

(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2012-521199

(P2012-521199A)

(43) 公表日 平成24年9月13日(2012.9.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G 4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B O 6 3
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	4 B O 6 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C O 7 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 94 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-501081 (P2012-501081)	(71) 出願人	505098650
(86) (22) 出願日	平成22年3月22日 (2010. 3. 22)		ウォルター アンド エリザ ホール イ
(85) 翻訳文提出日	平成23年11月10日 (2011. 11. 10)		ンスティテュート オブ メディカル リ
(86) 国際出願番号	PCT/AU2010/000325		サーチ
(87) 国際公開番号	W02010/108215		オーストラリア国 ビクトリア州 メルボ
(87) 国際公開日	平成22年9月30日 (2010. 9. 30)		ルン パークビル ロイヤル パレード
(31) 優先権主張番号	61/162, 616		1 ジー
(32) 優先日	平成21年3月23日 (2009. 3. 23)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100102118
			弁理士 春名 雅夫
		(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫応答を調節するための化合物および方法

(57) 【要約】

本発明は、Clec9Aとして公知の樹状細胞マーカーに結合するタンパク質の同定に関する。本発明は、樹状細胞へ抗原などの治療物質を標的化するための新規の化合物を提供する。さらに、抗原に対する体液性および／またはT細胞媒介性免疫応答を調節する方法、病的状態に関与するその樹状細胞への細胞傷害性物質の送達方法、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを調節する方法、および破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部に由来する物質に対する免疫応答、ならびに抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を調節する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療物質へ結合されたポリペプチドを含む化合物であって、ポリペプチドが、

(i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(iii) (i) もしくは (ii) の生物活性断片

を含み、化合物のポリペプチドが、

(a) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

(b) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含む第2ポリペプチドに結合する、化合物。

【請求項 2】

ポリペプチドが、SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含む、請求項1記載の化合物。

【請求項 3】

治療物質が抗原である、請求項1または請求項2記載の化合物。

【請求項 4】

抗原が、癌抗原、自己抗原、アレルゲン、ならびに／または、病原性および／もしくは感染性生物由来の抗原である、請求項3記載の化合物。

【請求項 5】

治療物質が細胞傷害性物質である、請求項1または請求項2記載の化合物。

【請求項 6】

治療物質が薬物および／または薬理学的物質である、請求項1または請求項2記載の化合物。

【請求項 7】

検出可能な標識へ結合されたポリペプチドを含む化合物であって、ポリペプチドが、

(i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(iii) (i) もしくは (ii) の生物活性断片

を含み、化合物のポリペプチドが、

(a) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

(b) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含む第2ポリペプチドに結合する、化合物。

【請求項 8】

(i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(iii) (i) もしくは (ii) の生物活性断片

を含むポリペプチドに結合する化合物。

【請求項 9】

SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合する、請求項8記載の化合物。

【請求項 10】

ポリペプチドである、請求項8または請求項9記載の化合物。

【請求項 11】

抗体またはその抗原結合性断片である、請求項10記載の化合物。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、または四重特異性抗体である、請求項11記載の化合物。

【請求項 1 3】

治療物質へ結合されている、請求項8～12のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 1 4】

治療物質が抗原である、請求項13記載の化合物。

【請求項 1 5】

抗原が、癌抗原、自己抗原、アレルゲン、ならびに／または、病原性および／もしくは感染性生物由来の抗原である、請求項14記載の化合物。

【請求項 1 6】

治療物質が細胞傷害性物質である、請求項13記載の化合物。

【請求項 1 7】

治療物質が薬物および／または薬理学的物質である、請求項13記載の化合物。

【請求項 1 8】

検出可能に標識されている、請求項8～17のいずれか一項記載の化合物。

【請求項 1 9】

請求項1～18のいずれか一項記載の化合物および薬学的に許容される担体を含む組成物

。

【請求項 2 0】

アジュバントをさらに含む、請求項19記載の組成物。

【請求項 2 1】

化合物が、リポソーム中に封入されているか、またはその表面上に露出されている、請求項19または請求項20記載の組成物。

【請求項 2 2】

請求項1～18のいずれか一項記載の化合物および／または請求項19～21のいずれか一項記載の組成物を対象へ投与する工程を含む、対象における免疫応答を調節する方法。

【請求項 2 3】

抗原に対する免疫応答を誘導および／または強化する、請求項22記載の方法。

【請求項 2 4】

自己抗原またはアレルゲンに対する免疫応答を低下させる、請求項22記載の方法。

【請求項 2 5】

対象における抗原に対する免疫応答を調節する方法であって、樹状細胞またはその前駆体を請求項1～18のいずれか一項記載の化合物および／または請求項19～21のいずれか一項記載の組成物へインビトロで曝露する工程、ならびに該細胞を対象へ投与する工程を含む、方法。

【請求項 2 6】

細胞が対象から単離されている、請求項25記載の方法。

【請求項 2 7】

体液性および／またはT細胞媒介性応答を調節する工程を含む、請求項22～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 8】

ナイーブCD8⁺ T細胞の活性化および／またはナイーブCD4⁺ T細胞の活性化を調節する工程を含む、請求項27記載の方法。

【請求項 2 9】

樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防する方法であって、請求項1～18のいずれか一項記載の化合物および／または請求項19～21のいずれか一項記載の組成物を対象へ投与する工程を含む、方法。

【請求項 3 0】

請求項5、6、16または17記載の化合物を投与する工程を含む、請求項18記載の方法。

【請求項 3 1】

10

20

30

40

50

樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防する方法であって、対象の細胞内に存在する場合に、

(i) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

(ii) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含むポリペプチドの細胞内での活性のレベルを、ポリヌクレオチドを欠く細胞と比較して調節する、単離されたポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドをコードする構築物を対象へ投与する工程を含む、方法。

【請求項 3 2】

ポリヌクレオチドが、細胞内でのポリペプチドの活性のレベルを下方制御し、ポリヌクレオチドが、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒性ポリヌクレオチド、マイクロRNA、および二本鎖RNAより選択される、請求項31記載の方法。

【請求項 3 3】

樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患が、癌、感染症、自己免疫疾患またはアレルギーである、請求項29～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 4】

自己免疫疾患がエリテマトーデスである、請求項33記載の方法。

【請求項 3 5】

感染症がプラスモジウム種感染症である、請求項33記載の方法。

【請求項 3 6】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを調節する方法であって、

(i) 以下を含むポリペプチド

(a) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(b) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／もしくは

(c) (a) もしくは (b) の生物活性断片、

(ii) 請求項1～18のいずれか一項記載の化合物、ならびに／または

(iii) 請求項19～21のいずれか一項記載の組成物

を投与する工程を含む、方法。

【請求項 3 7】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を調節する方法であって、

(i) 以下を含むポリペプチド

(a) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(b) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／もしくは

(c) (a) もしくは (b) の生物活性断片、

(ii) 請求項1～18のいずれか一項記載の化合物、ならびに／または

(iii) 請求項19～21のいずれか一項記載の組成物

を投与する工程を含む、方法。

【請求項 3 8】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質に対する免疫応答を調節する方法であって、

(i) 以下を含むポリペプチド

(a) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(b) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一

10

20

30

40

50

なアミノ酸配列；および／もしくは

(c) (a) もしくは (b) の生物活性断片、

(ii) 請求項1～18のいずれか一項記載の化合物、ならびに／または

(iii) 請求項19～21のいずれか一項記載の組成物

を投与する工程を含む、方法。

【請求項 3 9】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを調節する方法であって、以下を含むポリペプチド：

(i) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(ii) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／もしくは

(iii) (i) もしくは (ii) の生物活性断片

の産生を調節する化合物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 4 0】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を調節する方法であって、以下を含むポリペプチド：

(i) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(ii) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(iii) (i) もしくは (ii) の生物活性断片

の産生を調節する化合物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 4 1】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の免疫応答を調節する方法であって、以下を含むポリペプチド：

(i) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(ii) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(iii) (i) もしくは (ii) の生物活性断片

の産生を調節する化合物を投与する工程を含む、方法。

【請求項 4 2】

化合物がポリヌクレオチドである、請求項39～41のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 3】

ポリヌクレオチドが、動物の細胞内でのポリヌクレオチドの発現を指示することができるプロモーターへ機能的に連結されている、請求項42記載の方法。

【請求項 4 4】

ポリヌクレオチドが、ポリペプチドをコードする遺伝子からのmRNAレベルを下方制御する、請求項42または請求項43記載の方法。

【請求項 4 5】

ポリヌクレオチドが、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒性ポリヌクレオチド、マイクロRNA、および二本鎖RNAより選択される、請求項44記載の方法。

【請求項 4 6】

ポリヌクレオチドが、ポリペプチドをコードする遺伝子からのmRNAレベルを上方制御する、請求項42または請求項43記載の方法。

【請求項 4 7】

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは

10

20

30

40

50

死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを増加させる、請求項36または請求項39記載の方法。

【請求項48】

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを減少させる、請求項36または請求項39記載の方法。

【請求項49】

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を増加させる、請求項37または請求項40記載の方法。

10

【請求項50】

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を減少させる、請求項37または請求項40記載の方法。

【請求項51】

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質に対する免疫応答を増加させる、請求項38または請求項41記載の方法。

【請求項52】

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質に対する免疫応答を減少させる、請求項38または請求項41記載の方法。

20

【請求項53】

対象が、移植片対宿主病（GVHD）、自己免疫疾患、感染症、神経変性疾患、全身性炎症反応症候群（SIRS）、癌および損傷より選択される疾患に苦しんでいる、請求項36～52のいずれか一項記載の方法。

【請求項54】

対象中における免疫応答を調節するための医薬の製造のための、請求項1～18のいずれか一項記載の化合物および／または請求項19～21のいずれか一項記載の組成物の使用。

【請求項55】

対象中における抗原に対する免疫応答を調節するための医薬の製造のための、請求項1～18のいずれか一項記載の化合物および／または請求項19～21のいずれか一項記載の組成物へインビトロで曝露された樹状細胞またはその前駆体の使用。

30

【請求項56】

対象中における樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防するための医薬の製造のための、請求項1～18のいずれか一項記載の化合物および／または請求項19～21のいずれか一項記載の組成物の使用。

【請求項57】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを調節するための医薬の製造のための、

40

(i) 以下を含むポリペプチド

(a) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(b) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(c) (a) もしくは (b) の生物活性断片、

(ii) 請求項1～18のいずれか一項記載の化合物、および／または

(iii) 請求項19～21のいずれか一項記載の組成物

の使用。

【請求項58】

50

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を調節するための医薬の製造のための、

(i) 以下を含むポリペプチド

(a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(c) (a) もしくは (b) の生物活性断片、

(ii) 請求項1~18のいずれか一項記載の化合物、および／または

(iii) 請求項19~21のいずれか一項記載の組成物

の使用。

10

【請求項59】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質に対する免疫応答を調節するための医薬の製造のための、

(i) 以下を含むポリペプチド

(a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(c) (a) もしくは (b) の生物活性断片、

(ii) 請求項1~18のいずれか一項記載の化合物、および／または

(iii) 請求項19~21のいずれか一項記載の組成物

の使用。

20

【請求項60】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを調節するための医薬の製造のための、以下を含むポリペプチド：

(i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(iii) (i) もしくは (ii) の生物活性断片

の産生を調節する化合物の使用。

30

【請求項61】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を調節するための医薬の製造のための、以下を含むポリペプチド：

(i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(iii) (i) もしくは (ii) の生物活性断片

の産生を調節する化合物の使用。

40

【請求項62】

対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質に対する免疫応答を調節するための医薬の製造のための、以下を含むポリペプチド：

(i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(iii) (i) もしくは (ii) の生物活性断片

50

の産生を調節する化合物の使用。

【請求項 6 3】

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞に関連する疾患を診断する、予後診断するおよび／またはその状態をモニタリングする方法であって、

(i) 以下を含むポリペプチドに結合する化合物と細胞とを接触させる工程：

(a) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(b) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(c) (a) もしくは (b) の生物活性断片、ならびに

10

(ii) ポリペプチドが存在するかまたは存在しないかを判定する工程

を含み、

ここで、ポリペプチドの存在が、疾患の診断、予後および／または状態を提供する、方法。

【請求項 6 4】

化合物が抗体またはその抗原結合性断片である、請求項63記載の方法。

【請求項 6 5】

化合物が検出可能に標識されている、請求項63または請求項64記載の方法。

【請求項 6 6】

対象に対してインビボで行われる、請求項63～65のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 6 7】

対象から得られた試料に対してインビトロで行われる、請求項63～65のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 8】

疾患が、移植片対宿主病（GVHD）、自己免疫疾患、感染症、神経変性疾患、全身性炎症反応症候群（SIRS）、癌および損傷より選択される、請求項63～67のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6 9】

細胞を死滅させるための療法の有効性をモニタリングする方法であって、

(i) 細胞を療法へ曝露する工程、および

30

(ii) 請求項63～68のいずれか一項記載の方法を使用して、破壊された細胞膜を有する細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部を検出する工程を含み、

ここで、破壊された細胞膜を有する細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞の存在が、療法が有効であることを示す、方法。

【請求項 7 0】

工程（i）における細胞がインビボにある、請求項69記載の方法。

【請求項 7 1】

療法が対象へ施される、請求項69または請求項70記載の方法。

【請求項 7 2】

40

対象が癌または感染症を有する、請求項69記載の方法。

【請求項 7 3】

対象から得られた試料に対して工程（ii）を行う、請求項69～72のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7 4】

療法が薬物療法または放射線療法である、請求項69～73のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7 5】

初期アポトーシス細胞と、後期アポトーシス細胞、壊死細胞または死細胞とを識別する方法であって、

(i) 以下のものに結合する化合物と細胞とを接触させる工程：

50

- (a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；
 - (b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または
 - (c) (a) もしくは (b) の生物活性断片、ならびに
- (ii) ポリペプチドへの化合物の結合が存在するかまたは存在しないかを判定する工程を含み、
ここで、ポリペプチドへの化合物結合は、細胞が後期アポトーシス細胞、壊死細胞または死細胞であることを示す、方法。

【請求項 76】

- 対象中における抗原に対する免疫応答を調節する方法であって、
- (i) 樹状細胞またはその前駆体の集団を得る工程、
 - (ii) 以下を含むポリペプチドの産生および／または活性を調節する工程：
 - (a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；
 - (b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または
 - (c) (a) もしくは (b) の生物活性断片、
 - (iii) 樹状細胞またはその前駆体と抗原とを接触させる工程、ならびに
 - (iv) 樹状細胞またはその前駆体を対象へ投与する工程
- を含む、方法。

【請求項 77】

工程 (iii) が、樹状細胞またはその前駆体と、前記抗原を含む、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞、死細胞、および／またはそれらの一部とを接触させることを含む、請求項76記載の方法。

【請求項 78】

- 工程 (iii) が、
- (a) 抗原を含む細胞を得ること、
 - (b) 細胞の細胞膜を破壊すること、および
 - (c) 工程 (b) の産物と樹状細胞またはその前駆体とを接触させること
- を含む、請求項76または請求項77記載の方法。

【請求項 79】

工程 (ii) の前に、ポリペプチドを発現する細胞について集団を濃縮する工程をさらに含む、請求項76~78のいずれか一項記載の方法。

【請求項 80】

- 樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を試料から濃縮する方法であって、
- (i) 樹状細胞またはその前駆体を含む試料を、請求項1~4、7~15または18のいずれか一項記載の化合物と接触させる工程、および
 - (ii) 該化合物へ結合された細胞を単離する工程
- を含む、方法。

【請求項 81】

- 樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を試料から濃縮する方法であって、
- (i) 以下を含むポリペプチド
 - (a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または
 - (b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列
- をコードする第2ポリヌクレオチドへハイブリダイズする検出可能に標識された第1ポリヌクレオチドと、樹状細胞またはその前駆体を含む試料とを接触させる工程、ならびに
- (ii) 検出可能に標識された細胞を単離する工程
- を含む、方法。

【請求項 82】

工程 (ii) から得られた細胞を対象へ投与する、請求項80または請求項81記載の方法。

【請求項 83】

癌、感染症、自己免疫疾患またはアレルギーより選択される疾患を治療および／または予防するために細胞を投与する、請求項82記載の方法。

【請求項 84】

試料中の樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法であって、

(i) 樹状細胞またはその前駆体を含む試料を、請求項1～4、7～15または18のいずれか一項記載の化合物と接触させる工程、および

(ii) 該化合物へ結合された細胞を検出する工程を含む、方法。

【請求項 85】

試料中の樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法であって、

(i) 以下を含むポリペプチド

(a) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

(b) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

をコードする第2ポリヌクレオチドへハイブリダイズする検出可能に標識された第1ポリヌクレオチドと、樹状細胞またはその前駆体を含む試料とを接触させる工程、ならびに

(ii) 検出可能に標識された細胞を検出する工程を含む、方法。

【請求項 86】

対象中における樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法であって、

(i) 請求項1～4、7～15または18のいずれか一項記載の化合物を対象へ投与する工程、

(ii) 該化合物へ結合された細胞を検出する工程を含む、方法。

【請求項 87】

化合物が検出可能に標識されている、請求項84または請求項86記載の方法。

【請求項 88】

対象中における樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法であって、

(i) 以下を含むポリペプチド

(a) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

(b) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

をコードする第2ポリヌクレオチドへハイブリダイズする検出可能に標識された第1ポリヌクレオチドを対象へ投与する工程、ならびに

(ii) 検出可能に標識された細胞を検出する工程を含む、方法。

【請求項 89】

樹状細胞が、マーカーであるCD8、CD24、Nec1-2、CD11c、HLADRおよびBDCA3のうちの1つまたは複数を発現する、請求項80～88のいずれか一項記載の方法。

【請求項 90】

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞または死細胞を検出する方法であって、

(i) 以下を含むポリペプチドに結合する化合物と細胞とを接触させる工程：

(a) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(b) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(c) (a) もしくは (b) の生物活性断片、ならびに

(ii) ポリペプチドへの化合物の結合が存在するかまたは存在しないかを判定する工程

を含み、

ここで、ポリペプチドへの化合物結合が、細胞が、破壊された細胞膜を有するか、病原体に感染しているか、死にかけているか、または死滅していることを示す、方法。

【請求項 9 1】

化合物がポリペプチドである、請求項1～21のいずれか一項記載の化合物をコードする単離されたおよび／または外因性ポリヌクレオチド。

【請求項 9 2】

対象の細胞内に存在する場合に、細胞内でのポリペプチドの活性のレベルを、ポリヌクレオチドを欠く細胞と比較して調節する単離されたポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが、

(i) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

(ii) SEQ ID NO: 48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

(iii) (i) もしくは (ii) の生物活性断片

を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 9 3】

請求項91～請求項92記載の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 9 4】

発現ベクターである、請求項93記載のベクター。

【請求項 9 5】

請求項91～請求項92記載の少なくとも1つのポリヌクレオチドおよび／または請求項93もしくは請求項94記載の少なくとも1つのベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 9 6】

細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、動物細胞または植物細胞である、請求項95記載の宿主細胞。

【請求項 9 7】

請求項80～83のいずれか一項記載の方法によって得られた、樹状細胞および／またはその前駆体の濃縮された集団。

【請求項 9 8】

請求項97記載の樹状細胞および／またはその前駆体の濃縮された集団を培養することによって得られた、拡大された樹状細胞集団および／またはその前駆体。

【請求項 9 9】

請求項91～請求項92記載のポリヌクレオチド、請求項93もしくは請求項94記載のベクター、請求項95もしくは請求項96記載の宿主細胞、および／または請求項97もしくは請求項98記載の細胞集団、ならびに薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 1 0 0】

請求項1～18のいずれか一項記載の化合物、請求項91～請求項92記載のポリヌクレオチド、請求項93もしくは請求項94記載のベクター、請求項95もしくは請求項96記載の宿主細胞、請求項97もしくは請求項98記載の細胞集団、および／または請求項19～21もしくは99のいずれか一項記載の組成物を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、Clec9Aとして公知の樹状細胞マーカーに結合するタンパク質の同定に関する。本発明は、樹状細胞へ抗原などの治療物質を標的化するための新規の化合物を提供する。さらに、抗原に対する体液性および／またはT細胞媒介性免疫応答を調節する方法、病的状態に関与するその樹状細胞への細胞傷害性物質の送達方法、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを調節する方法、および破壊された細胞膜を有

10

20

30

40

50

する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部に由来する物質に対する免疫応答、ならびに抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を調節する方法が提供される。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

樹状細胞生物学

樹状細胞 (DC) は、大抵の組織中において見られ、ここで、それらは、抗原性環境を絶えずサンプリングし、いくつかのタイプの受容体を使用して、侵入病原体をモニタリングしている。定常状態において、病原体の検出時は増加した速度で、非リンパ組織中のセンチネルDCは、リンパ組織へ遊走し、ここで、それらは、それらが収集およびプロセッシングしたAgをT細胞へ提示する。T細胞によって獲得される表現型は、DCがそのAgを提示する状況に依存する。Agが無害な自己成分である場合、DCは、種々の形態のT細胞不応答性 (寛容) を誘導し得る (Kenna et al., 2008)。しかし、Agが病原体、または損傷した自己に由来する場合、DCは、危険信号を受け取り、活性化状態になり、次いで、T細胞が、刺激され、防御免疫を提供するに必要なエフェクターとなる (Heath and Villadangos, 2005)。さらに、DCは、交戦中の特定の病原体に適合された異なる能力 (遊走性、サイトカイン分泌) を獲得するようにエフェクターT細胞に指示し得る。免疫を適合させるために必要とされる情報は、DCと病原体との相互作用によって決定され、分泌サイトカインまたは膜タンパク質を介してT細胞へDCによって伝達される。

【0003】

DC異質性

DCネットワークは、異なるDCサブタイプから構成されている (Shortman and Naik, 2007)。DCは、形質細胞様プレDC (pDC) および通常型DC (cDC) に大きく分類され得る。pDCは、刺激されると高レベルのIFN α を分泌し、活性化後に初めてDC形態となる (Hochrein et al., 2001; O'Keefe et al., 2002)。cDCは、即時DC形態およびAg提示機能を有し、「リンパ組織常在性」DCと、リンパを経由してリンパ節 (LN) に到達する古典的な「遊走性」DCとに分類され得る。マウスにおけるリンパ組織常在性DCは、さらに、CD8⁺およびCD8⁻サブセットへ分類され得る (Belz et al., 2004; Lahoud et al., 2006; Henri et al., 2001)。さらに、感染症または炎症の結果として、単球から炎症性DCが生じる (Shortman and Naik, 2007)。重要なことには、DCサブタイプは、多くの機能 (ナイーブT細胞を活性化するためのAgの取り込み、プロセッシングおよび提示) を共有するだけでなく、サブセット特異的な役割を示す。これらとしては、以下が挙げられる: Toll様受容体の差別的発現、特定のケモカインの産生、T細胞をTh1サイトカインプロファイルへ指定するCD8⁺ DCに主に限定される、IL-12分泌、および、CD8⁺ DCに主に限定される、MHC Iを介しての外因性Agの交差提示; これは、これらのDCがCD8⁺ T細胞へのウイルスAgの主な提示体となることを可能にし、それらが細胞傷害機能を発することを可能にする。

【0004】

ヒトは、これらのDCサブセットの等価物を含む可能性が非常に高く、何故ならば、同一の組織 (血液または胸腺) から抽出されたマウスおよびヒトDCが類似しているためである (Vandenabeele et al., 2001; O'Keefe et al., 2003)。しかし、種間でマーカーが相違していること (CD8 α はヒトDC上にはない) および詳細な分析のためにヒトリンパ器官を得ることは困難であることに起因して、大抵のマウスリンパ器官常在性DCサブセットのヒト等価物は、未知のままである。従って、マウスおよびヒトの間で保存されたDCサブセット特異的マーカーを定義することが、主な課題である。

【0005】

細胞死および免疫応答

アポトーシスは、発生の間、免疫系内で絶えず生じている。それは、細胞膜の巻き込み、核の凝縮、およびそれらの細胞内容物を依然として保持しているアポトーシス小体への細胞の断片化を特徴とし; これらは通常、細胞内容物の放出なしに「貪食細胞」によって

飲み込まれる。対照的に、損傷または感染の間に生じ得る壊死は、細胞膜破裂および細胞内容物放出を特徴とする。しかし、それらが迅速に飲み込まれない場合、細胞内容物はまた、アポトーシス細胞から放出され得る（二次壊死）。アポトーシス細胞の迅速なクリアランスは、自己Agに対する炎症応答を回避する免疫抑制環境を一般的に促進し、一方、壊死、またはアポトーシス細胞クリアランスの失敗は、自己Agに対する免疫応答を促進する（Hume, 2008; Nagata, 2007; Peng et al., 2007）。従って、アポトーシス細胞の早期認識は、自己免疫の予防および恒常性維持に必須である。

【0006】

死細胞／死にかけている細胞の認識

DCを含む貪食細胞は、死にかけている細胞における多くの分子変化を感知する。通常は細胞内にある分子は、アポトーシス細胞の細胞表面上に提示または分泌され得、または、細胞膜が破壊されると最終的に露出され得る。存在する分子は修飾され得、または、新しい分子がストレスに応答して産生され得る。このような分子の一例は、ホスフォチジルセリン（phosphatidylserine）（PS）であり、これは、アポトーシスプロセスの初期に細胞膜の内部から外部へトランスロケーションされる脂質であり、「イートミー（eat me）」シグナルとして役立つ。CD36、MFG-E8およびTim4を含む、貪食細胞上の多くの分子がPSの認識を媒介する。

【0007】

ストレスに応答して産生される分子の別の例は、熱ショックタンパク質またはストレスタンパク質（Hsp）であり、これらは、インタクトな細胞中においては分子シャペロンとして役立ち（Binder et al., 2004）、ストレスを受けた／死にかけている細胞からDCへシグナルを提供し得る（Delneste, 2004）。貪食細胞およびDC上の提案されるHsp受容体としては、CD91、Lox1/Clec8、CD40、TLR2、TLR4、CD36が挙げられる。さらに、Hsp-シャペロン処理ペプチドでの免疫化は非常に有効であり、pg量のタンパク質しか必要としない。

【0008】

DCによる死細胞の認識および取り込み

マクロファージおよびDCは両方とも、死細胞または死にかけている細胞を取り込むことができる。マクロファージ上のスカベンジャー受容体の多くは、DC上においても見られる。しかし、DCだけが、細胞成分をプロセッシングし、次いで、それらをナイーブT細胞へ効果的に提示しこれを活性化する能力を有する。さらなる病原体シグナルの非存在下でのDCによるアポトーシス細胞の取り込みは、一般的に寛容を誘導する（Steinman et al., 2000）一方、壊死細胞の取り込みは、DC成熟および免疫応答の刺激を誘導する（Sauter et al., 2000）。従って、DC上の受容体によるこれらの状態の差別的認識は、免疫系にとって非常に重要である。マウスCD8⁺ cDCは、アポトーシス／死細胞の取り込みと、T細胞への細胞結合されたウイルスAgの続いての提示、特にCD8 T細胞へのMHC I上での「交差提示」、との両方で、CD8⁺ DCよりも効率的である（Belz et al., 2004; Schnorrer et al., 2006; Belz et al., 2005; Iyoda et al., 2002）。ヒトpDCは、死にかけている細胞の取り込みで有効であると主張されている（Hoeffel et al., 2007）。従って、DCサブタイプによる死細胞取り込み受容体の選択的発現が重要な問題である。

【0009】

Clec9A

Clec9A（本発明者らによって5B6とも呼ばれる）は、C型レクチン様分子ファミリーの1つである。ヒトにおいて、Clec9A発現は、マウスCD8⁺樹状細胞のヒト等価物であるようである樹状細胞のサブセットに限定される。Clec9Aは、免疫応答を調節するために標的化され得る（Caminschi et al., 2008）。現在まで、Clec9AならびにClec9Aの可溶性形態に結合する抗体は、樹状細胞へ抗原を標的化するために有用であることがわかっていた。しかし、Clec9Aの天然のリガンドは、今まで同定されていなかった。

【発明の概要】

【0010】

10

20

30

40

50

発明の概要

本発明者らは、Clec9Aのリガンドを同定した。これらのリガンドは、樹状細胞などのClec9A発現細胞へ治療物質を標的化するために使用され得る。

【0011】

第1局面において、本発明は、治療物質へ結合されたポリペプチドを含む化合物であって、ポリペプチドが、

i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

iii) i) またはii) の生物活性断片

を含み、化合物のポリペプチドが、

a) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

b) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含む第2ポリペプチドに結合する、化合物を提供する。

【0012】

好適な治療物質の例としては、抗原、細胞傷害性物質、薬物および／または薬理学的物質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0013】

抗原は、動物における免疫応答を誘導する任意の分子であり得る。例としては、癌抗原、自己抗原、アレルゲン、および／または、病原性および／または感染性生物由来の抗原が挙げられるが、これらに限定されない。

【0014】

ある態様において、病原性および／または感染性生物由来の抗原は、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) または三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*) に由来し得るが、これらに限定されない。

【0015】

別の局面において、本発明は、検出可能な標識へ結合されたポリペプチドを含む化合物であって、ポリペプチドが、

i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

iii) i) またはii) の生物活性断片

を含み、化合物のポリペプチドが、

a) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

b) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

を含む第2ポリペプチドに結合する、化合物を提供する。

【0016】

別の局面において、本発明は、

i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

iii) i) またはii) の生物活性断片

を含むポリペプチドに結合する化合物を提供する。

【0017】

上記局面の好ましい態様において、化合物は、可溶性断片などのClec9Aに結合する、Clec9A、Clec9A自体またはClec9Aの断片に結合する抗体ではない。

【0018】

好ましい態様において、化合物はポリペプチドである。

【0019】

上記局面の別の好ましい態様において、化合物は、抗体またはその抗原結合性断片である。抗体またはその抗原結合性断片の例としては、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、または四重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0020】

さらに好ましい態様において、上記局面の化合物は治療物質へ結合されている。このような治療物質の例は、第1局面に関して上述されている。

【0021】

さらに好ましい態様において、上記局面の化合物は、検出可能に標識されている。

10

【0022】

さらなる局面において、本発明は、本発明の化合物および薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。

【0023】

ある態様において、組成物は、アジュバントをさらに含む。

【0024】

別の態様において、化合物は、リボソーム中に封入されているか、またはその表面上に露出されている。

【0025】

さらなる局面において、本発明は、本発明の化合物および／または本発明の組成物を対象へ投与する工程を含む、対象における免疫応答を調節する方法を提供する。

20

【0026】

ある態様において、抗原に対する免疫応答は、誘導および／または強化される。

【0027】

特に好ましい態様において、免疫応答は、ヘルパーT細胞応答を強化することによって調節される。

【0028】

さらに好ましい態様において、免疫応答は、CD4+および／またはCD8+ T細胞の活性化によって調節される。

【0029】

別の特に好ましい態様において、免疫応答は、B細胞抗体産生を強化することによって調節される。産生される抗体の例には、IgG1、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgE、および／またはIgD抗体アイソタイプが含まれるが、これらには必ずしも限定されない。

30

【0030】

さらに好ましい態様において、免疫応答は、記憶応答を生じさせることによって調節される。

【0031】

特に好ましい態様において、対象に、抗原を含む化合物を投与する。

【0032】

別の態様において、自己抗原またはアレルゲンに対する免疫応答を低下させる。この態様において、免疫応答は、T細胞応答および／またはB細胞抗体応答を抑制することによって調節されることが好ましい。

40

【0033】

別の局面において、本発明は、対象における抗原に対する免疫応答を調節する方法であって、樹状細胞またはその前駆体を本発明の化合物および／または本発明の組成物ヘインビトロで曝露する工程、ならびに該細胞を対象へ投与する工程を含む方法を提供する。

【0034】

ある態様において、細胞は対象から単離されている。

【0035】

50

好ましくは、体液性および／またはT細胞媒介性応答が調節される。

【0036】

さらなる態様において、ナイーブCD8+ T細胞の活性化、および／またはナイーブCD4+ T細胞の活性化が調節される。

【0037】

さらに別の態様において、体液性応答は、IgG1、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgE、および／またはIgD抗体アイソタイプの産生を含む。別の態様において、体液性応答は、IgG1抗体アイソタイプの産生を少なくとも含む。

【0038】

好ましくは、樹状細胞は、動物樹状細胞または動物樹状細胞の前駆体である。より好ましくは、樹状細胞はヒト樹状細胞である。なおより好ましくは、ヒト樹状細胞は、Nec1-2+、HLA DR+および／またはBDCA-3+である。

【0039】

さらに別の局面において、本発明は、本発明の化合物および／または本発明の組成物を対象に投与する工程を含む、樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防する方法を提供する。

【0040】

好ましくは、方法は、細胞傷害性物質、薬物および／または薬理学的物質を含む化合物を投与する工程を含む。

【0041】

さらなる局面において、本発明は、樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防する方法であって、対象の細胞内に存在する場合に、

i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含むポリペプチドの細胞内での活性のレベルを、該ポリヌクレオチドを欠く細胞と比較して調節する、単離されたポリヌクレオチドおよび／または該ポリヌクレオチドをコードする構築物を対象へ投与する工程を含む、方法を提供する。

【0042】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、細胞内でのポリペプチドの活性のレベルを下方制御する。このようなポリヌクレオチドの例としては、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒性ポリヌクレオチド、マイクロRNA、および二本鎖RNAが挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

代替の態様において、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドの活性のレベルを上方制御する。例えば、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。

【0044】

樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患の例としては、癌、感染症、自己免疫疾患またはアレルギーが挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

ある態様において、自己免疫疾患はエリテマトーデスである。

【0046】

別の態様において、感染症は、プラスモジウム種、例えば、熱帯熱マラリア原虫または三日熱マラリア原虫感染症である。

【0047】

別の局面において、本発明は、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを調節する方法であって、

i) 以下を含むポリペプチド

10

20

30

40

50

- a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；
 - b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または
 - c) a) またはb) の生物活性断片
 - ii) 本発明の化合物、および／または
 - iii) 本発明の組成物
- を投与する工程を含む方法を提供する。

【0048】

別の局面において、本発明は、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を調節する方法であって、

10

- i) 以下を含むポリペプチド
 - a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；
 - b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または
 - c) a) またはb) の生物活性断片
 - ii) 本発明の化合物、および／または
 - iii) 本発明の組成物
- を投与する工程を含む方法を提供する。

20

【0049】

さらなる局面において、本発明は、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質に対する免疫応答を調節する方法であって、

- i) 以下を含むポリペプチド
 - a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；
 - b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または
 - c) a) またはb) の生物活性断片
 - ii) 本発明の化合物、および／または
 - iii) 本発明の組成物
- を投与する工程を含む方法を提供する。

30

【0050】

さらなる局面において、本発明は、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを調節する方法であって、以下を含むポリペプチド：

- i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；
 - ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または
 - iii) i) またはii) の生物活性断片
- の産生を調節する化合物を投与する工程を含む方法を提供する。

40

【0051】

別の局面において、本発明は、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を調節する方法であって、以下を含むポリペプチド：

- i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；
- ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または
- iii) i) またはii) の生物活性断片

50

の産生を調節する化合物を投与する工程を含む方法を提供する。

【0052】

さらなる局面において、本発明は、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の免疫応答を調節する方法であって、以下を含むポリペプチド：

i) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

iii) i) またはii) の生物活性断片

の産生を調節する化合物を投与する工程を含む方法を提供する。

【0053】

好ましくは、前述の3つの局面の化合物は、ポリヌクレオチドである。好ましくは、ポリヌクレオチドは、動物の細胞内でのポリヌクレオチドの発現を導くことができるプロモーターと機能的に連結されている。

【0054】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする遺伝子からのmRNAレベルを下方制御する。例としては、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒性ポリヌクレオチド、マイクロRNA、および二本鎖RNAが挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

一態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO：81～113に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数を含むポリヌクレオチドへ生理的条件下でハイブリダイズするアンチセンスポリヌクレオチドである。

【0056】

別の態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO：81～113に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数を含むポリヌクレオチドを切断することができる触媒性ポリヌクレオチドである。

【0057】

さらなる態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO：81～113に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数のうち少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含む二本鎖RNA (dsRNA) 分子であり、ここで、二本鎖である分子の部分は、少なくとも19塩基対の長さであり、かつ該オリゴヌクレオチドを含む。ある態様において、ポリヌクレオチドは、単一のプロモーターから発現され、ここで、二本鎖部分の鎖が、一本鎖部分によって連結されている。

【0058】

代替的な態様において、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする遺伝子からのmRNAレベルを上方制御する。

【0059】

一態様において、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを増加させる。代替の態様において、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを減少させる。

【0060】

別の態様において、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞、もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を増加させる。代替の態様において、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび

10

20

30

40

50

／または提示を減少させる。

【0061】

別の態様において、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質に対する免疫応答を増加させる。代替の態様において、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質に対する免疫応答を減少させる。

【0062】

さらに好ましい態様において、対象は、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部に関連する疾患に苦しんでいる。このような疾患の例としては、移植片対宿主病（GVHD）、自己免疫疾患、感染症、神経変性疾患、全身性炎症反応症候群（SIRS）、癌および損傷が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0063】

さらに、対象中における免疫応答を調節するための医薬の製造のための、本発明の化合物および／または本発明の組成物の使用が提供される。

【0064】

さらに、対象中における抗原に対する免疫応答を調節するための医薬の製造のための、本発明の化合物および／または本発明の組成物へインビトロで曝露された樹状細胞またはその前駆体の使用が提供される。

20

【0065】

さらに、対象中における樹状細胞またはその前駆体が関与する疾患を治療および／または予防するための医薬の製造のための、本発明の化合物および／または本発明の組成物の使用が提供される。

【0066】

別の局面において、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを調節するための医薬の製造のための、

i) 以下を含むポリペプチド

a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

30

b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

c) a) またはb) の生物活性断片

ii) 本発明の化合物、および／または

iii) 本発明の組成物

の使用が提供される。

【0067】

別の局面において、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を調節するための医薬の製造のための、

40

i) 以下を含むポリペプチド

a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

c) a) またはb) の生物活性断片

ii) 本発明の化合物、および／または

iii) 本発明の組成物

の使用が提供される。

【0068】

50

別の局面において、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質に対する免疫応答を調節するための医薬の製造のための、

i) 以下を含むポリペプチド

a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

c) a) またはb) の生物活性断片

ii) 本発明の化合物、および／または

iii) 本発明の組成物

の使用が提供される。

10

【0069】

別の局面において、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部の取り込みおよび／またはクリアランスを調節するための医薬の製造のための、以下を含むポリペプチド：

i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

iii) i) またはii) の生物活性断片

の産生を調節する化合物の使用が提供される。

20

【0070】

別の局面において、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質の抗原認識、プロセッシングおよび／または提示を調節するための医薬の製造のための、以下を含むポリペプチド：

i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

iii) i) またはii) の生物活性断片

の産生を調節する化合物の使用が提供される。

30

【0071】

別の局面において、対象中における、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部、または周囲細胞に由来する物質に対する免疫応答を調節するための医薬の製造のための、以下を含むポリペプチド：

i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

iii) i) またはii) の生物活性断片

の産生を調節する化合物の使用が提供される。

40

【0072】

さらなる局面において、本発明は、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞に関連する疾患の状態を診断、予後診断および／またはモニタリングする方法であって、

i) 以下を含むポリペプチドのリガンドに結合する化合物と細胞とを接触させる工程：

a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；ならびに／または

c) a) またはb) の生物活性断片、ならびに

ii) リガンドが存在するかまたは存在しないかを判定する工程

50

を含み、

ここで、リガンドの存在が、疾患の診断、予後および／または状態を提供する、方法を提供する。

【0073】

上記局面の好ましい態様において、化合物は、可溶性断片などのClec9Aに結合する、Clec9A、Clec9A自体またはClec9Aの断片に結合する抗体ではない。

【0074】

ある態様において、化合物は、抗体またはその抗原結合性断片である。例としては、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、または四重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0075】

好ましい態様において、化合物は検出可能に標識されている。

【0076】

ある態様において、方法は、対象に対してインビボで行われる。代替の態様において、方法は、対象から得られた試料に対してインビトロで行われる。

【0077】

上述したように、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞に関連する疾患の例としては、移植片対宿主病（GVHD）、自己免疫疾患、感染症、神経変性疾患、全身性炎症反応症候群（SIRS）、癌および損傷が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0078】

さらなる局面において、本発明は、細胞死滅に関して療法の有効性をモニタリングする方法であって、

i) 細胞を療法へ曝露する工程、および

ii) 本発明の方法を使用して、破壊された細胞膜を有する細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部を検出する工程、を含み、

破壊された細胞膜を有する細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞の存在は、この療法が有効であることを示す、方法を提供する。

【0079】

30

ある態様において、工程i)における細胞はインビボである。代替の態様において、工程i)における細胞はインビトロである。

【0080】

好ましくは、療法が対象へ与えられる。ある態様において、対象は、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞に関連する疾患に苦しんでいる。好ましい態様において、対象は癌または感染症を有する。

【0081】

さらなる態様において、工程ii)は、対象から得られた試料に対して行われる。

【0082】

療法は、任意のタイプの処置であり得る。例としては、薬物療法または放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0083】

さらなる局面において、本発明は、初期アポトーシス細胞と、後期アポトーシス細胞、壊死細胞または死細胞とを識別する方法であって、

i) 以下のものに結合する化合物と細胞とを接触させる工程：

a) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

b) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；ならびに／または

c) a) またはb) の生物活性断片、ならびに

ii) ポリペプチドへの化合物の結合が存在するかまたは存在しないかを判定する工程

50

を含み、

ここで、ポリペプチドへの化合物の結合が、細胞が後期アポトーシス細胞、壊死細胞または死細胞であることを示す、方法を提供する。

【0084】

上記局面の好ましい態様において、化合物は、可溶性断片などのClec9Aに結合する、Clec9A、Clec9A自体またはClec9Aの断片に結合する抗体ではない。

【0085】

別の局面において、本発明は、対象中における抗原に対する免疫応答を調節する方法であって、

i) 樹状細胞またはその前駆体の集団を得る工程、

10

ii) 以下を含むポリペプチドの産生および／または活性を調節する工程：

a) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

b) SEQ ID NO：48～80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；ならびに／または

c) a) またはb) の生物活性断片、

iii) 樹状細胞またはその前駆体と抗原とを接触させる工程、ならびに

iv) 樹状細胞またはその前駆体を対象へ投与する工程

を含む方法を提供する。

【0086】

上記局面の好ましい態様において、ポリペプチドの活性は、可溶性断片などのClec9Aに結合する、Clec9A、Clec9A自体またはClec9Aの断片に結合する抗体によって調節されない。

20

【0087】

好ましい態様において、工程iii) は、樹状細胞またはその前駆体と、前記抗原を含む、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞、死細胞、および／またはそれらの一部とを接触させることを含む。

【0088】

さらなる態様において、工程iii) は、

a) 抗原を含む細胞を得ること、

b) 細胞の細胞膜を破壊すること、および

30

c) 工程b) の産物と樹状細胞またはその前駆体とを接触させること

を含む。

【0089】

別の態様において、本方法はさらに、工程ii) の前に、ポリペプチドを発現する細胞について集団を濃縮する工程を含む。

【0090】

ある態様において、工程ii) およびiii) は同時に行われる。

【0091】

ある態様において、破壊された細胞膜を有する細胞、死にかけている細胞または死細胞は、癌細胞である。

40

【0092】

別の態様において、ポリペプチドの産生および／または活性を増加させる。代替の態様において、ポリペプチドの産生および／または活性を減少させる。

【0093】

ある態様において、前駆体は単球である。

【0094】

好ましくは、抗原に対する免疫応答を増加させる。

【0095】

別の局面において、本発明は、樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を試料から濃縮する方法であって、

50

- i) 樹状細胞またはその前駆体を含む試料を本発明の化合物と接触させる工程、および
 - ii) 該化合物へ結合された細胞を単離する工程
- を含む方法を提供する。

【0096】

さらなる局面において、本発明は、樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を試料から濃縮する方法であって、

- i) 以下を含むポリペプチド

- a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

- b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

をコードする第2ポリヌクレオチドへハイブリダイズする検出可能に標識された第1ポリヌクレオチドと、樹状細胞またはその前駆体を含む試料とを接触させる工程、ならびに

- ii) 検出可能に標識された細胞を単離する工程
- を含む方法を提供する。

【0097】

好ましい態様において、2つの上記方法の工程ii) から得られた細胞を対象へ投与する。ある態様において、癌、感染症、自己免疫疾患またはアレルギーより選択される疾患を治療および／または予防するために細胞を投与する。

【0098】

本発明はまた、試料中の樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法であって、

- i) 樹状細胞またはその前駆体を含む試料を本発明の化合物と接触させる工程、および
- ii) 該化合物へ結合された細胞を検出する工程

を含む方法を提供する。

【0099】

なお別の局面において、本発明は、試料中の樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法であって、

- i) 以下を含むポリペプチド

- a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

- b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列

をコードする第2ポリヌクレオチドへハイブリダイズする検出可能に標識された第1ポリヌクレオチドと、樹状細胞またはその前駆体を含む試料とを接触させる工程、ならびに

- ii) 検出可能に標識された細胞を検出する工程
- を含む方法を提供する。

【0100】

別の局面において、本発明は、対象中における樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法であって、

- i) 本発明の化合物を対象へ投与する工程、
- ii) 該化合物へ結合された細胞を検出する工程

を含む方法を提供する。

【0101】

ある態様において、化合物は、検出可能に標識されている。しかし、当業者が認識するように、例えば、化合物に結合する検出可能に標識された二次抗体の使用などの、他の手順も用いられ得る。

【0102】

さらに別の局面において、本発明は、対象中における樹状細胞またはそのサブセットもしくは前駆体を検出する方法であって、

- i) 以下を含むポリペプチド

- a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；および／または

10

20

30

40

50

b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列をコードする第2ポリヌクレオチドへハイブリダイズする検出可能に標識された第1ポリヌクレオチドを対象へ投与する工程、ならびに

ii) 検出可能に標識された細胞を検出する工程を含む方法を提供する。

【0103】

好ましい態様において、樹状細胞は、マーカーであるCD8、CD24、Nec1-2、CD11c、HLADRおよびBDCA3のうちの1つまたは複数を発現する。

【0104】

好ましくは、樹状細胞は、マーカーであるNec1-2、HLADRおよびBDCA3のうちの1つまたは複数を発現するヒト樹状細胞である。

【0105】

代替の態様において、樹状細胞は、マーカーであるCD24、Nec1-2、CD11cおよびCD8のうちの1つまたは複数を発現するマウス樹状細胞である。

【0106】

好ましくは、前駆体樹状細胞は、培養下でおよび／または照射を受けたレシピエントへの移入後に樹状細胞に分化することができる、中期または後期前駆体樹状細胞である。

【0107】

別の局面において、本発明は、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞または死細胞を検出する方法であって、

i) 以下を含むポリペプチドに結合する化合物と細胞とを接触させる工程：

a) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

b) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；および／または

c) a) またはb) の生物活性断片、ならびに

ii) ポリペプチドへの化合物の結合が存在するかまたは存在しないかを判定する工程を含み、

ここで、ポリペプチドへの化合物結合が、細胞が、破壊された細胞膜を有するか、病原体に感染しているか、死にかけているか、または死滅していることを示す、方法を提供する。

【0108】

上記局面の好ましい態様において、化合物は、可溶性断片などのClec9Aに結合する、Clec9A、Clec9A自体またはClec9Aの断片に結合する抗体ではない。

【0109】

さらに、化合物がポリペプチドである、本発明の化合物をコードする単離されたおよび／または外因性ポリヌクレオチドが提供される。

【0110】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、以下を含む：

i) SEQ ID NO: 81~113のいずれか1つに提示されたヌクレオチド配列；

ii) SEQ ID NO: 81~113のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なヌクレオチド配列；および／または

iii) i) および／もしくはii)、またはその相補体へハイブリダイズするヌクレオチド配列。

【0111】

別の局面において、本発明は、対象の細胞内に存在する場合に、細胞内でのポリペプチドの活性のレベルを、該ポリヌクレオチドを欠く細胞と比較して調節する単離されたポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが、

i) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 48~80のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列；および／または

iii) i) もしくはii) の生物活性断片を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0112】

ある態様において、ポリヌクレオチドは、動物の細胞内でのポリヌクレオチドの発現を指示することができるプロモーターへ機能的に連結されている。

【0113】

好ましい態様において、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする遺伝子からのmRNAレベルを下方制御する。このようなポリヌクレオチドの例としては、アンチセンスポリヌクレオチド、センスポリヌクレオチド、触媒性ポリヌクレオチド、マイクロRNAおよび二本鎖RNA (dsRNA) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0114】

ある態様において、アンチセンスポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 81~113に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数を含むポリヌクレオチドへ生理学的条件下でハイブリダイズする。

【0115】

別の態様において、触媒性ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 81~113に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数を含むポリヌクレオチドを切断することができる。

【0116】

ある態様において、dsRNA分子は、SEQ ID NO: 81~113に提示されたヌクレオチドの配列のいずれか1つまたは複数のうち少なくとも19個の連続したヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを含み、ここで、TはUで置き換えられ、二本鎖である該分子の部分は、少なくとも19塩基対の長さでありかつ該オリゴヌクレオチドを含む。

20

【0117】

なおさらなる態様において、dsRNA分子は単一のプロモーターから発現され、ここで、二本鎖部分の鎖は一本鎖部分によって連結されている。

【0118】

代替の態様において、ポリヌクレオチドは、ポリペプチドをコードする遺伝子からのmRNAレベルを上方制御する。例えば、ポリヌクレオチドはポリペプチドをコードする。

30

【0119】

また、本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。好ましくは、ベクターは発現ベクターである。

【0120】

さらなる局面において、本発明は、本発明の少なくとも1つのポリヌクレオチドおよび／または本発明の少なくとも1つのベクターを含む宿主細胞を提供する。細胞は、これらに限定されないが、細菌細胞、酵母細胞、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞などの任意の細胞タイプであり得る。

【0121】

さらに、本発明の少なくとも1つの細胞を含む、トランスジェニック植物などの、トランスジェニック非ヒト生物が提供される。

40

【0122】

さらなる局面において、本発明は、本発明の方法によって得られた、樹状細胞および／またはその前駆体の濃縮された集団を提供する。

【0123】

別の局面において、本発明は、本発明の樹状細胞および／またはその前駆体の濃縮された集団を培養することによって得られた、拡大された樹状細胞集団および／またはその前駆体を提供する。

【0124】

さらなる局面において、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主

50

細胞、および／または本発明の細胞集団、ならびに薬学的に許容される担体を含む組成物が提供される。

【0125】

さらなる局面において、本発明の化合物、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の細胞集団、および／または本発明の組成物を含むキットが提供される。

【0126】

明らかであるように、本発明の1つの局面の好ましい特徴および特性は、本発明の多くの他の局面にも適用可能である。

【0127】

本明細書の全体を通じて、「含む (comprise)」という用語、または「含む (comprise s)」もしくは「含む (comprising)」などの変形物は、記載された要素、整数もしくは段階、または要素群、整数群もしくは段階群は含まれるものの、他の任意の要素、整数もしくは段階、または要素群、整数群もしくは段階群も排除しないことを意味すると解釈される。

【0128】

以下では、本発明を、以下の非限定的な実施例により、さらには添付の図面を参照しながら説明する。

【図面の簡単な説明】

【0129】

【図1】 マウス (m) およびヒト (h) の5B6遺伝子のゲノム構造、およびそれらによってコードされる予想されるタンパク質構造。(A) マウス5B6および (B) ヒト5B6をコードする完全長cDNA。(C) マウス5B6およびヒト5B6によってコードされる予想されるタンパク質配列のタンパク質配列アラインメント。配列同一性は濃いグレーで強調され、類似性は薄いグレーで示されている。矢尻はエクソン境界を表している。(D) C57BL/6Jマウスのゲノム配列データベース (UCSCアセンブリ 2006年2月) およびヒトデータベース (UCSCアセンブリ 2006年3月) のそれぞれに対するcDNAのアラインメントによって決定されたマウス5B6およびヒト5B6の遺伝子構造を模式的に表している。5B6遺伝子のコード領域をコードするエクソンは黒のボックスによって表され、エクソンおよびイントロンのサイズ (bp) が下に示されている。(E) マウス5B6およびヒト5B6のタンパク質の概略図。

【図2】 マウス5B6およびヒト5B6のCTLD (Clec9A) と、配列相同性を有するタンパク質とのアラインメント。ラットマンノース結合タンパク質A (MBP-A) を、機能的糖質認識ドメインを有する古典的C型レクチンドメインとして比較のために含めている。グレーのボックスは保存された残基を指し示し、(+) はタンパク質ホモ二量体化に参与するシステイン残基の別の対を指し示している。(*) は、ジスルフィド結合を形成する保存されたシステイン残基を表示している。MBP-A中のCa²⁺を連結させる残基は1および2と命名されている。

【図3】 マウス5B6の遺伝子発現プロファイル。リアルタイムRT-PCRを用いて、(A) 脾臓cDCサブセット; DN、CD4⁺およびCD8⁺、胸腺cDCサブセット; CD8⁻およびCD8⁺、LN cDCサブセット; CD8⁻、CD8⁺、皮膚およびランゲルハンス細胞 (LC) ならびに胸腺および脾臓pDCを含むリンパ器官定常状態DCにおけるGapdhを基準として、5B6遺伝子の発現プロファイルを調べた。(B) 胸腺細胞 (thym)、リンパ節 (LN) BおよびT細胞、脾臓 (spl) BおよびT細胞、NK細胞、未熟マクロファージ (im mac)、成熟マクロファージ (mat mac)、脾臓pDCおよびcDCを含む造血細胞。(C) 定常状態 (安静時) マウスから、ならびにLPSおよびCpGによるインビボ活性化から3時間後に単離した脾臓cDC。

【図4】 DCおよび他の造血細胞上でのm5B6 (Clec9A) タンパク質の表面発現。(A) DCを精製して、4色免疫蛍光染色によって表面標識した。DCを、CD11c (N418-PeCy7)、CD45RA (14.8-APC)、CD8 (53-6.7-APC-Cy7) およびm5B6 (10B4-ビオチン) に対するmAbで染色した。脾臓DCはCD4 (GK1.5-FITC) でも染色し、胸腺DCはSirpα (p84-FITC) でも、皮下LN DCはCD205 (NLDC-145-FITC) でも染色した。以前に記載された通りに³¹、脾臓cDCはCD4

10

20

30

40

50

^{+}cDC ($CD11^{hi}CD45RA^{-}CD4^{+}CD8^{-}$)、 $DN\ cDC$ ($CD11^{hi}CD45RA^{-}CD4^{-}CD8^{-}$) および $CD8^{+}cDC$ ($CD11^{hi}CD45RA^{-}CD8^{+}CD4^{-}$) に分けた。胸腺 cDC は $CD8^{-}cDC$ ($Sirp\alpha^{hi}CD8^{lo}$) および $CD8^{+}cDC$ ($Sirp\alpha^{lo}CD8^{+}$) に分けた。LN cDC は $CD8^{-}cDC$ ($CD11c^{+}CD205^{-}CD8^{-}$)、皮膚 cDC ($CD11c^{+}CD205^{int}CD8^{-}$)、ランゲルハンス細胞 ($CD11c^{+}CD205^{hi}CD8^{-}$) および $CD8^{+}cDC$ ($CD11c^{+}CD205^{hi}CD8^{+}$) に分けた。pDC は $CD11c^{int}CD45RA^{+}$ として同定した。脾細胞は、 $CD3$ (KT3-1.1-FITC)、 $CD19$ (1D3-PeCy7)、 $NK1.1$ (PK136-PeCy7)、 $CD49b$ (Hm α 2-APC) に対する mAb で染色して、B細胞 ($CD19^{+}CD3^{-}$)、T細胞 ($CD19^{-}CD3^{+}$) および NK細胞 ($NK1.1^{+}CD49b^{+}CD3^{-}$) を同定した。脾臓マクロファージは材料および方法の項で指示した通りに濃縮し、 $CD11b$ (M1/70-Cy5) および $F4/80$ -FITC で染色して $CD11b^{hi}F4/80^{+}$ として同定した。骨髓細胞および脾細胞は $CD11b$ (M1/70-Cy5) および $Ly6C$ (5075-3.6-FITC) に対する mAb で染色し、単球は側方散乱 $^{lo}Ly6C^{hi}CD11b^{hi}$ として定義された。骨髓マクロファージは $Ly6C^{int}CD11b^{hi}$ であった。細胞集団を SA-PE で対比染色し、m5B6 発現に関して分析した。実線はゲーティングを行った細胞上での m5B6 染色を表し、点線はアイソタイプを一致させた対照によるゲーティングを行った細胞の染色を表している。(B) 脾臓 DC の濃縮された調製物を m5B6 (10B4-ビオチン)、 $CD11c$ (N418-Quantum dot 655)、 $CD8\alpha$ (YTS-169-PerCPy5.5 および $CD24$ (M1/69-Alexa 633) に対する mAb ならびに 120G8-FITC で染色し、続いて SA-PE で対比染色した。pDC ($CD11c^{int}120G8^{+}$) および cDC ($CD11c^{hi}120G8^{-}$) を m5B6 の発現に関して分析した。cDC 上で、m5B6 発現は $CD8a$ および $CD24$ の発現と相関した。ほとんどの脾臓 pDC が m5B6 を発現した。(C) 血液 DC の濃縮された調製物を、同じ mAb を用いて脾臓 DC (B) と並行して染色し、同一のゲーティング戦略を用いて分析した。血液 DC は $CD8\alpha$ を発現しなかったが、 $CD24$ を発現した。脾臓 DC と同様に、 $CD24$ を発現する血液 DC は 5B6 を共発現し、血液由来の pDC は、それらの脾臓対応物と同じように、m5B6 を発現した。

10

20

30

【図 5】ヒトおよびマカクザルの DC および造血細胞上での 5B6 の発現。(A) ヒトおよびマカクザルの末梢血単核細胞 (PBMC) を単離して、HLADR、BDCA3、5B6 に対する mAb、ならびに PE を結合させた $CD3$ (T細胞)、 $CD14$ (単球)、 $CD19$ (B細胞) および $CD56$ (ナチュラルキラー細胞) を含む系列カクテル (Lineage cocktail) で表面免疫蛍光標識した。血液 DC を $HLADR^{+}$ 系列 (PE) $^{-}$ としてゲーティングし、それらの 5B6 (ヒトおよびマカクザル) および BDCA3 (ヒト) の発現をさらに分析した。(B) ヒト PBMC を、必要な表面マーカーおよび 5B6 に対する mAb で表面免疫蛍光標識した。単球 ($CD14^{+}$)、NK細胞 ($NKp46^{+}$)、T細胞 ($CD3^{+}$) および B細胞 ($CD19^{+}$) をゲーティングし、それらの 5B6 の発現に関して分析した (実線)。点線は、アイソタイプを一致させた対照によるゲーティングを行った細胞の染色を表している。

【図 6】可溶性 5B6 の、一過性にトランスフェクトされた 293T 細胞上の膜結合型 5B6 との結合。293T 細胞に対して、完全長の非タグ付加 m5B6 (283T-m5B6)、h5B6 (293T-h5B6) または非 DNA (293T) をコードする発現構築物を一過性にトランスフェクトした。2日後に細胞を収集し、可溶性 FLAG タグ付加 m5B6、h5B6、および Cire を用いて表面免疫蛍光し、結合をビオチン化抗 Flag mAb 9H10 およびストレプトアビジン PE を用いて検出した。生細胞を前方散乱およびヨウ化プロピジウム排除に対してゲーティングし、抗 Flag Ab およびストレプトアビジン-PE (点線) による対照染色を基準として、それらの可溶性 5B6 (実線) の表面結合に関して分析した。

40

【図 7】Clec9A の可溶性組換え外部ドメインの作製。(A) 内因性および組換え可溶性 mClec9A タンパク質の略図。内因性タンパク質は、Clec9A 細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン (TM) および細胞質ドメイン (cyto) を含む。2つの形態の組換え可溶性 mClec9A タンパク質を作製した：全長 Clec9A 外部ドメイン、FLAG タグおよびビオチン化コンセンサス配列からなる mClec9A-ecto (予想分子量 約 27kDa)；ならびに Clec9A-CTLD、FLAG タグおよびビオチン化コンセンサス配列からなる mClec9A-CTLD (予想分子量 約 19.7 kDa)。(B) 内因性 mClec9A 発現のウェスタンブロット分析。骨髓を Flt3L と共に培養して DC を作製し (Naik et al., 2005)、DC 溶解物を、非還元 (N) および還元 (R) 条件下で電気泳動させた。抗 mClec9A Ab (24/04-10B4) を使用して、ブロットをハイブリダイズさせ、HRP 結合抗ラット Ig および Enhanced Chemiluminescence-Plus (Amersham) を使用して、結合を検出した。m

50

Clec9Aが非還元条件下で二量体として移動するのが観察された。(C) ビオチン化組換え可溶性mClec9Aタンパク質のウェスタンブロット分析。ビオチン化mClec9A-ectoおよびmClec9A-CTLDを、非還元(N)および還元(R)条件下で電気泳動させ、SA-HRPおよびEnhanced Chemiluminescence (Amersham) を使用して、タンパク質を検出した。内因性mClec9Aと同様に、組換えmClec9A-ectoが、非還元条件下で二量体として、還元条件下で単量体として移動するのが観察され、一方、mClec9A-CTLDは、全ての条件下で単量体として移動した(B, C)。

【図8】死細胞へのClec9A外部ドメインの結合。(A) 胸腺細胞に γ 照射し(5Gy)、次いで、10%FCSを含有するRPMI-1640中において37°Cで4時間または16時間培養し、アポトーシス死の進行を追跡した。試料をビオチン化mClec9A-ecto(実線)、またはバックグラウンド対照としてのビオチン化Cire-ecto(破線)と共にインキュベートし、SA-PEを使用して結合を検出した。胸腺細胞を、アネキシンV-FITCで染色し、フローサイトメトリーによって分析し、Clec9A結合の分析のためにアネキシンV⁻(生存)細胞またはアネキシンV⁺(アポトーシス)としてゲーティングした。4時間でアネキシンV⁺細胞の41%がPI⁺であり; 16時間でアネキシンV⁺細胞の90%がPI⁺であった。ビオチン化Cire-ectoを使用して観察されたバックグラウンドは、第2段階試薬のみで観察されたものと類似していた。(B) Mcl-1を不活性化するためのNoxaを過剰発現するMEF(van Delft et al., 2006)を、約80%コンフルエンスまで増殖させ、次いで、16時間2.5 μ M ABT-737で処理することによってアポトーシスを受けるように誘導した。対照未処理MEF(生存)およびABT-737処理MEF(後期アポトーシス)を採取し、mClec9A-ecto(実線)、hCLEC9A-ecto(実線)、またはCire-ecto(バックグラウンド対照、破線)と共にインキュベートした。ビオチン化抗FLAG mAb、SA-PEおよびフローサイトメトリーを使用して、結合を検出した。標準前方散乱(FSC)およびPI排除(PI⁻)に基づいて、未処理MEFの90%が生存しており、一方、減少したFSCおよび陽性PI染色に基づいて、ABT-737処理MEFの95%が死滅していた。(C) 対照未処理MEF(生存)およびABT-737処理MEF(2.5 μ M ABT-737、16時間; 後期アポトーシス)を、PBSのみの中において、またはDNアーゼI、RNアーゼA、プロテアーゼKもしくはトリプシンの存在下において、インキュベートした。細胞を広範に洗浄し、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼを除去し、次いで、ビオチン化mClec9A-ecto(実線)、または対照としてのビオチン化Cire-ecto(破線)と共にインキュベートした。SA-PEおよびフローサイトメトリーを使用して、結合を検出した。標準FSCおよびPI排除に基づいて、未処理MEFの80%が生存しており、一方、減少したFSCおよび陽性PI染色に基づいて、ABT-737処理MEFの97%が死滅していた。

【図9】Clec9A結合は、CTLDによって媒介され、多様な種によって発現されるタンパク質に対して向けられる。(A) 生存または凍結・解凍マウス線維芽細胞(3T3細胞株)を、ビオチン化mClec9AまたはhCLEC9A外部ドメインまたはCTLD(実線)と共に、またはビオチン化対照(Cire-ecto、破線)と共に、インキュベートした。(B) ヒト293T細胞を凍結・解凍し、次いで、5mM EDTA(実線)の非存在または存在下においてビオチン化mClec9A-ecto、hCLEC9A-ecto(実線)またはCire(破線)と共にインキュベートした。(C) マウス3T3細胞、昆虫SF21細胞、細菌JM109細胞、および酵母(ピキア・パストリス(Pichia pastoris))細胞を、2回凍結・解凍し、次いで、ビオチン化mClec9A-ecto(実線)、またはビオチン化対照(Cire-ecto、破線)と共にインキュベートした。(A)~(C)における結合を、SA-PEおよびフローサイトメトリーを使用して検出した。

【図10】赤血球膜の細胞骨格成分へのClec9Aの結合。(A) 生存RBCまたはRBC膜(サポニンゴースト)を、ビオチン化mClec9A-ecto、mClec9A-CTLD(実線)と共に、またはビオチン化コントロールタンパク質mClec12A(実線)またはCire(点線)と共にインキュベートした。(B) RBC膜(サポニンゴースト)を、スペクトリン除去バッファの非存在(太い実線)または存在(細い実線)下で処理し、その後、ビオチン化mClec9A-ecto、mClec9A-CTLD(実線)と共に、またはビオチン化コントロールタンパク質Cire(点線)と共にインキュベートした。(A)~(B)における結合を、SA-PEおよびフローサイトメトリーを使用して検出した。

【図 1 1】Clec9Aは精製スペクトリンへ結合する。ELISAプレートにスペクトリンまたはアクチンタンパク質（10 µg/ml）でコーティングし、次いで、段階的濃度の精製ビオチン化Clec9A-ecto、Clec9A-CTLDまたはコントロールタンパク質Cireでプローブした。結合されたタンパク質を、SA-HRPを使用して検出し、ABTSを使用して視覚化した。3つの実験の累積データを示す。Clec9A-ectoは、Clec9A-CTLDよりも効率的にスペクトリンに結合した。Clec9A-ectoもClec9A-CTLDもアクチンへ結合しなかった。コントロールタンパク質Cireは、スペクトリンにもアクチンにも結合しなかった。

【図 1 2】可溶性mClec9Aは、CD8⁺ DCによる死細胞の取り込みをブロックしない。（A）脾臓cDC上におけるClec9Aの表面発現。DCを、ラットIgおよび抗FcR mAb（2.4G2）を使用してブロックし、CD11c（N418-PE-Cy7）、CD45RA（14.8-APC）、CD8（53-6.7-APC-Cy7）、CD172a（p84-FITC）、およびClec9A（24/04-10B4-ビオチン）またはアイソタイプ対照ビオチン（IgG2a-κ；BD Pharmingen）のいずれかに対するmAbを使用して表面標識し、次いで、SA-PEで対比染色し、フローサイトメトリーによって分析した。脾臓cDCを、CD11c^{hi} CD45RA⁻ CD172a^{hi} CD8⁻（CD8⁻）としてまたはCD11c^{hi} CD45RA⁻ CD172a^{lo} CD8⁺（CD8⁺）としてゲーティングし、Clec9Aのそれらの表面発現について分析した。実線は、ゲーティングされた細胞上におけるmClec9A染色を示し、点線は、アイソタイプ適合対照を使用し、ゲーティングされた細胞の染色を示す。（B）脾臓cDCによる死細胞の貪食作用取り込み。脾細胞を凍結・解凍し、次いで、PIで標識し、次いで、mClec9A-ectoの非存在または存在下でインキュベートした。DCを、CD11cおよびCD8に対するmAbで表面標識し、次いで、4℃または37℃で3時間、PI標識脾細胞と共に共培養した。DCを、CD8⁺（CD11c^{hi} CD8⁺）またはCD8⁻（CD11c^{hi} CD8⁻）としてゲーティングし、死細胞取り込みの指標としてのPI陽性であった細胞のパーセンテージについて分析した。

【図 1 3】A) mClec9AおよびhCLEC9AはRNF41へ結合する。mClec9A-ecto、hClec9A-ectoおよびmClec12A-ectoを、ビーズ結合RNF41融合タンパク質と共にインキュベートした。結合されたタンパク質を溶出し、抗-Flag-HRPを使用して検出した（レーン1：GST-RNF41_{FL}、レーン2：GST-RNF41₇₂₋₃₁₇、レーン3：GSTコントロール）。精製Clec-ectoの試料をレーン4に示す。B) グルタチオンビーズから溶出されたGST-RNF41融合タンパク質のクーマシー染色。

【発明を実施するための形態】

【0130】

配列表の手引き

SEQ ID NO：1-ヒト5B6。

SEQ ID NO：2-マウス5B6。

SEQ ID NO：3-チンパンジー5B6。

SEQ ID NO：4-マカクザル5B6。

SEQ ID NO：5-イヌ5B6。

SEQ ID NO：6-ウシ5B6。

SEQ ID NO：7-ウマ5B6。

SEQ ID NO：8-ラット5B6。

SEQ ID NO：9-ヒト5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：10-マウス5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：11-チンパンジー5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：12-マカクザル5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：13-イヌ5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：14-ウシ5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：15-ウマ5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：16-ラット5B6をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO：17～28、38および39-オリゴヌクレオチドプライマー。

SEQ ID NO：29-マウス5B6の抗原性断片。

SEQ ID NO：30-ヒト5B6の抗原性断片。

- SEQ ID NO : 31-ビオチン化コンセンサス配列。
- SEQ ID NO : 32-マウスClec12aの部分配列。
- SEQ ID NO : 33-マウスデクチン-1の部分配列。
- SEQ ID NO : 34-マウスClec8aの部分配列。
- SEQ ID NO : 35-マウスNKG2Dの部分配列。
- SEQ ID NO : 36-ヒトNKG2Dの部分配列。
- SEQ ID NO : 37-ラットMBP-Aの部分配列。
- SEQ ID NO : 40-ストークを含む可溶性マウス5B6。
- SEQ ID NO : 41-ストークを含む可溶性ヒト5B6。
- SEQ ID NO : 42-ストークを有しない可溶性マウス5B6。 10
- SEQ ID NO : 43-ストークを有しない可溶性ヒト5B6。
- SEQ ID NO : 44-ストークを含む可溶性flagタグ付加マウス5B6。
- SEQ ID NO : 45-ストークを含む可溶性flagタグ付加ヒト5B6。
- SEQ ID NO : 46-ストークを有しない可溶性flagタグ付加マウス5B6。
- SEQ ID NO : 47-ストークを有しない可溶性flagタグ付加ヒト5B6。
- SEQ ID NO : 48-ヒト赤血球スペクトリン α 1 (楕円赤血球症2またはSPTA1)。
- SEQ ID NO : 49-ヒト非赤血球スペクトリン α 1 (α フォドリンまたはSPTAN1) (アイソフォーム1)。
- SEQ ID NO : 50-ヒト非赤血球スペクトリン α 1 (α フォドリンまたはSPTAN1) (アイソフォーム2)。 20
- SEQ ID NO : 51-ヒト赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォームa)。
- SEQ ID NO : 52-ヒト赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォームb)。
- SEQ ID NO : 53-ヒト非赤血球 β スペクトリン1、またはSPTBN1 (アイソフォーム1)。
- SEQ ID NO : 54-ヒト非赤血球 β スペクトリン1、またはSPTBN1 (アイソフォーム2)。
- SEQ ID NO : 55-ヒト非赤血球 β スペクトリン2、またはSPTBN2。
- SEQ ID NO : 56-マウススペクトリン α 1、またはSPNA1。
- SEQ ID NO : 57-マウススペクトリン α 2、またはSPNA2。
- SEQ ID NO : 58-マウススペクトリン β 1、またはSPNB1。
- SEQ ID NO : 59-マウススペクトリン β 2、またはSPNB2 (アイソフォーム1)。
- SEQ ID NO : 60-マウススペクトリン β 2、またはSPNB2 (アイソフォーム2)。 30
- SEQ ID NO : 61-マウススペクトリン β 3、またはSPNB3。
- SEQ ID NO : 62-マウススペクトリン β 4、またはSPNB4。
- SEQ ID NO : 63-マウススペクトリン β 5、またはSPNB5。
- SEQ ID NO : 64-チンパンジー赤血球 α 1スペクトリン (楕円赤血球症2またはSPTA1) (アイソフォーム1)。
- SEQ ID NO : 65-チンパンジー赤血球 α 1スペクトリン (楕円赤血球症2またはSPTA1) (アイソフォーム2)。
- SEQ ID NO : 66-チンパンジー赤血球 α 1スペクトリン (楕円赤血球症2またはSPTA1) (アイソフォーム3)。
- SEQ ID NO : 67-チンパンジー赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォーム1)。 40
- SEQ ID NO : 68-チンパンジー赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォーム2)。
- SEQ ID NO : 69-チンパンジー赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォーム3)。
- SEQ ID NO : 70-チンパンジー赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォーム4)。
- SEQ ID NO : 71-チンパンジー非赤血球 β スペクトリン1、またはSPTBN1 (アイソフォーム1)。
- SEQ ID NO : 72-チンパンジー非赤血球 β スペクトリン2、またはSPTBN2 (アイソフォーム1)。
- SEQ ID NO : 73-ウマ赤血球 α スペクトリン1 (楕円赤血球症2またはSPTA1)。
- SEQ ID NO : 74-ウマ赤血球 β スペクトリン、またはSPTB。
- SEQ ID NO : 75-ウマ非赤血球 β スペクトリン1、またはSPTBN1。 50

SEQ ID NO: 76-ヒトRNF41 RING (リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン (Really Interesting New Gene)) フィンガータンパク質41 (アイソフォーム1)。

SEQ ID NO: 77-ヒトRNF41 RING (リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン) フィンガータンパク質41 (アイソフォーム2)。

SEQ ID NO: 78-マウスRNF41 RING (リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン) フィンガータンパク質41 (アイソフォーム1)。

SEQ ID NO: 79-チンパンジーRNF41 RING (リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン) フィンガータンパク質41 (アイソフォーム1)。

SEQ ID NO: 80-ウマRNF41 RING (リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン) フィンガータンパク質41。

SEQ ID NO: 81-ヒト赤血球スペクトリン α 1 (橢円赤血球症2またはSPTA1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 82-ヒト非赤血球スペクトリン α 1 (α フォドリンまたはSPTAN1) (アイソフォーム1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 83-ヒト非赤血球スペクトリン α 1 (α フォドリンまたはSPTAN1) (アイソフォーム2) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 84-ヒト赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォームa) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 85-ヒト赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォームb) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 86-ヒト非赤血球 β スペクトリン1、またはSPTBN1 (アイソフォーム1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 87-ヒト非赤血球 β スペクトリン1、またはSPTBN1 (アイソフォーム2) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 88-ヒト非赤血球 β スペクトリン2、またはSPTBN2をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 89-マウススペクトリン α 1、またはSPNA1をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 90-マウススペクトリン α 2、またはSPNA2をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 91-マウススペクトリン β 1、またはSPNB1をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 92-マウススペクトリン β 2、またはSPNB2 (アイソフォーム1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 93-マウススペクトリン β 2、またはSPNB2 (アイソフォーム2) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 94-マウススペクトリン β 3、またはSPNB3をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 95-マウススペクトリン β 4、またはSPNB4をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 96-マウススペクトリン β 5、またはSPNB5をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 97-チンパンジー赤血球 α 1スペクトリン (橢円赤血球症2またはSPTA1) (アイソフォーム1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 98-チンパンジー赤血球 α 1スペクトリン (橢円赤血球症2またはSPTA1) (アイソフォーム2) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 99-チンパンジー赤血球 α 1スペクトリン (橢円赤血球症2またはSPTA1) (アイソフォーム3) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 100-チンパンジー赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォーム1) をコードするオープンリーディングフレーム。

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 101—チンパンジー赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォーム2) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 102—チンパンジー赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォーム3) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 103—チンパンジー赤血球 β スペクトリン、またはSPTB (アイソフォーム4) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 104—チンパンジー非赤血球 β スペクトリン1、またはSPTBN1 (アイソフォーム1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 105—チンパンジー非赤血球 β スペクトリン2、またはSPTBN2 (アイソフォーム1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 106—ウマ赤血球 α スペクトリン1 (楕円赤血球症2またはSPTA1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 107—ウマ赤血球 β スペクトリン、またはSPTBをコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 108—ウマ非赤血球 β スペクトリン1、またはSPTBN1をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 109—ヒトRNF41 RING (リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン) フィンガータンパク質41 (アイソフォーム1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 110—ヒトRNF41 RING (リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン) フィンガータンパク質41 (アイソフォーム2) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 111—マウスRNF41 RING (リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン) フィンガータンパク質41 (アイソフォーム1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 112—チンパンジーRNF41 RING (リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン) フィンガータンパク質41 (アイソフォーム1) をコードするオープンリーディングフレーム。

SEQ ID NO: 113—ウマRNF41 RING (リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン) フィンガータンパク質41をコードするオープンリーディングフレーム。

【0131】

発明の詳細な説明

一般的な手法および定義

別に明確に定義する場合を除き、本明細書で用いるすべての技術用語および科学用語は、当業者 (例えば、細胞培養、分子遺伝学、分子生物学、免疫学、免疫細胞化学、タンパク質化学および生化学) が一般に理解しているものと同じ意味を持つものとする。

【0132】

別に指示する場合を除き、本発明で利用する組換えタンパク質、細胞培養および免疫学の手法は、当業者に周知の標準的な手順である。そのような手法は、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T.A. Brown (編), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volume 1 and 2, IRL Press (1991)、D.M. Glover and B.D. Hames (編), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996)、およびF.M. Ausubel et al. (編), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現時点までのすべての改訂を含む)、Ed Harlow and David Lane (編) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988)、およびJ.E. Coligan et al. (編) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (現時点までのすべての改訂を含む) といった文献中に記載および説明されている。

【0133】

句「破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞」、およびその変形物は、本明細書で用いる場合、細胞が、可能な場合、これらの特徴の1つまたは複数を有し得る状況を含む。例えば、細胞は、破壊された膜を有し、病原体に感染されており、かつ死にかけている場合がある。

【0134】

本明細書で用いる場合、用語「破壊された細胞膜を有する細胞」は、細胞膜の完全性が損なわれた細胞を指す。これは、孔を有する細胞、ならびに損傷されたまたは破裂された細胞を含む。

【0135】

本明細書で用いる場合、用語「死にかけている細胞」は、後期アポトーシス細胞または壊死細胞を指す。好ましくは、死にかけている細胞はアネキシンV⁺であるか、または、それらはヨウ化プロピジウム (PI)⁺である。核を有する死にかけている細胞については、それらはアネキシンV⁺かつPI⁺であることが好ましい。特に好ましい態様において、死にかけている細胞は、少なくともアネキシンV⁺である。なお別の態様において、壊死細胞は二次壊死細胞である。

10

【0136】

本明細書で用いる場合、「初期アポトーシス細胞」は、アネキシンV⁺かつPI⁻である細胞を含む。

【0137】

本明細書で用いる場合、用語「死細胞」は、細胞死プロセスの引き返し限界点を通過し、変化を逆行させることができない、細胞を指す。細胞は、アポトーシスまたは壊死によって死滅している場合がある。

20

【0138】

句「病原体に感染した細胞」に関して、用語、病原体は、細胞に感染し得る任意の生物を含む。例としては、ウイルス、原生動物および細菌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0139】

本明細書で用いる場合、用語「またはそれらの一部」は、本明細書に定義されるポリペプチドのリガンドを含む、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞の、任意の部分の指す。例としては、グレブおよび細胞ホモジネート／溶解物が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0140】

本明細書で用いる場合、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部についての、用語「取り込みおよび／またはクリアランス」は、細胞の、細胞物質、例えば、タンパク質またはその断片の除去を指す。ある態様において、樹状細胞は、細胞の取り込みおよび／またはクリアランスを、少なくとも一部分、担う。好ましくは、樹状細胞は5B6⁺ (Clec9A⁺としても知られる) である。

【0141】

本明細書で用いる場合、用語「周囲細胞」は、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞の1つまたは複数に近接した細胞を指す。

40

【0142】

本明細書で用いる場合、用語「治療すること」、「治療する」または「治療」は、特定の病気の少なくとも1つの症状を低下または消失させるに十分な治療有効量の本発明に有用な化合物を投与することを含む。

【0143】

本明細書で用いる場合、用語「予防すること」、「予防する」または「予防」は、特定の病気の少なくとも1つの症状の発症を停止または妨害するに十分な治療有効量の本発明に有用な化合物を投与することを含む。

50

【0144】

本明細書で用いる場合、用語「診断すること」またはその変形物は、疾患の検出を指す。

【0145】

本明細書で用いる場合、用語「予後診断すること」またはその変形物は、疾患の未来の結果の評価を指す。

【0146】

本明細書で用いる場合、用語「状態をモニタリングすること」またはその変形物は、疾患の段階を判定することを指す。状態は、対象に疾患についての治療が与えられる前、間および／または後に判定され得る。

10

【0147】

本明細書で用いる場合、用語「5B6」および「Clec9A」は、以下を含むポリペプチドを指す；

i) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列；ならびに／または

iii) i) または ii) の生物活性、可溶性および／または抗原性断片。好ましくは、ポリペプチドは、樹状細胞のサブセット上において少なくとも発現される。

【0148】

本明細書で用いる場合、ある態様において、「試料」は、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部を有することが疑われる任意の生物材料であり得る。他の態様において、「試料」は、5B6+樹状細胞を有することが疑われる任意の生物材料であり得る。例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：血液、例えば、全末梢血、臍帯血、胎児血液、骨髄、血漿、血清、尿、培養細胞、唾液または尿道拭き取り検体 (urethral swab)、リンパ組織、例えば、扁桃、パリエル板、虫垂、胸腺、脾臓およびリンパ節、ならびに型通りの検査、診断または外科理由のために採取された任意の生検試料、例えば、腫瘍生検材料または炎症器官／組織の生検材料。試料は、直接検査してもよく、または検査の前に何らかの形の処理を必要としてもよい。例えば、生検試料は、検査の前に細胞懸濁液を作製するための均質化を必要とすることがある。さらに、生物試料が液体形態でない範囲において（例えば、それは固体、半固体または脱水された液体試料であり得る）、それは、試料を流動化するための緩衝剤などの試薬の添加を必要とし得る。流動化試薬は、本明細書に定義される化合物と試料とを接触させる前に、試料と混合され得る。

20

30

【0149】

本明細書で用いる場合、用語「結合させる」、「結合された」またはその変形物は、本発明に有用な化合物と治療物質もしくは検出可能な標識との間の任意の形態の共有結合または非共有結合、または本発明に有用な化合物および治療物質もしくは検出可能な標識をリボソーム中などに互いに近接させて配置することを指すように広く使用される。

【0150】

本明細書で用いる場合、用語「免疫応答」は、抗原に応答しての、対象の免疫系の反応性の変化を指し、これには、抗体産生、細胞性免疫の誘導、補体活性化および／または免疫寛容の発生が含まれ得る。

40

【0151】

本明細書で用いる場合、句「細胞の細胞膜を破壊すること」は、細胞膜の完全性を損なわせる任意の方法を指す。このような方法の例としては、照射、界面活性剤への曝露、ならびに凍結／解凍が挙げられるが、これらに限定されない。ある態様において、細胞は前記方法によって死滅させられる。

【0152】

本明細書で用いる場合、用語「対象」は、好ましくは動物に関する。より好ましくは、対象は、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、またはヒツジなどの哺乳動物である。最も好ま

50

しくは、対象はヒトである。

【0153】

5B6 (Clec9A) リガンド

本明細書で用いる場合、用語「5B6リガンド」または「Clec9Aリガンド」またはそれらの変形物は、5B6 (Clec9A) に結合する本明細書に定義されるタンパク質、即ち、スペクトリン、RNF41、ならびにそれらの変異体／突然変異体／断片を指す。

【0154】

スペクトリン

用語「スペクトリン」は、本明細書で用いる場合、アクチン細胞骨格を形質膜へ連結するための分子足場タンパク質として作用し、細胞形状の決定、膜貫通タンパク質の配置、および細胞小器官の組織化において機能する、線維状アクチンの架橋に関与する膜結合細胞骨格タンパク質を指す (Broderick and Winder, 2005)。

【0155】

スペクトリンは伝統的には赤血球型および非赤血球型に分けられ、前者は、赤血球だけに限定されており、RBCの弾性を担う。スペクトリンは細胞に遍在し、異なるアイソフォームが、異なる生物における異なる組織において発現され得る。スペクトリンは、多くの繰り返す α ヘリックス106アミノ酸単位（または「スペクトリンリピート」）を含む、高モジュールタンパク質である。

【0156】

α 型は、一般的に20個のスペクトリンリピートを含み、 β 型とは対照的に、一般的にアクチン結合ドメイン (ABD) を欠いている。大抵の α 形態は、ポリプロリン含有タンパク質に結合するためのSH3 (Src相同3ドメイン) を含む。非赤血球 α アイソフォームは、一般的に、カルシウムに結合するためのEFハンドモチーフを含む。スペクトリンの赤血球 α 型の例をSEQ ID NO: 48、64~66および73として提示する。スペクトリンの非赤血球 α 型の例をSEQ ID NO: 49~50として提示する。ヒトSPTA1遺伝子 (赤血球スペクトリン $\alpha 1$ をコードする) の突然変異は、溶血性貧血および楕円または卵形RBC形状を特徴とする常染色体優性血液障害である、2型楕円赤血球症 (EL2) の原因である。SPTA1突然変異はまた、遺伝性熱変形赤血球症 (HPP) およびIII型球状赤血球症 (SPH3) を引き起こし、両方とも溶血性疾患である。非赤血球 $\alpha 1$ 遺伝子 (SPTAN1) の突然変異は、シェーグレン症候群、自己免疫疾患、関節リウマチ、多発性硬化症、神経変性疾患および口腔乾燥症を引き起こす。 $\alpha 1$ スペクトリンの非赤血球型 (SPTAN1遺伝子によってコードされる) はまた、 α フォドリンとして公知である。

【0157】

β 型は、一般的に17個のスペクトリンリピートおよびアクチン結合ドメイン (ABD) を含む。ABDは、一般的に、2つのCH (カルポニン相同) ドメインを含み、これらは、スペクトリンの β 型がF-アクチンと相互作用するのを可能にする。 β スペクトリンの非赤血球型は、膜リン脂質との相互作用のためのPH (プレクストリン相同) ドメインを含む。スペクトリンの β 型は、一般的に、EFハンドモチーフを欠いている。スペクトリンの赤血球 β 型の例をSEQ ID NO: 51~52、67~70および74として提示する。スペクトリン非赤血球 β 型の例をSEQ ID NO: 53~55、71~72および75として提示する。ヒトSPTB遺伝子 (赤血球スペクトリン β をコードする) の突然変異は、3型楕円赤血球症 (EL3)、I型球状赤血球症 (SPH1)、筋ジストロフィー、種々の貧血性疾患および熱変形赤血球症を含む、RBC障害の原因である。非赤血球 $\beta 1$ 遺伝子 (SPTBN1) の突然変異は、2型神経線維腫症および白血病を引き起こす。 $\beta 1$ スペクトリンの非赤血球型 (SPTBN1遺伝子によってコードされる) はまた、 β フォドリンとして公知である。

【0158】

スペクトリンは、ヘッド・トゥー・ヘッド配置で連結された α および β 二量体の四量体として機能する。 α および β スペクトリンは相互作用して二量体を形成し、2つのヘテロ二量体は機能性四量体を形成する。四量体は、それらの末端を介して、線維状アクチンおよびバンド4.1タンパク質からなる結合複合体へ結合する。スペクトリンはまた、アンキ

リンおよびバンド3タンパク質を介して（特にRBC中において）、ならびにまたタンパク質4.1およびグリコホリンCを介して、内在性膜タンパク質へ結合する。相互作用もまた、 β スペクトリンのPHドメインを介してリン脂質と生じる。

【0159】

RNF-41タンパク質

RNF-41タンパク質は、RING（リアリー・インタレスティング・ニュー・ジーン）フィンガータンパク質、ニューレグリン受容体分解タンパク質-1（NRDP1）、または胎児肝臓RINGタンパク質（FLRF）としても公知であり、E3ユビキチンリガーゼとして作用しかつ標的タンパク質の分解を調節するタンパク質を指す。RNF-41についての標的タンパク質としては、EGF（上皮成長因子）受容体ファミリーのメンバー、例えばErbB3（またはHer3）が挙げられる。RNF-41の他の標的としては、ErbB4、ユビキチン特異的プロテアーゼ8（Usp8）、Birc6およびレティキュロン4（reticulon 4）（NogoAとしても公知の、Rtn4）が挙げられる。RNF-41の突然変異は、腫瘍疾患へ関連付けられた。RNF-41の過剰発現は、乳癌成長の阻害およびErbB3を減少させることが示された。RNF-41の低下したレベルは、原発性ヒト乳癌組織中のErbB3レベルと逆相関した。

【0160】

ヒトにおいて、3つの転写物変異体は、RNF-41の2つのアイソフォーム、即ち、それぞれ、SEQ ID NO：76および77に提示される、アイソフォーム1および2をコードする。他の生物由来のRNF-41タンパク質の例を、SEQ ID NO：78～80に提示する。

【0161】

化合物

本発明者らは、5B6（当技術分野においてCLEC9AおよびHEEE9341とも呼ばれる）が、樹状細胞のサブセットにおいて発現され、免疫応答を調節するために標的化され得、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞および死細胞上のリガンドに結合することを以前に示している（Caminschi et al., 2008；WO 09/026660；US 61/052,983；WO 09/137871；US 61/120,801）。このことは、リガンドへの5B6の結合を調節する化合物、および／またはリガンドの産生を調節する化合物が、広範囲の診断、予後診断および治療手順において使用されることを可能にした。本発明者らは今回、特に、樹状細胞へ治療分子を標的化するために使用され得る、5B6に結合するさらなる分子を同定した。

【0162】

本発明に有用な化合物としては、治療物質を送達するように修飾されたスペクトリンまたはRNF41などのリガンド、ならびにこれらのリガンドに結合する、好ましくは特異的に結合するものが挙げられる。結合は、共有もしくは非共有結合相互作用、または共有および非共有結合相互作用の組み合わせによって媒介され得る。相互作用が、非共有結合された複合体を生じさせる場合、生じる結合は、典型的に、静電気、水素結合、または親水性／親油性相互作用の結果である。好ましい態様において、化合物は、精製および／または組換えポリペプチドである。

【0163】

必須ではないが、化合物は、5B6またはリガンドへ特異的に結合し得る。句「特異的に結合する」は、特定の条件下で、化合物が5B6またはリガンドに結合し、かなりの量の他の、例えば、タンパク質または炭水化物へは結合しないことを意味する。一態様において、化合物は、樹状細胞を含む対象から得られた試料中において5B6に特異的に結合し、他の分子には結合しない。別の態様において、化合物は、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはそれらの一部を含む対象から得られた試料中の、リガンドへ特異的に結合し、他の分子には結合しない。このような条件下での特異的結合は、その特異性のために選択される抗体を必要とし得る。別の態様において、別のタンパク質と比べた場合、化合物の結合間で、5倍を超える差異がある、好ましくは25、50または100倍を超える差異があれば、化合物は「特異的に結合する」とみなされる。

【0164】

抗体

一態様において、スペクトリンまたはRNF41などのリガンドに結合する化合物は、抗体またはその抗原結合性断片を含む。用語「抗体」および「免疫グロブリン」は、1対の低分子量の軽(L)鎖および1対の重(H)鎖という2対のポリペプチド鎖からなり、その4つすべてがジスルフィド結合によって相互に連結されている、構造的に関連のある糖タンパク質のクラスを指す。免疫グロブリンの構造は十分に特徴付けられている。例えば、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))を参照のこと。手短に述べると、各重鎖は、典型的には、重鎖可変領域(本明細書では V_H と略記)および重鎖定常領域(本明細書では C_H と略記)で構成される。重鎖定常領域は、典型的には、 C_{H1} 、 C_{H2} および C_{H3} という3つのドメインで構成される。各軽鎖は、典型的には、軽鎖可変領域(本明細書では V_L と略記)および軽鎖定常領域(本明細書では C_L と略記)で構成される。軽鎖定常領域は、典型的には、1つのドメイン C_L で構成される。 V_H 領域および V_L 領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれるより保存性の高い領域が散在する、相補性決定領域(CDR)とも呼ばれる、超可変性を有する領域(または構造的に規定されたループの形態および/または配列において超可変的であり得る超可変領域)にさらに細分され得る。

【0165】

各 V_H および V_L は、典型的には、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって次の順序に並んだ3つのCDRおよび4つのFRで構成される: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 (Chothia and Lesk, 1987も参照のこと)。典型的には、この領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)に記載された方法によって行われる(本明細書における、KabatにおけるようなまたはKabatに従った可変ドメイン残基の番号付けなどの語句は、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに対するこの番号付け方式のことを指す)。この番号付け方式を用いると、ペプチドの実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはCDRの短縮またはその中への挿入に対応して、より少数のまたは追加のアミノ酸を含むことがある。

【0166】

用語「ヒト化抗体」は、本明細書で用いる場合、親抗体の抗原結合特性を保持しているかまたは実質的に保持しているが、ヒトにおける免疫原性がより低い、非ヒト抗体、典型的にはマウスのものに由来する抗体のことを本明細書において指す。

【0167】

用語、相補性決定領域(CDR)は、本明細書で用いる場合、免疫グロブリン結合部位の可変断片(Fv)領域の結合親和性および特異性を相伴って規定するアミノ酸配列のことを指す。

【0168】

用語、フレームワーク領域(FR)は、本明細書で用いる場合、CDR間に挿入されたアミノ酸配列のことを指す。抗体のこれらの部分は、CDRを適切な向きに保持する(CDRが抗原に結合することを可能にする)のに役立つ。可変領域は、軽鎖または重鎖のいずれにしても、フレームワークおよび典型的には3つのCDRを含む。

【0169】

用語、定常領域(CR)は、本明細書で用いる場合、エフェクター機能を付与する抗体分子の部分のことを指す。主題のヒト化抗体の定常領域は、ヒト免疫グロブリンに由来する。重鎖定常領域は、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ または μ という5種のアイソタイプのいずれかから選択され得る。さらに、種々のサブクラスの重鎖(IgGサブクラスの重鎖など)は、異なるエフェクター機能を担っており、従って、所望の重鎖定常領域を選択することにより、所望のエフェクター機能を備える抗体を作製することができる。好ましい重鎖定常領域は、 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3)および $\gamma 4$ (IgG4)であり、より好ましくは $\gamma 4$ (IgG4)である。軽鎖定常領域は、 κ 型または λ 型のもの、好ましくは κ 型のものであり

得る。

【0170】

抗体は、完全な状態 (intact) の免疫グロブリンとして、または、VHもしくはVLドメインのいずれかを含むドメイン抗体、重鎖可変領域の二量体 (VHH、ラクダ科動物に関して記載されているようなもの)、軽鎖可変領域の二量体 (VLL)、軽鎖および重鎖の可変領域のみを含むFv断片、または重鎖可変領域およびCH1ドメインを含むFd断片を非限定的に含む種々の形態にある修飾物として存在することができる。重鎖および軽鎖の可変領域が一つに連結されて一本鎖抗体を形成したものからなるscFv (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988)、ならびに二重特異性抗体および三重特異性抗体といったscFvのオリゴマーもまた、「抗体」という用語の範囲に含まれる。可変領域と定常領域の一部とを含む、Fab、(Fab')₂およびFabFc₂断片といった抗体の断片も、同じく範囲に含まれる。CDRグラフト化抗体断片および抗体断片のオリゴマーも同じく範囲に含まれる。Fvの重鎖成分および軽鎖成分は同じ抗体に由来してもよく、または異なる抗体に由来し、その結果キメラ性Fv領域を生じてよい。抗体は動物 (例えばマウス、ウサギまたはラット) もしくはヒト由来のものであってもよく、またはキメラ性 (Morrison et al, 1984) であるか、もしくはヒト化 (Jones et al, 1986) およびUK 8707252) されていてもよい。本明細書で用いる場合、「抗体」という用語は、これらのさまざまな形態を含む。本明細書中に提示した指針、ならびに上記に引用した参考文献中およびHarlowおよびLane (前記) などの刊行物中に記載されている当業者に周知のそのような方法を用いて、本発明の方法に用いるための抗体を容易に作ることができる。

【0171】

本明細書で用いる場合、「抗原結合性断片」は、全長分子と同一の抗原に結合することができる、本明細書で定義した抗体の一部分のことを指す。

【0172】

天然供給源からのものではない本発明の抗体または抗原結合性断片、例えばヒト化抗体は、好ましくは、親抗体の結合特性のかなりの割合を保っている。特に、本発明のこのような抗体または断片は、ヒト化抗体などの抗体または断片を作製するために用いられる親抗体によって認識される抗原に特異的に結合する能力を保っている。好ましくは、抗体または断片は、親抗体と同じまたは実質的に同じ抗原結合親和性およびアビディティを呈する。理想的には、抗体または断片の親和性は、親抗体の親和性の10%未満ではなく、より好ましくは約30%未満ではなく、最も好ましくは親和性は親抗体の50%未満ではない。抗原結合親和性をアッセイするための方法は、当技術分野において周知であり、これには最大半量結合アッセイ、競合アッセイおよびスキャッチャード分析が含まれる。

【0173】

種々のイムノアッセイ形式が、リガンドと特異的に免疫反応性である抗体または断片を選択するために使用され得る。例えば、あるタンパク質または炭水化物と特異的に免疫反応性である抗体を選択するためには、表面標識およびフローサイトメトリー分析または固相ELISAイムノアッセイがルーチンの使用される。特異的な免疫反応性の決定に使用され得るイムノアッセイの形式および条件の説明については、HarlowおよびLane (前記) を参照のこと。

【0174】

抗体は、1つの可変軽 (V_L) 鎖および1つの可変重 (V_H) 鎖を含むFv領域であってもよい。軽鎖および重鎖は直接連結されてもよく、またはリンカーを経由して連結されてもよい。本明細書で用いる場合、リンカーとは、軽鎖および重鎖と共有的に連結されて、それらが対象とするエピトープと特異的に結合しうるコンフォメーションをそれらが実現しうるように、その2つの鎖の間に十分な間隔および柔軟性を与える分子のことを指す。タンパク質リンカーが特に好ましいが、それはそれらが融合ポリペプチドのIg部分に内在する成分として発現されうるためである。

【0175】

もう1つの態様においては、組換え的に作製された一本鎖scFv抗体、好ましくはヒト化s

cFvを本発明の方法に用いる。

【0176】

モノクローナル抗体

本明細書に記載の5B6リガンドを対象とするモノクローナル抗体は当業者によって容易に作製可能である。

【0177】

ハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を作るための一般的な方法は周知である。抗体産生性の不死細胞株は、細胞融合によって作り出すことができ、発癌性DNAによるBリンパ球の直接的な形質転換またはエプスタイン-バーウイルスによるトランスフェクションといった他の手法によって作り出すこともできる。5B6リガンドエピトープに対して作製された一団のモノクローナル抗体は、さまざまな特性、すなわちアイソタイプおよびエピトープ親和性に関してスクリーニングすることができる。

10

【0178】

動物由来のモノクローナル抗体は、直接的インビボ免疫療法および体外免疫療法の両方のために用いることができる。しかし、例えば、マウス由来のモノクローナル抗体をヒトにおいて治療物質として用いた場合には、患者がヒト抗マウス抗体を産生することが観察されている。このため、動物由来のモノクローナル抗体は、治療法には、特に長期的使用には好ましくない。しかし、確立された遺伝子工学の手法を用いることで、動物由来の部分およびヒト由来の部分を含むキメラ抗体またはヒト化抗体を作り出すことができる。動物は例えば、マウス、またはラットなどの他の齧歯動物でありうる。

20

【0179】

キメラ抗体の可変領域が例えばマウス由来であり、一方、定常領域がヒト由来である場合には、そのキメラ抗体は「純粋な」マウス由来のモノクローナル抗体よりも一般に免疫原性が低いと考えられる。これらのキメラ抗体は、「純粋な」マウス由来の抗体が不適であることが判明した場合には、治療的使用のためにより適している可能性が高いと考えられる。

【0180】

キメラ抗体を作製するための方法は当業者にとって利用可能である。例えば、軽鎖および重鎖を、例えば別々のプラスミド中にある免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖を用いて、別々に発現させることができる。続いてこれらを精製し、インビトロで集合させて完全な抗体にすることができる。そのような集合を実現するための方法は記載されている（例えば、Sun et al, 1986を参照）。そのようなDNA構築物は、抗体の軽鎖または重鎖の可変領域に関する機能的に再配列化された遺伝子をコードするDNAが、ヒト定常領域をコードするDNAと連結されたものを含む。軽鎖および重鎖に関するDNA構築物がトランスフェクトされた骨髓腫またはハイブリドーマなどのリンパ系細胞は、抗体鎖を発現して集合させることができる。

30

【0181】

縮小され単離された軽鎖および重鎖からのIgG抗体の形成のためのインビトロ反応のパラメーターも記載されている。完全なH2L2 IgG抗体としての重鎖および軽鎖の細胞内会合および連結を実現するための、同じ細胞内での軽鎖および重鎖の共発現も可能である。そのような共発現は、同じ宿主細胞内で同じまたは異なるプラスミドのいずれかを用いて達成することができる。

40

【0182】

本発明のもう1つの好ましい態様において、抗体は、ヒト化されており、すなわち、抗体のヒト含量を最大にすると同時に、例えばラット、ウサギまたはネズミ親抗体などの可変領域に起因する結合親和性の損失がほとんどまたは全くないような分子モデリング法によって作製される抗体である。

【0183】

ヒト化に際しては、どのヒト抗体配列を使用すべきかを決定する上で検討すべきいくつかの要因がある。軽鎖および重鎖のヒト化は互いに独立して検討されるが、その論法はそ

50

れぞれについて基本的に同様である。

【0184】

この選択過程は以下の原理に基づく。所与の抗体の抗原特異性および親和性は、主として可変領域CDRのアミノ酸配列によって決まる。可変ドメインフレームワーク残基には直接的な寄与はほとんどまたは全くない。フレームワーク領域の主な機能は、抗原を認識するようにCDRをその適正な空間定位に保持することにある。このため、動物の、例えば齧歯動物のCDRのヒト可変ドメインフレームワークへの置換は、ヒト可変ドメインフレームワークがその元になった動物可変ドメインに対して高度に相同的であるならば、それらの正しい空間定位の保持をもたらす可能性が極めて高い。このため、ヒト可変ドメインは、好ましくは、動物可変ドメインに対して高度に相同的であるものを選択すべきである。適したヒト抗体可変ドメイン配列は、以下のように選択することができる。

10

【0185】

段階1.

コンピュータプログラムを用いて、動物由来の抗体の可変ドメインに対して最も相同的であるヒト抗体可変ドメインの配列に関して、利用可能なすべてのタンパク質（およびDNA）データベースを検索する。適したプログラムの出力は、動物由来の抗体に対して最も相同的な配列のリスト、各配列に対する相同率（percent homology）、および動物由来の配列に対する各配列のアラインメントである。これは重鎖および軽鎖の可変ドメイン配列の両方について独立して行われる。上記の分析は、ヒト免疫グロブリン配列のみが含まれる場合には、より容易に達成される。

20

【0186】

段階2.

ヒト抗体可変ドメイン配列をリスト化し、相同性を比較する。主として、比較は、極めて可変的である重鎖のCDR3を除外したCDRの長さによって行われる。ヒト重鎖ならびにκおよびλ軽鎖は、3つの重鎖サブグループ、4つのκ鎖サブグループおよび6つのλ鎖サブグループというサブグループに分類される。各サブグループ内でのCDRサイズは類似しているが、サブグループ間では異なる。通常、相同性の最初の近似として、動物由来抗体のCDRをヒトサブグループのうちの1つと合致させることが可能である。続いて、同様の長さのCDRを有する抗体を、特にアミノ酸配列について、特にCDR内のアミノ酸配列について比較し、同じく周囲のフレームワーク領域中のアミノ酸配列についても比較する。最も相同的であるヒト可変ドメインを、ヒト化のためのフレームワークとして選択する。

30

【0187】

実際のヒト化方法／手法

抗体は、EP 0239400に従って所望のCDRをヒトフレームワークにグラフト化することによってヒト化する。したがって、そのCDRを再形成（reshape）することが望まれるヒトDNAから出発して、所望の再形成された抗体をコードするDNA配列を作製することができる。所望のCDRを含む動物由来可変ドメインのアミノ酸配列を、選択したヒト抗体可変ドメイン配列のアミノ酸配列と比較する。ヒト可変領域に動物由来CDRを組み入れるために動物中の対応する残基に変更する必要があるヒト可変ドメイン中の残基を明らかにする。また、ヒト配列を置換する、ヒト配列に付加する、またはヒト配列から欠失させる必要のある残基が存在する場合もある。

40

【0188】

所望の残基を含むようにヒト可変ドメインのフレームワークに突然変異を誘発させるために用いるオリゴヌクレオチドを合成する。それらのオリゴヌクレオチドは、任意の都合のよいサイズのものであってよい。通常は、利用する特定の合成装置の性能によってのみ、長さが限定される。オリゴヌクレオチド指定インビトロ突然変異誘発法は周知である。

【0189】

ヒト化抗体またはその断片をコードするものなどの合成遺伝子配列は、DNA 2.0 (Menlo Park, Calif.)、Geneart (Regensburg, Germany)、CODA Genomics (Irvine, Calif.)、

50

およびGenScript, Corporation (Piscataway, N.J.)を含む複数のサービス企業のいずれかを通じて商業的に注文することが可能である。

【0190】

または、ヒト化を、WO 92/07075の組換えポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて達成することもできる。この方法を用いて、CDRをヒト抗体のフレームワーク領域間に接合することができる。一般に、WO 92/07075の手法は、2つのヒトフレームワーク領域ABおよびCD、ならびにそれらの間にある、ドナーCDRによって置換させようとするCDRを含むテンプレートを用いて行うことができる。プライマーAおよびBはフレームワーク領域ABを増幅するために用いられ、プライマーCおよびDはフレームワーク領域CDを増幅するために用いられる。しかし、プライマーBおよびCはそれぞれその5'末端に、ドナーCDR配列のすべてまたは少なくとも一部に対応する別の配列も含む。プライマーBおよびCは、PCRを行おうとする条件下で互いにその5'末端のアニーリングを可能にするのに十分な長さだけ重複している。このため、増幅された領域ABおよびCDは重複伸長によって遺伝子スプライシングを行って、単一の反応でヒト化産物を生成することができる。

【0191】

抗体を再形成するための突然変異誘発反応の後に、突然変異を誘発したDNAを、軽鎖または重鎖定常領域をコードする適切なDNAと連結し、発現ベクター中にクローニングして、宿主細胞、好ましくは哺乳動物細胞にトランスフェクトすることができる。これらの段階はルーチン的な様式で行うことができる。したがって、再形成された抗体は、以下の段階を含む方法によって調製することができる：

(a) 可変ドメインがヒト抗体に由来するフレームワーク領域および本発明のヒト化抗体のために必要とされるCDRを含んでいる、Ig重鎖または軽鎖の少なくとも該可変ドメインをコードするDNA配列と機能的に連結された適したプロモーターを含む第1の複製可能な発現ベクターを調製する段階；

(b) 相補的なIg軽鎖または重鎖それぞれの少なくとも可変ドメインをコードするDNA配列と機能的に連結された適したプロモーターを含む第2の複製可能な発現ベクターを調製する段階；

(c) 第1の、または両方の調製したベクターによって細胞株を形質転換する段階；および

(d) 形質転換された細胞株を培養して改変抗体を産生させる段階。

【0192】

好ましくは、段階（a）におけるDNA配列は、ヒト抗体鎖の可変ドメインおよび各定常ドメインの両方をコードしている。ヒト化抗体は、任意の適した組換え発現系を用いて調製することができる。改変抗体を産生するように形質転換される細胞株は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株、または不死化哺乳動物細胞株であってよく、これは骨髓腫、ハイブリドーマ、トリオーマもしくはクアドローマ（quadroma）細胞株などのリンパ系起源のものが有利である。細胞株には、エプスタイン-バーウイルスなどのウイルスによる形質転換によって不死化されたB細胞などの正常なリンパ系細胞も含まれうる。最も好ましくは、不死化細胞株は骨髓腫細胞株またはその派生物である。

【0193】

抗体の発現のために用いられるCHO細胞は、ジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）欠損性であり、それ故に増殖のためにチミジンおよびヒポキサンチンに依存するものでもよい。親のdhfr⁻ CHO細胞株に対して、抗体をコードするDNA、およびdhfr陽性表現型のCHO細胞形質転換体の選択を可能にするdhfr遺伝子をトランスフェクトする。選択は、チミジンおよびヒポキサンチンを欠く培地上でコロニーを培養することによって行うが、これらが存在しないことにより、非形質転換細胞が増殖すること、および形質転換細胞が葉酸経路を再利用してそれ故に選択系を回避することが妨げられる。これらの形質転換体は通常、トランスフェクトされた関心対象のDNAおよびdhfrをコードするDNAの共組込み（co-integration）により、関心対象のDNAを低レベルで発現する。抗体をコードするDNAの発現レベルは、メトトレキサート（MTX）を用いた増幅によって高めることができる。この薬物は酵素dhf

rの直接阻害薬であり、これらの条件下で生存するのに十分な程度にdhfr遺伝子コピー数を増幅する耐性コロニーの単離を可能にする。dhfrおよび抗体をコードするDNA配列は元の形質転換体において密に連結しているため、通常、同時に増幅が起こり、それ故に所望の抗体の発現が増加する。

【0194】

CHOまたは骨髄腫細胞とともに用いるのに好ましい別の発現系は、WO 87/04462に記載されたグルタミンシンテターゼ（GS）増幅系である。この系は、酵素GSをコードするDNAおよび所望の抗体をコードするDNAによる細胞のトランスフェクションを含む。続いて、グルタミン非含有培地中で増殖し、それ故にGSをコードするDNAが組み込まれたと推測しうる細胞を選択する。続いて、これらの選択されたクローンを、メチオニンスルホキシミン（Msx）を用いた酵素GSの阻害に供する。細胞は、生存するために、GSをコードするDNAを増幅し、それに伴って抗体をコードするDNAの同時増幅が起こると考えられる。

【0195】

ヒト化抗体を産生させるために用いられる細胞株は好ましくは哺乳動物細胞株であるが、細菌細胞株または酵母細胞株などの任意の他の適切な細胞株を用いることも可能である。特に、大腸菌（E.coli）由来の細菌株が用いられうると想定される。得られた抗体を機能に関して確かめる。機能が失われている場合には、段階（2）に戻って、抗体のフレームワークを改変することが必要である。

【0196】

ひとたび発現されると、硫酸アンモニウム沈降、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、当技術分野の標準的な手順に従って、本発明の抗体全体、その二量体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を回収および精製することができる（概論については、Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.(1982)を参照）。薬学的用途には、均質度が少なくとも約90～95%の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98～99%またはそれ以上の均質度が最も好ましい。ひとたび部分的にまたは所望の均質度になるまで精製すると、続いてヒト化抗体を、治療的に、またはアッセイ手順、免疫蛍光染色などの開発および実施に用いることができる（概論については、Lefkovits and Pernis（編）, Immunological Methods, Vols.I and II, Academic Press (1979 and 1981)を参照）。

【0197】

Greenwoodら（1993）によって行われた研究により、ヒトエフェクター細胞による抗体のFc領域の認識を、免疫グロブリン分子の定常領域を人工的に操作することによって最適化できることが実証されている。これは、所望の特異性を有する抗体の可変領域遺伝子を、ヒト対象における有効な抗原依存性細胞傷害（ADCC）が実証されている免疫グロブリンアイソタイプ、例えばIgG1およびIgG3アイソタイプをコードするヒト定常領域遺伝子と融合させることによって達成しうると考えられる（Greenwood and Clark, Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man. Mike Clark（編）, Academic Titles, Section II, p.85-113, (1993)）。結果として得られるキメラまたはヒト化抗体は、体液性免疫および／またはT細胞媒介性免疫を調節することにおいて特に有効であるはずである。

【0198】

完全なヒト可変領域を有する抗体は、抗原負荷に応答してそのような抗体を産生するが、その内因性座位は能力を失っているように改変されたトランスジェニック動物に抗原を投与することによって調製されることもできる。抗体自体またはその類似体のいずれかを得るために、その後さまざまな操作を行うことができる（例えば、US 6,075,181を参照）。

【0199】

抗体またはその断片をコードする遺伝子の調製

抗体、軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子の両方またはそれらの部分、例えば一本鎖Fv領域をコードする遺伝子は、ハイブリドーマ細胞株からクローニングすることができる。それら

はすべて、例えばClontechによって製造されているような市販のキットを用いるRACEなどの同じ一般的戦略を用いてクローニングしうる。典型的には、例えば、ハイブリドーマ細胞から抽出したポリ(A)+ mRNAを、プライマーとしてランダムヘキサマーを用いて逆転写させる。Fv領域に関しては、 V_H ドメインおよび V_L ドメインを、2つのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別々に増幅する。重鎖配列は、抗5B6リガンド重鎖それぞれのアミノ末端タンパク質配列に従って設計された5'末端プライマー、およびコンセンサス免疫グロブリン定常領域配列に従った3'末端プライマーを用いて増幅しうる(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991))。軽鎖Fv領域は、抗5B6リガンド軽鎖のアミノ末端タンパク質配列に従って設計された5'末端プライマーをプライマーC- κ と組み合わせて用いて増幅する。当業者は、Fv領域を得るために多くの適したプライマーを用いることを理解すると考えられる。

10

【0200】

PCR産物を適したクローニングベクター中にサブクローニングする。DNA制限による正確な大きさのインサートを含むクローンを同定する。続いて、クローニング部位に隣接した配列決定プライマーを用いて、二本鎖プラスミドDNAから重鎖または軽鎖のコード領域のヌクレオチド配列を決定することができる。DNAのシーケンシングを容易にするために、市販のキット(例えば、Sequenase(商標)キット、United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio, USA)を用いてもよい。Fv領域をコードするDNAを、例えば、PCRおよびLCRなどの増幅手法を含む、任意の適した方法によって調製することもできる。

20

【0201】

化学合成によって一本鎖オリゴヌクレオチドを生成させる。これを、相補的配列とのハイブリダイゼーションによって、または一本鎖をテンプレートとして用いるDNAポリメラーゼを用いる重合によって、二本鎖DNAに変換することができる。一本鎖Fv領域全体を化学合成することも可能であるが、多数の短い配列(約100~150塩基)を合成して、その後これらを連結することが好ましい。

【0202】

または、部分配列をクローニングして、適切な制限酵素を用いて適切な部分配列を切断することもできる。続いて、断片を連結して所望のDNA配列を生成させることができる。

30

【0203】

Fvの可変軽鎖および可変重鎖のDNAが得られると、それらの配列を、当業者に周知の手法を用いて、直接的にまたはペプチドリinkerをコードするDNA配列を介して、互いに連結することができる。1つの態様において、重鎖領域および軽鎖領域は、重鎖Fvドメインのカルボキシ末端から始まって軽鎖Fvドメインのアミノ末端で終わる可動性のペプチドリinker(例えば、 $(Gly_4Ser)_3$)によって連結される。この配列全体は、一本鎖抗原結合タンパク質の形態にあるFvドメインをコードする。

【0204】

治療物質

本明細書に定義する化合物は、治療物質を送達するために用いることができる。治療物質の例には、抗原、細胞傷害性物質、薬物および/または薬理学的物質が非限定的に含まれる。

40

【0205】

いくつかの態様において、治療物質は、化合物と融合されたポリペプチドであってよい。化合物を含む融合ポリペプチドは、当業者に公知の方法によって調製することができる。例えば、Fv領域をコードする遺伝子を、治療物質をコードする遺伝子と融合させる。任意で、Fv遺伝子はペプチドコネクターをコードするセグメントと連結される。ペプチドコネクターは、化合物と治療物質との間に単に間隔を与えるために、またはこれらの領域間の可動性を助長してそれらがそれぞれその最適なコンフォメーションを達成することを可能にするために存在することができる。コネクターを含むDNA配列がまた、クローニング

50

を容易にする配列（プライマー部位または制限部位など）を与えてもよく、または結合部分をコードする配列と治療物質をコードする配列との間でリーディングフレームを保たせてもよい。そのようなコネクターペプチドの設計は当業者に周知である。

【0206】

一般に、融合ポリペプチドの作製は、例えば、Fv軽鎖および重鎖ならびにそれらと融合させる任意の他のタンパク質をコードするDNAを別々に調製する段階、ならびにDNA配列をプラスミドまたは他のベクター中で組み換えて特定の所望の融合ポリペプチドをコードする構築物を形成する段階を含む。しかし、より簡単な1つのアプローチは、特定のFv領域をコードするDNAを、所望の融合ポリペプチドを既にコードしている構築物中に挿入する段階を含む。Fv領域をコードするDNA配列は、当業者に周知の手法を用いて構築物中に挿入される。

10

【0207】

本発明に有用な化合物、例えば、組換え一本鎖抗体は、当業者に周知でありかつ利用可能な任意の方法によって、治療物質と融合させること、または別の様式で結合させることができる。2つの成分は、さまざまな周知の化学的手順のいずれかによって互いに化学結合させることができる。例えば、結合はヘテロ二官能性架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒドなどによるものであってよい。さまざまな免疫毒素の製造、ならびに化学的結合（conjugation）の方法は、当技術分野において周知である（例えば、"Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet", Thorpe et al., Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, p. 168-190 (1982); Waldmann, 1991; Vitetta et al., 1987; Pastan et al., 1986; および Thorpe et al., 1987を参照）。

20

【0208】

薬物および／または薬理学的物質の例には、DC活性化を促進する物質（例えば、TLRリガンド）、DCの活性化または機能を抑制する物質（例えば、キナーゼおよびホスファターゼなどのDCシグナル伝達分子の特異的な阻害物質または促進物質）、およびDCの死滅を調節する物質（例えば、アポトーシスの促進物質または抑制物質）が非限定的に含まれる。そのような薬物および／または薬理学的物質は当業者に周知である。

【0209】

当業者は、本発明の方法において細胞傷害性物質として用いるのに適した細菌性または植物性のポリペプチド毒素が数多くあることを認識していると考えられる。これらのポリペプチドには、天然型または改変型のシュードモナス外毒素（PE）、ジフテリア毒素（DT）、リシン、アブリン、ゲロニン、モモルジンII、志賀毒素および志賀毒素様毒素のa鎖などの細菌RIP、ルフィン、アトリコサンチン（atrichosanthin）、モモルジンI、オシロイバナ属（Mirabilis）抗ウイルスタンパク質、ポークウィード抗ウイルスタンパク質、ブリオジン2（byodion 2）（米国特許第5,597,569号）、ガボリン（gaporin）、ならびに遺伝子操作されたそれらの変異体などのポリペプチドが非限定的に含まれる。天然型のPEおよびDTは非常に毒性の強い化合物であり、典型的には肝臓毒性を介して死に到らしめる。好ましくは、PEおよびDTは、毒素の天然のターゲティング成分、例えばPEのドメインIaおよびDTのB鎖が除去された形態に改変される。当業者は、本発明が特定の細胞傷害性物質に限定されないことを理解していると考えられる。

30

40

【0210】

本発明における使用に適したその他の細胞傷害性物質には、細菌性または植物性の毒素、薬物などの物質、例えば、シクロホスファミド（CTX；サイトキサン）、クロランブシル（CHL；リユーケラン）、シスプラチン（CisP；CDDP；プラチノール）、ブスルファン（ミレラン）、メルファラン、カルムスチン（BCNU）、ストレプトゾトシン、トリエチレンメラミン（TEM）、マイトマイシンC、およびその他のアルキル化剤；メトトレキサート（MTX）、エトポシド（VP-16；ベプシド）、6-メルカプトプリン（6MP）、6-チオグアニン（6TG）、シラタピン（Ara-C）、5-フルオロウラシル（5FU）、ダカルバジン（DTIC）、2-クロロデオキシアデノシン（2-CdA）、およびその他の代謝拮抗剤；アクチノマイシ

50

ンD、ドキソルビシン（DXR；アドリアマイシン）、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンならびに他の抗生物質を含む抗生物質；ビンクリスチン（VCR）、ビンブラスチンなどのアルカロイド；ならびに、細胞分裂阻害薬、デキサメタゾン（DEX；デカドロロン）などのグルココルチコイド、およびプレドニゾンなどのコルチコステロイド、ヒドロキシ尿素などのヌクレオチド酵素阻害薬を含むその他の抗癌剤などが非限定的に含まれる。

【0211】

当業者は、本発明の化合物と周知の手法によって結合させて、樹状細胞を特異的に破壊するために送達することができる他の放射性同位体および化学的細胞傷害性物質が数多くあることを認識していると考えられる（例えば、米国特許第4,542,225号を参照）。光活性化毒素の例には、ジヒドロピリジン-コノトキシンおよび ω -コノトキシンが含まれる。用いる細胞傷害性試薬の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ および ^{32}P が含まれる。抗体は、当技術分野で周知の手法を用いて、そのような試薬で標識することができる。例えば、抗体の放射標識に関する手法については、Wenzel and Meares, Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, N.Y. (1983)を参照されたい (Colcher et al., 1986; "Order, Analysis, Results and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (編), Academic Press, p. 303-16, (1985)も参照されたい)。

【0212】

1つの例では、インジウム-111またはイットリウム-90に対する高親和性キレート部位を与えるために、安定なチオ尿素共有結合によってリンカー-キレターチウキセタンを化合物と結合させる。

【0213】

抗原

本発明の方法に有用な化合物はまた、「抗原」に結合させてもよい。

【0214】

「抗原」という用語はさらに、上記のものなどの公知の抗原または野生型抗原のペプチド類似体またはタンパク質類似体も範囲に含むことを意図している。類似体は野生型抗原よりも可溶性であるかまたはより安定的であってよく、また、抗原の免疫学的活性をより高める突然変異または修飾も含んでよい。本発明において同じく有用であるのは、所望の抗原のアミノ酸配列に相同的なアミノ酸配列を有するペプチドまたはタンパク質であり、この相同抗原は各々の腫瘍または生物に対する免疫応答を誘導する。

【0215】

「癌抗原」とは、本明細書で用いる場合、腫瘍細胞または癌細胞に随伴し、MHC分子の状況下で抗原提示細胞の表面上に発現された時に免疫応答を誘発することができる、分子または化合物（例えば、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、脂質、糖脂質、糖質および／またはDNA）のことである。癌抗原には、自己抗原のほか、癌に特異的に随伴しない可能性もあるが、にもかかわらず動物に対して投与された場合に腫瘍細胞もしくは癌細胞に対する免疫応答を誘導および／もしくは強化する、および／または腫瘍細胞もしくは癌細胞の増殖を低下させる他の抗原も含まれる。

【0216】

「病原性および／または感染性生物由来の抗原」とは、本明細書で用いる場合、任意の生物の抗原のことであり、これには感染性ウイルス、感染性細菌、原生動物（シュードモナス属など）および蠕虫類を含む感染性寄生生物ならびに感染性真菌が非限定的に含まれる。典型的には、本発明における使用のためには、抗原は、生物由来のタンパク質もしくはその抗原性断片、または、対応する生物に対して特異的な免疫応答を誘導する、天然に存在する抗原と同一であるか類似している合成化合物である。天然に存在する生物抗原に類似している化合物または抗原は、当業者に周知である。天然に存在する生物抗原に類似している化合物の非限定的な例は、多糖抗原のペプチド模倣物である。

【0217】

癌抗原の具体的な態様には、例えば、Ras p21原癌遺伝子、腫瘍抑制因子p53およびHER-2/neuおよびBCR-abl癌遺伝子のタンパク質産物、ならびにCDK4、MUM1、カスパーゼ8およびβカテニンといった突然変異抗原；ガレクチン4、ガレクチン9、炭酸脱水酵素、アルドラーゼA、PRAME、Her2/neu、ErbB-2およびKSA、αフェトプロテイン（AFP）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）などの癌胎児性抗原といった過剰発現性抗原；胎児性癌抗原（CEA）などの自己抗原、ならびにMart 1/Melan A、gp100、gp75、チロシナーゼ、TRP1およびTRP2などのメラノサイト分化抗原；PSA、PAP、PSMA、PSM-P1およびPSM-P2などの前立腺関連抗原；MAGE 1、MAGE 3、MAGE 4、GAGE 1、GAGE 2、BAGE、RAGEなどの再活性化された胎児性遺伝子産物、ならびにNY-ESO1、SSX2およびSCP1などの他の癌精巢抗原；Muc-1およびMuc-2などのムチン；GM2、GD2およびGD3などのガングリオシド、中性糖脂質ならびにルイス（y）およびグロボH（globo-H）などの糖タンパク質；ならびにTn、トンプソン-フライデンライヒ（Thompson-Freidenreich）抗原（TF）およびsTnなどの糖タンパク質。

10

【0218】

癌抗原およびそれらの各々の腫瘍細胞標的には、例えば、癌に関する抗原としてのサイトケラチン、特にサイトケラチン8、18および19が含まれる。上皮膜抗原（EMA）、ヒト胎児性抗原（HEA-125）、ヒト乳脂肪球、MBr1、MBr8、Ber-EP4、17-1A、C26およびT16も公知の癌抗原である。デスミンおよび筋特異的アクチンは筋原性肉腫の抗原である。胎盤性アルカリホスファターゼ、β-ヒト絨毛性ゴナドトロピンおよびα-フェトプロテインは、栄養膜細胞および生殖細胞腫瘍の抗原である。前立腺特異的抗原は前立腺癌の抗原であり、胎児性癌抗原は結腸腺癌のものである。HMB-45は黒色腫の抗原である。子宮頸癌では有用な抗原はヒトパピローマウイルスによってコードされている可能性が考えられる。クロモグラニン-A（Chromagranin-A）およびシナプトフィジンは、神経内分泌腫瘍および神経外胚葉性腫瘍の抗原である。特に関心の対象であるのは、壊死領域を有する固形腫瘍塊を形成する悪性度の高い腫瘍である。

20

【0219】

ある種の癌の素因となることが知られている病原体に由来する抗原も、本発明において有利に用いることができる。本明細書で提供する癌ワクチンにおける使用に関して特に関心の対象となる病原体には、B型肝炎ウイルス（肝細胞癌）、C型肝炎ウイルス（ヘパトーマ）、エプスタイン-バーウイルス（EBV）（バーキットリンパ腫、鼻咽頭癌、免疫抑制状態にある個体におけるPTLD）、HTLV（成人T細胞白血病）、発癌性ヒトパピローマウイルス16型、18型、33型、45型（成人子宮頸癌）およびヘリコバクター-ピロリ菌（*Helicobacter pylori*）（B細胞性胃リンパ腫）が含まれる。哺乳動物、より具体的にはヒトにおいて抗原として役立つ可能性のあるその他の医学的な重要性のある微生物は、文献中に、例えばC. G. A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, (1983)に広範に記載されている。

30

【0220】

例示的なウイルス病原体には、哺乳動物、より具体的にはヒトを感染させる感染性ウイルスが非限定的に含まれる。感染性ウイルスの例には、以下が非限定的に含まれる：レトロウイルス科（Retroviridae）（例えば、ヒト免疫不全ウイルス、HIV-1（HTLV-III、LAVまたはHTLV-III/LAVまたはHIV-IIIとも呼ばれる；およびHIV-LPなどの他の分離株；ピコルナウイルス科（Picornaviridae）（例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カリシウイルス科（Caliciviridae）（例えば、胃腸炎を引き起こす系統）；トガウイルス科（Togaviridae）（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビウイルス科（Flaviviridae）（例えば、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス科（Coronaviridae）（例えば、SARSコロナウイルスなどのコロナウイルス）；ラブドウイルス科（Rhabdoviridae）（例えば、水疱性口炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（Filoviridae）（例えば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（Paramyxoviridae）（例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス

40

50

、呼吸器合胞体ウイルス)；オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)(例えば、インフルエンザウイルス)；ブンガウイルス科(Bungaviridae)(例えば、ハンタンウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルスおよびナイロウイルス)；アレナウイルス科(Arenaviridae)(出血熱ウイルス)；レオウイルス科(Reoviridae)(例えば、レオウイルス、オルビウイルス(orbivirus)およびロタウイルス)；ビルナウイルス科(Birnaviridae)；ヘパドナウイルス科(Hepadnaviridae)(B型肝炎ウイルス)；パルボウイルス科(Parvoviridae)(パルボウイルス)；パポバウイルス科(Papovaviridae)(パピローマウイルス、ポリオーマウイルス)；アデノウイルス科(Adenoviridae)(ほとんどのアデノウイルス)；ヘルペスウイルス科(Herpesviridae)単純ヘルペスウイルス(HSV)1および2、水痘ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、ヘルペスウイルス；ポックスウイルス科(Poxviridae)(天然痘ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス)；およびイリドウイルス科(Iridoviridae)(例えば、アフリカブタ熱ウイルス)；および未分類ウイルス(例えば、海綿状脳症の病原性因子、デルタ型肝炎の病因(B型肝炎ウイルスの欠損性従位物(defective satellite)と考えられる)、非A非B型肝炎の病因(クラス1=内部的に伝染；クラス2=非経口的に伝染(すなわちC型肝炎)；ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス)。

【0221】

また、グラム陰性菌およびグラム陰性菌を、脊椎動物における主題組成物および方法による標的とすることもできる。そのようなグラム陽性菌には、パストレラ属(*Pasteurella* sp.)、ブドウ球菌属(*Staphylococci* sp.)および連鎖球菌属(*Streptococcus* sp.)が非限定的に含まれる。グラム陰性菌には、大腸菌(*Escherichia coli*)、シュードモナス属(*Pseudomonas* sp.)およびサルモネラ属(*Salmonella* sp.)が非限定的に含まれる。感染性細菌の具体的な例には、以下が非限定的に含まれる：ヘリコバクター-ピロリ(*Helicobacter pylori*)、ライム病ボレリア(*Borrelia burgdorferi*)、レジオネラ菌(*Legionella pneumophila*)、マイコバクテリウム属(*Mycobacterium* sp.) (例えば、結核菌(*M. tuberculosis*)、マイコバクテリウム-アビウム(*M. avium*)、マイコバクテリウム-イントラセルラーレ(*M. intracellulare*)、マイコバクテリウム-カンサイイ(*M. kansasii*)、マイコバクテリウム-ゴルドナエ(*M. goodii*)など)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)、化膿性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*) (A群連鎖球菌)、ストレプトコッカス-アガラクチア(*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌)、連鎖球菌(ビリダンス群)、糞便連鎖球菌(*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス-ボビス(*Streptococcus bovis*)、連鎖球菌(嫌気性属)、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、病原性カンピロバクター属(*Campylobacter* sp.)、腸球菌属(*Enterococcus* sp.)、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)、ジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム属(*Corynebacterium* sp.)、ブタ丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)、破傷風菌(*Clostridium tetani*)、エンテロバクター-アエロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、パストレラ-ムルトシダ(*Pasteurella multocida*)、バクテロイデス属(*Bacteroides* sp.)、フソバクテリウム-ヌクレアツム(*Fusobacterium nucleatum*)、ストレプトバシラス-モニリフォルミス(*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*)、トレポネーマ-ペルテヌエ(*Treponema pertense*)、レプトスピラ属(*Leptospira*)、リケッチア属(*Rickettsia*)およびアクチノマイセス-イスラエリ(*Actinomyces israelii*)。

【0222】

主題組成物における抗原の供給源としての使い道がある可能性のある細菌性病原体のポリペプチドには、以下が非限定的に含まれる：フルンケル症の原因となるエロモナス-サルモニシダ(*Aeromonis salmonicida*)の鉄調節外膜タンパク質(「IROMP」)、外膜タンパク質(「OMP」)およびAタンパク質、細菌性腎臓病(BKD)の原因となるレニバクテリ

ウム-サーモニナラム (*Renibacterium salmoninarum*) のp57タンパク質、エルシニア症 (*Yersiniosis*) の主要表面関連抗原 (「msa」)、表面発現細胞毒素 (「mpr」)、表面発現溶血素 (「ish」) および鞭毛抗原; パスツレラ症 (*Pasteurellosis*) の細胞外タンパク質 (「ECP」)、鉄調節外膜タンパク質 (「IROMP」) および構造タンパク質; ビブリオ-アングイラルム (*Vibrios anguillarum*) およびビブリオ-オルダリイ (*V. ordalii*) のOMPおよび鞭毛タンパク質; エドワジエラ-イクタルリ (*Edwardsiella ictaluri*) およびエドワジエラ-タルダ (*E. tarda*) の鞭毛タンパク質、OMPタンパク質、aroAおよびpurA; ならびにイクチオフチリウス属 (*Ichthyophthirius*) の表面抗原; ならびにサイトファ-ガ-カラムナリ (*Cytophaga columnari*) の構造タンパク質および調節タンパク質; ならびにリケッチアの構造タンパク質および調節タンパク質。この種の抗原は、組換え的に、または当技術分野で公知の任意の他の手段によって単離または調製することができる。

【0223】

病原体の例にはさらに、哺乳動物、より具体的にはヒトを感染させる感染性真菌および寄生生物が非限定的に含まれる。感染性真菌の例には、以下が非限定的に含まれる: クリプトコッカス-ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、ヒストプラズマ-カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、コクシジオイデス-イミティス (*Coccidioides immitis*)、ブラストミセス-デルマティティディス (*Blastomyces dermatitidis*)、クラミジア-トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*) およびカンジダ-アルビカンズ (*Candida albicans*)。

【0224】

寄生生物の例には、細胞内寄生生物および偏性細胞内寄生生物が含まれる。寄生生物の例には、以下が非限定的に含まれる: 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、卵形マラリア原虫 (*Plasmodium ovale*)、四日熱マラリア原虫 (*Plasmodium malariae*)、三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*)、二日熱マラリア原虫 (*Plasmodium knowlesi*)、ネズミバベシア (*Babesia microti*)、バベシア原虫 (*Babesia divergens*)、クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*)、トキソプラズマ-ゴンディ (*Toxoplasma gondii*)、旋毛虫 (*Trichinella spiralis*)、森林型熱帯リーシュマニア (*Leishmania major*)、ドノバン-リーシュマニア (*Leishmania donovani*)、ブラジル-リーシュマニア (*Leishmania braziliensis*)、皮膚リーシュマニア (*Leishmania tropica*)、ガンビアトリパノソーマ (*Trypanosoma gambiense*)、ローデシアトリパノソーマ (*Trypanosoma rhodesiense*)、バンクロフト糸状虫 (*Wuchereria bancrofti*)、マレー糸状虫 (*Brugia malayi*)、チモール糸状虫 (*Brugia timori*)、回虫 (*Ascaris lumbricoides*)、回旋糸状虫 (*Onchocerca volvulus*) およびマンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)。

【0225】

哺乳動物、より具体的にはヒトにおいて抗原として役立つ可能性のあるその他の医学的な重要性のある微生物は、文献中に広範に記載されており、例えば、C. G. A Thomas, Medical Microbiology, Bailliere Tindall, (1983)を参照されたい。ヒトの感染症およびヒト病原体の治療に加えて、本発明の組成物および方法は、非ヒト哺乳動物の感染を治療するためにも有用である。例示的な非ヒト病原体には、以下が含まれる: マウス乳腺癌ウイルス (「MMTV」)、ラウス肉腫ウイルス (「RSV」)、トリ白血病ウイルス (「ALV」)、トリ骨髄芽球症ウイルス (「AMV」)、マウス白血病ウイルス (「MLV」)、ネコ白血病ウイルス (「FeLV」)、マウス肉腫ウイルス (「MSV」)、テナガザル白血病ウイルス (「GALV」)、脾臓壊死ウイルス (「SNV」)、細網内皮症ウイルス (「RV」)、サル肉腫ウイルス (「SSV」)、メーソン-ファイザーサルウイルス (「MPMV」)、サルレトロウイルス1型 (「SRV-1」)、HIV-1、HIV-2、SIV、ビスナウイルス、ネコ免疫不全ウイルス (「FIV」) およびウマ伝染性貧血ウイルス (「EIAV」) などのレンチウイルス、HTLV-1、HTLV-II、サルT細胞白血病ウイルス (「STLV」) およびウシ白血病ウイルス (「BLV」) などのT細胞白血病ウイルス、ならびにヒト泡沫状ウイルス (「HFV」)、サル泡沫状ウイルス (「SFV」) およびウシ泡沫状ウイルス (「BFV」) などの泡沫状ウイルス。

【0226】

検出可能な標識

本発明に有用な化合物は、広範囲にわたる検出系に用いることができる。例えば、化合物を、対象の内部領域を画像化するため、および／または対象における疾患の有無を診断するために用いることができる。

【0227】

本発明の診断的、予後診断的および／またはモニタリングする方法が、患者試料中に存在する5B6のレベルまたは5B6を発現する細胞、リガンドおよび／またはリガンドを発現する細胞を測定するためのある程度の定量を含むことは、当業者には明らかであると考えられる。そのような定量は、適切な対照試料を含めることによって容易に与えられる。

【0228】

好ましくは、内部対照を本発明の方法に含める。好ましい内部対照は、1例または複数例の健常個体から採取した1つまたは複数の試料である。

【0229】

本発明に有用な化合物は、診断的に用いる場合、インビトロまたはインビボでの結合イベントの容易な検出を可能にするための検出可能な標識などの診断的試薬と連結させることができる。適した標識には、ビオチン、酵素、化学発光分子、発蛍光団、色素マーカー、または標的分子の検出および／もしくは位置決定のための他の画像化試薬といった放射性同位体または非放射性標識が含まれる。または、化合物と結合する第2の標識抗体またはアビジン（例えば）を検出のために用いることもできる。

【0230】

酵素イムノアッセイの場合には、酵素を、一般的にはグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸によって第2の抗体と結合させる。しかし、容易に理解されることが考えられるが、当業者にとって容易に利用可能な、多種多様にわたる結合（conjugation）手法が存在する。よく用いられる酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼが特に含まれる。特定の酵素とともに用いることになる基質は、一般に、対応する酵素によって加水分解を受けると検出可能な色の変化を生じるように選択される。適した酵素の例には、アルカリホスファターゼおよびペルオキシダーゼが含まれる。また、上述したような発色基質ではなくて蛍光産物を生じる、蛍光発生基質を用いることも可能である。

【0231】

別の例では、フルオレセインおよびローダミンなどの、ただしこれらには限定されない蛍光化合物を、例えば抗体と、それらの結合能力を変化させることなしに化学的に結合させることができる。特定の波長の光による照射で活性化されると、蛍光色素で標識された抗体が光エネルギーを吸収して、分子における励起状態を誘導し、光学顕微鏡で視覚的に検出可能な特徴的な色の光を発する。

【0232】

さらに別の非限定的な例として、化合物を造影剤と結合させたものを、組織化学的な組織切片における5B6またはリガンド発現の検出に用いることもできる。化合物は、適した超磁性（supermagnetic）標識、常磁性標識、高電子密度標識、エコー源性標識、放射性標識、またはビオチンもしくはアビジンのような非放射性標識と共有的または非共有的に結合させることができる。

【0233】

標識された細胞の検出および単離

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞は、細胞選別、特に蛍光活性化細胞選別（FACS）を含む当技術分野で周知の種々の手法によって、基体（例えば、パニングにおけるようなプラスチック表面）に結合させた親和性試薬を用いることによって、または、ビーズ（例えば、着色されたラテックスビーズまたは磁性粒子）の特性に基づいて単離しうる固相粒子に結合させた親和性試薬を用いることによって、試料において検出することができる。当然ながら、細胞を検出するために用いられる手順は、細胞がいかにして標識されているかに依存すると考えられる。

10

20

30

40

50

【0234】

1つの例では、細胞選別装置にとって適切な特徴（例えば、蛍光色素の場合には、選別装置の光源によって励起されうる色素、および細胞選別装置の検出器によって検出されうる発光スペクトル）を有する任意の検出可能な物質を用いることができる。フローサイトメトリーでは、細胞または他の粒子を含む液体流にレーザー光のビームを透過させて投射し、それらが集束光に当たって信号を生じた時にそれらを検出器によって拾い上げる。続いて、これらの信号はコンピュータ記憶およびデータ解析のために変換されて、さまざまな細胞特性に関する情報を提供することができる。適した色素によって標識された細胞はレーザービームによって励起され、特徴的な波長の光を発する。この発せられた光を検出器によって拾い上げ、これらのアナログ信号をデジタル信号に変換することで、これらの記憶、解析および表示が可能になる。

10

【0235】

蛍光活性化細胞選別装置（FACS）などの多くのより大型のフローサイトメーターも同じく「細胞選別装置」であり、細胞を特定の集団からチューブ内または他の収集容器内に選択的に回収させる能力を有する装置も同様である。1つの特に好ましい態様において、細胞はFACSを用いて単離される。この手順は当技術分野で周知であり、例えば、Melamed et al., Flow Cytometry and Sorting, Wiley-Liss, Inc., (1990); Shapiro, Practical Flow Cytometry, 4th Edition, Wiley-Liss, Inc., (2003); および Robinson et al., Handbook of Flow Cytometry Methods, Wiley-Liss, Inc. (1993)に記載されている。

20

【0236】

細胞を選別するために、装置の電子機器は、レーザービームによって調べられた各細胞について収集された信号を解釈し、その信号をコンピュータ上に設定された選別基準と比較する。細胞が必要な基準を満たすならば、電荷が液体流に加えられ、それは細胞を含む液滴へと正確に分けられる。この電荷は、関心対象の細胞が流れから離脱しようとするまさにその瞬間に流れに対して加えられ、荷電した液滴が流れから分かれた後は取り除かれる。液滴が降下するのに伴って、それらは強く正または負に荷電した2枚の金属プレートの間を通過する。荷電した液滴は反対の極性を有する金属プレートの方に引き寄せられて、さらなる検査のために、収集容器内に、または顕微鏡スライド上に回収される。

【0237】

細胞は、例えば、レーザー、例えばアルゴンレーザー（488nm）などを用いて、および例えばAutocloneユニット（Coulter EPICS Altra, Beckman-Coulter, Miami, Fla., USA）が装着されたフローサイトメーターにより、単一の細胞として、または複数の細胞として、収集容器内に自動的に回収させることができる。本発明の方法のために有用な適したFACS機器のその他の例には、MoFlo（商標）High-speed cell sorter（Dako-Cytomation Ltd）、FACS Aria（商標）（Becton Dickinson）、FACS Diva（Becton Dickinson）、ALTRA（商標）Hyper sort（Beckman Coulter）およびCyFlow（商標）sorting system（Partec GmbH）が非限定的に含まれる。

30

【0238】

固相粒子を用いた、試料からの破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞の検出には、所望の特性を備えた任意の粒子を利用することができる。例えば、沈殿が容易になるように、大きな粒子（例えば、直径が約90~100 μmを上回る）を用いてもよい。好ましくは、粒子は「磁性粒子」（すなわち、磁場を用いて収集することができる粒子）である。標識された細胞はカラム中に保たれる（磁場によって保持される）が、非標識細胞はそのまま通過してもう一方の端から溶出する。磁性粒子は現在、Dynal Biotech (Oslo, Norway) およびMilteni Biotech GmbH (Germany) を含む種々の製造元から販売されている。磁性細胞選別（MACS）の一例は、Al-Mufti et al. (1999) によって提示されている。

40

【0239】

レーザーキャプチャーマイクロダイセクションがまた、標識された細胞をスライド上において本発明の方法を用いて選択的に検出するために使用され得る。レーザーキャプチャ

50

ーマイクロダイセクションを使用する方法は、当技術分野で公知である（例えば、U.S.20030227611およびBauer et al., 2002を参照のこと）。

【0240】

標識された樹状細胞またはその前駆体の検出および単離

本明細書で用いる場合、「濃縮する」および「濃縮された」という用語は、それらの最も広い意味で用いられ、処理された試料中での非樹状細胞またはその前駆体に対する樹状細胞またはその前駆体の相対濃度が、相当する未処理試料よりも大きくなるような、樹状細胞またはその前駆体の単離を包含する。好ましくは、濃縮された樹状細胞および／またはその前駆体は、元の試料から得られた試料中の非樹状細胞またはその前駆体の少なくとも10%、より好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%から分離されている。最も好ましくは、濃縮された細胞集団は、非樹状細胞またはその前駆体を全く含まない（つまり、純粋である）。用語「濃縮する」および変形物は、本明細書中で、用語「単離する」およびその変形物と交換可能に使用される。さらに、本発明の方法を使用して濃縮された細胞の集団は、単一の樹状細胞またはその前駆体のみを含み得る。加えて、本発明の濃縮方法は、単一の樹状細胞またはその前駆体を単離するために使用され得る。

【0241】

樹状細胞またはその前駆体は、細胞選別、特に蛍光活性化細胞選別（FACS）を含む当技術分野で周知の種々の技術によって、支持体（例えば、パニングにおけるようなプラスチック表面）へ結合された親和性試薬を使用することによって、または、ビーズ（例えば、着色されたラテックスビーズまたは磁性粒子）の特性に基づいて単離され得る固相粒子へ結合された親和性試薬を使用することによって、試料から濃縮することができる。当然ながら、樹状細胞および／またはその前駆体を濃縮するために用いられる手順は、細胞がいかにして標識されているかに依存する。

【0242】

一例において、細胞選別装置にとって適切な特徴を有する任意の検出可能な物質が使用され得る（例えば、蛍光色素の場合には、選別装置の光源によって励起され得る色素、および細胞選別装置の検出器によって検出され得る発光スペクトル）。フローサイトメトリーでは、レーザー光のビームが、細胞または他の粒子を含む液体流に投射され、これらは、集束光によって当てられると信号を生じさせ、これらは、検出器によって拾われる。次いで、これらの信号は、コンピュータ保存およびデータ解析のために変換され、さまざまな細胞特性に関する情報を提供することができる。適した色素によって標識された細胞は、レーザービームによって励起され、特徴的な波長で光を発する。この発せられた光は検出器によって拾われ、これらのアナログ信号はデジタル信号に変換され、それらの保存、解析および表示が可能になる。

【0243】

蛍光活性化細胞選別装置（FACS）などの多くのより大型のフローサイトメーターも「細胞選別装置」であり、細胞を特定の集団からチューブまたは他の収集容器中へ選択的に置く能力を有する装置も同様である。特に好ましい態様において、細胞はFACSを用いて単離される。この手順は当技術分野で周知であり、例えば、Melamed et al., Flow Cytometry and Sorting, Wiley-Liss, Inc., (1990); Shapiro, Practical Flow Cytometry, 4th Edition, Wiley-Liss, Inc., (2003); およびRobinson et al., Handbook of Flow Cytometry Methods, Wiley-Liss, Inc. (1993)に記載されている。

【0244】

細胞を選別するために、装置の電子機器は、レーザービームによって調べられながら各細胞について収集された信号を解釈し、信号をコンピュータ上に設定された選別基準と比較する。細胞が必要な基準を満たすならば、電荷が液体流に加えられ、それは細胞を含有

する液滴へと正確に分けられる。この電荷は、関心対象の細胞が流れから離脱しようとするまさにその瞬間に流れに対して加えられ、荷電した液滴が流れから分かれた後は取り除かれる。液滴が降下するのに伴って、それらは強く正または負に荷電した2枚の金属プレートの間を通過する。荷電した液滴は、反対の極性を有する金属プレートの方に引き寄せられて、さらなる検査のために、収集容器内に、または顕微鏡スライド上に置かれる。

【0245】

細胞は、例えば、レーザー、例えばアルゴンレーザー（488nm）を用いて、および例えばAutocloneユニットが装着されたフローサイトメーター（Coulter EPICS Altra, Beckman-Coulter, Miami, Fla., USA）により、単一の細胞として、または複数の細胞として、収集容器内に自動的に置かれ得る。本発明の方法のために有用な適したFACS機器の他の例としては、MoFlo（商標）高速セルソーター（Dako-Cytomation Ltd）、FACS Aria（商標）（Becton Dickinson）、FACS Diva（Becton Dickinson）、ALTRA（商標）ハイパーソーター（Beckman Coulter）およびCyFlow（商標）ソーティングシステム（Partec GmbH）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0246】

固相粒子を使用しての試料からの樹状細胞および／またはその前駆体の濃縮には、所望の特性を備えた任意の粒子を利用することができる。例えば、沈殿が容易になるように、大きな粒子（例えば、直径が約90～100 μmを上回る）を用いてもよい。好ましくは、粒子は「磁性粒子」（すなわち、磁場を用いて収集することができる粒子）である。標識された細胞はカラム中に保たれる（磁場によって保持される）が、非標識細胞はそのまま通過してもう一方の端から溶出される。磁性粒子は現在、DynaL Biotech（ノルウェー、オスロ）およびMilteni Biotech GmbH（ドイツ）を含む種々の製造業者から市販されている。磁性細胞選別（MACS）の一例は、Al-Mufti et al.（1999）によって提示されている。

【0247】

レーザーキャプチャーマイクロダイセクションがまた、標識された樹状細胞またはその前駆体をスライド上において本発明の方法を用いて選択的に濃縮するために使用され得る。レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを使用する方法は、当技術分野で公知である（例えば、U.S.20030227611およびBauer et al., 2002を参照のこと）。

【0248】

濃縮後、細胞は、直ちに使用されるか、または当技術分野で公知の手法を用いて樹状細胞および／またはその前駆体の数を増やすためにインビトロで培養され得る。さらに、成熟樹状細胞を生じさせるために、樹状細胞前駆体は培養され得る。

【0249】

5B6リガンドと結合する化合物の同定

スペクトリンまたはRNF41などの5B6リガンドと結合する化合物を同定することができる、被験化合物のスクリーニングの方法は記載されており、本発明の方法において有用である。

【0250】

5B6リガンドの活性の阻害物質は、5B6リガンドと結合することができ、その結果としてその生物活性を阻害することができる薬物を同定する上で有用なアッセイおよび手法の行使によってスクリーニングされる。そのようなアッセイには、5B6リガンドを発現させるためのファージディスプレイシステムのための哺乳動物細胞株（例えば、CHO細胞または293T細胞）の使用、および、見込みのある結合性化合物の結合試験のためのタンパク質を産生させるために、トランスフェクトされた哺乳動物細胞または大腸菌もしくは他の微生物を用いることが含まれる。

【0251】

別の例として、5B6リガンドと特異的に結合する化合物を同定するための1つの方法は、被験化合物とリガンドとの結合が可能になるように、リガンドを発現する選択された細胞を被験化合物と接触させる段階、および、リガンドと結合する被験化合物がもしあればその量を決定する段階を単に含む。そのような方法は、被験化合物と固体支持体上に固定化

されたりガンドとのインキュベーションを伴う。典型的には、固定化された化合物を含む表面を、タンパク質を含む溶液と接触するようにさせ、適切な任意の適切な検出システムを用いて結合を判定する。適した検出システムは当技術分野で公知であり、そのいくつかは本明細書に記載されている。

【0252】

コンピュータモデリングおよび検索の技術は、5B6リガンドと結合しうる化合物の同定を可能にする。5B6リガンドまたはその活性部位の三次元幾何構造を決定することができる。これは、完全な分子構造を決定することができる、X線結晶学を含む公知の方法によって行うことができる。

【0253】

コンピュータ利用による数値モデリングの方法は、構造（例えば、不完全な、または正確さが十分でない構造が決定される態様において）を完成させるため、またはその精度を向上させるために用いることができる。タンパク質もしくは核酸などの特定の生体高分子に対して特異的なパラメーター化モデル、分子の動きの計算に基づく分子動態モデル、熱アンサンブルに基づく統計力学モデル、または複合モデルを非限定的に含む、当技術分野で認知されている任意の方法を用いることができる。

【0254】

5B6リガンドの三次元構造は、GRAM、DOCKまたはAUTODOCK (Dunbrack et al, 1997) などのドッキングプログラムを用いたコンピュータモデリングの使用を通じて、アンタゴニストまたはアゴニストを同定するために用いることができる。また、コンピュータプログラムを、候補化合物とポリペプチドとの引力、斥力および立体障害を予測するために用いることもできる。一般に、適合が強固である（例えば、立体障害がより少ない、および／または引力がより大きい）ほど、これらの特性はより強固な結合定数に一致することから、見込みのあるアゴニストまたはアンタゴニストはより効力が大きいと考えられる。さらに、見込みのあるアゴニストまたはアンタゴニストの設計における特異性がより高いほど、それが他のタンパク質と干渉する可能性はより低いと考えられる。

【0255】

最初に、見込みのある化合物を、例えば、組換えバクテリオファージによって作製されるランダムペプチドライブラリーまたは化学ライブラリーのスクリーニングなどによって入手することが可能と考えられる。続いて、このようにして選択された化合物を、1つまたは複数の有望な見込みのある化合物が同定されるまで、コンピュータモデリングプログラムによって系統的に修飾する。

【0256】

そのようなコンピュータモデリングは、作り出しうると考えられる無数の本質的にランダムな化学修飾とは反対に、有限数の合理的化学修飾の選択を可能にし、その中の任意のものが有用なアゴニストまたはアンタゴニストを導きうる可能性があると考えられる。それぞれの化学修飾は、追加の化学的段階を必要とし、それは有限数の化合物の合成については妥当であるが、見込みのあるすべての修飾物を合成する必要があるならば直ちに手に負えなくなる。このため、三次元構造モデリングおよびコンピュータモデリングの使用により、これらの多数の化合物をコンピュータのモニタスクリーン上で迅速にスクリーニングすることができ、無数の化合物を労力をかけて合成することなしに、可能性のある少数の候補化合物を決定することができる。

【0257】

ほとんどの型のモデルについては、構成原子および原子団の間の力を表す標準的な分子力場が必要であり、物理化学で公知な力場から選択することができる。当技術分野で公知であり、そのような方法に用いることができる例示的な力場には、定原子価 (Constant Valence) 力場 (CVFF)、AMBER力場およびCHARM力場が非限定的に含まれる。不完全な、またはより正確でない試行的構造は、これらのモデリング方法によって計算される完全でより正確な構造に対する拘束条件として役立てることができる。

【0258】

分子モデリングシステムのさらなる例には、CHARMmプログラムおよびQUANTAプログラム (Polygen Corporation, Waltham, MA) がある。CHARMmはエネルギー最小化および分子動態学の機能を実行する。QUANTAは分子構造の構築、グラフィックモデリングおよび解析を実行する。QUANTAは分子相互の挙動の対話型構築、修飾、可視化および解析を可能にする。

【0259】

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞に関連する疾患

破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞に関連する疾患の例としては、以下が挙げられるが、これらに必ずしも限定されない：

1) 生体防御を担う免疫系の細胞によって発生されるシグナルに応答してアポトーシスが誘導される疾患、例えば、移植片対宿主病 (GVHD) および自己免疫疾患 (全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ (RA)、強皮症、シェーグレン症候群、多発性硬化症、インスリン依存型糖尿病、潰瘍性大腸炎)。

2) 細胞死がウイルス感染によって誘導されるか、またはアポトーシスがウイルスもしくは寄生虫感染によって感染された細胞と免疫系の細胞との反応によって誘導される疾患、例えば、ウイルス性血球貪食症候群 (VAHS) および他のウイルス感染症 (HCV、HIV、インフルエンザウイルス)。

3) 異常なアポトーシスシグナルによって細胞死が誘導される疾患、例えば、神経変性疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病)。

4) 白血病、例えば、急性リンパ性白血病。

5) アポトーシスが、例えば、放射線被爆または投薬 (抗癌剤など) によって人為的に誘導される疾患。

6) 全身性炎症反応症候群 (SIRS)、生体への侵入に応答して免疫系が非特異的に活性化されてサイトカイン産生の制御が不可能となることによって臓器障害が生じる疾患 (HPS、重症肺炎)。

7) 細胞死が欠如している疾患、例えば、癌。

8) 損傷、特に、損傷後の回復。

【0260】

生体中における細胞死進行は、本発明を使用して測定され得、従って、これらの疾患の進行がモニタリングされ得る。特に、本発明は、GVHD、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、血球貪食症候群 (HPS)、特に、ウイルス性血球貪食症候群 (VAHS)、急性リンパ性白血病、インフルエンザ脳炎、脳症、およびマラリアに有用である。

【0261】

ポリペプチド

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は一般に互換的に用いられ、単一のポリペプチド鎖のことを指すが、それは非アミノ酸基の付加によって修飾されてもよく、修飾されていなくてもよい。そのようなポリペプチド鎖は、他のポリペプチドもしくはタンパク質、または補因子などの他の分子と会合してもよい。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、本明細書で用いる場合、本明細書に記載したポリペプチドの変異体、突然変異体、生物活性断片、修飾物、類似体および／または誘導体も含む。

【0262】

ポリペプチドの一致率 (%identity) は、GAP (Needleman and Wunsch, 1970) 分析 (GCGプログラム) によって、ギャップクリエーションペナルティ (gap creation penalty) = 5 およびギャップ伸長ペナルティ = 0.3 を用いて決定される。クエリー配列は少なくとも 25 アミノ酸長であり、GAP 分析は 2 つの配列を少なくとも 25 アミノ酸の領域にわたって整列化する。より好ましくは、クエリー配列は少なくとも 50 アミノ酸長であり、GAP 分析は 2 つの配列を少なくとも 50 アミノ酸の領域にわたって整列化する。より好ましくは、クエリー配列は少なくとも 100 アミノ酸長であり、GAP 分析は 2 つの配列を少なくとも 100 アミノ酸の

10

20

30

40

50

領域にわたって整列化する。さらにより好ましくは、クエリー配列は少なくとも200アミノ酸長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも200アミノ酸の領域にわたって整列化する。さらにより好ましくは、GAP分析は2つの配列をその全長にわたって整列化する。

【0263】

本明細書で用いる場合、「生物活性断片」とは、完全長ポリペプチドの規定された活性を維持している、本明細書に記載したようなポリペプチドの一部である。生物活性断片は、それらが規定された活性を維持している限り、任意のサイズであってよい。好ましくは、生物活性断片は、少なくとも100アミノ酸長である。スペクトリンおよびRN41などの5B6のリガンドに関して、好ましい生物活性は、Clec9Aへの結合である。

【0264】

ある態様において、SEQ ID NO:1~8のいずれか1つまたは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列を含む第2ポリペプチドは、SEQ ID NO:1~8のうちの1つの生物活性および／または可溶性断片であるか、またはこれを含む。本明細書で用いる場合、「可溶性断片」とは、膜貫通領域を欠いているポリペプチドの部分を指す。好ましい態様において、可溶性断片は、少なくとも約40個、少なくとも約50個、少なくとも約55個、または少なくとも約100個の、SEQ ID NO:1~8のいずれか1つのN末端残基を含まない。さらに好ましい態様において、可溶性断片は、以下を含むポリペプチドのC型レクチン様ドメインを含む：

i) SEQ ID NO:1~8のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；または

ii) SEQ ID NO:1~8のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列。さらなる態様において、可溶性断片は、以下を含む：

i) SEQ ID NO:40~47のいずれか1つに提示されたアミノ酸配列；または

ii) SEQ ID NO:40~47のいずれか1つもしくは複数に対して少なくとも50%同一なアミノ酸配列、

ここで、可溶性断片は、少なくとも約40個の、SEQ ID NO:1~8のいずれか1つのN末端残基を含まない。

【0265】

定義したポリペプチドに関して、以上に提示したものを上回る数値を示す一致率が、好ましい態様の範囲に含まれることは理解され则认为られる。したがって、適用可能な場合には、最小限の一致率の数値に照らし合わせて、ポリペプチドは、関連する指定したSEQ ID NOに対して少なくとも50%、より好ましくは少なくとも55%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ましくは少なくとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.1%、より好ましくは少なくとも99.2%、より好ましくは少なくとも99.3%、より好ましくは少なくとも99.4%、より好ましくは少なくとも99.5%、より好ましくは少なくとも99.6%、より好ましくは少なくとも99.7%、より好ましくは少なくとも99.8%、さらにより好ましくは少なくとも99.9%同一なアミノ酸配列を含むことが好ましい。

【0266】

本明細書に記載したポリペプチドのアミノ酸配列突然変異体は、本明細書で定義した核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することによって、または所望のポリペプチドのインビトロ合成によって調製することができる。そのような突然変異体は、アミノ酸配列内部の残基の欠失、挿入または置換を含む。最終的なタンパク質産物が所望の特徴を有することを条件として、最終構築物に達するために欠失、挿入および置換の組み合わせを実施することができる。

【0267】

突然変異体（改変）ポリペプチドは、当技術分野で公知の任意の手法を用いて調製する

10

20

30

40

50

ことができる。例えば、本明細書に記載したポリヌクレオチドを、インビトロ突然変異誘発にかけることができる。そのようなインビトロ突然変異誘発法は、ポリヌクレオチドに適したベクター中にサブクローニングする段階、ベクターを大腸菌XL-1 red (Stratagene) などの「突然変異誘発物 (mutator)」系統に形質転換導入する段階、および形質転換された細菌に適した世代数だけ増殖させる段階を含みうる。別の例では、本明細書で定義するポリヌクレオチドを、Harayama (1998) によって広く記載されているDNAシャフリング法にかける。突然変異した／改変されたDNAに由来する産物を、それらが所望の表現型を付与しうるか否かを判定するために、本明細書に記載した手法を用いて直ちにスクリーニングすることができる。

【0268】

10

アミノ酸配列突然変異体の設計において、突然変異部位の位置および突然変異の性質は、改変しようとする特徴に依存すると考えられる。突然変異のための部位は、例えば(1) まず保存的アミノ酸選択範囲での置換、続いて達成された結果に応じたより根本的な選択部での置換、(2) 標的残基の欠失、または(3) 位置特定された部位に隣接させての他の残基の挿入によって、個別的にまたは連続して改変することができる。

【0269】

アミノ酸配列の欠失は一般に、約1～15残基、より好ましくは約1～10残基、典型的に約1～5個の連続した残基の範囲にわたる。

【0270】

20

置換突然変異体は、ポリペプチド分子中に、除去された少なくとも1つのアミノ酸残基、およびその場所に挿入された異なる残基を有する。置換突然変異誘発に関して最大の関心対象となる部位には、機能に関して重要であると同定された部位が含まれる。関心対象の他の部位には、さまざまな系統もしくは種から得られる特定の残基が同一であるもの、および／または関連タンパク質から得られる特定の残基が同一であるものが含まれる。これらの位置は生物活性にとって重要な可能性がある。これらの部位、特に少なくとも3つの他の同一に保存された部位のある配列中に含まれるものを、好ましくは、比較的保存的な様式で置換する。そのような保存的置換は表1に示されている。

【0271】

(表1) 例示的な置換

元の残基	例示的置換
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

10

20

30

【0272】

さらに、必要であれば、非天然アミノ酸または化学的アミノ酸類似体を、本明細書に記載したポリペプチドに置換または付加として導入することもできる。そのようなアミノ酸には、一般的アミノ酸のD-異性体、2,4-ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4-アミノ酪酸、2-アミノ酪酸、6-アミノヘキサニン酸、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、 β -アラニン、フルオロ-アミノ酸、遺伝子工学により改造された (designer) アミノ酸、例えば β -メチルアミノ酸、 $C\alpha$ -メチルアミノ酸、 $N\alpha$ -メチルアミノ酸およびアミノ酸類似体全般などが非限定的に含まれる。

40

【0273】

同じく本発明の範囲に含まれるものには、合成中または合成後に、例えば、ビオチン化、ベンジル化、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質加水分解切断、抗体分子または他の細胞リガンドとの連結などによって、異なるように修飾されたポリペプチドの使用がある。これらの修飾は、ポリペプチドの安定性および／または生物活性を高めるために役立つ可能性がある。

【0274】

本明細書に記載したポリペプチドは、天然ポリペプチドの産生および回収、組換えポリ

50

ペプチドの産生および回収、ならびにポリペプチドの化学合成を含む、種々のやり方で産生することができる。1つの態様において、単離された本発明のポリペプチドは、ポリペプチドを産生させるのに有効な条件下でポリペプチドを発現しうる細胞を培養して、ポリペプチドを回収することによって産生される。培養のために好ましい細胞は、本発明の組換え細胞である。有効な培養条件には、ポリペプチド産生を可能にする有効な培地、バイオリアクター、温度、pHおよび酸素の条件が非限定的に含まれる。有効な培地とは、細胞が培養されて本発明のポリペプチドを産生するような任意の培地のことを指す。そのような培地は、典型的には、同化しうる炭素、窒素およびリンの供給源、ならびに適切な塩、ミネラル、金属および他の栄養分、例えばビタミンなどを有する水性培地を含む。本発明の細胞は、従来の発酵バイオリアクター、組織培養フラスコ、振盪フラスコ、試験管、マイクロタイターディッシュおよびペトリ皿などの中で培養することができる。培養は、組換え細胞にとって適切な温度、pHおよび酸素含量で行うことができる。そのような培養条件は当業者の専門技術の範囲内にある。

10

【0275】

ポリヌクレオチド

「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書において、「核酸」という用語と互換的に用いられる。

【0276】

ポリヌクレオチドの一致率は、GAP (Needleman and Wunsch, 1970) 分析 (GCGプログラム) により、ギャップクリエーションペナルティ=5およびギャップ伸長ペナルティ=0.3を用いて決定される。別に指定する場合を除き、クエリー配列は少なくとも45ヌクレオチド長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも45ヌクレオチドの領域にわたって整列化する。好ましくは、クエリー配列は少なくとも150ヌクレオチド長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも150ヌクレオチドの領域にわたって整列化する。より好ましくは、クエリー配列は少なくとも250ヌクレオチド長であり、GAP分析は2つの配列を少なくとも250ヌクレオチド長の領域にわたって整列化する。さらにより好ましくは、GAP分析は2つの配列をその全長にわたって整列化する。

20

【0277】

定義したポリヌクレオチドに関して、以上に提示したものを上回る数値を示す一致率が、好ましい態様の範囲に含まれることは理解され则认为られる。したがって、適用可能な場合には、最小限の一致率の数値に照らし合わせて、本明細書で定義するポリヌクレオチドは、関連する指定したSEQ ID NOに対して少なくとも50%、より好ましくは少なくとも55%、より好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも65%、より好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも91%、より好ましくは少なくとも92%、より好ましくは少なくとも93%、より好ましくは少なくとも94%、より好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも96%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%、より好ましくは少なくとも99.1%、より好ましくは少なくとも99.2%、より好ましくは少なくとも99.3%、より好ましくは少なくとも99.4%、より好ましくは少なくとも99.5%、より好ましくは少なくとも99.6%、より好ましくは少なくとも99.7%、より好ましくは少なくとも99.8%、さらにより好ましくは少なくとも99.9%同一な配列を含むことが好ましい。

30

40

【0278】

本明細書で用いる場合、「ハイブリダイズする」という用語は、2つの一本鎖核酸分子が、少なくとも部分的に二本鎖である核酸を水素結合を通じて形成しうることを指す。

【0279】

本明細書で用いる場合、「ストリンジェントな条件」という語句は、ポリヌクレオチド、プローブ、プライマーおよび／またはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、他の配列にはハイブリダイズしないと考えられる条件のことを指す。スト

50

リンジェントな条件は配列依存的であり、環境が異なれば異なると考えられる。長い配列は短い配列よりも高い温度で特異的にハイブリダイズすると考えられる。一般に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度およびpHでの特定の配列の熱融点 (T_m) よりも約 5°C 低くなるように選択する。 T_m は、標的に対して相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度 (規定のイオン強度、pHおよび核酸濃度の下で) である。標的配列は一般に過剰に存在するため、 T_m では平衡状態でプローブの50%が占有される。典型的には、ストリンジェントな条件は、塩濃度がナトリウムイオン濃度で約1.0M未満、典型的にはナトリウムイオン (または他の塩の) 濃度で約0.01~1.0M、pH7.0~8.3であり、温度は短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド (例えば、10~50ヌクレオチド) に関しては少なくとも約 30°C であり、より長いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドに関しては少なくとも約 60°C であると考えられる。ストリンジェントな条件を、ホルムアミドなどの脱安定剤の添加によって達成することもできる。

【0280】

ストリンジェントな条件は当業者に公知であり、Ausubel et al. (前記)、6.3.1-6.3.6、ならびに本明細書に記載した実施例に記載がある。好ましくは、条件は、互いに少なくとも約65%、70%、75%、85%、90%、95%、98%または99%相同な配列が、典型的には互いにハイブリダイズしたままに保たれるようなものである。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な一例は、6×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSAおよび500mg/mlの変性サケ精子DNAを含む高塩濃度緩衝液中、 65°C でのハイブリダイゼーションに続く、0.2×SSC、0.01% BSA中、 50°C での1回または複数回の洗浄である。もう1つの態様においては、中等度ストリンジェンシーの条件下で、SEQ ID NO: 81~113のヌクレオチド配列を含む核酸分子の1つまたは複数にハイブリダイズしうる核酸配列が提供される。中等度ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の非限定的な一例は、6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100mg/mlの変性サケ精子DNA中、 55°C でのハイブリダイゼーションに続く、1×SSC、0.1% SDS中、 37°C での1回または複数回の洗浄である。用いうる中等度ストリンジェンシーの他の条件は当技術分野で周知であり、例えば、Ausubel et al. (前記) およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, (1990)を参照されたい。さらにもう1つの態様においては、SEQ ID NO: 81~113のヌクレオチド配列のいずれか1つまたは複数を含む核酸分子にハイブリダイズしうる核酸が提供される。低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の非限定的な一例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100mg/mlの変性サケ精子DNA、10% (wt/vol) デキストラン硫酸中、 40°C でのハイブリダイゼーションに続く、2×SSC、25mM Tris-HCl (pH 7.4)、5mM EDTAおよび0.1% SDS中、 50°C での1回または複数回の洗浄である。用いうる低ストリンジェンシーの他の条件は当技術分野で周知であり、例えば、Ausubel et al. (前記) およびKriegler (前記) を参照されたい。

【0281】

ポリヌクレオチドは、天然に存在する分子と比較して、ヌクレオチド残基の欠失、挿入または置換である1つまたは複数の突然変異を有してもよい。突然変異体は天然に存在する (すなわち、天然供給源から単離された) ものでもよく、または合成性でもよい (例えば、核酸に対する部位指定突然変異誘発による)。

【0282】

通常は、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのモノマーをホスホジエステル結合またはその類似体によって連結して、サイズが比較的短いモノマー単位、例えば12~18個から数百個のモノマー単位までの範囲にわたるオリゴヌクレオチドを形成させる。ホスホジエステル結合の類似体には以下が含まれる: ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデートおよびホスホルアミデート。

【0283】

アンチセンスポリヌクレオチド

「アンチセンスポリヌクレオチド」という用語は、ポリペプチドをコードする特定のmRNA分子の少なくとも一部分に対して相補的であり、mRNA翻訳などの転写後イベントに干渉することができる、DNAまたはRNAまたはそれらの組み合わせの分子を意味すると解釈されるものとする。アンチセンス方法の使用は当技術分野で周知である（例えば、G. Hartman and S. Endres, Manual of Antisense Methodology, Kluwer (1999)を参照）。植物におけるアンチセンス手法の使用は、Bourque, 1995およびSenior, 1998によって総説されている。Bourque, 1995は、アンチセンス配列が植物系における遺伝子不活性化の方法としてどのように利用されてきたかという例を数多く挙げている。また、任意の酵素活性の100%阻害を達成することは必ずしも必要でなく、部分的阻害でも系における測定可能な変化をもたらす可能性がかなり高いという記述も参照されたい。Senior (1998) は、現在ではアンチセンス方法が遺伝子発現を操作するための極めて十分に確立された手法であると述べている。

10

【0284】

本発明に有用なアンチセンスポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドに生理的条件下でハイブリダイズすると考えられる。本明細書で用いる場合、「生理的条件下でハイブリダイズするアンチセンスポリヌクレオチド」という用語は、ポリヌクレオチド（完全または部分的に一本鎖である）が、細胞内、好ましくはヒト細胞内で通常の条件下で、SEQ ID NO: 81~113のいずれか1つに提示されたものなどのタンパク質をコードするmRNAと二本鎖ポリヌクレオチドを形成することが少なくとも可能であることを意味する。

20

【0285】

アンチセンス分子は、構造遺伝子に対応する配列、または遺伝子発現もしくはスプライシングイベントに対する制御をもたらす配列を含むことができる。例えば、アンチセンス配列は、標的遺伝子のターゲティングされたコード領域、または5'-非翻訳領域（UTR）もしくは3'-UTR、またはこれらの組み合わせに対応してもよい。それは一部には、転写中または転写後にスプライシングで除去されられると思われるイントロン配列に対して相補的であってもよいが、好ましくは標的遺伝子のエクソン配列のみに対して相補的である。UTRの多様性が一般に大きいことに鑑みれば、これらの領域を標的とすることで遺伝子阻害のより大きな特異性が得られる。

【0286】

アンチセンス配列の長さは、少なくとも19個の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも50ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも100、200、500または1000ヌクレオチドであるべきである。遺伝子転写物の全体に対して相補的な完全長配列を用いることもできる。その長さは最も好ましくは100~2000ヌクレオチドである。ターゲティングされる転写物に対するアンチセンス配列の同一性の度合いは、少なくとも90%、より好ましくは95~100%であるべきである。アンチセンスRNA分子は当然ながら、分子を安定化するために機能しうる無関係な配列を含んでもよい。

30

【0287】

触媒性ポリヌクレオチド

触媒性ポリヌクレオチド／核酸という用語は、異なる基質を特異的に認識してこの基質の化学修飾を触媒する、DNA分子もしくはDNA含有分子（当技術分野では「デオキシリボザイム」としても知られる）またはRNA分子もしくはRNA含有分子（「リボザイム」としても知られる）のことを指す。触媒性核酸中の核酸塩基は、塩基A、C、G、T（およびRNAの場合はU）でありうる。

40

【0288】

典型的には、触媒性核酸は、標的核酸の特異的認識のためのアンチセンス配列、および核酸を切断する酵素活性（本明細書では「触媒ドメイン」とも称する）を含む。本発明において特に有用なリボザイムの型は、ハンマーヘッド型リボザイム（Haseloff and Gerlach, 1988; Perriman et al., 1992）およびヘアピン型リボザイム（Shippy et al., 1999）である。

50

【0289】

本発明に有用なリボザイムおよびリボザイムをコードするDNAは、当技術分野で周知の方法を用いて化学合成することができる。また、リボザイムを、RNAポリメラーゼプロモーター、例えばT7 RNAポリメラーゼまたはSP6 RNAポリメラーゼのプロモーターと機能的に連結されたDNA分子（転写されるとRNA分子を生じる）から調製することもできる。ベクターが、DNA分子と機能的に連結されたRNAポリメラーゼプロモーターも含む場合には、RNAポリメラーゼおよびヌクレオチドとのインキュベーションによってリボザイムをインビトロで生成させることができる。1つの別の態様では、DNAを発現カセットまたは転写カセット中に挿入することができる。合成後に、RNA分子を、リボザイムを安定化してそれをRNAアーゼに対して抵抗性にする能力を有するDNA分子との連結によって修飾することができる。 10

【0290】

本明細書に記載したアンチセンスポリヌクレオチドの場合と同じく、本発明に有用な触媒性ポリヌクレオチドも、「生理的条件」下、すなわち細胞内部の条件（特にヒト細胞などの動物細胞内部の条件）下で、標的核酸分子（例えば、SEQ ID NO: 81~113に提示されたいずれかのポリペプチドをコードするmRNA）とハイブリダイズしうるべきである。

【0291】

RNA干渉

RNA干渉（RNAi）は、特定のタンパク質の産生を特異的に阻害するために特に有用である。理論に制約されることは望まないが、Waterhouse et al. (1998) は、dsRNA（二重鎖RNA）を用いてタンパク質産生を低下させることができる機序に関するモデルを提示している。この技術は、関心対象の遺伝子のmRNAまたはその一部、この場合には本発明によるポリペプチドをコードするmRNAと本質的に同一な配列を含むdsRNA分子の存在に依拠している。簡便には、dsRNAは、センス配列およびアンチセンス配列が、センス配列およびアンチセンス配列をハイブリダイズさせてループ構造を形成する無関係な配列を有するdsRNA分子を形成させることを可能にする無関係な配列に隣接している、組換えベクターまたは宿主細胞内で単一のプロモーターから産生させることができる。本発明に適したdsRNA分子の設計および作製は、特にWaterhouse et al. (1998)、Smith et al. (2000)、WO 99/32619、WO 99/53050、WO 99/49029およびWO 01/34815を考慮すれば、十分に当業者の能力の範囲内にある。 20 30

【0292】

1つの例では、不活性化しようとする標的遺伝子に対する相同性を有する、少なくとも部分的に二本鎖であるRNA産物の合成を導くDNAを導入する。このため、このDNAは、RNAへと転写された場合にハイブリダイズして二本鎖RNA領域を形成することができる、センス配列およびアンチセンス配列の両方を含む。1つの好ましい態様において、センス配列およびアンチセンス配列は、RNAへと転写された場合にスプライシングで除去されるイントロンを含む、スパーサー領域によって隔てられる。この配置は、より高い効率での遺伝子サイレンシングをもたらすことが示されている。二本鎖領域は、1つのDNA領域または2つのそれから転写される、1つまたは2つのRNA分子を含みうる。二本鎖分子の存在は、二本鎖RNA、さらには標的植物遺伝子からの相同的RNA転写物の両方を破壊して、標的遺伝子の活性を有効に低下または消失させることができる、内因性植物系からの応答を誘発すると考えられている。 40

【0293】

ハイブリダイズするセンス配列およびアンチセンス配列の長さは、それぞれ少なくとも19個の連続したヌクレオチド、好ましくは少なくとも30または50ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも100、200、500または1000ヌクレオチドであるべきである。遺伝子転写物の全体に対応する完全長配列を用いることもできる。その長さは最も好ましくは100~2000ヌクレオチドである。ターゲティングされる転写物に対するセンス配列およびアンチセンス配列の同一性の度合いは、少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95~100%であるべきである。アンチセンスRNA分子は当然ながら、分子を安定化するために機 50

能しうる無関係な配列を含んでもよい。RNA分子は、RNAポリメラーゼIIプロモーターまたはRNAポリメラーゼIIIプロモーターの制御下で発現させることができる。後者の例には、tRNAプロモーターまたはsnRNAプロモーターが含まれる。

【0294】

好ましい短鎖干渉性RNA（「siRNA」）分子は、標的mRNAの約19～21個の連続したヌクレオチドと同一なヌクレオチド配列を含む。好ましくは、標的mRNA配列は、ジヌクレオチドAAで始まり、GC含量は約30～70%（好ましくは、30～60%、より好ましくは40～15%、より好ましくは約45%～55%）であり、それを導入しようとする動物（好ましくはヒト）のゲノム中の標的以外のいかなるヌクレオチド配列に対しても、例えば、標準的なBLAST検索による判定で、高い一致率を有しない。

【0295】

マイクロRNA

マイクロRNA調節は、従来のRNAi／PTGSから逸脱して、遺伝子調節に向けて進化した、RNAサイレンシング経路の明らかに特殊化した分枝路である。マイクロRNAは、特徴的な逆向き反復配列として構成された遺伝子様エレメント中にコードされる特定クラスの低分子RNAである。転写されると、マイクロRNA遺伝子はステムループを形成した前駆体RNAを生じ、その後にそれからマイクロRNAがプロセッシングされる。マイクロRNAは典型的には約21ヌクレオチド長である。放出されたmiRNAは、配列特異的な遺伝子抑圧を発揮するアルゴノートタンパク質の特定のサブセットを含む、RISC様複合体中に組み入れられる（例えば、Millar and Waterhouse, 2005；Pasquinelli et al, 2005；Almeida and Allshire, 2005を参照）。

【0296】

共抑制

用いる別の分子生物学的アプローチは共抑制である。共抑制の機序は十分には解明されていないが、転写後遺伝子サイレンシング（PTGS）を伴うと考えられており、その点でアンチセンス抑制の多くの例と非常に類似している。これは、植物の中に、ある遺伝子の余分な1コピーまたはその断片をその発現のためのプロモーターに対してセンスの向きに導入することを伴う。センス断片のサイズ、標的遺伝子領域に対するその対応関係、および標的遺伝子に対するその配列同一性の度合いは、アンチセンス配列に関して上述した通りである。場合によっては、遺伝子配列のこの追加のコピーは標的植物遺伝子の発現と干渉する。共抑制をアプローチ実行する方法については、WO 97/20936およびEP 0465572を参照されたい。

【0297】

組換えベクター

本発明に有用な組換えベクターは、ポリヌクレオチド分子を宿主細胞内に送達することができる任意のベクター中に挿入された、本明細書に記載した少なくとも1つのポリヌクレオチド分子、および／または本明細書に記載したポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。そのようなベクターは、天然では本発明のポリヌクレオチド分子に隣接して認められず、好ましくはポリヌクレオチド分子の由来である種以外の種に由来するポリヌクレオチド配列である、異種ポリヌクレオチド配列を含む。ベクターは、RNAまたはDNA、原核生物性または真核生物性のいずれでもよく、典型的にはトランスポゾン（米国特許第5,792,294号に記載されたものなど）、ウイルスまたはプラスミドである。

【0298】

組換えベクターの一つの型は、発現ベクターと機能的に連結されたポリヌクレオチドを含む。機能的に連結されたという語句は、分子が宿主細胞内に形質転換導入された時に発現されうるような様式での、発現ベクター中へのポリヌクレオチド分子の挿入のことを指す。本明細書で用いる場合、発現ベクターとは、宿主細胞を形質転換させて、指定のポリヌクレオチド分子の発現を生じさせることができる、DNAベクターまたはRNAベクターのことである。好ましくは、発現ベクターは宿主細胞内で複製可能である。発現ベクターは原核生物性または真核生物性のいずれでもよく、典型的にはウイルスまたはプラスミドであ

る。発現ベクターには、細菌細胞、真菌細胞、内部寄生生物細胞、節足動物細胞、動物細胞および植物細胞を含む組換え細胞において機能する（すなわち、遺伝子発現を導く）任意のベクターが含まれる。ベクターはまた、無細胞発現系においてポリペプチドを産生するために用いることもでき、そのような系は当技術分野で周知である。

【0299】

「機能的に連結された」とは、本明細書で用いる場合、2つまたはそれ以上の核酸（例えば、DNA）セグメント間の機能的関係のことを指す。典型的には、それは転写調節エレメントと転写される配列との機能的関係のことを指す。例えば、プロモーターは、それが適切な宿主細胞および／または無細胞発現系におけるコード配列の転写を刺激または調節する場合には、本明細書で定義したポリヌクレオチドなどのコード配列と機能的に連結されている。一般に、転写される配列と機能的に連結されたプロモーター転写調節エレメントは、転写される配列と物理的に連続しており、すなわち、それらはシス作用性である。しかし、エンハンサーなどの一部の転写調節エレメントは、それらが転写を強化するコード配列と物理的に連続していること、または近接して位置することは必ずしも必要でない。

10

【0300】

特に、発現ベクターは、転写制御配列、翻訳制御配列、複製起点、および組換え細胞と適合性であり、かつ本発明のポリヌクレオチド分子の発現を制御する他の調節配列などの調節配列を含む。特に、本発明の組換え分子は転写制御配列を含む。転写制御配列とは、転写の開始、伸長および終結を制御する配列のことである。特に重要な転写制御配列は、プロモーター、エンハンサー、オペレーターおよびレプレッサー配列といった、転写開始を制御するものである。適した転写制御配列には、本発明の組換え細胞の少なくとも1つにおいて機能する任意の転写制御配列が含まれる。そのような種々の転写制御配列が当業者に公知である。好ましい転写制御配列には、細菌細胞、酵母細胞、節足動物細胞、線虫細胞、植物細胞または動物細胞において機能するものが含まれ、これには例えば、tac、lac、trp、trc、oxy-pro、omp/lpp、rrnB、バクテリオファージλ、バクテリオファージT7、T7lac、バクテリオファージT3、バクテリオファージSP6、バクテリオファージSP01、メタロチオネイン、α-接合因子、ピキア属（*Pichia*）アルコールオキシダーゼ、アルファウイルスのサブゲノムプロモーター（シンドビスウイルスのサブゲノムプロモーターなど）、抗生物質耐性遺伝子、バキュロウイルス、ヘリオチス-ゼア（*Heliothis zea*）昆虫ウイルス、ワクシニアウイルス、ヘルペスウイルス、アライグマボックスウイルス、他のボックスウイルス、アデノウイルス、サイトメガロウイルス（中間初期（intermediate early）プロモーターなど）、シミアンウイルス40、レトロウイルス、アクチン、レトロウイルス長末端反復配列、ラウス肉腫ウイルス、熱ショック、リン酸および硝酸による転写制御配列、ならびに原核細胞または真核細胞における遺伝子発現を制御することができる他の配列などがあるが、これらには限定されない。

20

30

【0301】

宿主細胞

本発明のある一定の態様に有用であるものは、本明細書に記載した1つまたは複数の組換え分子によって形質転換された宿主細胞、またはそれらの子孫細胞を含む、組換え細胞である。細胞内へのポリヌクレオチド分子の形質転換導入は、ポリヌクレオチド分子を細胞内に挿入することができる任意の方法によって達成しうる。形質転換の手法には、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着およびプロトプラスト融合が非限定的に含まれる。組換え細胞は単細胞であり続けてもよく、または組織、臓器もしくは多細胞生物体へと増殖させてもよい。本発明の形質転換導入されたポリヌクレオチド分子は、染色体外に保たれてもよく、または、それらが発現される能力が保たれるような様式で、形質転換（すなわち、組換え）細胞の染色体内部の1つもしくは複数の部位に組み込まれてもよい。

40

【0302】

形質転換のために適した宿主細胞には、本発明のポリヌクレオチドを用いて形質転換す

50

ることができる任意の細胞が含まれる。本発明の宿主細胞は、本明細書に記載したポリペプチドを内因性に（すなわち、天然で）産生することができてもよく、または、本明細書に記載した少なくとも1つのポリヌクレオチド分子によって形質転換された後にそのようなポリペプチドを産生することができてもよい。本発明の宿主細胞は、本明細書に記載した少なくとも1つのタンパク質を産生することができる任意の細胞であってよく、これには細菌細胞、真菌（酵母を含む）細胞、寄生生物細胞、線虫細胞、節足動物細胞、動物細胞および植物細胞が含まれる。宿主細胞の例には、サルモネラ属（*Salmonella*）、エシェリキア属（*Escherichia*）、バシラス属（*Bacillus*）、リステリア属（*Listeria*）、サッカロミセス属（*Saccharomyces*）、スポドプテラ属（*Spodoptera*）、マイコバクテリウム属（*Mycobacterium*）、トリコプルシア属（*Trichoplusia*）、BHK（ベビーハムスター腎臓）細胞、CHO細胞、293細胞、EL4細胞、MDCK細胞、CRFK細胞、CV-1細胞、COS（例えば、COS-7）細胞およびペロ細胞が含まれる。宿主細胞のさらなる例には、大腸菌K-12派生株を含む大腸菌；チフス菌（*Salmonella typhi*）；弱毒系統を含むネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）；ヨウトガ（*Spodoptera frugiperda*）；イラクサギンウワバ（*Trichoplusia ni*）；および非腫瘍形成性マウスG8筋芽細胞（例えば、ATCC CRL 1246）が含まれる。

10

【0303】

組換えDNA技術を用いることで、例えば、宿主細胞内のポリヌクレオチド分子のコピー数、それらのポリヌクレオチド分子が転写される効率、その結果生じる転写物が翻訳される効率、および翻訳後修飾の効率を操作することにより、形質転換導入されたポリヌクレオチド分子の発現を改善することができる。本発明のポリヌクレオチド分子の発現を増加させるために有用な組換え手法には、ポリヌクレオチド分子を高コピー数プラスミドと機能的に連結させること、1つまたは複数の宿主細胞染色体中へのポリヌクレオチド分子の組込み、プラスミドへのベクター安定性配列の付加、転写制御シグナル（例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー）の置換または改変、翻訳制御シグナル（例えば、リボソーム結合部位、シャイン-ダルガルノ配列）の置換または改変、宿主細胞のコドン使用に対応する本発明のポリヌクレオチド分子の改変、および転写物を不安定化する配列の削除が非限定的に含まれる。

20

【0304】

遺伝子治療

本明細書に記載した治療用ポリヌクレオチド分子は、「遺伝子治療」としばしば称される治療様式におけるその種のポリヌクレオチドの発現により、本発明に従って用いることができる。例えば、本発明の化合物をコードするポリヌクレオチド、または細胞における5B6リガンドの産生を上方制御もしくは下方制御するポリヌクレオチドを、例えば疾患の治療および／または免疫応答を調節するための遺伝子治療に用いることができる。すなわち、患者からの細胞を、DNAまたはRNAなどのポリヌクレオチドがポリペプチドをコードするようにエキスピボで人為的に操作する。続いて、人為的に操作された細胞を、そのポリヌクレオチドによって治療しようとする患者に与えることができる。この態様において、細胞は、例えば、幹細胞または分化した幹細胞を形質転換するために用いることができる、本明細書に記載したポリペプチドをコードするRNAを含むレトロウイルスプラスミドベクターの使用によって、エキスピボで人為的に操作してもよい。そのような方法は当技術分野で周知であり、本発明におけるそれらの使用は本明細書における教示から明らかであると考えられる。

30

40

【0305】

さらに、細胞を、インビボでのポリペプチドの発現のために、当技術分野で公知の手順によってインビボで人為的に操作してもよい。例えば、本明細書に記載したポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、複製能が欠損したレトロウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターまたは他のベクター（例えば、ポックスウイルスベクター）における発現のために人為的に操作してもよい。続いて、発現構築物を単離することができる。パッケージング細胞に対して、ヒト5B6の可溶性断片などの本明細書に記載したポリペプチ

50

ドをコードするRNAを含むプラスミドベクターによる形質導入を行って、パッケージング細胞が関心対象の遺伝子を含む感染性ウイルス粒子を産生するようにする。これらの産生細胞を、インビボでの細胞の人為的に操作およびインビボでのポリペプチドの発現のために患者に投与することができる。ポリペプチドを投与するためのこれらの方法および他の方法は、本発明の教示により、当業者には明らかなはずである。

【0306】

本明細書中に上述したレトロウイルスプラスミドベクターを得ることができるレトロウイルスには、モロニーマウス白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、アデノウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルスおよび乳腺癌ウイルスが非限定的に含まれる。1つの好ましい態様において、レトロウイルスプラスミドベクターはモロニーマウス白血病ウイルスから得られる。

【0307】

そのようなベクターは、ポリペプチドを発現させるための1つまたは複数のプロモーターを含むと考えられる。用いる適したプロモーターには、以下が非限定的に含まれる：レトロウイルスLTR；SV40プロモーター；およびヒトサイトメガロウイルス（CMV）プロモーター。ヒストン、RNAポリメラーゼIII、メタロチオネインプロモーター、熱ショックプロモーター、アルブミンプロモーター、5B6プロモーター、ヒトグロビンプロモーターおよびβ-アクチンプロモーターを非限定的に含む、真核生物細胞プロモーターなどの細胞プロモーターを用いることもできる。用いるそのほかのウイルス性プロモーターには、アデノウイルスプロモーター、チミジンキナーゼ（TK）プロモーターおよびB19パルボウイルスプロモーターが非限定的に含まれる。適したプロモーターの選択は、本明細書に含まれる教示から、当業者には明らかであると考えられる。

【0308】

レトロウイルスプラスミドベクターを用いてパッケージング細胞株に形質導入して、産生細胞株を形成させることができる。トランスフェクトさせることができるパッケージング細胞の例には、PE501、PA317、Y-2、Y-AM、PA12、T19-14X、VT-19-17-H2、YCRE、YCRIP、GP+E-86、GP+envAm12、およびMiller（1990）によって記載されたDAN細胞株が非限定的に含まれる。ベクターは、当技術分野で公知の任意の手段によってパッケージング細胞内に形質導入される。そのような手段には、エレクトポレーション、リポソームの使用、およびCaPO₄沈降が非限定的に含まれる。1つの代替法では、レトロウイルスプラスミドベクターをリポソーム中に封入するか、または脂質と結合させて、宿主に投与する。

【0309】

産生細胞株は、（例えば）ポリペプチドをコードする核酸配列を含む感染性レトロウイルスベクター粒子を生成すると考えられる。続いて、そのようなレトロウイルスベクター粒子を用いて、真核細胞にインビトロまたはインビボで形質導入する。形質導入された真核細胞は、ポリペプチドをコードする核酸配列を発現すると考えられる。形質導入を行う真核細胞には、胚性幹細胞、胚性癌細胞、ならびに造血幹細胞、肝細胞、線維芽細胞、筋芽細胞、ケラチノサイト、筋細胞（特に骨格筋細胞）、内皮細胞および気管支上皮細胞が含まれる。

【0310】

本発明による遺伝子治療は、患者における遺伝子治療用ポリヌクレオチドの一過性の（一時的な）存在、または患者へのポリヌクレオチドの永続的導入を伴いうる。

【0311】

本発明による、本明細書で考察した物質の直接投与のような遺伝子治療は、単独で用いてもよく、または他の治療様式とともに用いてもよい。

【0312】

薬学的組成物、投与量および投与経路

許容される担体または希釈剤とともに化合物を含む組成物は、本発明の方法において有用である。

10

20

30

40

50

【0313】

治療用組成物は、適切な純度を有する所望の成分を、任意で薬学的に許容される担体、添加剤または安定化剤と混合することにより、凍結乾燥製剤、水溶液または水性懸濁液の形態で調製することができる (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, O sol, A. ed. (1980))。許容される担体、添加剤または安定化剤は、好ましくは、用いられる投与量および濃度でレシピエントに対して無毒性であり、これには、Tris、HEPES、PIPES、リン酸、クエン酸および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンなどの抗酸化剤；保存料（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンを含む単糖類、二糖類および他の糖質；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；ならびに／または、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

10

【0314】

そのような担体のその他の例には、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えばヒト血清アルブミン、緩衝物質、例えばグリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、塩、または電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、および、セルロースを基にした物質が含まれる。

20

【0315】

インビボ投与のために用いようとする治療用組成物は、無菌であるべきである。これは、凍結乾燥および再構成の前または後での、無菌濾過膜を通しての濾過によって容易に達成される。組成物は、全身投与される場合には、凍結乾燥形態または溶液の状態で保存することができる。凍結乾燥形態にある場合、それは典型的には使用時点での適切な希釈剤による再構成用の他の成分と組み合わせて製剤化される。液体製剤の一例は、皮下注射用の単回用量バイアル内に充填された、無菌で、透明で、無色の、保存処置がなされていない (unpreserved) 溶液である。

30

【0316】

治療用組成物は一般に、無菌のアクセスポート (access port) を有する容器、例えば、皮下注射針による貫通が可能なストッパーを有する静脈内用の溶液バックまたはバイアルの内部に配置される。組成物は好ましくは、皮下、筋肉内または非経口的に、例えば、静脈内注射もしくは注入として投与されるか、または体腔内に投与される。

【0317】

化合物は、1回の用量当たり約0.001~2000mg/kg体重、より好ましくは1回の用量当たり約0.01~500mg/kg体重の量で投与される。反復用量を、治療に当たる医師によって処方された通りに投与することもできる。

40

【0318】

組成物の単回投与または多回投与は、患者が必要とし、かつ患者によって認容される投与量および頻度に応じて行われる。投与量および頻度は典型的には、投与される具体的な治療物質または予防用物質、疾患の重症度および種類、または必要な免疫応答、投与経路、ならびに患者の年齢、体重、反応および既往歴に応じて、各患者に特異的な要因によって異なると考えられる。当業者は、そのような要因を検討すること、および、例えば文献中に報告され、Physician's Desk Reference, 56th ed., (2002)で推奨されている投与量に従うことにより、適したレジメンを選択することができる。一般に、用量は、許容され

50

ない毒性を患者に生じさせることなく、疾患の症状または徴候を治療または改善するのに十分である。

【0319】

別の例において、本発明の方法に有用な化合物は、抗原、例えば、癌または病原体もしくは感染性生物の抗原を含み、体液性および／またはT細胞媒介性免疫応答を強化するためのワクチンとして、筋肉内、皮下もしくは静脈内注射によって、または経口的に送達され得る。別の例において、抗原は、自己抗原またはアレルゲン性抗原であり、これは、33 D1およびDEC-205に関して記載されたものと同様の免疫応答を減らすために使用され得る (Bonifaz et al., 2002; Finkelman et al., 1996)。

【0320】

10

本発明の別の例において、放射標識された形態が、5B6リガンドまたは5B6を発現する標的細胞へ治療物質として静脈内注射によって送達される。放射性標識抗体およびそれらを治療薬として患者に投与するための方法の以前の例は、当業者に公知である。その例には、HLA-DRのβサブユニットに対するヨウ素¹³¹標識Lym-1、ならびに抗CD20インジウム¹¹¹およびイットリウム⁹⁰標識イブリツモマブチウキセタン (IDEC-Y2B8、ZEVALIN (登録商標) およびヨウ素I 131トシツモマブ (BEXXAR (登録商標)) が含まれる。

【0321】

一態様において、組成物はアジュバントを含まない。別の態様において、組成物はアジュバントを含む。アジュバントの例としては、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウム (ミョウバン)、ムラミルジペプチド、細菌内毒素、リピド X、ポリリボヌクレオチド、アルギン酸ナトリウム、ラノリン、リゾレシチン、ビタミンA、サポニン、リポソーム、レバミゾール、DEAE-デキストラン、ブロックコポリマー (blocked copolymer) または他の合成アジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。このようなアジュバントはさまざまな販売元から市販されており、例えば、Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) またはフロイント不完全アジュバントもしくはフロイント完全アジュバント (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) がある。

20

【0322】

1つの態様において、組成物はリポソームまたは膜小胞を含む。そのようなリポソームの例は、米国特許第2007/0026057号、Leserman (2004) およびvan Broekhoven et al. (2004) に記載されている。これらの場合には、化合物は、関心対象の作用物質の送達を強化するためにリポソームをターゲティングするために用いることができる。米国特許第2007/0026047号に概説されているように、本発明に用いるための膜小胞の調製のための方法は、WO 00/64471に記載されている。

30

【0323】

免疫応答、ならびに／または抗原認識、プロセッシングおよび／もしくは提示を調節する、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかけている細胞もしくは死細胞、またはその一部を検出するための組成物は、慣例的には注射によって非経口的に、例えば皮下、筋肉内または静脈内に投与される。他の投与様式に適したそのほかの製剤には、坐薬、および場合によっては経口製剤が含まれる。坐薬の場合、従来の結合剤および担体には、例えば、ポリアルキレングリコールまたはトリグリセリドが含まれうる。そのような坐薬は、有効成分を0.5%~10%、好ましくは1%~2%の範囲で含む混合物から形成することができる。経口製剤は、例えば、医薬品等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムのような、通常用いられる添加剤を含む。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、徐放性製剤または粉末の形態をとり、有効成分が10%~95%、好ましくは25%~70%を占める。組成物を凍結乾燥する場合には、凍結乾燥された材料を、投与の前に、例えば懸濁液として再構成することができる。再構成は好ましくは緩衝液中で行わせる。患者に対する経口投与のためのカプセル、錠剤および丸剤には、例えば、Eudragit「S」、Eudragit「L」、酢酸セルロース、酢酸フタル酸セルロースまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースを含む、腸溶性コーティングを施してもよい。

40

50

【0324】

任意の治療レジメンにおいて、治療用組成物は、患者に対して、単独で、または他の治療物質、組成物などを含むカクテルとして投与することができる。

【0325】

ある態様において、免疫応答は、抗原へ結合された本発明の化合物をコードするDNAワクチンを使用することによって調節される。DNAワクチン接種は、対象の組織の細胞による抗原の発現のための、対象の組織中への、抗原をコードするDNAの直接的なインビボ導入を伴う。このようなワクチンを本明細書では「DNAワクチン」または「核酸を基にしたワクチン」と呼ぶ。DNAワクチンは、US 5,939,400、US 6,110,898、WO 95/20660、WO 93/19183、Demangel et al. (2005) およびNchinda et al. (2008) に記載されている。

10

【0326】

現在までのところ、哺乳動物系におけるほとんどのDNAワクチンは、サイトメガロウイルス (CMV) に由来するウイルスプロモーターに依拠している。これらは、多数の哺乳動物種において筋肉接種および皮膚接種の両方で優れた効率を有している。DNA免疫処置によって誘発される免疫応答に影響を及ぼすことが知られている1つの要因はDNA送達の方法であり、例えば、非経口的経路は遺伝子移入の割合が低く、遺伝子発現のばらつきがかなり大きい恐れがある。遺伝子銃を用いたプラスミドの高速接種は、マウスの免疫応答を高めたが、これは恐らく、DNAトランスフェクションの効率がより高く、樹状細胞による抗原提示がより有効であったためである。本発明の核酸を基にしたワクチンを含むベクターはまた、当技術分野で公知の他の方法、例えば、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、形質導入、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈降、リポフェクション (リソソーム融合)、またはDNAベクター輸送体によって、所望の宿主中へ導入され得る。

20

【0327】

抗原性ポリペプチドを産生するトランスジェニック植物が、当技術分野で周知の手順によって構築することができる。多数の植物由来の食用ワクチンが、現在、動物病原体およびヒト病原体の両方に対して開発中である。免疫応答はまた、抗原エピトープを提示するウイルス様粒子 (VLP) またはキメラ性植物ウイルスを産生するトランスジェニック植物を用いた経口免疫処置から生じた。これらのVLPまたはキメラ性ウイルスの粒子状形態は、胃内での抗原の安定性を増加させ、消化管における取り込みに利用可能な抗原の量を効果的に増加させ得ることが、示唆された。

30

【実施例】

【0328】

実施例1 - 5B6のクローニングおよび発現材料および方法マウス

マウスを、The Walter and Eliza Hall Institute (WEHI) において特定病原体除去環境で交配させた。雌性マウスを6~12週齢で用いた。または、齢を一致させた性別コホートを作成した。動物はNational Health and Medical Research Council of Australiaの指針に従って取り扱った。実験手順はWEHIのAnimal Ethics Committeeによる承認を得た。

40

【0329】

5B6の配列同定

シークエンシングは、Big Dye Terminatorバージョン3.1 (Applied Biosystems, Victoria, Australia) および200ngのプラスミドDNAを用いて行い、ABI 3730xl 96キャピラリー自動DNAシークエンサー上での電気泳動にかけた。配列と、発現配列タグ、cDNAおよびタンパク質のデータベースとの比較は、National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) を用いて、基本局所配列比較検索ツール (basic local alignment search tool) (BLAST) によって行った。ゲノム位置決定は、University of California Santa Cruz, Genome Browser (www.genome.ucsc.edu/) を用いて、マウスのアセン

50

ブリ（2006年2月）およびヒトのアセンブリ（2006年3月）に対するBLASTアラインメントによって行った。

【0330】

定量的RT-PCR

RNA（最大1μg）をRQ1 DNアーゼ（Promega）でDNアーゼ処理し、続いてランダムプライマー（Promega）およびSuperscript II 逆転写酵素（Gibco BRL, Gaithersburg, MD）を用いてcDNAに逆転写させた。造血細胞における5B6およびGapdhの発現を決定するために、Quantitect SYBR Green PCRキット（Qiagen）およびLight cycler（Roche, Victoria; Australia）を用いて、リアルタイム逆転写PCR（RT-PCR）を行った。リアルタイムRT-PCRのための特異的プライマーは以下の通りとした。

5B6; 5'-TGTGACTGCTCCCACAACCTGGA-3' (SEQ ID NO:17); 5'-
TTTGCACCAATCACAGCACAGA-3' (SEQ ID NO:18), *Gapdh*; 5'-
CATTTGCAGTGGCAAAGTGGAG-3' (SEQ ID NO:19); 5'-
GTCTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3' (SEQ ID NO:20)

95℃、15分間の最初の活性化段階に続いて、94℃で15秒間（変性）、50～60℃で20～30秒間（アニーリング）および72℃で10～12秒間（伸長）を40サイクル行い、その後に融点分析を行った。各遺伝子の発現レベルを、 10^{-2} ～ 10^{-6} pgの特異的DNA断片から作成した標準曲線を用いて決定し、Gapdhに対する相対的な比として表した。

【0331】

5B6の組換え体の表面発現

完全長マウスおよびヒト5B6（m5B6およびh5B6）を、脾臓DC cDNAから、Advantage cDNAポリメラーゼ（Clontech）および以下のプライマー：

[5B6: 5'-GCCATTTCTTGTACCAACCTACTCCT-3'
(SEQ ID NO:21); 5'-CGGTGTGGTATGGATCGTCACTT-3' (SEQ ID NO:22)],
[HE: 5'-AGCCTCCTGTGTGGACTGCTTT-3' (SEQ ID NO:23); 5'-
TTCATGGCCCACATTTTGGTTT-3' (SEQ ID NO:24)]

を用いるPCR増幅によって単離し、その結果得られた産物をpGemT easyプラスミド（Promega）中にサブクローニングした。m5B6およびh5B6を、C末端（細胞外）FLAGタグ付加タンパク質としてチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞の表面上に、および緑色蛍光タンパク質（GFP）を5B6のN末端細胞質ドメインと融合させた融合タンパク質としてマウスEL4細胞の表面上に、発現させた。FLAGタグ付加タンパク質を作製するためには、5B6をコードするcDNAをAdvantage high fidelityポリメラーゼ（Clontech）を用いて増幅し、AscIおよびMlu-Iで制限消化した上で、FLAGエピトープを含むように改変されたpEF-Bosベクター（T. Willson博士；WEHIにより寄贈）中にサブクローニングした。

【0332】

CHO細胞に対して、pEF-Bos-5B6レクチン、およびネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含むpGK-neoプラスミドをエレクトロポレーション（Gene Pulsar, Biorad, NSW, Australia）によってコトランスフェクトし、トランスフェクト体を1mg/mlのG418（Geneticin, Life Technologies）によって選択した。5B6レクチン陽性細胞をラット抗FLAG mAbで、その後に抗ラットIg-PE（Caltag）で染色し、続いてフローサイトメトリー選別によって単離した。GFPタグ付加タンパク質は、5B6レクチンをコードするcDNAを増幅し、EcoRIで制限消化した上でpEGFP-C2 ベクター（Clontech）中にサブクローニングし、その後にEL4細胞へのエレクトロポレーションを行って、1mg/mlのG418で選択することによって作製した。5B6陽性細胞は、GFP陽性細胞のフローサイトメトリー選別によって単離した。完全長非タグ標識タンパク質は、5B6レクチンをコードするcDNAを増幅し、EcoRIで制限消化した上でpIRES-Neoベクター中にサブクローニングし、その後にCHO細胞へのエレクト

ロポレーションを行って、1mg/mlのG418で選択することによって作製した。

【0333】

C型レクチンに対するmAbの作製

ウィスターラットに対して、50 µgのキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 結合ペプチド：5B6マウスペプチド

(H-DGSSPLSDLLPAERQRSAGQIC-OH) (SEQ ID NO:29)

、ヒトペプチド

(H-RWLWQDGSSPSPGLLPAERSQSANQVC-OH) (SEQ ID NO:30)

10

、または5B6-FLAGを発現する 1×10^7 個のCHO細胞による免疫処置を4週間間隔で3~4回行い、さらに最終追加投与を行って、その4日後にSp2/0骨髓腫細胞と融合させた。特異的mAbを分泌するハイブリドーマを、C型5B6-FLAGを発現するCHO細胞およびGFP-5B6を発現するE L4細胞を用いた上清のフローサイトメトリー分析によって同定した。マウス5B6およびヒト5B6のそれぞれに対して特異的な反応性を呈したハイブリドーマが作製された。

【0334】

まとめると、以下のmAbが以前に作製され、本研究に利用された。2種類のラットmAb 24/04-10B4 (ペプチド免疫処置による) および42/04-4202 (CHO-5B6-FLAG免疫処置による) がマウス5B6 (m5B6) に対して産生された。WO 09/026660に記載されているように、2種類のラット抗体20/05-3A4および23/05-4C6 (h5B6ペプチド免疫処置による) がh5B6に対して

20

【0335】

DCの単離およびフローサイトメトリー分析

リンパ系器官からのDCの単離は、以前の記載の通りに行った (Vremec et al, 2000)。手短に述べると、組織を機械的に切り刻み、コラゲナーゼおよびDNアーゼで消化した上で、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で処理した。低密度細胞を密度遠心分離 (1.077 g/cm^3 Nycodenz, Axis-Shield, Oslo, Norway) によって濃縮した。非DC系列細胞をmAb (KT3-1.1、抗CD3; T24/31.7、抗Thy1; TER119、抗赤血球; ID3、抗CD19; および1A8、抗Ly6G) でコーティングし、続いて抗ラットIg磁性ビーズ (Biomagビーズ、QIAGEN, Victoria, Australia) を用いて除去した。血液DCは赤血球 (RBC) の除去 ($0.168 \text{ M NH}_4\text{Cl}$; 4°C で5分間) および上記の通りの無関係な細胞を除去することによって濃縮したが、ただしmAbカクテルにはmAb F4/80も含めた。DC濃縮集団をラットIgおよび抗FcR mAb (2.4G2) を用いてブロックし、続いて、蛍光色素と結合させた、CD11c (N418)、CD205 (NLDC-145)、CD4 (GK1.5)、GD8 (YTS169.4)、CD24 (M1/69)、120G8またはCD45RA (14.8)、Sirpα (pS4) およびm5B6 (24/04-10B4-ビオチン) に対するmAbで染色した。

30

【0336】

cDCはCD11c^{hi}CD45RA⁻またはCD11c^{hi}120G8⁻として選択された。脾臓cDCは、CD4⁺cDC (CD11c^{hi}CD45RA⁻CD4⁺CD8⁻)、二重陰性 (DN) cDC (CD11c^{hi}CD45RA⁻CD4⁻CD8⁻) およびCD8⁺cDC (CD11c^{hi}CD45RA⁻CD8⁺CD4⁻) にさらに細分された。胸腺DCはCD8⁻cDC (Sirpα^{hi}CD8^{lo}) およびCD8⁺cDC (Sirpα^{lo}CD8^{hi}) に細分された。LN cDCはCD8⁻cDC (CD11c^{hi}CD205⁻CD8⁻)、皮膚DC (CD11c⁺CD205^{int}CD8⁻)、ランゲルハンス細胞 (CD11c⁺CD205^{hi}CD8⁻) およびCD8⁺cDC (CD11c⁺CD205^{hi}CD8⁺) に細分され、これらは以前の記載の通りであった (Lahoud et al, 2006)。pDCは、CD11c^{int}CD45RA⁺またはCD11c^{int}120G8⁺として分離された。ビオチン染色をストレプトアビジン (SA) -フィコエリトリン (PE) を用いて検出した。さまざまなDC集団上でのm5B6の発現を分析して、アイソタイプ対照染色 (IgG2a, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) と比較した。フローサイトメトリー分析はLSR II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 上で行い、自己蛍光およびヨウ化プロピジウム (PI) 陽性の死細胞は除外した。

40

【0337】

ヒト血液DCおよび造血細胞の単離およびフローサイトメトリー分析

50

ヒト血液から、Ficoll-Pacque-PLUS (GE Healthcare, Rydalmere, NSW, Australia) 密度分離法を用いて、末梢血単核細胞 (PBMC) を単離した。血液ドナーからはインフォームドコンセントを得ており、採取はHuman Research Ethics Committee, Melbourne Health による承認を得た。PBMCをラットIgおよび抗FcR mAb (2.4G2) でブロックし、続いて、HLA-DRに対するmAb (L243; Becton Dickinson) ならびにPEと結合させた、系列マーカー、すなわちCD3 (BW264156; T細胞)、CD14 (Tuk4; 単球)、CD19 (6D5; B細胞) およびCD56 (AF12-7H3; NK細胞) に対するmAbのカクテルによって染色した。血液DCはHLA-DR^{hi}、系列細胞としてゲーティングされ、それらのBDCA-1 (ADJ-8E3)、BDCA-3 (AD5-14H2)、BDCA-4 (AD5-17F6) およびCD16 (VEP13) の発現に基づいてさらに分離された。PBMCは、CD3 (BW264156; T細胞)、CD19 (6D5; B細胞)、CD56 (AF12-7H3) およびNKp46 (9E2) (CD5 6⁺Kp46⁺; NK細胞) およびCD14 (Tuk4; 単球) に対するmAbを用いて単離された、他の造血細胞の供給源としても用いた。h5B6 (20/05-3A4) の発現に関する染色およびフローサイトメトリー分析を行い、PI陽性の死細胞は除外した。別に指定する場合を除き、抗ヒトmAbはすべてMiltenyi Biotec (North Ryde, NSW, Australia) から購入した。

【0338】

マウス造血細胞上の5B6の単離および分析

脾細胞懸濁液を、DC単離の場合と同様に調製した (Vremec et al, 2000)。細胞を、CD3 (KT3-1.1)、CD19 (1D3)、NK1.1 (PK136)、CD49b (Hm α2; eBioscience, San Diego, CA, USA) に対するmAbで染色し、続いてB細胞 (CD19⁺CD3⁻)、T細胞 (CD19⁻CD3⁺) およびNK細胞 (CD49b⁺K1.1⁺CD3⁻) を選択した。脾臓マクロファージを1.082g/cm³の密度遠心分離 (Nycodenz) によってまず濃縮し、CD3⁺ T細胞およびCD19⁺ B細胞を免疫磁性ビーズによって除去した。濃縮された細胞を、CD11b (M1/70) およびF4/80に対するmAbで染色し、続いてマクロファージをCD11b^{hi}F4/80⁺としてゲーティングした。骨髄マクロファージおよび単球は、脾臓の場合と同様にまず濃縮し、続いてCD11b (M1/70) およびLy6C (5075-3.6) で染色した。続いて単球を側方散乱¹⁰Ly6C^{hi}CD11b^{hi}としてゲーティングし、マクロファージをLy6C^{int}CD11b^{hi}としてゲーティングした。すべての細胞をラットIgおよび抗FcR mAb (2.4G2) でブロックし、その後抗5B6 mAb (10B4-ビオチン) を含むさまざまなmAbカクテルによる免疫蛍光染色を行った。ビオチン染色はストレプトアビジン-PEを用いて検出した。試料はLSR II (Becton Dickinson) 上で5B6の発現に関して分析し、PI陽性の死細胞は除外した。

【0339】

可溶性5B6の組換え発現

可溶性5B6を作製するためには、ヒンジおよび外部ドメイン領域を含むcDNAを、Advantage high fidelity 2ポリメラーゼ (Clontech) および以下のプライマー

[m5B6: 5'-

TAGTAGACGCGTGAGCAGCAGGAAAGACTCATC-3' (SEQ ID NO:25); 5'-TAGTAGACGCGTTCAGATGCAGGATCCAAATGC-3'] (SEQ ID NO:26), [H5B6:5'-TAGTAGACGCGTCAGCAGCAAGAAAAACTCATC-3' (SEQ ID NO:27); 5'-TAGTAGACGCGTTCAGACAGAGGATCTCAACGC-3'] (SEQ ID NO:28)

を用いて増幅した。増幅されたcDNAをMlu-1で制限消化し、大腸菌ビオチンホロ酵素シンテターゼBirAによって特異的に認識されるビオチン化コンセンサス配列 (ペプチドコンセンサス配列NSGLHHILDAQKMVWNHR (SEQ ID NO:31)) およびFLAGエピトープを含むように改変されたpEF-BosベクターのMlu-1部位にサブクローニングした。したがって、その結果得られたレクチン融合構築物は以下を含んだ (N末端から順に): IL3シグナル配列 (分泌を確実にするため)、ビオチン化コンセンサスペプチド配列、FLAG-タグ、ヒンジ領域およびレクチンドメイン。組換えタンパク質は、8 μg DNA/75cm²フラスコを含むDMEM-10% FCS中での、ヒューゲン (Fugene) を用いた、293T細胞 (ポリオーマ/SV40ラージT抗原

が安定的にトランスフェクトされたヒト腎臓上皮細胞株)の一過性トランスフェクションによって発現させた。8時間後に培地を除去し、細胞を2回洗浄した上で、10mlのX-Vivo-10タンパク質非含有/無血清培地(BioWhittaker, Walkersville, MD)中にて36~60時間インキュベートした。分泌された組換えタンパク質を含む培地を収集し、培養上清からの組換えタンパク質を、カットオフ値10,000mwtの遠心分離装置(Nanosep 10K Omega, PALL Life Sciences)を用いて100倍に濃縮した。続いて、濃縮されたタンパク質をそのまま用いるか、またはBIR酵素(Avidity, Denver, CO)を用いて酵素的にビオチン化した。

【0340】

膜結合5B6に対する可溶性5B6の結合を調べるための結合アッセイ

293T細胞に対して、pIRES Neo中にある完全長非タグ付加5B6をコードする発現構築物を一過性にトランスフェクトした。2~3日後に細胞を収集し、(1)可溶性FLAGタグ付加ビオチン化m5B6、h5B6およびCireで標識してストレプトアビジンPEで検出するか、または(2)可溶性FLAGタグ付加5B6、ビオチン化抗FLAG mAb 9H10およびストレプトアビジン-PE、のいずれかを用いる表面免疫蛍光標識を行った。生細胞を前方散乱もしくは側方散乱に関して、またはヨウ化プロピジウム排除によってゲーティングし、それらの可溶性5B6の表面結合に関して分析した。可溶性5B6の結合の特異性は、Cireなどの他の可溶性FLAGタグ付加C型レクチンに対する結合との比較によって示された。

【0341】

ELISA

組換え可溶性タンパク質の分泌は、捕捉/ツーサイト(two-site)ELISAによってアッセイした。手短に述べると、96ウェルのポリ塩化ビニル製マイクロタイタープレート(Costar, Broadway, Cambridge, UK)を、精製した捕捉用mAb、すなわち抗FLAG 9H10 12.5ug/ml(自家作製)でコーティングした。培養上清を、ビオチン化抗m5B6抗体(24/04-10134)-(2ug/ml)、ストレプトアビジン-HRPおよびABTS基質を用いて検出した。ビオチン化組換え可溶性タンパク質は、捕捉/ツーサイトELISAによってアッセイした。手短に述べると、96ウェルのポリ塩化ビニル製マイクロタイタープレート(Costar, Broadway, Cambridge, UK)を、精製した捕捉用mAb、すなわち抗FLAG 9H10 12.5ug/ml(自家作製)でコーティングした。培養上清を、ストレプトアビジン-HRPおよびABTS基質を用いて検出した。

【0342】

結果

脾臓DCサブセット間の遺伝子発現パターンの比較

遺伝子発現プロファイル分析により、CD8⁻ cDCと対比してCD8⁺ cDCサブセットによって優先的に発現されるマウスcDNAクローンが同定された。5B6と命名されたこのクローンは、CD8⁺ DCにおいて差異を伴って発現される、第6番染色体上に認められる遺伝子である「仮想的C型レクチン」の断片に相当した(Riken 9830005G006、(最近、C型レクチンドメインファミリー9、メンバーA、(Clec9a) Genbankアクセッション番号AK036399.1、Unigene ID Mm.391518と命名)。さらに、公開データベースの分析により、最近になってCLEC9Aと再命名された、第12番染色体上の5B6のヒトオルソログ(HEEE9341)が明らかになった。チンパンジー(Genbankアクセッション番号XP_001143778)、マカクザル(XP_001114857)、イヌ(Genbankアクセッション番号XP_854151)、ウシ(XP_873119)、ウマ(XP_001493987)およびラット(Genbankアクセッション番号XP_578403)などの他の動物にもオルソログが存在することが同定されている。

【0343】

C型レクチンの同定、特性決定およびクローニング

本発明者らは、マウスおよびヒトの5B6をコードする完全長cDNAをPCRによって増幅し、遺伝子のシーケンシングを行った(図1Aおよび1B)。

【0344】

13.4kbのゲノムDNAの範囲にまたがる7個のエクソンによってコードされるマウス5B6の完全長コード配列(図1D)は、264アミノ酸(aa)のタンパク質をコードする単一のオー

10

20

30

40

50

ブンリーディングフレーム (ORF) (795bp) を含む (図1C)。ヒト5B6のコード配列は、12.9kbのゲノムDNAの範囲にまたがる6個のエクソンによってコードされ (図1D)、同様に、241aaのタンパク質をコードする単一のORFを含む (図1C)。

【0345】

マウスおよびヒトの5B6遺伝子はそれぞれ、その細胞外領域内にある単一のC型レクチンドメイン、膜貫通領域、およびシグナル伝達モチーフの可能性のあるYXXL残基を含む細胞質尾部を有する、膜貫通タンパク質と推定されるものをコードする (Fuller et al, 2007) (図1C)。ヒト5B6は、マウスのものよりも短いヒンジ領域を有する。マウスおよびヒトのタンパク質配列のアラインメントは図1Cに示されている (同一性53%; 類似性69%)。提唱されるマウスおよびヒトの5B6タンパク質の構造の概略図は図1Eに示されている。

10

【0346】

NCBI Blastタンパク質分析を用いることで、m5B6はマウスのデクチン-1 (Clec7A)、Clec12BおよびNKG2Dとの配列類似性が最も高く、一方、h5B6はLOX-1 (Clec8A)、Clec12BおよびDCAL-2 (Clec12A) と最も類似していることが明らかになった。5B6のCTLDは、古典的なC型レクチンであるラットマンノース結合タンパク質A (MBP-A) と同じく、2つのジスルフィド結合を形成する4個の保存的なシステイン残基を有する (図2)。さらに、5B6は、さらに2つのシステイン残基をネック (neck) 領域に保有し、タンパク質のホモ二量体化を可能にする (Weis et al, 1998)。決定的に重要なこととして、古典的なC型レクチンにおいて Ca^{2+} 結合に関与する残基はマウスおよびヒトの5B6には存在しない (図2)。

【0347】

C型レクチン遺伝子の発現

マイクロアレイ分析により、5B6は、 CD8^+ DCと対比して CD8^+ DCにおいて3.5倍の高さのレベルで、DN DCと対比して CD8^+ DCにおいて2.6倍の高さのレベルで発現されると予想された。このため、本発明者らはプライマーを設計し、マウス脾臓cDCサブセットにおける5B6の発現を定量的RT-PCRによって調べた。5B6は CD8^+ cDCによって優先的に発現されることが確認された。脾臓 CD8^+ DCは脾臓 CD4^+ cDCよりも22倍の多さのmRNAを発現した (図3A)。

20

【0348】

本発明者らは、一団の造血細胞種にわたってのマウスおよびヒトの5B6遺伝子の発現を定量的リアルタイムRT-PCRによって検討した。5B6 mRNAの発現はcDCおよびpDCの双方のDCに特異的であり、NK細胞におけるmRNA発現は中等レベルであった (図3B)。これは CD8^+ cDCと対比して脾臓 CD8^+ DCにおいて優先的に発現された。これはまた、胸腺 CD8^+ cDCおよびLN CD8^+ DEC205^{hi} cDCにおいても差異を伴って発現された (図3A)。さらに、3種類の脾臓cDC集団のすべてにおいて、遺伝子発現は、それぞれToll様受容体9および4に対するリガンドであるCpGおよびLPSによるインビボ活性化の3時間後には低下した (図3C)。

30

【0349】

マウス5B6タンパク質の表面発現

m5B6およびh5B6のタンパク質発現について調べるために、本発明者らは、5B6トランスフェクト細胞の表面にあるタンパク質をフローサイトメトリーによって認識するmAbを作製した。一団の新たに単離したマウス造血細胞をmAb 10B4で染色することにより、m5B6がcDCのあるサブセット上およびほとんどのpDC上で発現されることが指し示された (図4A)。注目されることに、m5B6タンパク質は、T細胞、ほとんどのB細胞、単球およびマクロファージを含む、調べた他のほとんどの造血細胞上では検出されなかった。若干のmRNAを発現したNK細胞上でも、それは同じく検出されなかった (図4A)。しかし、B細胞のわずかな (3%) 割合は、m5B6に関して明らかに陽性染色された。10B4による何らかの染色が認められたのは骨髓細胞のおよそ3%に過ぎず、このほとんどは弱かった。したがって、造血系において、m5B6の表面発現は主としてDCに限定されて生じる (図4A)。加えて、mAb 10B4による凍結切片の染色からも、DCに起因する範囲を越える染色は認められなかった (非提示データ)。

40

【0350】

50

続いて、脾臓、LNおよび胸腺cDC上でのm5B6の表面レベルを比較した。m5B6は、脾臓、胸腺およびLNのCD8⁺ cDCによって発現された（図4A）。ほとんどの脾臓、胸腺およびLN CD8⁺ cDCならびに遊走性cDC（皮膚DCおよびランゲルハンス細胞）は、m5B6発現に関して陰性であった（図4A、B）。しかし、CD8⁺ cDCのわずかな割合は、バックグラウンド染色を上回るものを示した。これは、このCD8⁺ cDCゲーティングの内部に存在することが知られている、まだCD8αを発現していないCD8⁺ cDC系列のDCのわずかな割合に起因する可能性がある。炎症性マウス脾臓由来の炎症性CD11^{int}CD11b^{hi} DCの標本上では、m5B6染色は全く検出されなかった（Naik et al, 2006）（非提示データ）。これらのDC表面発現プロファイルは、定量的RT-PCRによって観察された遺伝子発現と一致した（図3）。

【0351】

10

マウス血液DC上でのマウス5B6の表面発現

マウス血液は、脾臓内に認められるDCと比べて成熟DC（CD11c^{hi}）を極めてわずかしき含まず、これらのわずかな血液DCではCD8の発現はみられない（O'Keefe et al, 2003）。しかし、マウスでは、CD24発現はCD8の発現と相関づけられている。血液内の成熟DCのわずかな割合はこのマーカーを発現する。おそらくこれらの細胞はCD8⁺になる途上にあると考えられる。血液DC上での5B6の発現を明らかにするために、本発明者らはそれらを単離して、CD24および5B6によって染色した。CD24を発現するDC（これらはCD8⁺DCになるように運命づけられている）は5B6も発現する（図4C）。

【0352】

20

マカクザルおよびヒトの5B6の表面発現

ヒト5B6（h5B6）の表面発現について調べるために、本発明者らは、フローサイトメトリーによる測定でh5B6-トランスフェクト細胞の表面上の天然タンパク質を認識した（非提示データ）、2種類のモノクローナル抗体（20/05-3A4；23/05-4C6）を作製した。ヒトまたはマカクザルから新たに単離した末梢血細胞の染色により、5B6はDCのサブセット上で発現されることが指し示された（図5）。特に、HLADR⁺ DCのわずかなサブセットはh5B6に関して陽性であった（図5A）。ほとんどの他のヒト血液細胞は陽性染色を示さなかったが、ヒト血液B細胞上では低レベルの染色が観察された（図5B）。5B6を発現するDCがマウス血液に見いだされるものと類似しているか否かを明らかにするために、これらの血液DCをBDCA-1、BDCA-3およびBDCA-4によっても染色した。mAb 3A4による染色は、わずかなBDCA-3⁺ DCサブセット（マウスCD8⁺ cDC¹⁷の等価物と提唱されている）に限定され、BDCA-4⁺サブセットには存在しなかった（非提示データ）。このことは、h5B6が、マウスCD24⁺に類似した種類のcDCであるCD8⁺ DC系列上には存在するが（Galibert et al, 2005）、マウスとは対照的に、pDC上には存在しないことを示唆する。

30

【0353】

可溶性5B6は膜結合型5B6と種交差的な様式で相互作用することができる

5B6分子の結合パートナーを同定するために、本発明者らは、可溶性FLAGタグ付加m5B6およびh5B6、ならびに対照可溶性FLAGタグ付加C型レクチンCireを作製した。可溶性5B6を、pIresNeoベクター中にある完全長非タグ付加5B6構築物による一過性トランスフェクション後に膜結合型m5B6およびh5B6を発現する293T細胞との結合に関してスクリーニングした。可溶性マウス5B6は、膜結合型マウス5B6およびヒト5B6を発現する293T生細胞のいずれとも結合することができたが、モック（DNAを有しない）トランスフェクト293T細胞との結合はごくわずかまたは皆無であった（図6）。同様に、可溶性ヒト5B6は、膜結合型マウス5B6およびヒト5B6を発現する293T生細胞のいずれとも結合することができたが、モックトランスフェクト293T細胞とは結合しなかった。対照的に、対照可溶性分子Cireは対照またはトランスフェクト細胞株のいずれともごくわずかな結合しか示さなかった。したがって、可溶性5B6は膜結合型5B6と種交差的な様式で相互作用することができる。

40

【0354】

実施例2—死にかけている細胞および死細胞によって発現される5B6リガンド、ならびに5B6リガンドの同定

材料および方法

50

命名

この実施例にわたって、5B6はClec9Aと呼ばれる。

マウス

雌性C57BL/6J Wehiマウス、8～12週齢を、Walter and Eliza Hall Institute (WEHI) において特定病原体除去条件下で飼育した。動物を、National Health and Medical Research Council of Australiaのガイドラインに従って扱った。実験手順は、Institutional Animal Ethics Committee, WEHIによって承認された。

【0355】

可溶性Clec9Aの組換え発現

可溶性Clec9Aの2つの型、全長Clec9A外部ドメイン (Clec9A-ecto; ストーク (stalk) およびCTL D) およびClec9A CTL Dのみ (Clec9A-CTL D) を作製した。可溶性外部ドメインマウスClec9AをSEQ ID NO: 40として提供し、可溶性外部ドメインヒトClec9AをSEQ ID NO: 41として提供し、可溶性CTL DのみマウスClec9AをSEQ ID NO: 42として提供し、可溶性CTL DのみヒトClec9AをSEQ ID NO: 43として提供する。

【0356】

必要とされる外部ドメイン領域を含むcDNAを、Advantage High Fidelity 2ポリメラーゼ (Clontech) またはHotStar HiFidelityポリメラーゼ (Qiagen) および下記のプライマーを使用して、オリジナルのcDNA配列 (Caminschi et al., 2008) から増幅させた:

mClec9A-ecto-フォワード: 5'-

TAGTAGACGCGTGAGCAGCAGGAAAGACTCATC-3' (SEQ ID NO:25);

mClec9A-CTL D-フォワード: 5'-

TAGTAGACGCGTGGTAGTGACTGCAGCCCTTGT-3' (SEQ ID NO:38);

mClec9A-リバーズ 5'-TAGTAGACGCGTTCAGATGCAGGATCCAAATGC-3'

(SEQ ID NO:26). hCLEC9A-ecto-フォワード: 5'-

TAGTAGACGCGTCAGCAGCAAGAAAAACTCATC-3' (SEQ ID NO:27);

hCLEC9A-CTL D-フォワード: 5'-

TAGTAGACGCGTAACAGCAGTCCTTGTCCAAACAAT -3' (SEQ ID NO:39);

hCLEC9A-リバーズ: 5'-TAGTAGACGCGTTCAGACAGAGGATCTCAACGC-3'

(SEQ ID NO:28)

【0357】

増幅されたcDNAを、ビオチン化コンセンサス配列 (大腸菌ビオチンホロ酵素シンテターゼBirAによって特異的に認識されるペプチドコンセンサス配列NSGLHHILDAQKMVWNHR (SEQ ID NO: 31)) およびFLAGエピトープを含有するように修飾されたpEF-Bosベクター中へサブクローニングした。得られた融合構築物は、従って、以下を含んだ (N末端の順に): I L3シグナル配列 (分泌を確実にするため)、ビオチン化コンセンサスペプチド配列、FLAG タグ、およびClec9A cDNA断片。タグ化可溶性外部ドメインマウスClec9AをSEQ ID NO: 44として提供し、タグ化可溶性外部ドメインヒトClec9AをSEQ ID NO: 45として提供し、タグ化可溶性CTL DのみマウスClec9AをSEQ ID NO: 46として提供し、タグ化可溶性CTL DのみヒトClec9AをSEQ ID NO: 47として提供する。

【0358】

組換えタンパク質を、哺乳動物細胞の一過性トランスフェクションによって発現させ、無タンパク質/無血清培地中において培養した: 293T細胞をX-Vivo-10培地 (BioWhittaker) において培養したか、またはFreeStyle 293F細胞をFreeStyle発現培地 (Invitrogen) において培養した。分泌された組換えタンパク質を含有する培地を、抗マウスClec9A mAb (24/04-10B4) との反応性によって、可溶性mClec9Aの存在についてアッセイした。分泌された組換えタンパク質を、10,000 mol wtカットオフ遠心装置 (Millipore) を使用して100倍に濃縮し、直接使用したか、またはBIR酵素 (Avidity) を使用して酵素的にビオチ

ン化した。必要である場合、Clec9A可溶性タンパク質を、抗FLAG M2アガロース樹脂 (Sigma) および100 µg/ml FLAGペプチド (Auspep) での溶出を使用してアフィニティークロマトグラフィー (chromatography) によって精製し、プレパックされたSuperdex 200カラム (GE Healthcare) を使用するサイズ排除クロマトグラフィーによってさらに精製した。さらに必要に応じて、BIR酵素 (Avidity) を用いて精製された可溶性Clec9Aを特異的にビオチン化した。

【0359】

マウス胚線維芽細胞

Noxaを発現するマウス胚線維芽細胞 (MEF) (van Delft et al., 2006) を、1日前に播種し、約80%コンフルエンスまで増殖させ、次いで、2.5 µM ABT-737での処理によってアポトーシスを受けるように誘導した。16時間後、細胞を、細胞解離緩衝液 (酵素フリーのPBSベース; Gibco) を使用して採取した。

【0360】

赤血球膜の作製

マウス血液をヘパリン添加チューブ中に収集し、PBSで1:25に希釈し、1204gでの遠心分離によって採取した。密度遠心分離 (1.091 g/cm³ Nycondenz, Axis-Shield, Oslo, Norway) に続いて高密度フラクションを収集することによって、赤血球 (RBC) を濃縮し、使用前にPBSでさらに3回洗浄した。サポニン溶解バッファー (プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) が補充された、PBS中0.15%サポニン (Sigma)) を使用してのRBCのサポニン溶解、16,060 gでの遠心分離、および膜細胞ペレットが白色になるまで同一のバッファーでの繰り返し洗浄によって、精製RBC膜を調製した。次いで、RBC膜を、染色のために直ちに使用したか、または相互作用タンパク質の精製のために-80°Cで保存した。

【0361】

次いで、「スペクトリンを含まない」膜をCiana et al. (2005) の改変プロトコルを使用して調製した。簡潔には、RBC膜を200 µl 5P8 (5mMリン酸Na、0.5mM EDTA、0.2mM PMSF、pH8.0) に再懸濁し、次いで、37°Cで1時間、10 mlの0.5mM EDTA pH8.5、0.33mM DTT、0.15mM PMSFで処理した。「スペクトリンを含まない」膜を4°Cで40分間27,000 gで遠心分離することによって回収し、染色のために直ちに使用したか、または-80°Cで保存した。

【0362】

可溶性Clec9Aを使用する結合アッセイ

結合アッセイを、氷上において、結合緩衝液 (0.2% BSA/および0.02% アジ化ナトリウムを含有するPBS) 中で行った。細胞をPBSで3回洗浄し、血清蛋白質を除去し、次いで結合緩衝液中に再懸濁した。細胞を以下のいずれかと共にインキュベートした: (1) ビオチン化可溶性Clec9Aおよび対照、SA-PEで検出、または (2) 可溶性FLAG-タグ化Clec9A、ビオチン化抗FLAG mAb 9H10、次いでSA-PEで検出。生細胞を、前方散乱および側方散乱に対して、またはヨウ化プロピジウム (PI) 排除によってゲーティングし、一方、死細胞を、前方散乱および側方散乱に対して、またはPI封入によってゲーティングした。可溶性Clec9A結合の分析を、FACScan (Becton Dickinson) を使用するフローサイトメトリーによって行った。結合の特異性を、他の可溶性FLAGタグ化C型レクチン、マウスCire/mDCSign (Caminschi et al., 2001) およびClec12A (Pyz et al., 2008) への結合と比較することによって実証した。

【0363】

Clec9A結合の検出のためのELISA

ELISAプレート (Costar, Broadway, Cambridge, UK) に、10 mg/mlのスペクトリン (ヒト赤血球から精製、Sigma、#S3644) またはアクチン (Sigma) を4°Cで一晩コーティングした。未結合タンパク質を洗い流し (PBS、0.05% Tween-20)、ELISAプレートをPBS、1%B SAでブロッキングした。連続希釈したビオチン化精製mClec9A-ecto、mClec9A-CTLDおよびCire可溶性タンパク質を平板培養し (PBS、1%BSA)、4°Cで一晩インキュベートした。結合された可溶性タンパク質を、ストレプトアビジン-HRPを使用して検出し、ABTSを使用して視覚化した。

【0364】

タンパク質マイクロアレイを使用しての相互作用タンパク質の同定

ビオチン化精製可溶性mClec9A-ectoおよびCire（コントロール）を、Casein Washing Buffer（Invitrogen）中において50 µg/mlへ希釈し、"ProtoArray Human Protein Microarray v4.1 Protein-Protein interaction (PPI) kit for biotinylated proteins"（Invitrogen、#PAH05241011）を使用して製造業者の指示通りにヒトタンパク質マイクロアレイへハイブリダイズさせた。ビオチン化タンパク質の結合を、Streptavidin-Alexa Fluor647を使用して検出し、画像を、蛍光マイクロアレイスキャナー（GenePix4000Bスキャナー、Axon Instruments）を使用して得た。陽性相互作用をProtoArray Prospectorソフトウェア（Invitrogen）を使用して確認した。

10

【0365】

リンパ器官からのDCによる死細胞の貪食作用取り込み

脾臓DCを以前記載されたように単離し（Caminschi et al., 2008）、死細胞の取り込みについて評価した（Schnorrer et al., 2006から改変）。簡単に記載すると、DCを、CD11c（N418-アロフィコシアニン（APC））およびCD8（YTS169.4-FITC）に対する抗体で標識した。脾細胞を、2回の凍結次いで解凍（ドライアイス上で30秒間、続いて37℃で30秒間）へ供し、次いで、4℃で10分間250ng/ml PIで標識し、過剰のPI色素を洗浄除去した。標識された凍結・解凍脾細胞（1 x 10⁶細胞／ウェル）を、4℃で30分間25 µg/mlで、可溶性タンパク質、mClec9A-ecto、mClec9A-CTLDまたは対照タンパク質Cireと共にインキュベートし、その後、10%FCS、100 U/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン、および10⁻⁴ M 2-MEを含有する改変RPMI-1640培地中の2.5 x 10⁵ DCを添加した。共培養物を、貪食作用を可能にするために37℃で、または4℃（対照）で3時間インキュベートし、次いで、LSRII（Becton Dickinson）を使用するフローサイトメトリー分析のために採取した。DCをCD11c⁺CD8⁺またはCD11c⁺CD8⁻細胞としてゲーティングし、PI⁺であったDCの割合を計算した。4℃での取り込みは、DC表面への死滅した脾細胞の結合の指標であり、一方、37℃でのさらなる取り込みは、貪食作用取り込みの指標であった。

20

【0366】

結果および議論

可溶性Clec9A外部ドメインの作製

Clec9Aリガンドを得るために、本発明者らは、まず、マウス分子およびヒト分子の両方の外部ドメインのタグ化可溶性形態を作製した。全長Clec9A外部ドメイン（Clec9A-ecto；ストーク領域およびClec9A CTLD）、またはClec9A CTLDのみ（Clec9A-CTLD）のいずれかをコードし、FLAGタグおよびビオチン化コンセンサス配列（Brown et al., 1998）を含む、構築物を作製した（図7A）。組換え可溶性mClec9AおよびhCLEC9Aタンパク質を、無タンパク質／無血清培地を使用して哺乳動物細胞中において発現させた。BirA（Avidity）酵素（図7C）を使用してそれらを酵素的にビオチン化し、ストレプトアビジン-PE（SA-PE）で検出したか、または抗FLAG試薬を使用してそれらを検出した。対照として、他のC型レクチン、マウスCire/mDCSign（Caminschi et al., 2001）およびClec12A（Pyz et al., 2008）についての同様の構築物を作製した。

30

【0367】

マウスおよびヒトClec9Aは死細胞へ結合する

種々のマウスおよびヒト細胞をスクリーニングし、可溶性Clec9Aが細胞表面へ結合し得るかどうかを測定し；低いまたは最低限の結合が正常生細胞で観察されたが、本発明者らは、いったん細胞膜が損傷されると細胞核を染色する核色素ヨウ化プロピジウム（PI）での染色に基づいて死滅していた細胞へのClec9A結合を観察した。従って、本発明者らは、γ照射を使用してアポトーシスを受けるように誘導された胸腺細胞へのmClec9Aの結合を調べた。

40

【0368】

胸腺細胞を、アポトーシスの初期マーカーであるアネキシンVで、および破壊された細胞膜を有する程度まで損傷された細胞をマークするためにPIで、染色した。mClec9A-ecto

50

は、一部のアポトーシスマウス胸腺細胞へ強力に結合したが、それらの生存相当物へは結合せず；特に、結合は、初期アネキシンV⁺アポトーシス細胞ではなく、後期アポトーシス／二次壊死細胞（アネキシンV⁺PI⁺）へ限定された（図8A）。

【0369】

本発明者らは、さらに、BH3模倣薬物ABT-737によって誘導されるアポトーシスを受けるように誘導されたマウス胚線維芽細胞（MEF）を調べた。本発明者らは、mClec9AおよびhCLEC9Aの両方が、後期アポトーシスMEFへ強力に結合したが、それらの生存相当物へは結合しなかった（図8B）ことを見出した。ヌクレアーゼによってではなく、プロテアーゼ（トリプシン、プロテアーゼK）によってアポトーシス細胞を前処理することは、用量依存様式でClec9A結合を低下させ、このことは、リガンドはタンパク質またはタンパク質結合分子であったことを示唆している（図8C）。死細胞への結合のレベルは、試験した他のC型レクチンの可溶性形態、即ち、Cire（図8A、BおよびC）およびClec12A（データは示さず）で見られたいずれの「非特異的」結合よりも高かった。

【0370】

細胞膜破裂が、リガンドを明らかにするために必要とされる全てであったという可能性を、一次壊死のモデルとして、細胞を凍結および解凍した直後にClec9Aで染色することによって試験した。Clec9Aは、凍結および解凍された3T3細胞へ（図9A）、他の凍結および解凍されたマウス細胞へ、ならびに固定および透過処理された細胞へ、および凍結マウス組織切片へ（データは示さず）、結合した。結合は、死細胞の露出された外部表面を含み、何故ならば、それはまた、mClec9Aでコーティングされた蛍光ビーズを可溶性mClec9Aの代わりに使用した場合に、蛍光顕微鏡検査下で見られたためであった（データは示さず）。凍結・解凍前に生存細胞をトリプシンで処理することは、Clec9A結合を排除せず（データは示さず）、このことは、リガンドは最初は細胞内にあったことを示している。

【0371】

要約すると、データは、Clec9Aについてのリガンドは、通常は生存細胞内に含まれ、後期アポトーシスまたは壊死において生じるような、膜破壊の後にのみ露出されることを示している。

【0372】

死細胞への結合はC型レクチンドメインを介する

死細胞へのClec9A結合の要件を調べるために、可溶性組換えタンパク質のより短い形態（CTLDのみ）を、可溶性全長外部ドメイン（ストーク+CTLD）と比較した。mClec9A-CTLDおよびhCLEC9A-CTLDは両方とも、ホモ二量体mClec9A外部ドメインと比べて、単量体であり、このことは、ストーク領域がホモ二量体化を必要としたことを示している（図7）。しかし、mClec9A-CTLDおよびhCLEC9A-CTLDは両方とも、全長外部ドメインと同様のレベルの死細胞への結合を示し、このことは、単量体CTLDが結合に十分であることを示している（図9A）。mClec9A-ectoおよびmClec9A-CTLDは、Clec9Aの限界希釈を使用した場合であっても、同様のレベルの結合を示し、このことは、外部ドメインおよびCTLDが、死細胞へ同様に結合したことを示している。

【0373】

結合はEDTAによって影響されなかったので（図9B）、カルシウムなどの二価金属イオンは、結合に必要ではない。

【0374】

死細胞へのClec9A結合の種間保存

図8および9Aに示されるように、マウスおよびヒトClec9Aは両方とも、死滅したマウス細胞へ結合した。培養細胞株または新たに単離した細胞に由来するかにかかわらず、結合は、試験した全ての死滅したマウス細胞タイプに見られた。マウスおよびヒトClec9Aはまた、死滅したヒト細胞へ（図9B）、ならびにハムスターおよびサル細胞へ（データは示さず）、等しく十分に結合した。結合はまた、凍結され解凍された昆虫細胞に対して見られたが、凍結され解凍された細菌または酵母に対しては見られなかった（図9C）。従って、Clec9Aによる死細胞の認識は、進化にわたって保存されており、リガンドは、大抵の動物

細胞によっておよび昆虫細胞によってさえ発現される。

【0375】

Clec9Aは細胞膜の細胞骨格成分へ結合する

Clec9Aが細胞膜内に存在するリガンドに結合し得るかどうかを判定するために、mClec9Aを、マウス赤血球から単離した膜（RBCゴースト）へ結合するその能力についてアッセイした。サポニン含有バッファー中でのRBCの溶解および繰り返し洗浄によってRBCゴーストを調製し、細胞を透過処理し、RBC膜の再封鎖を防止した。Clec9A-ectoおよびClec9A-CTLDの両方はRBC膜へ結合し、一方、2つのコントロールタンパク質（CireおよびClec12A）は結合を示さなかった。さらに、RBC膜が「スペクトリン除去」バッファーで処理されている場合、Clec9Aはより低いレベルで結合することがわかり、このことは、Clec9Aが、スペクトリンへまたはスペクトリン結合細胞骨格成分へ結合することを示している（図10）。 10

【0376】

Clec9Aは精製スペクトリンへ結合する

Clec9Aがスペクトリンと直接相互作用し得るかどうかを判定するために、可溶性Clec9A-ecto、Clec9A-CTLDおよびコントロールタンパク質Cireを、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を使用して、精製スペクトリンへおよびアクチンへ結合するそれらの能力についてアッセイした。精製ビオチン化Clec9A可溶性タンパク質（Clec9A-ectoおよびClec9A-CTLD）はスペクトリンへ結合し、一方、Cireはスペクトリンへもアクチンへも結合しなかった（図11）。mClec9A-ectoは、Clec9A-CTLDよりも効率的にスペクトリンへ結合し、このことは、Clec9Aのストーク領域がClec9Aとスペクトリンとの相互作用（親和性）に寄与していることを示している（図11）。 20

【0377】

Clec9A-ectoはRNF41と相互作用する

Clec9Aがさらなる分子と相互作用し得るかどうかを判定するために、精製ビオチン化mClec9A-ectoおよびCireを使用し、ヒトタンパク質マイクロアレイをスクリーニングした。mClec9A-ectoは、RNF41（アクセッション番号NM_194358）のアイソフォームへ結合することがわかった。従って、RNF41は、もう一つの可能性のある結合パートナーである。

【0378】

Clec9AはDCによる死細胞の取り込みを媒介するのか？

Clec9Aは、以前報告され（Caminschi et al., 2008 ; Sancho et al., 2008）かつ図12Aにおいて確認されたように、脾臓CD8⁺ DC上に発現され、CD8⁺ DC上には発現されない。CD8⁺ DCは、死細胞の貪食作用時により効率的となることが以前報告された（Iyoda et al., 2002 ; Schulz et al., 2002 ; Schnorrer et al., 2006）。従って、本発明者らは、死細胞の取り込みが、過剰の可溶性Clec9Aを使用してブロックされ得るかどうかを調べた。以前報告されたように（Iyoda et al., 2002 ; Schulz and Sousa, 2002）、CD8⁺ DCは、核色素PIで標識された死滅した脾細胞の貪食作用が、それらのCD8⁺ 相当物よりも効率的であった（図12B）。しかし、可溶性mClec9Aの添加は、全長外部ドメイン（mClec9A-ecto ; 図12B）またはCTLDのみ（データは示さず）にかかわらず、死細胞のCD8⁺ DC取り込みに対して顕著な効果は有さなかった。親油性膜色素PKH26で標識された死滅した脾細胞を使用して、同様の結果が観察された（データは示さず）。 30 40

【0379】

結論

Clec9Aは、後期アポトーシスまたは壊死細胞へ強力に結合し；それは、多様な起源および組織型の細胞によって発現されるが細胞膜が破壊されるまで利用可能でない成分を、認識する。従って、Clec9Aは、初期アポトーシス細胞と壊死細胞とを識別するに役立ち得る。このことは、DCの生物学において重要な差異であると考えられ、何故ならば、初期アポトーシス細胞の取り込みは、自己Agに対する免疫抑制環境を促進することが報告されており、一方、アポトーシス細胞の失敗したクリアランスまたは壊死は、免疫原性応答を促進することが報告されているためである。Clec9Aは、CD8⁺ DC上において選択的に発現され、これは、死細胞からのAgの取り込みおよびプロセッシングに特化しており、従って、そ 50

れは、このプロセスにおいて役割を有する可能性が高い。スペクトリンおよびRNF41はいずれもmClec9Aに結合するようであり、この分子の結合パートナーの一部を構成することが示唆される

【0380】

実施例3-m5B6リガンドの同定

CD8+ DCは、他のDC型よりも効率的に死細胞を取り込む (Iyoda et al., 2002)。CD8+ DC上で発現される、m5B6は、死細胞に特異的に結合するが、初期アポトーシス細胞には結合しない。初期アポトーシス細胞と壊死細胞とを識別するためにCD8+ DCによって使用される分子は最も重要であり、何故ならば、DCによる初期アポトーシス細胞の取り込みは寛容を誘導するが、壊死細胞の取り込みは免疫を誘導するためである (Sauter et al., 2000)。従って、DC上の受容体によるこれらの状態の差別的認識は、免疫系にとって非常に重要である。重要なことに、CD8+ DCのみが、外因性Agに対する効率的なCD8 T細胞応答を誘導することができる (Belz et al., 2004)。

【0381】

一部の関連C型レクチンは、それらのリガンドが同定されており、あるものは、多数のリガンドを有する (例えば、LOX-1/Clec8a、Dectin-1/Clec7a)。5B6リガンドのアイデンティティは、一団の免疫化学技術およびプロテオミクス技術を使用して決定されるであろう。

【0382】

第1のアプローチにおいては、細胞を、35Sを使用して代謝的に標識し、細胞死を誘導し、次いで、可溶性FLAGタグ化m5B6と共にインキュベートする。過剰の遊離Clec9Aを洗浄除去し、細胞を、化学架橋剤の存在または非存在下でインキュベートする。細胞を溶解し、複合体を、抗FLAG M2または抗5B6親和性樹脂のいずれかを使用してアフィニティー精製する。結合されたタンパク質を、過剰のFLAGまたは5B6ペプチドで溶出する。

【0383】

補足的なアプローチにおいて、多量のバッチのsol-5B6を精製し、NHS活性化セファロース樹脂へ結合させる。少なくとも 5×10^7 個のEL4細胞からの溶解物を、5B6親和性樹脂と共にインキュベートし、結合されたタンパク質を溶出する。溶出されたタンパク質をSDS-PAGEによって分析し、PVDF膜へ移し、ホスフォイメジャーを使用して視覚化する。陽性バンドを同定するために、この手順をスケールアップし、溶出液をSDS-PAGEおよびSypro Ruby/クマシーブルー染色によって分析する。バンドを切り取り、タンパク質を、質量分析を使用して同定する。手短に記載すると、タンパク質バンドを、トリプシンで消化し (Moritz et al., 1996)、キャピラリークロマトグラフィーで分離し (Moritz et al., 1992)、オンラインエレクトロスプレーイオン化イオントラップ質量分析計 (Simpson et al., 2000) を使用して配列決定する。

【0384】

さらなる補足的なアプローチにおいて、標準プロトコルによって、ラットを死細胞で免疫化し、融合を行い、ハイブリドーマを作製する。死細胞へ結合して、フローサイトメトリーによってアッセイした場合にsol-5B6の結合をブロックするAbについて、ハイブリドーマをスクリーニングする。本発明者らは、ブロッキングAgをクローン化および精製し、それを使用してリガンドを免疫沈降させ、質量分析によって同定を可能にする。

【0385】

可能性のあるリガンドについてのMycタグ化発現構築物を作製し、293T細胞中へ一過性トランスフェクションし、細胞死を誘導し、その後、5B6+ DCまたは5B6トランスフェクタント細胞と共にインキュベートする。本発明者らは、細胞を溶解し、抗Clec9A mAbを使用して5B6複合体を免疫沈降させ、ウェスタンブロットによってmycタグ化リガンドの共沈について分析する。あるいは、本発明者らは、5B6複合体の直接ウェスタンブロットを行う。補足的なアプローチにおいて、本発明者らは、可能性のある候補物を組換え可溶性分子として発現させ、5B6トランスフェクタントへのそれらの結合を確認する。

【0386】

10

20

30

40

50

5B6リガンドに結合する抗体は、標準手順を使用して作製される。

【0387】

実施例4—Clec9AはRNF41に結合する

材料および方法

GST-RNF41タンパク質の発現および精製

RNF41の2つの形態（全長RNF41（SEQ ID NO：76）；RNF41転写物変異体2（SEQ ID NO：77））をコードするcDNA構築物を、改変pGEX-2Tベクター（GE Healthcare）中へサブクローニングした。組換えタンパク質を、以前記載されたように（Grieco et al, 1992）、BL21（DE3）大腸菌中においてグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）融合タンパク質として発現させ、精製した。簡潔には、プラスミドで形質転換されたBL21（DE3）細胞を、Superbroth中において30℃で培養し、OD₆₀₀が約0.8に到達したら、0.1 mM イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド（IPTG）で、3時間、誘導した。IPTG誘導細胞を氷上において1時間溶解バッファー（リン酸緩衝食塩水中の、0.2 mg/mL リゾチーム、1% Triton-X 100、30 μg/mL DNアーゼI、1 mM PMSF）で溶解させた。溶解した細胞を4℃にて15分間16060 gで遠心分離した。GST-RNF41タンパク質を含有する得られた不溶性ペレットを、最初に、10分間（4℃）、1.5% N-ラウロイルサルコシン（Sarcosyl（商標）、Sigma）中に懸濁し、GST-RNF41タンパク質を抽出し、さらに10分間、2% Triton X-100および1 mM CaCl₂を補った。溶解物を遠心分離した（16060 g、15分）。可溶化GST-RNF41タンパク質を含有する上澄みを、グルタチオン-セファロース4B樹脂（GE Healthcare）と共に1時間（4℃）インキュベートした。GST-RNF41融合タンパク質とカップリングされたグルタチオン-セファロース樹脂を、下記に示すように、タンパク質-タンパク質相互作用を検出するためにプルダウンアッセイにおいて使用した。

【0388】

コントロールとして、GST-タンパク質を、プラスミドコントロールでのBL21細胞の形質転換、IPTG誘導、溶解および遠心分離によって作製した。GSTタンパク質を含有する得られた上澄みに、1.5% Sarcosyl、1% Triton X-100、1 mM CaCl₂を補った。GSTタンパク質をグルタチオン-セファロース4B樹脂へ結合させ、プルダウンアッセイにおいてコントロールとして使用した。

【0389】

プルダウンアッセイによるタンパク質-タンパク質相互作用

GSTまたはGST-RNF41タンパク質のいずれかがカップリングされたグルタチオンセファロース樹脂を、結合バッファー（完全プロテアーゼ阻害剤カクテル混合物（Roche）および1 mM PMSFを含有する、20 mM Tris緩衝食塩水、pH 7.5中の、0.2% NP-40および2%グリセロール）中に再懸濁し、1 μg/m精製FLAGタグ付き可溶性Clec9A（同様に結合バッファー中）と混合し、4℃で回転ホイール上において2時間インキュベートした。ビーズを結合バッファーで広範囲に洗浄し、未結合タンパク質を除去した。2 x SDS還元試料の添加によって、結合タンパク質をビーズから溶出し、92℃で5分間加熱した。溶出されたタンパク質を、SDS-PAGEによって分離し、続いて抗FLAG抗体を用いるウェスタンブロットを行った。

【0390】

結果

Clec9A相互作用タンパク質を検出するための代替のアプローチにおいて、本発明者らは、mClec9A-ectoおよびCireを、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）タグ付きヒトタンパク質からなるタンパク質マイクロアレイ（Invitrogen）とハイブリダイズさせた。mClec9A-ectoはRNF41のアイソフォーム（RNF41転写物変異体2によってコードされる）へ結合し、一方、Cire-ectoはRNF41に結合しなかった。本発明者らは、細菌細胞中において、全長RNF41（RNF41_{FL}）、およびRNF41転写物変異体2（RNF41₇₂₋₃₁₇）をGST-RNF41融合タンパク質としてサブクローニングし、発現させた。融合タンパク質を、グルタチオンビーズ上へ固定し、mClec9A-ectoと共にまたはコントロールmClec12A-ectoと共にインキュベートした。mClec9A-ectoは、GST-RNF41_{FL}およびGST-RNF41₇₂₋₃₁₇の両方へ直接結合したが、GST単独へは結合しなかった（図13）。対照的に、コントロールClec12AはRNF41へ結合

しなかった。これによって、mClec9AはRNF41へ特異的に結合することが確認された。これらの研究を、hCLEC9A相互作用を調べるために拡大し、hClec9A-ectoが同様にRNF41に結合することがわかり（図13）、これは、Clec9A-RNF41相互作用が種間で保存されていることを示している。

【0391】

当業者には、概括的に記載された本発明の精神または範囲から逸脱することなく、具体的な態様に示された本発明に数多くの変更および／または改変を加えうることが理解されることが考えられる。したがって、本発明の態様はあらゆる面において限定的なものではなく、例示的なものであるとみなされるべきである。

【0392】

本出願は、そのすべての内容が参照により本明細書に組み入れられる、2009年3月23日に出願されたUS 61/162,616に対する優先権を主張する。

【0393】

本明細書で考察および／または参照したすべての刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0394】

本明細書に含まれる文書、行為、材料、装置または物品などの議論は、単に本発明に関する状況を提供することのみを目的としている。それは、これらの事項のいずれかまたはすべてが、先行技術基盤の一部を構成すること、または本出願の各請求項の優先権主張日の前に存在していたために本発明に関連する分野における共通の一般的知識であったことを認定するものとみなされるべきではない。

【0395】

参考文献

10

20

- Almeida and Allshire (2005) *TRENDS Cell Biol* 15: 251-258.
- Al-Mufti et al (1999) *Am. J. Med. Genet.* 85:66-75.
- Bauer et al (2002) *Int J Legal Med* 116:39-42.
- Belz et al (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8670-8675.
- Belz et al. (2005) *J Immunol* 175, 196-200 (2005).
- Binder et al. (2004) *Tissue Antigens* 64, 442-51 (2004).
- Bird et al (1988) *Blood* 80:1418-1422.
- Bonifaz et al (2002) *J Exp Med* 196:1627-1638.
- Bourque (1995) *Plant Sci.* 105:125-149.
- Broderick and Winder (2005) *Advan Prot Chem* 70:203-246.
- Brown et al (1998) *J Exp Med* 188, 2083-90.
- Caminschi et al (2001) *Mol Immunol* 38:365-373.
- Caminschi et al (2008) *Blood* 112:3264-3273.
- Chothia and Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917.
- Ciana et al (2005) *J Biosci* 30:317-328.
- Colcher et al (1986) *Methods Enzymol.* 121:802-816.
- Delneste (2004) *Biochem Soc Trans* 32, 633-5.
- Demangel et al (2005) *Mol Immunol* 42:979-985.
- Dunbrack et al (1997) *Folding and Design*, 2:R27-42.
- Finkelman et al (1996). *J Immunol* 157:1406-1414.
- Fuller et al (2007) *J Biol Chem* 282:12397-12409.
- Galibert et al (2005) *J Biol Chem* 280:21955-21964.
- Greenwood et al (1993) *Eur J Immunol* 23: 1098-1104.
- Grieco et al (1992) *BioTechniques* 13:856-857.
- Harayama (1998) *Trends Biotech.* 16:76-82.
- Haseloff and Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591.
- Heath and Valladangos (2005)
- Henri et al (2001) *J Immunol* 167, 741-748 (2001).
- Hochrein et al (2001) *J Immunol* 166:5448-5455.
- Hoeffel et al (2007) *Immunity* 27, 481-92.
- Hume (2008) *Nat Immunol* 9, 12-4.
- Huston et al (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5879-5883.
- Iyoda et al (2002) *J Exp Med* 195, 1289-302.
- Jones et al (1986) *Nature* 321:522-525.
- Kenna et al (2008) *Blood* 111, 2091-100 (2008).
- Lahoud et al (2006) *J Immunol* 177:372-382.
- Leserman (2004) *J Liposome Res* 14:175-189.

10

20

30

40

- Millar and Waterhouse (2005) *Funct Integr Genomics* 5:129-135.
- Miller (1990) *Blood* 76:271-278.
- Moritz et al. (1992) *J Chromatogr* 599:119-130.
- Moritz et al. (1996) *Electrophoresis* 17:907-917.
- Morrison et al (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851-6855.
- Nagata (2007) *Immunol Rev* 220, 237-50 (2007).
- Naik et al (2006) *Nat Immunol* 7:663-671.
- Naik et al. (2005) *J Immunol* 174:6592-6597.
- Nchinda et al (2008) *J Clin Investig* 118:1427-1436.
- Needleman and Wunsch. (1970). *J. Mol. Biol.*, 48, 443-453.
- O'Keeffe et al (2002) *J Exp Med* 196:1307-1319.
- O'Keeffe et al (2003) *Blood* 101:1453-1459.
- Pasquinelli et al (2005) *Curr Opin Genet Develop* 15: 200-205.
- Pastan et al (1986) *Cell* 47: 641-648.
- Peng et al (2007) *J Autoimmun* 29:303-309.
- Perriman et al (1992) *Gene* 113: 157-16.
- Pyz et al (2008) *Eur J Immunol* 38:1157-1163.
- Sancho et al (2008) *J Clin Invest* 118:2098-2110.
- Sauter et al (2000) *J Exp Med* 191, 423-434.
- Schnorrer et al (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10729-10734.
- Schulz & Sousa (2002) *Immunology* 107:183-189.
- Senior (1998) *Biotech. Genet. Engin. Revs.* 15:79-119.
- Shippy et al (1999) *Mol. Biotech.* 12: 117-129.
- Shortman and Naik (2007). *Nat Rev Immunol* 7:19-30.
- Simpson et al. (2000) *Electrophoresis* 21:1707-1732.
- Smith et al (2000) *Nature* 407: 319-320.
- Steinman et al (2000) *J Exp Med* 191, 411-6.
- Steinman et al (2003) *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
- Sun et al (1986) *Hybridoma* 5S1:517-520.
- Thorpe et al (1987) *Cancer Res* 47: 5924-31.
- van Broekhoven et al (2004) *Cancer Res* 64:4357-4365.
- van Delft et al (2006) *Cancer Cell* 10, 389-99
- Vandenabeele et al (2001) *Blood* 97:1733-1741.
- Vitetta et al (1987) *Science* 238: 1098 -1104.
- Vremec et al (2000) *J Immunol* 164:2978-2986.
- Waldmann (1991) *Science* 252: 1657-1662.
- Waterhouse et al (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13959-13964.
- Weis et al (1998) *Immunol Rev.* 163:19-34.

10

20

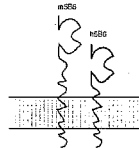
30

40

【図 3】

[illegible][illegible][illegible]

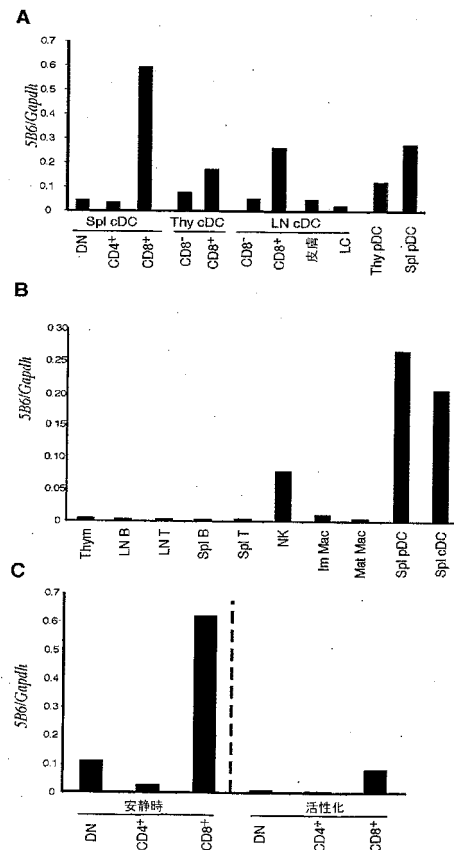
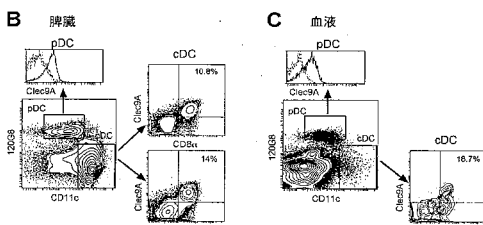
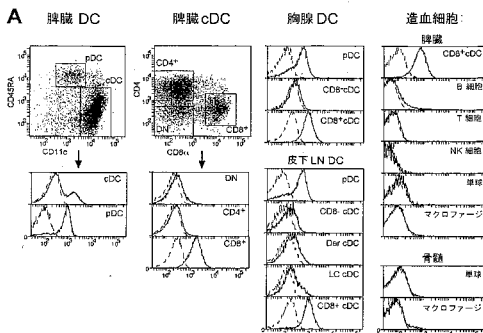
E. タンパク質概略図



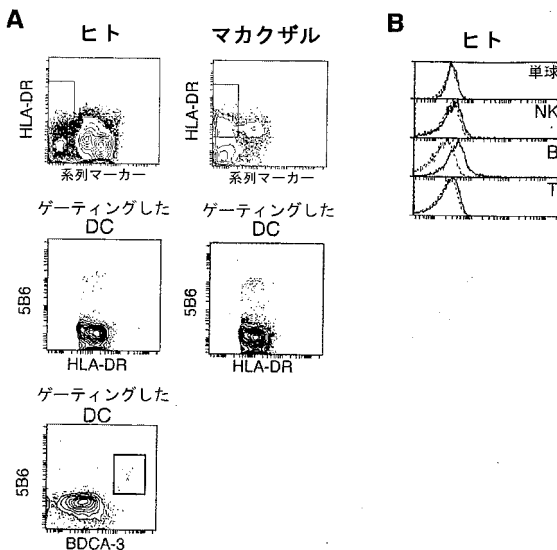
0.7 |



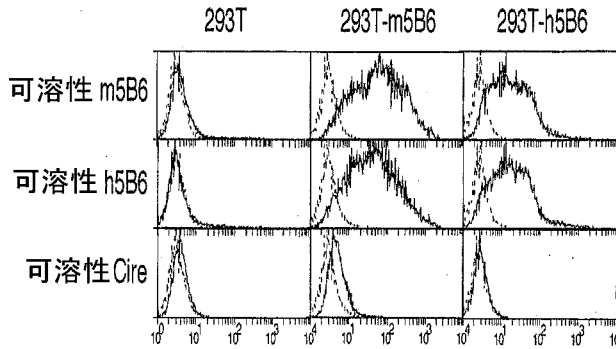
【図 5】



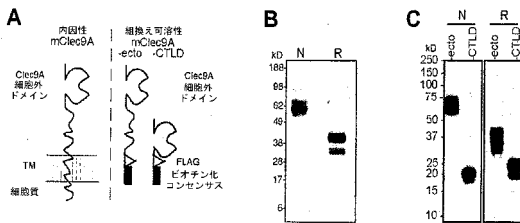
【図 5】



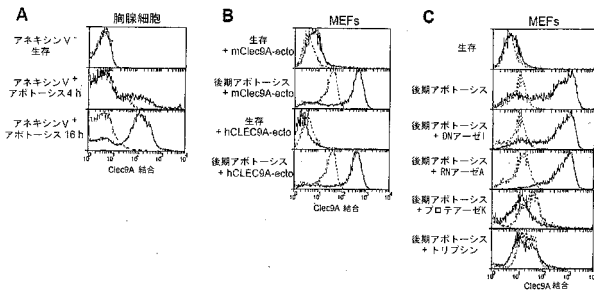
【図 6】



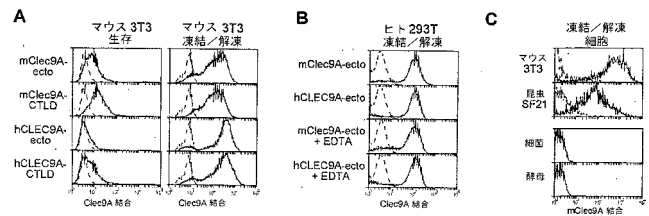
【図 7】



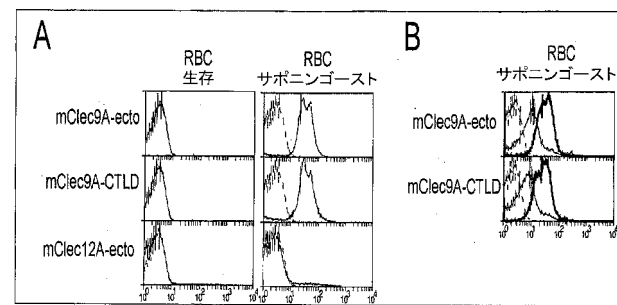
【図 8】



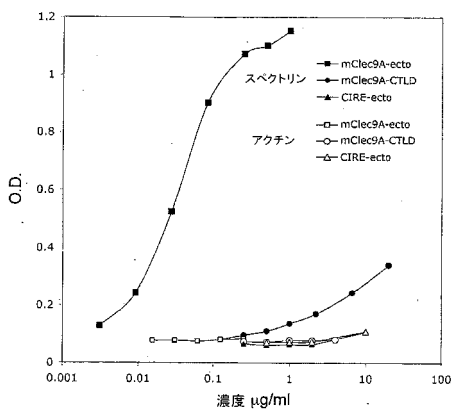
【図 9】



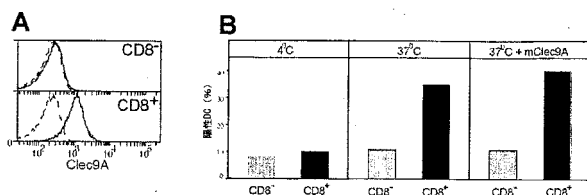
【図 10】



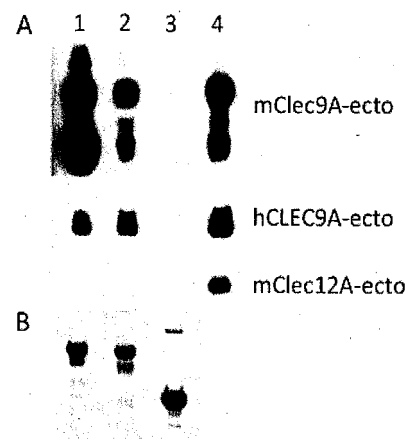
【図 11】



【図 12】



【図 13】



【配列表】

2012521199000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2010/000325
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/02 (2006.01) A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/35 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01) C12N 5/0784 (2010.01) C12N 15/12 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
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)		
Medline and WPI. Keywords: Spectrin, fodrin, SPTA1, SPTAN, SPNA, SPTB, SPNB, RNF41, NRDP1, FLRF, Clec9a, DNCR1, dendritic cell, therapeutic, cytotoxic, pharmaceutical, label, antigen, immune, engulf, apoptotic, necrotic, cell death, cancer, infection, allergy and similar terms		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/013484 A1 (Sancho-Madrid, D. et al.) 29 January 2009 (see p.10-20, 22-38, 52-54 and claims)	1-100
X	Huysamen, C. et al. 'CLEC9A is a Novel Activation C-type Lectin-like Receptor Expressed on BDCA3 ⁺ Dendritic Cells and a Subset of Monocytes'. J. Biol. Chem. 2008 vol. 283, p. 16693-16701. (see Experimental Procedures)	8-10, 13, 17-19, 91, 93-96, 99
X	Caminschi, I. et al. 'The Dendritic Cell Subtype-Restricted C-type Lectin CLEC9A is a Target for Vaccine Enhancement'. Blood. 2008 vol. 112, p. 3264-3273 (see Methods)	8-10, 13, 17-19, 91, 93-96, 99
☒ Further documents are listed in the continuation of Box.C ☒ 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 but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 June 2010		Date of mailing of the international search report 24 JUN 2010
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer CHRISTINA VAN BROEKHOVEN AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6225 6160

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2010/000325

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

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

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

See Supplemental Box.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/AU2010/000325

Supplemental Box

(To be used when the space in any of Boxes I to IV is not sufficient)

Continuation of Box No: III

This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

In assessing whether there is more than one invention claimed, I have given consideration to those features which can be considered to potentially distinguish the claimed combination of features from the prior art. Where different claims have different distinguishing features they define different inventions.

This International Searching Authority has found that there are 2 different inventions as follows:

- 1st Invention: Claims 1-100 (in part) are directed to a compound comprising a 1st polypeptide conjugated to a therapeutic agent or detectable label wherein the 1st polypeptide comprises (i) the amino acid sequence provided in any one of SEQ ID NO. 48-75, (ii) an amino acid sequence having at least 50% identity to any one of SEQ ID NO. 48-75, or (iii) a biologically active fragment of (i) or (ii), wherein the 1st polypeptide binds a 2nd polypeptide comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NO. 1-8 or polypeptide having at least 50% identity thereto; compounds which bind the 1st polypeptide; compositions which comprise the compounds; methods of using the compounds and compositions; use of the compounds and compositions for the manufacture of medicaments; polynucleotides encoding the compounds; vectors comprising the polynucleotides; host cells comprising the vectors; enriched DC populations and kits. It is considered that spectrins defined as a polypeptide comprising (i) the amino acid sequence provided in any one of SEQ ID NO. 48-75, (ii) an amino acid sequence having at least 50% identity to any one of SEQ ID NO. 48-75, or (iii) a biologically active fragment of (i) or (ii) comprises a first distinguishing feature.
- 2nd Invention: Claims 1-100 (in part) are directed to a compound comprising a 1st polypeptide conjugated to a therapeutic agent or detectable label wherein the 1st polypeptide comprises (i) the amino acid sequence provided in any one of SEQ ID NO. 76-80, (ii) an amino acid sequence having at least 50% identity to any one of SEQ ID NO. 76-80, or (iii) a biologically active fragment of (i) or (ii), wherein the 1st polypeptide binds a 2nd polypeptide comprising the amino acid sequence of any one of SEQ ID NO. 1-8 or polypeptide having at least 50% identity thereto; compounds which bind the 1st polypeptide; compositions which comprise the compounds; methods of using the compounds and compositions; use of the compounds and compositions for the manufacture of medicaments; polynucleotides encoding the compounds; vectors comprising the polynucleotides; host cells comprising the vectors; enriched DC populations and kits. It is considered that Ring Finger Protein 41 defined as a polypeptide comprising (i) the amino acid sequence provided in any one of SEQ ID NO. 76-80, (ii) an amino acid sequence having at least 50% identity to any one of SEQ ID NO. 76-80, or (iii) a biologically active fragment of (i) or (ii) comprises a second distinguishing feature.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

Each of the abovementioned groups of claims has a different distinguishing feature and they do not share any feature which could satisfy the requirement for being a special technical feature. Because there is no common special technical feature it follows that there is no technical relationship between the identified inventions. Therefore the claims do not satisfy the requirement of unity of invention *a priori*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2010/000325

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 1992/001935 A1 (The Regents of the University of California) 6 February 1992 (see p. 8-10 and claims)	8-12, 19, 63, 64, 67, 68, 90
X	WO 2004/108079 A2 (University of Massachusetts) 16 December 2004 (see p. 6-10, 19-26, 28-29, 32-34 and claims)	7-12, 18, 19, 21, 63-71, 73, 74, 91-96, 99
X	Chakrabarti, A. et al. 'Spectrin Organization and Dynamics: New Insights'. Biosci. Rep. 2006 vol. 26, p. 369-386 (see p. 370, 372, 377 and 379)	7-12, 18, 91-96
X	Liu, C-H. et al. 'New Insights into the Role of the Ubiquitin-proteasome Pathway in the Regulation of Apoptosis'. Chang Gung Med. 2007 J. vol. 30, p.469-479 (see p. 471-472)	7-10, 18, 91-96

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2010/000325

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report				Patent Family Member			
WO	2009013484	AU	2008278831	CA	2693277	EP	2185586
WO	9201935	CA	2088050	DK	33991	EP	0432218
		EP	0540591	JP	11030615	US	5118606
		WO	9002949				
WO	2004108079	NONE					
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.							
END OF ANNEX							

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
	C 1 2 N 5/00 1 0 2	
	C 1 2 N 5/00 1 0 3	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ラホード ミレイル ハンナ
オーストラリア国 ビクトリア州 メルボルン パークビル ロイヤル パレード 1ジー ダブ
リュイーエイチアイ

(72)発明者 カミンスチ イリナ
オーストラリア国 ビクトリア州 メルボルン パークビル ロイヤル パレード 1ジー ダブ
リュイーエイチアイ

(72)発明者 ショートマン ケン

- オーストラリア国 ビクトリア州 メルボルン パークビル ロイヤル パレード 1ジー ダブ
リュイーエイチアイ
- (72)発明者 ザン ジャンーグオ
オーストラリア国 ビクトリア州 メルボルン パークビル ロイヤル パレード 1ジー ダブ
リュイーエイチアイ
- (72)発明者 バン デルフト マーク フランシス
オーストラリア国 ビクトリア州 メルボルン パークビル ロイヤル パレード 1ジー ダブ
リュイーエイチアイ
- (72)発明者 ハン デビッド チン シャン
オーストラリア国 ビクトリア州 メルボルン パークビル ロイヤル パレード 1ジー ダブ
リュイーエイチアイ
- (72)発明者 ニコラ ニコス アンソニー
オーストラリア国 ビクトリア州 メルボルン パークビル ロイヤル パレード 1ジー ダブ
リュイーエイチアイ
- (72)発明者 カウマン アラン
オーストラリア国 ビクトリア州 メルボルン パークビル ロイヤル パレード 1ジー ダブ
リュイーエイチアイ
- (72)発明者 ライト マーク デクスター
オーストラリア国 ビクトリア州 メルボルン パークビル ロイヤル パレード 1ジー ダブ
リュイーエイチアイ

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 DA02 EA04 GA14 HA14 HA17
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C076 AA19 CC07 CC26 CC27 CC29 CC32 CC34 FF68
4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 MA24 NA14 ZB072
ZB082 ZB132 ZB212 ZB262 ZB312 ZB382 ZC022
4H045 AA11 BA10 DA76 EA20 FA74