得る。例えば、PCT公開WO 94/02602を参照のこと。非ヒト宿主において免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖をコードする内因性遺伝子が可能となり、そしてヒト免疫グロブリン重鎖およびヒト免疫グロブリン軽鎖をコードする活性な遺伝子座が、宿主のゲノムに挿入される。これらのヒト遺伝子は、例えば、必須のヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色体を使用して組み込まれる。次いで、全ての所望される改変を提供する動物は、改変の完全でない相補性を含む中間体トランスジェニック動物を交配することによってその後代として得られる。このような非ヒト動物の好ましい実施形態はマウスであり、そして、PCT公開WO 96/33735および同WO 96/34096に記載されるようにXenomouseTMと呼ばれる。この動物は、完全ヒト免疫グロブリンを分泌するB細胞を産生する。これらの抗体は、目的の免疫原での免疫後の動物から直接的に得られるか（例えば、ポリクローナル抗体の調製物）、または、動物由来の不死化したB細胞（例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ）から得られる。さらに、ヒトの可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子は、抗体を直接得るために回収され、そして発現され得るか、または抗体のアナログ（例えば、単鎖Fv分子）を得るためにさらに改変され得る。
20

【0052】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠く非ヒト宿主を産生する方法の例（マウスが例示される）は、米国特許第5,939,598号に開示される。これは、胚性幹細胞における少なくとも1つの内因性重鎖遺伝子座からJセグメント遺伝子を欠失させ、この遺伝子座の再配置を妨げ、かつ再配置された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の転写物の産生を妨げる工程を包含する方法によって得られ、この欠失は、選択マーカーをコードする遺伝子を含む標的ベクター；ならびに体細胞および生殖細胞がこれらの選択マーカーをコードする遺伝子を含むトランスジェニックマウスを胚性幹細胞から産生することによって与えられる。
30

【0053】

本発明の抗体（例えば、ヒト抗体）を産生するために有用な方法は、米国特許第5,916,771号に開示されている。この方法は、培養物中の1つの哺乳動物宿主細胞に、重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する工程、別の哺乳動物宿主細胞に軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを導入する工程、およびこれらの2つの細胞を融合してハイブリッド細胞を形成する工程を包含する。このハイブリッド細胞は、重鎖および軽鎖を含む抗体を発現する。さらなる有用な手順（すなわち、免疫原についての臨床的に関連するエピトープを同定する方法および抗親和性でこの関連するエピトープに免疫特異的に結合する抗体を分泌するための相関する方法が、PCT公開WO 99/53049に記載されている。
40
50

【0054】

(F_{a_b} フラグメントおよび单鎖抗体)

抗原タンパク質に特異的な单鎖抗体の產生のための技術が適用され得る(例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、 F_{a_b} 発現ライブラリーの構築のための方法が、タンパク質またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログ、またはホモログに対する所望の特異性を有するモノクローナル F_{a_b} フラグメントの迅速で効率的な同定を可能にするために適用され得る(例えば、Huseら(1989) Science 246 : 1275 - 1281)。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントは、以下を含むがこれらに限定されない当該分野で公知の技術によって產生され得る: (i) 抗体分子のペプシン消化によって產生される $F_{(a_b)_2}$ フラグメント; (ii) $F_{(a_b)_2}$ フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって生成される F_{a_b} フラグメント; (iii) パパインおよび還元剤で抗体分子を処理することによって生成される F_{a_b} フラグメントならびに(iv) F_v フラグメント。

【0055】

(免疫結合体)

本明細書中に記載の抗体は、薬剤(例えば、化学療法剤、造影剤、毒素(例えば、細菌起源、真菌起源、植物起源、または動物起源の酵素活性毒素あるいはそれらのフラグメント)あるいは放射性同位体(すなわち、放射性結合体))に対して結合体化され得る。

【0056】

使用され得る酵素活性毒素およびそれらのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖(*Pseudomonas aeruginosa* 由来)、リシンA鎖、アブリン(*abrin*)A鎖、モデクシン(*modecin*)A鎖、アルファサルシン(*sarcin*)、*Aleurites fordii* タンパク質、ナデシコ(*dianthin*)タンパク質、*Phytolaca americana* タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、モルモディカカラントインヒビター(*momordica charantia* inhibitor)、カルシン(*curcin*)、コロチン(*crotin*)、サパオナリアオフィシナリスインヒビター(*sapaponaria officinalis* inhibitor)、ゲロニン(*gelonin*)、ミトゲリン(*mitogellin*)、レストリクトシン(*restrictocin*)、フェノマイシン(*phenomycin*)、エノマイシン(*enomycin*)、およびトリコテセン(*tricotecene*)が挙げられる。種々の放射性核が、放射性核結合体化抗体の產生に利用可能である。例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、および¹⁸⁶Reが挙げられる。

【0057】

抗体および細胞傷害性薬剤の結合体は、例えば、以下の種々の二機能性タンパク質結合薬剤を使用して作製され得る: N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(S P D P)、イミノチオラン(iminothiolane)(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、ジメチルアジピミデート(dimethyl adipimidate) H C L)、活性エステル(例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド(glutaraldehyde))、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p - アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体(例えば、ビス(p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルイレン 2,6 - ディイソシアネート(tolylene 2,6 - diisocyanate))、およびビス活性フッ素化合物(例えば、1,5 - デフルオロ - 2,4 - デニトロベンゼン)。例えば、リシン免疫毒素(ricin immunotoxin)は、Vitettaら(1987) Science 238 : 1098 に記載されるように調製され得る。¹⁴C 標識 1 - イソチオシアナートベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX - D T P A)は、抗体に対する放射性核の結合体化のための例示的なキレート剤である。WO 94 / 11026 を参照のこと。

【0058】

本明細書中に記載の抗体はまた、検出可能な信号を生じる造影剤で標識し得る。造影剤およびこのような試薬で抗体を標識するための手順は周知である（例えば、Wensele およびMeares, Radio Immunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York, (1983); Colcherら, Meth. Enzymol. (1986) 121: 802-16を参照のこと）。これらの標識された抗体は、当該分野で認識されている技術（例えば、放射性核スキャニング（例えば、Bradwellら, Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldini (編) pp. 65-85, Academic Press (1985)を参照のこと）を含む）を使用して検出され得る。 10

【0059】

(薬学的組成物)

本明細書に記載の抗体は、腎細胞を画像化するかまたは腎細胞関連障害を処置するため 20 に哺乳動物被験体（例えば、ヒト）に投与され得る。これらの抗体は、単独または混合物として使用され得る。例えば、これらの抗体は、薬学的に受容可能な賦形剤またはキャリア（例えば、生理食塩水）の存在下で投与され得る。これらの賦形剤またはキャリアは、投与のモード（様式）および経路に基づいて選択され得る。適切な薬学的キャリアは、Remington's Pharmaceutical Sciences (E.W. Martin) およびUSP/NF (United States Pharmacopeia and the National Formulary) に記載されている。

【0060】

薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合性であるように処方される。投与経路の例としては、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経口（例えば、吸入）投与、経皮（局所的）投与、経粘膜投与、および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈剤（例えば、注射用蒸留水、生理食塩水、固定油、ポリエチレン glycol、グリセリン、ポリプロピレン glycol または他の合成溶媒）；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝剤（例えば、アセテート、シトарат、またはホスフェート）；および張度の調整のための薬剤（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムのような、酸または塩基で調整され得る。非経口調製物は、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、ディスポーザブルシリンジまたは複数回用量バイアルの中に入れられ得る。 30

【0061】

本発明の薬学的組成物は、「治療的有効量」または「予防的有効量」の本発明の抗体、抗体誘導体、または抗原結合ポリペプチドを含み得る。本明細書中で使用される場合、「治療的有効量」は、投薬量および必要とされる期間について、所望の治療結果を達成するために有効な量を意味する。抗体、抗体誘導体、または抗原結合ポリペプチドの治療的有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに個体において所望の応答を誘発するその抗体、抗体誘導体、または抗原結合ポリペプチドの能力のような要因に従って、変動し得る。治療的有効量が投与される場合、その抗体、抗体誘導体、または抗原結合ポリペプチドのあらゆる毒性または有害な作用よりも、治療的に有益な効果が上回る。本明細書中で使用される場合、「予防的有効量」は、投薬量および必要とされる期間について、所望の予防結果を達成するために有効な量を意味する。予防的用量は、疾患の発症前に被験体に投与されるので、予防的有効量は代表的に、治療的有効量よりも少ない。 40

【0062】

投薬レジメンは、最適の所望される応答（例えば、治療的応答または予防的応答）を与えるために調整され得る。例えば、本発明のいくつかの実施形態では、単回のボーラスが投与される。他の実施形態では、数回に分けられた用量が、長期間にわたって投与される 50

。用量は、状態の緊急度によって示されるように比例して減少または増加され得る。投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位形態で非経口組成物を処方することが有益である。本明細書中で使用される場合、「投薬単位形態」は、処置される哺乳動物被験体のための単位投薬量として適切な物理的に別個の単位であって、ここで各々が、必要とされる薬学的キャリアと共に所望の治療効果を生ずるために算出された予め決定された量の活性成分を含む、単位を意味する。

【0063】

本発明の抗体または抗体部分の治療的有効量または予防的有効量についての例示的な非制限的範囲は、0.1～100mg/kg、好ましくは、0.5～50mg/kg、より好ましくは、1～20mg/kg、さらにより好ましくは1～10mg/kgである。投薬量の値は、処置される状態の型および重篤度に応じて変動し得る。任意の特定の被験体について、特定の投薬レジメンが、その個体の必要性、およびこの組成物を投与する人物またはこの組成物の投与を監督する人物の専門的判断に従って、長期間にわたり調整されるべきである。本明細書中に示される投薬量範囲が単なる例示であり、そして本願発明の範囲を制限することを意図されないことが理解されるべきである。10

【0064】

非経口的な注射可能な投与は、一般的に、皮下、筋内または静脈内での注射および注入のために使用される。さらに、非経口投与のための1つのアプローチは、米国特許第3,710,795号（本明細書中で参考として援用される）に従う、一定レベルの投薬量が維持されることを保証する緩徐放出システムまたは持続放出システムの移植を使用する。20

【0065】

一般的に、適切な被験体は、KIM-1抗体が投与され得る任意の哺乳動物である。処置のために特に意図される被験体としては、ヒト、非ヒト霊長類、ヒツジ、ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ジャービル、ラットおよびマウスが挙げられる。

【0066】

有益に処置され得る腎臓の状態としては、KIM-1細胞表面タンパク質を発現する細胞からの可溶性KIM-1の放出阻害が、その状態を改善し得る状態が挙げられる。このような状態の例は、腎臓癌または腎臓損傷（腎臓癌（例えば、腎臓癌腫）を含む）である。他の状態としては、例えば、腎不全、慢性腎不全、急性腎炎、腎炎症候群、尿細管欠損、腎臓移植、毒性損傷、低酸素性損傷、および外傷が挙げられる。尿細管欠損は、腎多囊胞病、腎髓質囊胞病および髓質海綿腎のような、遺伝性または後天性のいずれかの性質のものが挙げられる。30

【0067】

（寄託）

モノクローナル抗体ABE3.16を産生するハイブリドーマを、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規約のもと、2001年5月2日付でアメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection（ATCC））に寄託し、そして受託番号ATCC PTA-3550を有する。出願人らは、本明細書に基づいて発行される特許存続期間の満了日前に、請求があった場合に、万が一この寄託物の状態により寄託機関がサンプルを供給し得ない場合には、この寄託物を取り替える義務を負うことを了解する。出願人らはまた、この寄託物が公的に利用可能となる時点となる、このような特許の発行に関してATCCに通知する義務を負うことを理解する。その時点の前に、この寄託物は、米国特許法施行規則第1.14条および米国特許法第112条の条項のもとで、特許庁長官に利用可能となる。40

【0068】

本発明をさらに、以下の例示的な実施例により例示する。この実施例は、単なる例示のために提供され、そして本発明の範囲または概念を制限するものとして解釈されなければならない。

50

【実施例】

【0069】

(実施例1：抗KIM-1モノクローナル抗体の生成)

モノクローナル抗体を、ヒトKIM-1ポリペプチドの細胞外ドメインに対して産生した。ヒトKIM-1の細胞外ドメイン(残基1~290)を、ヒトIgG1のFc部分(ヒンジCH2+CH3ドメイン)に結合し、そして哺乳動物発現プラスミドpEAG347にクローン化した構築物(KIM-1-Ig)を構築した。ヒトKIM-1(b)全長cDNAを、ヒト癌腫細胞株769-P由来のmRNAおよび公開されたDNA配列(Feigelsonら(1998)J.Virology:6621-28)に基づくプライマーを使用するRT-PCRによって得た。

10

【0070】

得られたcDNAの配列は、ヒトの腎臓および肝臓から得られたcDNAの配列と同一であった。pEAG347発現プラスミドは、構成的発現のためのタンデムプロモーター(SV40初期/アデノウイルス主要後期)、および安定に発現する細胞株のメトトレキサート選択のためのDHF遺伝子を含む。融合タンパク質を発現するトランスフェクトされたCHO細胞株を選択し、懸濁液中に適合させ、そして発酵槽において増殖させた。

【0071】

4匹のマウスに、ヒトKIM-1-Igで免疫した。KIM-1に対する抗体力価の増加を、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)を行うことによってモニターした。ELISAを、96ウェルプレート(Maxisorb, Nunc)において実施した。プレートを、50mM炭酸ナトリウム(pH9.6)にある100μlの抗原または捕捉抗体と共に4℃で一晩インキュベートすることによってコーティングした。次いで、潜在的な残りの吸着部位を、1%BSAを含む400μlのPBSと共に室温で1時間インキュベートすることによって、BSAでブロックした。プレートを、各反応工程の後で、PBSにより4回洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合体を、二次検出試薬として使用し、そして呈色反応を、テトラメチルベンジジンを用いて実施した。

20

【0072】

KIM-1に対して最高の血清学的力価を示すマウスを同定し、そしてKIM-1-Igでブーストした。次いで、マウスを屠殺し、そして1:6の比率の脾臓細胞:骨髄腫細胞で、そのマウスの脾臓細胞をFL653骨髄腫細胞と融合した。細胞融合物を、1ウェルあたり 10^5 細胞の密度で、1ウェルあたり 3.3×10^4 細胞の密度で、または1ウェルあたり 1.1×10^4 細胞の密度で、選択培地中において96ウェル組織培養プレートにプレーティングした。増殖についてポジティブなウェルを、ヒトKIM-1に対する抗体の発現について、ELISAによりスクリーニングし、そしてサブクローニングした。選択の終了時点で、最も強い結合を示す10個のクローンが残り、そしてELISAおよびウェスタンプロット分析によって特徴付けられた。この結果を、表1において下記に示す。

30

【0073】

【表1】

表1

クローン	AUF1	ASG1	ACA12	ABE3	ATE11	AMC12	AKG7	BIE6	AWE2	ARD5
アイソタイプ	G1k	G2b	G1k	G1k	G1k	G1k	G1k	G1k	G1k	G1k
hKIM-1-Igに 対するELISA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hKIM-1 (ムチン-マイ ナス)-Igに 対するELISA	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
還元下での ウェスタンブ ロット KIM-1-Ig	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
非還元下での ウェスタンブ ロットKIM -1-Ig	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4つのハイブリドーマクローン(ABE3、ACA12、AKG7およびARD5)をマウスの腹膜腔において増殖させた。腹水を回収し、そして各抗体を、プロテインA Sepharoseを使用するクロマトグラフィーによって精製した。ビオチン化AKG7を、アミノ反応性スルホ-NHS-LC-ビオチン(Pierce)の指向的結合により調製した。

【0074】

(実施例2: 抗KIM-1モノクローナル抗体の結合エピトープの同定)

ハイブリドーマABE3、ACA12、AKG7およびATE11によって産生されるモノクローナル抗体は、ムチンドメインを欠くKIM-1融合タンパク質(hKIM-1(mucin-min)Ig)に結合できない。これらの結果は、これらの抗体の結合エピトープが少なくとも部分的にムチンドメインであること実証した。さらに、これらの4つの抗体は、ウェスタンプロットにおいて還元され、変性されたhKIM-1-Igと反応することが観察された抗体のみである。この観察は、これらの抗体についてのエピトープが、タンパク質の一次構造におけるアミノ酸残基の单一ストレップに対応することを示した。

【0075】

結合エピトープを、KIM-1のムチンドメイン内に位置する残基210で始まり、そして細胞外ドメインの最終残基である残基290で終わる8つの重複合成18マーペプチドへの抗体の結合を測定することで同定した。結合研究に使用されたペプチドを、KIM-1ポリペプチド配列に関する図1Aに示す。結合研究の結果を、モノクローナル抗体ACA12、AKG7およびABE3について図1Bに示す。AKG7およびACA12の両方は、ペプチド45および46に結合するが、これらはそれぞれの結合親和性において異なった。これらの結果から、両方の抗体は、LQGAIIRRREP(配列番号3)(ペプチド45および46(図1A)に共通する9残基配列である)を含む配列に結合することが結論付けられている。このペプチド配列は、N結合グリコシル化またはO結合グリコシル化の推定部位を欠損し、ACA12およびAKG7が、KIM-1ポリペプチドのグリコシル化形態および非グリコシル化形態の両方を認識したことを示した。

【0076】

モノクローナル抗体ABE3は、ペプチド#49に結合するが、ペプチド#48または#50のいずれにも実質的に結合することを示さなかった。これらの観察は、ABE3の結合エピトープがDG LWNNNNQTQL(配列番号1)の周辺であることを示す。この配列は、最後のアスパラギン残基において潜在的なグリコシル化部位を示す。しかし、ABE3は合成ペプチドおよび種々のKIM-1のグリコシル化形態に結合するので、ABE3の結合は、主にペプチド部分に対してあると結論付けられた。

【0077】

(実施例3: KIM-1ポリペプチドの分断された(she'd)形態の同定)

この実施例は、KIM-1ポリペプチドの可溶性形態がKIM-1発現細胞から放出されることを証明した。

【0078】

3つの腎臓ヒト細胞株および1つの肝臓ヒト細胞株を、KIM-1の発現についてウェスタンプロットで分析した。使用された細胞株は、293(アデノウイルスで形質転換された胚性腎細胞: CRL-1573)、HK2(HPV-16で形質転換されたヒトの腎臓に近位の管状細胞; CRL-2190)、769-P(ヒト腎細胞腺癌; CRL-1933)およびHePG2(肝細胞癌; HB-8065)であった。細胞抽出物または馴化培地由来のタンパク質を、ウェスタンプロットによって分析しタンパク質のカルボキシ末端部位に対して惹起される、そしてABE3モノクローナル抗体、AKG7モノクローナル抗体、またはKIM-1(b)ウサギポリクローナル抗体でプローブした。ウサギポリクローナル抗体を、ヒトのKIM-1(b)タンパク質のC末端で最後の19残基および結合体化のためのさらなるシステイン残基に対応する、合成ペプチド(CKEVQAEEDNIYIENSLYATD(配列番号4); Research Genetics)に対して惹起した。このペプチドを、マレイミド活性化KLH(Pierce)に結合体化し、そしてこの結合体を使用して、ウサギに免疫した。抗血清を、様々な免疫化の後に回収した。

【0079】

馴化培地および細胞を、約90%の細胞コンフルエンシーで収集した。これらの細胞を、PBSでリンスし、そして5mM EDTAおよびプロテアーゼインヒビター(Boehringer Mannheim, Mini tablet)のカクテルを含む氷冷PBS中でゴム性ポリスマンでくい取った。これらの細胞を、ペレット化し、そしてプロテアーゼインヒビターを有する50mM HEPES、150mM NaCl、pH 7.5、1% NP-40中に再懸濁することによって溶解した(細胞ペレット1mgあたり20μlの溶解溶液)。氷上で5分後、この不溶性物質を、遠心分離(5分間、16000g)によって回収し、上清を2倍の還元ローディング緩衝液と混合した。各馴化培地のアリコートをまた、同じ容量の2倍の還元ローディング緩衝液と混合した。

【0080】

SDS-PAGEおよびウェスタンプロット分析のために、タンパク質のサンプルを、還元ローディング緩衝液と混合し、5分間95℃で温めた。次いで、還元そして変性したタンパク質を、4~20%ポリアクリルアミドゲル上のSDS-PAGEによって分離した。このタンパク質を、ニトロセルロースのシート上に移した。このプロットを5%PBT中の脱脂粉乳(Carnation)の溶液でブロッキンし、そしてマウスモノクローナル抗体のAKG7、ABE3またはACA12(1μg/mlで)を用いるか、またはKIM-1(b)のC末端ペプチドに対して惹起されるウサギポリクローナル抗血清(1000倍希釈)を用いて、同じ溶液中でプローブし、次いで、ヤギの抗マウス抗体またはヤギの抗ウサギ抗体のいずれかは、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合体化した。工程の間の洗浄を、PBTで行った。反応性結合を、化学発光によって示した。

【0081】

ABE3(図2A)を使用しての細胞抽出物のウェスタンプロット分析は、腎臓癌細胞株(レーン3)ならびに形質転換した腎近位管状細胞株HK2(レーン2)中のKIM-1の発現を示した; 約100kDaでの1つの主要なバンドならびに約70kDaおよび50kDaでの他の2つのバンドを、検出した。このパターンは、ラットKIM-1タンパク質について以前に観察された発現パターンと類似し、このKIM-1タンパク質はまた、SDS-PAGEの後、3つの識別可能なバンドで出現した(Ichimuraら、J.Biol.Chem.273:4135-42)。同じ3つのバンドをまた、ヒトのKIM1(b)のC末端に対応する合成ペプチドに対して惹起されるポリクローナル抗血清で観察した(図2B)。

10

20

30

40

50

【0082】

KIM-1の発現は、形質転換された胚腎細胞株293または線癌細胞株HepG2において検出され得なかった。ヒトKIM1ポリペプチドの予測された大きさは36kDaであるが、タンパク質が、Nグリコシル化のための4つの潜在的部位および複数のOグリコシル化部位を示すので、タンパク質のバンドは、より高い見かけ上の分子量で検出されたことが予測される。

【0083】

769-P細胞の細胞表面ビオチン化は、100kDaのKIM-1バンドが、実際の細胞表面タンパク質であったことを示した。他のバンドは、ゴルジ体を介して移行するKIM-1プロセッシング中間体おそらく対応する。

10

【0084】

AKG7モノクローナル抗体(図2C)を使用しての馴化培養培地のウェスタンプロット分析は、約90kDaで移動する可溶性KIM-1タンパク質の存在を示した。90kDaのバンドをまた、ACA12モノクローナル抗体で検出したが、ABE3モノクローナル抗体または抗KIM-1(b)C末端抗体では検出しなかった。約14kDaでのタンパク質のバンドをまた、抗KIM-1(b)C末端血清を用いて検出した。このバンドはKIM-1に無関係であり得るが、14kDaのバンドは、KIM1(b)の細胞表面切断のC末端産物を示す可能性もまだである。

【0085】

10kDaのサイズの減少ならびにABE3結合の欠損は、細胞環境へ可溶性形態を放出する細胞表面タンパク質分解性切断の結果であり得る。あるいは、この可溶性形態は、選択的スプライシング事象から生じ得、ここで、選択的なスプライシングの結果として生成されるタンパク質は、膜貫通ドメインおよび細胞ドメインを欠損していた。

20

【0086】

90kDaの溶解性ヒトKIM-1形態がKIM-1 mRNAの選択的スプライシングから生じ得る可能性に焦点を当てるために、組換えヒトKIM-1を、KIM-1 cDNA構築物から発現した(図3A~3C)。KIM-1(b)cDNAを、哺乳動物細胞中で構成的な過剰発現のためのベクター(pBEG347)にクローニングした。得られたプラスミド(phKIM1.2およびpEAG347)を使用して、COS-7細胞にトランスフェクトした。形質転換細胞を、コンフルエンシーに達するまで(トランスフェクションの後、約4日間)、増殖した。KIM-1発現細胞の馴化培地のアリコートを、1日および2日後に取り出した。4日で、馴化培地を回収し、そしてこの細胞を以前の節に記載したように加工し、細胞抽出物を得た。このサンプルを、AKG7(図3A)、ABE3(図3B)hKIM1(b)のカルボキシ末端に対して惹起されるポリクローナル抗体(図3C)を用いて、ウェスタンプロットによって分析した。

30

【0087】

腎細胞株由来のネイティブなヒトKIM-1を用いて観察されたパターンに類似して、組換えKIM-1(b)は、タンパク質の種々の翻訳後の改変された形態に対応するいくつかのバンドに現われた。AKG7を使用する細胞培養の上清の分析はまた、KIM-1の可溶性形態が細胞培養培地中に放出され、そしてその細胞培養培地において蓄積されることを明らかに示した。ネイティブな可溶性KIM-1のような放出された組換えKIM-1は、抗hKIM1(b)のC末端抗体を用いて検出されなかった。これはまた、ABE3でも検出されなかつたが、かすかなバンドを、タンパク質の高い濃度で時々観察した。この観察は、切断の後、抗体のいくつかの弱い結合を可能にするエピトープの一部が、離れたことを示した。14kDaのバンドをまた、排他的な抗hKIM-1(b)-C末端ポリクローナル抗体を用いて、細胞抽出物中で検出した。

40

【0088】

一緒に、これらのデータは、可溶性KIM-1が、膜貫通ドメインに近接する部位でのタンパク質分解性切断によって細胞外環境中へ放出しそしてABE3結合エピトープで重複したことを示した。免疫沈降およびSDS-PAGEによって単離された可溶性KIM

50

- 1 のエドマン分解による N 末端スプライシング分析は、実際のシグナル配列が P S O R T I I プログラムを使用する von Heijne の方法によって決定された予測されたシグナル配列よりも 4 残基長いか、または N 末端がシグナルペプチドの除去の後、短縮されるかのいずれかを示す、配列 S V K V G G E A G P X V X L X (配列番号 5) を同定した。

【 0089 】

(実施例 4 : A B E 3 モノクローナル抗体用いる分断 (shedding) K I M - 1 ポリペプチドの同定)

K I M - 1 のタンパク質分解放出での A B E 3 モノクローナル抗体の効果を試験するために、一過的にヒト K I M - 1 (b) を発現する C O S - 7 細胞を、種々の濃度の A B E 3 またはネガティブコントロールとしてマウス I g G の存在下で、 2 日間増殖した (図 4) 。

10

【 0090 】

ヒト組換え K I M - 1 (b) の一過性の発現に対して、 C O S - 7 細胞を、 10^6 細胞あたり $10 \mu g$ のプラスミド D N A を用いてエレクトロポレーションによってトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を、プレーティングし、そして 4 mM グルタミンおよび 10% ウシ胎仔血清を含む D M E M 中で増殖した。細胞を付着させるための 4 時間のインキュベーションの後、培地を、新しい培地を交換した。次いで、細胞コンフルエンシーは、約 20% であった。分断阻害研究について、トランスフェクトした細胞を、 12 ウエルプレートのウェルにプレーティングし、そして、種々の濃度の A B E 3 またはネガティブコントロールとしてマウス I g G (S i g m a) を追加した培地で増殖した。実験を、三通り行った。インキュベーションの 2 日後、馴化培地を、これらのウェルから回収し、遠心分離によって清澄化し、そして標準として精製した K I M - 1 - I g を使用する E L I S A によって評価した。

20

【 0091 】

この結果を、図 4 に示す。非特異的マウス I g G の添加は、培地中の可溶性 K I M - 1 のレベルに影響しなかったが、 A B E 3 が培地中に存在する場合、これらは可溶性 K I M - 1 の実質的な増加であった。従って、 A B E 3 抗体と競合的に結合することによって、 K I M - 1 のタンパク質分解性放出を部分的に阻害することが可能である。これは、 K I M - 1 切断部位が A B E 3 の結合部位でまたは結合部位に密接して位置することを確認した。

30

【 0092 】

可溶性 K I M - 1 の放出は、 A B E 3 の結合部位での非特異的プロテアーゼに対する K I M - 1 の高い感受性から生じ得ることが考えられ得る。しかし、 C 末端での 6 つのヒスチジン残基を有する細胞外ドメインの全体に対応する組換え可溶性 K I M - 1 の C 末端の切断は観察されず、そして同じ培地中の全長の K I M - 1 として一過的に発現した。

【 0093 】

(実施例 5 : メタロプロテイナーゼインヒビターを用いた K I M - 1 ポリペプチド分断の阻害)

メタロプロテイナーゼ (M M P) またはデスインテグリン (d e s i n t e g r i n) およびメタロプロテアーゼ (A D A M) は、細胞表面タンパク質の特異的切断に関与している。 2 つの M M P インヒビターの K I M - 1 ポリペプチドの切断に対する効果を、試験した。

40

【 0094 】

B B - 94 (b a t i s m a t a t) および G M 6 0 0 1 (I l o m a s t a t) は、いくつかのマトリクスメタロプロテイナーゼ (M M P) を阻害する、 2 つの広いスペクトルのヒドロキサム酸ベースの亜鉛メタロプロテイナーゼインヒビターである (20) 。 B B - 94 はまた、 T A C E (T N F 変換酵素) の強力なインヒビターである (18) 。細胞培養物における K I M - 1 の分断に対するこれら 2 つのインヒビターの活性を、試験した。

50

【0095】

BB-94 および GM6001 のストック溶液を、BB-94 については 70 mM の濃度にて、および GM6001 については 2.5 mM の濃度にて、DMSO 中で維持した。化合物を、0.5 μm ~ 32 μm の範囲の濃度へ新たな培地中に直接希釈した。腎臓癌腫細胞 769-P を、RPMI 培地 (10% ウシ胎仔血清、10 mM HEPES、および 1 mM ピルビン酸ナトリウムを補充した) 中で、種々の濃度の BB-94 および GM6001 の存在下で、28 時間にわたり増殖させた。2 つの化合物に細胞毒性がないことを、細胞生存度を 28 時間の培養期間の終わりに、ミトコンドリア色素 MTT を用いてチェックすることにより確認した (19) (21)。28 時間の期間の間に細胞外環境へ放出される可溶性 KIM-1 の量を、ELISA により測定した (図 5)。

10

【0096】

KIM-1 分断の完全な阻害は、32 μM のいずれかの MMP インヒビターの存在下で達成された。BB-94 は、GM6001 について、IC₅₀ が約 4 μM であったことと比較して、わずかにより有効であるようであった (約 1 μM の IC₅₀)。これらの結果により、KIM-1 の切断が、メタロプロテイナーゼ、おそらく、MMP ファミリーのメンバーまたは Adam ファミリーのメンバーにより媒介されることが示された。

【0097】

他の実施形態は、添付の特許請求の範囲の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【0098】

20

【図 1 A】図 1 A は、ヒト KIM-1 ムチンドメインのポリペプチド配列 (配列番号 6) およびモノクローナル抗体 ACA12、モノクローナル抗体 AKG7 およびモノクローナル抗体 ABE3 の結合エピトープをマッピングするために用いられる対応する 18 マーのオーバーラッピング合成ペプチドを示す概略的例示である。

【図 1 B】図 1 B は、種々の抗体濃度での、ペプチド 43 ~ 50 へのモノクローナル抗体 ABE、モノクローナル抗体 AKG7、およびモノクローナル抗体 ACA12 の結合を示すグラフのセットである。

【図 2】図 2 A ~ 図 2 C は、ABE3 と反応させた細胞抽出物のウェスタンプロット分析図 (図 2 A)、ヒト KIM-1 (b) C 末端に対するウサギポリクローナル抗体と反応させた細胞抽出物のウェスタンプロット分析図 (図 2 B)、およびモノクローナル抗体 AKG7 と反応させた馴化培地のウェスタンプロット分析図 (図 2 C) である。

30

【図 3】図 3 A ~ 図 3 C は、AKG7 と反応させた COS-7 細胞抽出物または馴化培地のウェスタンプロット分析図 (図 3 A)、ABE3 と反応させた COS-7 細胞抽出物または馴化培地のウェスタンプロット分析図 (図 3 B)、またはヒト KIM-1 (b) C 末端に対して惹起されたウサギポリクローナル抗体と反応させた COS-7 細胞抽出物または馴化培地のウェスタンプロット分析図 (図 3 C) である。

【図 4】図 4 は、KIM-1 (b) を発現する COS-7 細胞の、種々の濃度の ABE3 またはコントロールマウス IgG の存在下で増殖させた馴化培地中の可溶性 KIM-1 の濃度を示すヒストグラムである。

【図 5】図 5 は、769-P 細胞の、種々の濃度の BB-94 または GM6001 MM P インヒビターの存在下で増殖させた馴化培地中の可溶性 KIM-1 の濃度を示すグラフである。

40

【図 6 A】図 6 A は、ヒト KIM-1 (a) (配列番号 7) およびヒト HAVcr-1 または KIM-1 (b) (配列番号 8) の配列を示す。2 つのポリペプチドに共通する配列に対応する残基 323 までの単鎖配列が表される。下線部は、推定の単鎖および膜貫通ドメインである。影付き部は、4 つの推定 N-グリコシル化モチーフである。イタリック体は、KIM-1 (b) の C 末端に対する抗体を惹起するために用いられる合成ペプチドの配列である。

【図 6 B】図 6 B は、KIM-1 (b) タンパク質の概略図である。灰色の欄は、シグナル配列および膜貫通ドメインを表す。Ig 様ドメイン中のシステイン残基に印 (C) が付

50

けられている。4つの三角は、推定N-グリカンを表す。TSPリッチドメイン領域は、ムチン様ドメインを図式化するために濃くなっている。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Biogen, Inc.

<120> Molecules and Methods for Inhibiting Shedding of KIM-1

<130> 00689-512-061

<140> Not Yet Assigned

<141> 2002-05-31

10

<150> 60/295,449

<151> 2001-06-01

<150> 60/295,907

<151> 2001-06-04

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn Gln Thr Gln Leu Phe Leu Glu
1 5 10 15

His Ser

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro
1 5

30

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:consensus
sequence

<400> 3

Leu Gln Gly Ala Ile Arg Arg Glu Pro
1 5

40

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: chemically synthesized polypeptide

<400> 4

Cys Lys Glu Val Gln Ala Glu Asp Asn Ile Tyr Ile Glu Asn Ser Leu
1 5 10 15

Tyr Ala Thr Asp

20

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> VARIANT

<222> (11)

<223> Where Xaa is any amino acid as defined in the specification

<220>

<221> VARIANT

<222> (13)

<223> Where Xaa is any amino acid as defined in the specification

20

<220>

<221> VARIANT

<222> (15)

<223> Where Xaa is any amino acid as defined in the specification

<400> 5

Ser Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro Xaa Val Xaa Leu Xaa
1 5 10 15

<210> 6

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 6

Met Pro Leu Pro Arg Gln Asn His Glu Pro Val Ala Thr Ser Pro Ser
1 5 10 15

Ser Pro Gln Pro Ala Glu Thr His Pro Thr Thr Leu Gln Gly Ala Ile
20 25 30

Arg Arg Glu Pro Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Ser Tyr Thr Thr Asp Gly
35 40 45

Asn Asp Thr Val Thr Glu Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn Gln
50 55 60

Thr Gln Leu Phe Leu Glu His Ser Leu Leu Thr Ala Asn Thr Thr Lys

40

65

70

75

80

Gly

<210> 7
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Met His Pro Gln Val Val Ile Leu Ser Leu Ile Leu His Leu Ala Asp
 1 5 10 15

Ser Val Ala Gly Ser Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro Ser Val
 20 25 30

Thr Leu Pro Cys His Tyr Ser Gly Ala Val Thr Ser Met Cys Trp Asn
 35 40 45

Arg Gly Ser Cys Ser Leu Phe Thr Cys Gln Asn Gly Ile Val Trp Thr
 50 55 60

Asn Gly Thr His Val Thr Tyr Arg Lys Asp Thr Arg Tyr Lys Leu Leu
 65 70 75 80

Gly Asp Leu Ser Arg Arg Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Thr Ala
 85 90 95

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

Phe Asn Asp Met Lys Ile Thr Val Ser Leu Glu Ile Val Pro Pro Lys
 115 120 125

Val Thr Thr Thr Pro Ile Val Thr Thr Val Pro Thr Val Thr Thr Val
 130 135 140

Arg Thr Ser Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr
 145 150 155 160

Val Pro Thr Thr Met Ser Ile Pro Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr
 165 170 175

Met Thr Val Ser Thr Thr Ser Val Pro Thr Thr Thr Ser Ile Pro
 180 185 190

Thr Thr Thr Ser Val Pro Val Thr Thr Val Ser Thr Phe Val Pro
 195 200 205

Pro Met Pro Leu Pro Arg Gln Asn His Glu Pro Val Ala Thr Ser Pro
 210 215 220

Ser Ser Pro Gln Pro Ala Glu Thr His Pro Thr Thr Leu Gln Gly Ala
 225 230 235 240

Ile Arg Arg Glu Pro Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Ser Tyr Thr Thr Asp
 245 250 255

Gly Asn Asp Thr Val Thr Glu Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn

10

20

30

40

260	265	270		
Gln Thr Gln Leu Phe Leu Glu His Ser Leu Leu Thr Ala Asn Thr Thr				
275	280	285		
Lys Gly Ile Tyr Ala Gly Val Cys Ile Ser Val Leu Val Leu Leu Ala				
290	295	300		
Leu Leu Gly Val Ile Ile Ala Lys Lys Tyr Phe Phe Lys Lys Glu Val				
305	310	315	320	
Gln Gln Leu Arg Pro His Lys Ser Cys Ile His Gln Arg Glu				
325	330			
				10
<210> 8				
<211> 359				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				
<400> 8				
Met His Pro Gln Val Val Ile Leu Ser Leu Ile Leu His Leu Ala Asp				
1	5	10	15	
Ser Val Ala Gly Ser Val Lys Val Gly Gly Glu Ala Gly Pro Ser Val				
20	25	30		
Thr Leu Pro Cys His Tyr Ser Gly Ala Val Thr Ser Met Cys Trp Asn				
35	40	45		
Arg Gly Ser Cys Ser Leu Phe Thr Cys Gln Asn Gly Ile Val Trp Thr				
50	55	60		
Asn Gly Thr His Val Thr Tyr Arg Lys Asp Thr Arg Tyr Lys Leu Leu				
65	70	75	80	
Gly Asp Leu Ser Arg Arg Asp Val Ser Leu Thr Ile Glu Asn Thr Ala				
85	90	95		
Val Ser Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys Arg Val Glu His Arg Gly Trp				
100	105	110		
Phe Asn Asp Met Lys Ile Thr Val Ser Leu Glu Ile Val Pro Pro Lys				
115	120	125		
Val Thr Thr Pro Ile Val Thr Thr Val Pro Thr Val Thr Thr Val				
130	135	140		
Arg Thr Ser Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr Thr				
145	150	155	160	
Val Pro Thr Thr Met Ser Ile Pro Thr Thr Thr Val Pro Thr Thr				
165	170	175		
Met Thr Val Ser Thr Thr Ser Val Pro Thr Thr Thr Ser Ile Pro				
180	185	190		
Thr Thr Thr Ser Val Pro Val Thr Thr Val Ser Thr Phe Val Pro				
195	200	205		
Pro Met Pro Leu Pro Arg Gln Asn His Glu Pro Val Ala Thr Ser Pro				
				20

210	215	220	
Ser Ser Pro Gln Pro Ala Glu Thr His Pro Thr Thr Leu Gln Gly Ala			
225	230	235	240
Ile Arg Arg Glu Pro Thr Ser Ser Pro Leu Tyr Ser Tyr Thr Thr Asp			
245	250	255	
Gly Asn Asp Thr Val Thr Glu Ser Ser Asp Gly Leu Trp Asn Asn Asn			
260	265	270	
Gln Thr Gln Leu Phe Leu Glu His Ser Leu Leu Thr Ala Asn Thr Thr			
275	280	285	
Lys Gly Ile Tyr Ala Gly Val Cys Ile Ser Val Leu Val Leu Leu Ala			
290	295	300	10
Leu Leu Gly Val Ile Ile Ala Lys Lys Tyr Phe Phe Lys Lys Glu Val			
305	310	315	320
Gln Gln Leu Ser Val Ser Phe Ser Ser Leu Gln Ile Lys Ala Leu Gln			
325	330	335	
Asn Ala Val Glu Lys Glu Val Gln Ala Glu Asp Asn Ile Tyr Ile Glu			
340	345	350	
Asn Ser Leu Tyr Ala Thr Asp			
355			

【図1A】

FIGURE 1A

ACA12
AKG7
ABE3

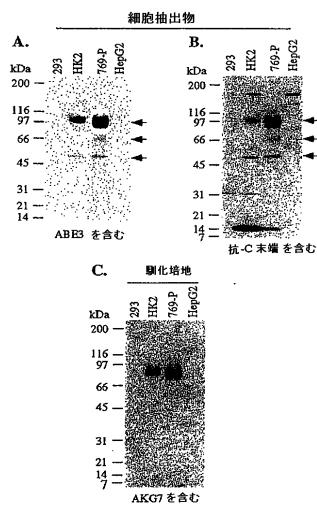
```

110
MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
115 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
120 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
125 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
130 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
135 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
140 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
145 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
150 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
155 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
160 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
165 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
170 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
175 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
180 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
185 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
190 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
195 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
200 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
205 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
210 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
215 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
220 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
225 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
230 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
235 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
240 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
245 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
250 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
255 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
260 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
265 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
270 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
275 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
280 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
285 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
290 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
295 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
300 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
305 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
310 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
315 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
320 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
325 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
330 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
335 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
340 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
345 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
350 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED
355 MFLPQKHEVAVGHSRSPINPAPTEPTIQLQAIIRKPTTSSPLVSYTIDQNEIVVSSRQGLAANQVQPLQHHLQVNTED

```

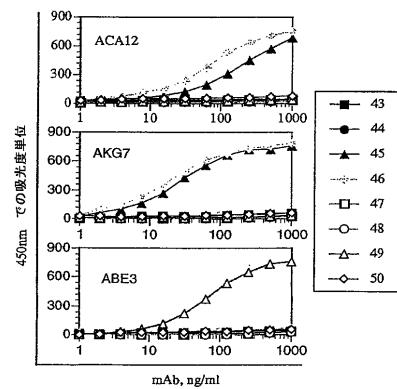
【図2】

FIGURE 2



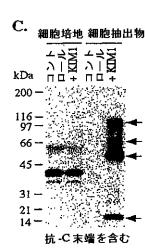
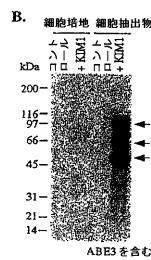
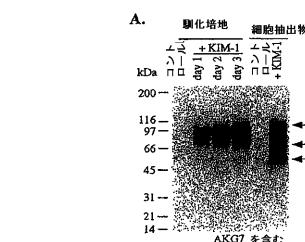
【図1B】

FIGURE 1B



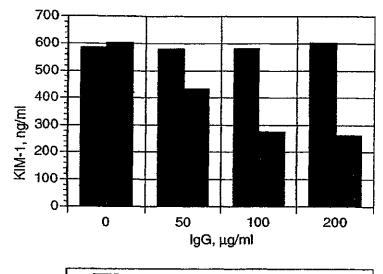
【図3】

FIGURE 3



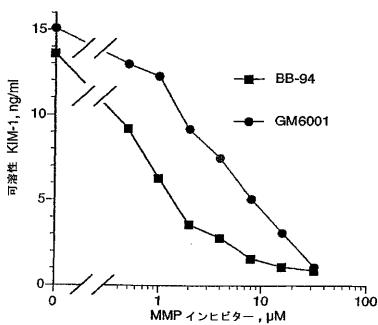
【図4】

FIGURE 4



【図5】

FIGURE 5



【図6 A】

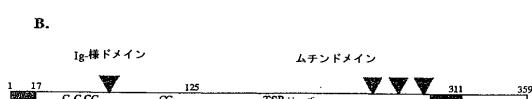
A.

```

> ヒト KIM-1 (a) (HNVcr-1) 334 aa
> ヒト KIM-1 (b) (HNVcr-1) 359 aa
MHPQVVILSLILHILADPSAGSVKVGGEGAGSVTLPCHVSGAVATSMCMNRGJCSLPTCQNG 60
IVWVNSGNSVYVYKDTYVYLLGDLRRDWSLTTEVTVVSDSGVYCCRVVHGRWFNDMKITV 120
SLGQVQVYVTTTPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYV 180
PTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYVPTVYV 240
IRREPPTSSPELYSYTTGPTVTESSDGLWNNSQDQPLEMSLQDQDQGIVGIVCIVL 300
VLLALLGVVIAKKYFFKKEVQQLT{RPHKSCIIHQRE 334
{SVSFSSLQINAKLQNAVEKEVQAEONIYIENSLYAID 359

```

【図6 B】



フロントページの続き

前置審査

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ベイリー, ベロニク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01719, ボックスボロウ, クーリッジ フーム
ロード 44

(72)発明者 ボンベントル, ジョセフ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01778, ウェイランド, ボストン ポスト ロード
101

審査官 横田 優子

(56)参考文献 国際公開第01/098481 (WO, A1)

特表2001-505761 (JP, A)

J Biol Chem., 277[42] (2002) p.39739-39748

J Virol., 72[8] (1998) p.6621-6628

J Biol Chem., 273[7] (1998) p.4135-4142

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

BIOSIS/WPI(DIALOG)