

(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2008-515781**  
(P2008-515781A)

(43) 公表日 平成20年5月15日(2008.5.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/47 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/47 Z N A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 C O 8 4
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 P	4 H O 4 5
<b>G O 1 N 33/564 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 N	
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/564 Z	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-531607 (P2007-531607)  
 (86) (22) 出願日 平成16年9月15日 (2004. 9. 15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年3月28日 (2007. 3. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/052195  
 (87) 国際公開番号 WO2006/029652  
 (87) 国際公開日 平成18年3月23日 (2006. 3. 23)

(71) 出願人 506286582  
 メディツィニシエ・ホフシューレ・ハノーバー  
 ドイツ・30625・ハノーバー・カール  
 ノイバークーシュトラーセ・1  
 (71) 出願人 507082862  
 トルステン・マティアス  
 ドイツ・55237・フロンハイム・シュ  
 ヴェーブニッツァー・シュトラーセ・13  
 (74) 代理人 100064908  
 弁理士 志賀 正武  
 (74) 代理人 100089037  
 弁理士 渡邊 隆  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫調節のための I L T 6 の使用

(57) 【要約】

本発明は、ヒトにおける免疫応答の調節に関する。より詳細には、本発明は、免疫応答を調節するためのILT6の医学的使用、および、ILT6を含む医薬組成物に関する。

更なる態様においては、本発明は、ILT6を使用した、例えば異種および/または自己抗原に対するヒトの免疫応答を調節するためのヒトの医学的処理に関する。更にその上、本発明は、診断目的のためのILT6の分析、および、その分析のために使用することができる診断用組成物に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

医学的用途のための、ヒトILT6遺伝子の天然の翻訳産物およびその機能的誘導体から選択されるヒトILT6タンパク質。

**【請求項 2】**

前記医学的用途が、自己免疫疾患および望ましくない免疫応答から選択される疾患を対象とする、請求項1に記載のILT6。

**【請求項 3】**

前記自己免疫疾患が、多発性硬化症、シューグレン症候群または急性期を有する自己免疫疾患であることを特徴とする、請求項2に記載のILT6。

**【請求項 4】**

前記望ましくない免疫応答が、移植患者における移植片対宿主病または宿主対移植片病であることを特徴とする、請求項2に記載のILT6。

**【請求項 5】**

前記医学的用途が、免疫応答の減少であることを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載のILT6。

**【請求項 6】**

前記免疫応答が、細胞性免疫応答であることを特徴とする、請求項2から5のいずれか一項に記載のILT6。

**【請求項 7】**

前記免疫応答が、液性免疫応答であることを特徴とする、請求項2から5のいずれか一項に記載のILT6。

**【請求項 8】**

真核または原核細胞において発現させた、ヒトILT6遺伝子配列に由来する天然の翻訳産物またはその機能的な誘導体である、請求項1から7のいずれか一項に記載のILT6。

**【請求項 9】**

請求項1から8のいずれか一項に記載のILT6を含むことを特徴とする医薬組成物。

**【請求項 10】**

ヒトから得られた体液サンプル中のILT6の濃度の測定を含むことを特徴とする、ヒトの免疫系の活性化の状態または免疫応答を分析する方法。

**【請求項 11】**

前記ILT6の測定が、抗体に基づくアッセイであることを特徴とする、請求項10に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記ヒトが自己免疫疾患に罹患していることを特徴とする、請求項10または11に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記自己免疫疾患が、多発性硬化症、シューグレン症候群および急性期を有する自己免疫疾患を含む群から選択されることを特徴とする、請求項12に記載の方法。

**【請求項 14】**

請求項9から13のいずれか一項に記載の方法に適することを特徴とする、ILT6に特異的な抗体。

**【請求項 15】**

体液サンプル中のILT6と交差反応する抗体を測定する方法。

**【請求項 16】**

請求項15に記載の方法で使用するための、ILT6、またはILT6により誘導可能な免疫学的応答性を有するILT6の誘導体。

**【請求項 17】**

リンパ球混合反応における、ヒトから得られた体液サンプル中に含まれるILT6のin vitro活性の測定を含むことを特徴とする、ヒトの免疫系の活性化の状態または免疫応答を分

10

20

30

40

50

析する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトにおける免疫応答の調節に関する。より詳細には、本発明は、免疫応答を調節するための化合物の医学的使用、および、前記化合物を含む医薬組成物に関する。

【0002】

更なる態様においては、本発明は、前記化合物を使用した、例えば異種および/または自己抗原に対するヒトの免疫応答を調節するためのヒトの医学的処理に関する。更なる上、本発明は、診断目的のための前記化合物の分析、および、その分析のために、または、前記化合物と交差反応する抗体の分析のために使用することができる診断用組成物に関する。

10

【背景技術】

【0003】

免疫系の活性を一般的に抑制することによって、免疫系の望ましくない活性を調節することが知られている。例として、化学療法またはコルチゾンのようなホルモンの医学的投与が用いられている。

【0004】

また、Ig様転写産物 (ILT) をコードする少なくとも19の遺伝子を含む、白血球Ig様受容体クラスター (LILR) によってコードされる遺伝子が知られている (Trowsdale et al., Immunol. Rev. 181, 20-38 (2001))。

20

【0005】

ILTは、様々な免疫細胞によって発現しており、ILT2およびILT4はHLA I分子に結合することが知られている。Chang et al., Nat. Immunol., 3: 237-243(2002)に、ILT3およびILT4の発現が、T細胞における寛容の産生に役割を果たしうることが開示されている。抗原に対する免疫応答の調節は、ILTにより、細胞溶解活性を阻害または活性化することによって、行われる (Dietrich et al., J. Immunol., 166: 2514-2521(2001))。

【0006】

LILRA3またはCD85eとも呼ばれるILT6については、可溶性タンパク質であり、すなわち、膜結合ではないことが見出されている。更なる上、Torkar et al., Eur. J. Immunol., 30: 3655-3662(2000)には、ILT6をコードする遺伝子の7つの5'エキソンが欠如した (6.7kbpセグメントの欠失) 個体が、ILT6について存在/不存在の多様性を示すことが開示されている。

30

【0007】

DNA配列については、ILT6は、ILT2遺伝子とある程度の相同性を有する。ILT6の遺伝子は、19q13に位置し、これは、中枢神経系に影響を及ぼす一般的な脱髄疾患である多発性硬化症 (MS) についてのリスク遺伝子を保有することが示されている染色体領域である。MSは、個体の免疫系による中枢神経系の進行性の破壊によって特徴付けられ、この疾患においては、細胞性免疫応答が、非常に重要な役割を果たしている。

【0008】

ILT2は、プロフェッショナルな抗原提示細胞 (APC) だけでなく、T細胞およびナチュラルキラー細胞上にも発現している。ILT2は、HLA Iに結合し、受容体として作用する。ILT2は、T細胞の活性を調節し、制御性T細胞と相互作用することによって、免疫寛容の誘導に関与している。例えば、ILT2は、粘膜抗原に対する免疫系の寛容を調節するのに関与している。更なる上、ILT2は、妊娠期間中の母親/胎児の免疫寛容に関与していると推測されている。

40

【非特許文献1】Trowsdale et al., Immunol. Rev. 181, 20-38 (2001)

【非特許文献2】Chang et al., Nat. Immunol., 3: 237-243(2002)

【非特許文献3】Dietrich et al., J. Immunol., 166: 2514-2521(2001)

【非特許文献4】Torkar et al., Eur. J. Immunol., 30: 3655-3662(2000)

50

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

本発明の第一の目的は、医学的目的で、例えば医薬組成物において、ヒトの免疫系の活性を調節するのに使用することができる化合物を提供することである。特に、細胞性免疫応答に主に影響を及ぼす化合物を提供することが望ましい。更にその上、免疫系の活性を活性化または抑制するのに使用することができる化合物を提供することが望ましい。この点において、特に、急性免疫応答の一部を形成するT細胞、好ましくは活性化されたT細胞の活性に対して作用する化合物を提供することが望ましい。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

本発明は、ILT6をコードするヒト遺伝子に由来する翻訳産物として得ることができる、ILT6を提供することによって前記の目的を達成する。代替的に、例えば、変異、誘導体化、欠失、および/または、それ自身もしくは他のペプチドとの融合によって得ることができる、ヒトILT6遺伝子産物の機能的誘導体が提供される。

## 【0011】

本発明者により、可溶性ILTであるILT6が、容量依存的に、細胞性免疫応答を調節することが見出された。詳細には、低濃度の、例えば0.01 µg/ml未満のILT6が、*in vitro*フォーマットで、リンパ球の増殖を活性化するのにに対して、0.01 µg/mlより高い濃度のILT6は、*in vitro*で、リンパ球の増殖を阻害することを見出した。

## 【0012】

ILT6は、ヒトILT6遺伝子に由来するDNA配列から、異種タンパク質発現のための既知の原核および真核発現システムによって産生することができる。哺乳類細胞内でILT6を発現させる場合は、イントロン配列を含むILT6遺伝子の自然的組織化を使用することができるのに対して、原核発現システムまたは酵母もしくは菌類を使用した発現システムについては、イントロン配列を含まないDNA配列、例えば、ILT6遺伝子に由来するプロセッシングを受けた転写産物のcDNAに由来するDNA配列を使用することが好ましい。

## 【0013】

本発明の前記目的にしたがって、ヒトILT6遺伝子産物だけでなく、自己免疫疾患（例えばMSまたはシュレーグレン症候群）のような望まない免疫応答の指標に適した、医薬的適用のためのその使用、または、医薬組成物における活性成分としての使用を提供する。更にその上、ヒトにおける、好ましくは、自己免疫疾患（例えばシュレーグレン症候群）に罹患した患者における、機能的に活性なILT6の濃度の診断的なアッセイ試験を提供する。本発明の更なる実施態様においては、患者に、好ましくは、自己免疫疾患（例えばシュレーグレン症候群）に罹患した患者に存在する、ILT6と交差反応する抗体の濃度の診断的なアッセイ試験を提供する。

## 【0014】

本発明者は、ホモ接合ILT6欠損が、MSに罹患した751人の患者においては、7.3%に検出されたが、コントロール群では3.8%のみであることを見出し、多発性硬化症（特に再発寛容型MS）との統計的に顕著な関連性を示したが、一次性進行型MSまたは二次性進行型MSとは関連性を示さなかった。コントロールにおいては、ホモ接合およびヘテロ接合ILT6欠損の分布は、ハーディー・ワインベルグ平衡と異なることはなかった。

## 【0015】

多くの自己免疫疾患が多遺伝子性であるので、MS患者におけるILT6の欠損は、いくつかの寄与因子の一つであろう。本発明者は、再発寛容型MSのみとの関連性から判断して、ILT6の欠損のみが、MSの発症の必須条件ではないと推測する。しかしながら、RRMSとILT6欠損の関連性（8.0%）の、PPMSとILT6欠損の関連性（7.0%）およびSPMSとILT6欠損の関連性（5.8%）との差異は、統計学的に顕著ではなく、少数のサンプル数が原因であろう（RRMS、n=451；PPMS、n=129；SPMS、n=154）。従って、現時点では、ILT6欠損が、MSの特定のサブグループについて特徴的であると結論付けることはできない。

10

20

30

40

50

## 【0016】

ILT6の作用についての機構は知られていないにもかかわらず、ILT6は、小さなリガンドに、特にMHC Iに結合する関連ILTのアゴニストとして作用していると推測される。代替的に、ILT6は、抗原と免疫系の細胞との間の可溶性メディエーターとして作用することができるであろう。

## 【0017】

ILT6は、主に、活性化されたT細胞に対して免疫調節作用を行っていることを示すことができた。たとえば、インターフェロン $\gamma$ によって活性化された単球およびマクロファージは、ILT6の存在によって免疫調節されるが、休止した免疫細胞、例えば休止した単球、B細胞、T細胞またはPBL (peripheral blood lymphocyte: 末梢血リンパ球) には顕著な影響を及ぼさない。活性化した免疫細胞の活性を免疫調節する目的のために、ヒトILT6遺伝子配列の翻訳産物を使用することができ、例えば、ヒトILT6についての構造遺伝子から、動物細胞に発現させることができる。代替的に、同一の翻訳産物を、微生物内で、ヒトILT6遺伝子配列に由来する、断続的に続くイントロン配列が欠損した、場合によっては、ILT6タンパク質の産生に使用される微生物において活性であるシグナル配列を加えた、遺伝子配列の翻訳により得ることができる。

10

## 【0018】

さらにその上、ILT6の機能的誘導体を、本発明の目的のために使用する。このような機能的誘導体には、例えば、天然のILT6タンパク質の1つまたは複数の領域と、異なるタンパク質またはILT6それ自身との融合タンパク質、および、ILT6タンパク質内の1つのアミノ酸またはアミノ酸領域の変換、欠失または置換が含まれる。他のペプチドとの融合についての例としては、ポリ-ヒスチジンタグのような精製のために有用なタグ、および既知の抗体によって検出されることができる抗原が挙げられる。ヒトILT6タンパク質の機能的誘導体のクローニングおよび発現は、過度の実験を行うことなく、標準的な方法に従って、当業者によって実施することができる。ILT6およびその誘導体の機能的活性は、このタンパク質の免疫調節特性を試験することにより(例えばリンパ球混合アッセイにより)、当業者によって求めることができる。このような機能的試験の例を、実施例3に示す。

20

## 【0019】

ILT6が、活性な免疫応答を、すなわち活性化された免疫細胞による急性免疫応答を免疫調節することは、ILT6の特別な利点である。それ故、ILT6は、医学的用途で、例えば、活性な免疫応答を調節するための医薬調製物における活性成分として、例えば、免疫応答の急性期または持続的免疫応答の経過に影響を与えるのに、使用することができる。好ましい実施態様においては、本発明は、必ずしも休止免疫細胞に影響を与えることなく、医学的用途でILT6を使用する。例として、例えば移植患者における移植片対宿主病または宿主対移植片病、または自己免疫疾患を原因とする免疫応答を治療するために、ILT6を使用することができる。自己免疫疾患の例としては、多発性硬化症およびシューグレン症候群を挙げることができ、これらの病気においては、好ましくは病気の急性期に、ILT6を使用して免疫応答を抑制することができる。

30

## 【0020】

医学的用途のためのILT6の投与は、適した調合物を使用して、i.m.、s.c.もしくはi.v.または経口的のいずれかで、注入によって実施することができる。

40

## 【0021】

体液、例えばヒトから得られた血液サンプルにおけるILT6の存在および濃度は、ヒトの免疫系の状態、例えば急性免疫応答の存在に関連することが見出された。

## 【0022】

従って、本発明は、更なる態様においては、体液のサンプルにおけるILT6の濃度および/または活性を測定するための診断的アッセイを提供する。ILT6の濃度および/または活性の測定の結果として、人の免疫系の状態を、例えば急性免疫応答の存在または不存在を、求めることができる。個体の更なる兆候または兆しに、分析方法の1つで測定した急性免疫応答の存在または不存在を関連付ける場合、分析方法を使用して、自己免疫疾患(例え

50

ばMSまたはシューグレン症候群)の状態または活性を測定することができる。

【0023】

1つの実施態様においては、ILT6に関連した診断試験は、抗体に基づくアッセイにより、体液(例えば血液)のサンプル中のILT6の濃度の分析である。抗体に基づくアッセイについての1つの例は、ILT6に特異的な少なくとも1つのモノクローナルまたはポリクローナル抗体および適した検出システムを使用したELISAフォーマットである。ELISAフォーマットは、非-競合または競合(例えば、体液サンプルに存在するILT6の競合物質として、真核または原核細胞で発現させたILT6タンパク質を使用した競合)とすることができる。他のフォーマットは、ILT6またはその交差反応性誘導体を検出するための、ILT6に対する抗体を使用した、体液サンプルのドットプロットまたはウェスタンプロットである。

10

【0024】

ILT6に特異的な抗体は、ポリクローナル抗体を含む血清を得るための、様々な実験動物、例えばマウス、ラットおよびウサギの免疫化により得ることができる。モノクローナル抗体は、免疫化した実験動物から単離した脾臓細胞とミエローム細胞との融合を使用したハイブリドーマ手法によって得ることができる。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の産生方法の詳細な記載は、「Methods in Enzymology」および「Molecular Cloning, A Laboratory Manual by Sambrook, Maniatis, Fritsch, Cold Spring Harbour」を利用することができる。

【0025】

自己免疫疾患または他の望ましくない免疫応答に罹患したヒトにおけるILT6に対する可能性ある免疫反応を考慮すれば、そして、医学的処置の間に患者に投与するILT6に対する可能性ある免疫反応に関しては、このようなILT6に対する免疫応答の測定のための診断方法および診断用組成物は、本発明の範囲内に含まれる。

20

【0026】

従って、更なる態様においては、本発明は、ILT6に対する自己抗体、およびILT6を発現していない患者に投与したILT6に対する抗体のための診断試験を提供する。これに関して、ILT6またはその機能的誘導体が、体液サンプル中のILT6と交差反応する抗体の存在および濃度を測定するための免疫学的アッセイにおける使用のために提供される。前記したように、ILT6およびその機能的誘導体は、異種遺伝子発現によって産生することができ、または、代替的に、ペプチド合成により合成的に産生することができる。誘導体は、好ましくは、ILT6に対する自己抗体または抗体と交差反応するエピトープを、単一にまたは反復して含む。

30

【0027】

診断試験は、ILT6に交差反応する抗体を特異的に吸収する補足タンパク質として、ILT6またはその免疫学的相当物を使用した、ELISA、プロット、または任意の他の免疫学的アッセイのフォーマットを使用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0028】

ここで、本発明を、添付の図面を参照に、より詳細に開示する。図1は、ILT6の濃度に依存した、末梢血単核球細胞の阻害および刺激をそれぞれ示すグラフである。

40

【0029】

シューグレン症候群については、ILT6欠損は、9%の患者に存在しており、この疾患との関連性は統計的に顕著であった。対照的に、ILT6欠損は、SLEおよび強皮症とは関連していない。

【実施例】

【0030】

(実施例1: ヒトILT6遺伝子のクローニング)

QiaAmp DNA Minikit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して、末梢全血からゲノムDNAを抽出した。PCRプライマー-5'CCC CCT GGA GCT CGT GG 3' (配列番号1) および5'GAC AGC AGA TTC TAA AAC AGT G 3' (配列番号2) を使用して、1150塩基対を含む完全なILT6遺伝

50

子を、製造者の取扱説明書に従って、1.5mMのMgCl<sub>2</sub>、200 μMのdNTP、2.5ユニットのTaqポリメラーゼを含む1×PCRバッファー中の10pmolの各プライマー、50ngのゲノムDNAを用いたPCR反応で増幅した。

【0031】

サーモサイクルは、95 15分間、30サイクルの94 45秒間、64 55秒間および72 55秒間、ならびに最終伸長72 10分間を使用した。産物を、電気泳動（1.5%アガロース）によって分離し、エチジウムブロマイドを用いて染色しUV下で検出した。

【0032】

配列決定については、TAクローニングキット（Invitrogen、Karlsruhe）を使用したPCR産物を、PCR2.1ベクターへとクローニングした。

10

【0033】

統計学的分析を、フィッシャーの正確確率を用いて、顕著性として0.05未満の関連性のみに関して実施した。

【0034】

（実施例2：ILT6の産生）

ILT6タンパク質の産生については、既知の方法に従って、ヒトの末梢全血から単離した完全なRNAについてのRT-PCRを使用して、例えば、QIAamp RNA blood mini kit(Qiagen、Hilden、Germany)を使用して、製造者の取扱説明書に従って、ヒトILT6をコードするcDNAを合成した。

【0035】

発現およびその後続く精製については、イントロン配列が介入していない完全なヒトILT6のエキソンをコードするcDNAを、3'にポリ-ヒスチジンタグをコードする融合配列で得た。これは、その生物学的活性を保持する、ヒトILT6の機能的誘導体の一例である。

20

【0036】

RT-PCRについては、以下のプライマーを細胞内RNAについて使用した：開始コドンの5'に追加のBamH1部位を含む5'AGG ATC CGC CAT GAC CCC CAT C 3'（配列番号3）および停止コドンの5'にヒスチジンタグをコードして停止コドンの3'にNot1部位を含む5'GCG GCC GC T CAA TGA TGA TGA TGA TGA TGC TCA CCA GCC TTG GAG 3'。得られた遺伝子産物は、以後は、ILT6::poly-Hisと称する。

【0037】

ベクターpCR2.1（Invitrogen）へのPCR産物のライゲーションおよび配列決定後に、融合ペプチドILT6::poly-Hisを、制限酵素部位BamH1およびNot1を使用して発現ベクターpBacPak8（Clontech）へとクローニングした。バキュロウイルスへの伝達後に、培養したSF9細胞へ感染させた。発現のために、細胞を、TNM-FH培地（Hink et al., Nature 226: 466-467(1970)に開示されており、80mlのウシ胎児血清、3.0gのラクトアルブミン水解物、3.0gのYeastolateと組み合わせた900mlのGrace培地を、粉末状成分が溶けるまで激しく攪拌し；必要であれば、1.0NのKOH（pHを上げる）または1.0NのHCl（pHを下げる）の添加によって、pHを6.40-6.45に調整し；必要であれば、無水D-グルコース（浸透圧を上げる）または水（浸透圧を下げる）を用いて浸透圧を360-380 milliosmolに調整して得ることができる（Sigma-Aldrich、product No.T3285で入手可能）で増殖させて、5-6日間37 °C、5% CO<sub>2</sub>雰囲気下で、プラークが形成されるまで感染させることによって誘導する。

30

【0038】

細胞を回収後に、細胞溶解液から、Hig-tagを利用し、ニッケルキレートカラムクロマトグラフィーを用いて、タンパク質を精製した。ILT6::poly-Hisを、ニッケルキレートカラムから抽出し、免疫調節実験に使用した。

【0039】

（実施例3：免疫系に対するILT6のin vitro活性）

実施例2に従って得られた組み換え産生したILT6::poly-Hisを、リンパ球混合反応における末梢血リンパ球（PBL）の活性を調節するために使用した。リンパ球混合反応は、その添加前に照射された、第二の健康なドナーから得られた20,000 PBLの添加によって刺激

40

した、健康な第一のドナーから得られた100,000 PBLを1ウェル当たり含む。

【0040】

実施例2で得られた組み換えILT6を、最終濃度0.33 μg/mlから0.0033 μg/mlで添加した。

【0041】

第一のドナーから得られたPBLの増殖をモニターするために、<sup>3</sup>H-チミジンを72時間後に添加し、試験反応物を96時間で回収した。比較のために、ILT6遺伝子配列をRo遺伝子配列に置き換えて実施例2に従って発現させて精製したタンパク質Roを使用した。

【0042】

図1に、ILT6の添加による、リンパ球混合反応における末梢血単核球の増殖の阻害を示す。3人の異なるドナーの刺激PBLを用いた実験から得られた平均値および標準偏差をプロットする。

10

【0043】

この結果により、高濃度のILT6、具体的には0.033 μg/ml以上の濃度のILT6は、活性化されたPBLの増殖を阻害するのに対して、低濃度のILT6、具体的には0.0033 μg/mlより低い濃度のILT6は、その増殖を刺激することが実証された。比較アッセイにおいてRoタンパク質を使用した場合、増殖阻害も活性化も実質的には見いだされなかった。

【0044】

顕微鏡を用いてPBLの形態を調べた場合、PBLの増殖を阻害する濃度のILT6は、PBLに毒性効果をもたらさなかったが、その増殖をむしろ休止させることが検出された。

20

【0045】

(実施例5：ILT6によるT細胞の直接的な調節)

様々な濃度のILT6を用いて処理したT細胞の細胞内カルシウム濃度をモニターするために、以下のアッセイを使用した：PBLまたはJurkat T細胞を、20 μMの可視光-刺激性Ca<sup>2+</sup>インディケータ-fluoro-h fluorochrome (CAS 121714-22-5/グリシン、N-[4-[6-[(アセチルオキシ)メトキシ]-2,7-ジクロロ-3-オキソ-3H-キサンテン-9-イル]-2-[2-[2-[ビス[2-[(アセチルオキシ)メトキシ]-2-オキシエチル]アミノ]-5-メチルフェノキシ]エトキシ]フェニル]-N-[2-[(アセチルオキシ)メトキシ]-2-オキシエチル]-、(アセチルオキシ)メチルエステル (Molecular Probes、c/o Invitrogen、Karlsruhe、Germany、catalog No.F1241)を用いて、30分間37 °Cで処理し、その後、穏やかにPRMI培地で三回、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で一回洗浄した。ポジティブコントロールとして、10 μMのIonomycinを、別々の試験サンプルに加えた。カルシウムの細胞内遊離を、FACScalibur (Becton Dickinson) fluorescence activated cell sorterを用いて、400nmで測定した。

30

【0046】

ILT6の存在により、カルシウムの細胞内遊離が誘導されたことが見出された。このことにより、ILT6がT細胞に直接作用することが実証された。

【0047】

IFN-γが、MSの急性期に増加したレベルで検出することができたという観察を考慮して、IFN-γによるILT6の産生の直接的な活性化から、ILT6が、自己免疫疾患 (例えば多発性硬化症) のような炎症性疾患の経過に生理学的に関与していることを推測することができる。しかしながら、炎症状態の間におけるILT6の増加した産生は、本発明によるILT6の医学的適用を損ねることはない。

40

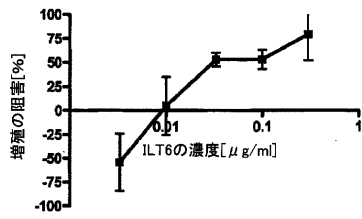
【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】図1は、ILT6の濃度に依存した、末梢血単核球細胞の阻害および刺激をそれぞれ示すグラフである。

【 図 1 】

Figure 1:



【 配 列 表 】

2008515781000001.app

【 国際調査報告 】

**PCT****INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference <b>N1009PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b>		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. <b>PCT/EP2004/052195</b>	International filing date (day/month/year) <b>15/09/2004</b>	(Earliest) Priority Date (day/month/year)	
Applicant <b>MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER</b>			
<p>This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.</p> <p>This International Search Report consists of a total of <u>5</u> sheets.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.</p>			
<p>1. <b>Basis of the report</b></p> <p>a. With regard to the <b>language</b>, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.</p> <p><input type="checkbox"/> The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).</p> <p>b. <input checked="" type="checkbox"/> With regard to any <b>nucleotide and/or amino acid sequence</b> disclosed in the international application, see Box No. I.</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> <b>Certain claims were found unsearchable</b> (See Box II).</p> <p>3. <input type="checkbox"/> <b>Unity of invention is lacking</b> (see Box III).</p> <p>4. With regard to the <b>title</b>,</p> <p><input type="checkbox"/> the text is approved as submitted by the applicant.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> the text has been established by this Authority to read as follows: <b>USE OF ILT6 FOR IMMUNOMODULATION</b></p> <p>5. With regard to the <b>abstract</b>,</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> the text is approved as submitted by the applicant.</p> <p><input type="checkbox"/> the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.</p> <p>6. With regard to the <b>drawings</b>,</p> <p>a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____</p> <p><input type="checkbox"/> as suggested by the applicant.</p> <p><input type="checkbox"/> as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.</p> <p><input type="checkbox"/> as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.</p> <p>b. <input checked="" type="checkbox"/> none of the figures is to be published with the abstract.</p>			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/052195

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07K16/28 A61K39/00 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WISNIEWSKI ANDRZEJ ET AL: "Distribution of LILRA3 (ILT6/LIR4) deletion in psoriatic patients and healthy controls." HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 64, no. 4, April 2003 (2003-04), pages 458-461, XP002326563 ISSN: 0198-8859 *Whole document, in particular: Abstract; page 458, right hand column, last paragraph* ----- -/--	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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		Date of mailing of the international search report
28 April 2005		10/06/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  BULCAO DE MELO BARRE

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2004/052195

**Box 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.: 10-13, 15 and 17  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 10-13, 15 and 17 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/052195

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOODIE S J ET AL: "Analysis of candidate genes on chromosome 19 in coeliac disease: An association study of the KIR and LILR gene clusters" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOGENETICS, vol. 29, no. 4, August 2002 (2002-08), pages 287-291, XP002326564 ISSN: 0960-7420	1-9,16
Y	*Whole document, in particular: Abstract*	10-15,17
X	TORKAR MICHAELA ET AL: "Arrangement of the ILT gene cluster: A common null allele of the ILT6 gene results from a 6.7-kbp deletion" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 30, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 3655-3662, XP002326565 ISSN: 0014-2980	1-9,16
Y	cited in the application *Whole document, in particular: Abstract; page 3657, left hand column, second paragraph and right hand column*	10-15,17
Y	PERICAK-VANCE M A ET AL: "Linkage and association analysis of chromosome 19q13 in multiple sclerosis." NEUROGENETICS. OCT 2001, vol. 3, no. 4, October 2001 (2001-10), pages 195-201, XP002326566 ISSN: 1364-6745 *Whole document, in particular: Abstract; page 199, right hand column, second paragraph*	10-15,17

## 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	37/02 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P	1/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
		A 6 1 P 37/06	

(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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72)発明者 トルステン・ヴィッテ

ドイツ・30559・ハノーファー・ニツチュケヴェーク・12

(72)発明者 トルステン・マティアス

ドイツ・55237・フロンハイム・シュヴェーブニツァー・シュトラッセ・13

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA04 DA02 EA04 GA11 HA03 HA11  
 4C084 AA02 AA07 BA44 CA18 CA36 DC50 NA14 ZA011 ZA012 ZA671  
 ZA672 ZB022 ZB052 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082  
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	使用ILT6进行免疫调节		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008515781A</a>	公开(公告)日	2008-05-15
申请号	JP2007531607	申请日	2004-09-15
[标]申请(专利权)人(译)	MEDI Tsuini切斯霍夫学派汉诺威 托斯登马提亚		
申请(专利权)人(译)	Meditseinishe-Hofushure汉诺威 托斯滕马蒂亚斯		
[标]发明人	トルステンヴィッテ トルステンマティアス		
发明人	トルステン・ヴィッテ トルステン・マティアス		
IPC分类号	C07K14/47 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/564 A61K38/00 A61P37/02 A61P25/00 A61P1/02 A61P37/06		
CPC分类号	A61P1/02 A61P25/00 C07K14/70503 C07K2319/21		
FI分类号	C07K14/47.ZNA C12N15/00.A G01N33/53.P G01N33/53.N G01N33/564.Z A61K37/02 A61P37/02 A61P25/00 A61P1/02 A61P37/06		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/CA36 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA012 4C084/ZA671 4C084/ZA672 4C084/ZB022 4C084/ZB052 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA72 4H045/FA74		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及人体免疫应答的调节。更具体地，本发明涉及ILT 6用于调节免疫应答的医学用途和涉及ILT 6的药物组合物。在另一方面，本发明涉及使用ILT6调节针对例如异源和/或自身抗原的人免疫应答的人类医学治疗。此外，本发明涉及用于诊断目的的ILT 6的分析和可用于其分析的诊断组合物。

