

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-538041
(P2005-538041A)

(43) 公表日 平成17年12月15日(2005.12.15)

(51) Int.Cl.⁷

C07K 16/28
A61K 38/00
A61K 39/395
A61P 1/04
A61P 1/16

F 1

C 07 K 16/28
A 61 K 39/395
A 61 K 39/395
A 61 P 1/04
A 61 P 1/16

Z N A
D
N
A 61 P 1/04
A 61 P 1/16

テーマコード (参考)
4 B 02 4
4 B 06 3
4 C 08 4
4 C 08 5
4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-578426 (P2003-578426)
(86) (22) 出願日 平成15年3月18日 (2003.3.18)
(85) 翻訳文提出日 平成16年9月27日 (2004.9.27)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2003/002785
(87) 國際公開番号 WO2003/080673
(87) 國際公開日 平成15年10月2日 (2003.10.2)
(31) 優先権主張番号 102 13 762.5
(32) 優先日 平成14年3月26日 (2002.3.26)
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(71) 出願人 503385923
ベーリンガー インゲルハイム インターナショナル ゲゼルシャフト ミット ベシェレンクテル ハフツング
ドイツ連邦共和国 55216 インゲルハイム ビンガー シュトラーセ 173
(74) 代理人 100082005
弁理士 熊倉 袤男
(74) 代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
(74) 代理人 100084663
弁理士 稲田 篤
(74) 代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】共刺激分子及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、セマフォリンタンパク質ファミリーのメンバーであって樹状細胞の表面上に選択的に発現されるSema4Aによって媒介される、新規な共刺激経路に関する。さらに、本発明は、免疫調節性物質を同定する方法におけるSema4Aタンパク質及びタンパク質誘導体の使用、並びにこれらを使用する治療的用途に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳動物Sema4Aタンパク質を選択的に認識して結合する、単離抗体又は抗体誘導体。

【請求項 2】

抗体又は抗体誘導体がヒトSema4Aタンパク質に結合する、請求項1記載の抗体又は抗体誘導体。

【請求項 3】

哺乳動物Tim-2タンパク質を選択的に認識して結合する、単離抗体又は抗体誘導体。

【請求項 4】

抗体又は抗体誘導体がヒトTim-2タンパク質に結合する、請求項3記載の抗体又は抗体誘導体。10

【請求項 5】

抗体又は抗体誘導体が、T細胞活性化に対するSema4Aタンパク質の共刺激作用を抑制する、請求項1～4のいずれか1項記載の抗体又は抗体誘導体。

【請求項 6】

賦形剤、アジュバント、希釈剤及び担体からなる群より選択される成分と、請求項1～5のいずれか1項記載の抗体又は抗体誘導体とを含む、医薬組成物。

【請求項 7】

自己免疫疾患、アレルギー及び喘息から選択される疾患の治療用医薬品を調製するための、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体又は抗体誘導体の使用。20

【請求項 8】

自己免疫疾患、アレルギー及び喘息から選択される疾患の治療を必要とする患者に対し、請求項2記載の抗体又は抗体誘導体を治療上有効な量で投与することを含む、自己免疫疾患、アレルギー及び喘息から選択される疾患を治療する方法。

【請求項 9】

自己免疫疾患、アレルギー及び喘息から選択される疾患の治療を必要とする患者に対し、請求項4記載の抗体又は抗体誘導体を治療上有効な量で投与することを含む、自己免疫疾患、アレルギー及び喘息から選択される疾患を治療する方法。

【請求項 10】

配列が配列番号1からなるタンパク質（ヒトSema4Aタンパク質）；及び配列番号1に対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含むタンパク質群；からなる群より選択される単離精製タンパク質であって、共刺激分子として作用する生物学的機能を有する前記単離精製タンパク質。30

【請求項 11】

Sema4Aタンパク質の細胞外セマドメインを少なくとも含み、且つSema4Aタンパク質の膜貫通ドメインの一部分を少なくとも欠いている、単離された可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体。

【請求項 12】

別のタンパク質又はタンパク質ドメインに融合している哺乳動物Sema4Aタンパク質の全部又は一部を含む、Sema4A融合タンパク質。40

【請求項 13】

配列番号3からなる配列である、請求項12記載のSema4A融合タンパク質。

【請求項 14】

対象者に投与されるときに、前記対象者のT細胞媒介性免疫応答を刺激する医薬組成物であって、

(i)請求項10記載のSema4Aタンパク質、請求項11記載の可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体及び請求項12又は13記載の哺乳動物Sema4A融合タンパク質からなる群より選択される医薬的に有効な成分；並びに

(ii)賦形剤、アジュバント、希釈剤及び担体からなる群より選択される成分；
を含む前記医薬組成物。50

【請求項 15】

医薬的に有効な成分がT細胞媒介性免疫応答を刺激する生物学的作用を有し、前記生物学的作用が、前記医薬的に有効な成分の存在下又は非存在下で、固定化された抗CD3抗体及び抗CD28抗体を用いてナイーブCD4+T細胞を刺激する工程；及びこのようにして処理したT細胞の活性化を、T細胞増殖又はIL-2分泌を評価することによって測定する工程；を含むアッセイによって評価することができ、T細胞増殖又はIL-2分泌の増加をもたらす化合物が、T細胞媒介性免疫応答を刺激する生物学的作用を有する化合物として分類される、請求項14記載の医薬組成物。

10

【請求項 16】

請求項10記載のSema4Aタンパク質、請求項11記載の可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体及び請求項12又は13記載の哺乳動物Sema4A融合タンパク質からなる群より選択され医薬的に活性な物質の、一次的若しくは二次的免疫不全の治療用医薬品又は正常なT細胞応答を刺激する医薬品を調製するための使用であって、

前記医薬的に活性な物質は、T細胞媒介性免疫応答を刺激する生物学的作用を有する、前記使用。

【請求項 17】

一次的若しくは二次的免疫不全から選択される疾患の治療又はT細胞応答の刺激のための方法であって、

前記治療又は刺激を必要とする患者に対して、請求項10記載のSema4Aタンパク質、請求項11記載の可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体又は請求項12若しくは13記載の哺乳動物Sema4A融合タンパク質を治療上有効な量で投与することを含む前記方法。

20

【請求項 18】

T細胞表面上に存在するTim-2抗原に反応性である、哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体。
【請求項 19】

ヒトを含む哺乳動物のT細胞媒介性免疫応答を調節し得る化合物を同定する方法であって、

候補化合物を調製する工程；表面にSema4A受容体を発現しているT細胞を、前記候補化合物と接觸させる工程；前記T細胞を活性化するのに適切な条件下で、前記T細胞をSema4A作用因子と接觸させる工程；及び前記候補化合物が前記T細胞の活性化を調節するかを決定する工程；を含み、

前記Sema4A作用因子が哺乳動物Sema4Aタンパク質、請求項10記載のヒトSema4Aタンパク質、請求項11記載の可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体、請求項12又は13記載の哺乳動物Sema4A融合タンパク質、及び細胞表面上にSema4Aタンパク質又はSema4Aタンパク質の細胞外セマドメインを少なくとも含むSema4Aタンパク質誘導体を発現している細胞からなる群より選択される、前記方法。

30

【請求項 20】

T細胞の活性化の調節が、T細胞増殖又はT細胞による培地中へのサイトカインの分泌を測定することによって決定される、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

サイトカインがインターロイキン-2、インターフェロン- γ 及びインターロイキン-4からなる群より選択される、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

Sema4A作用因子が骨髄由来の樹状細胞である、請求項19～21のいずれか1項記載の方法。

40

【請求項 23】

T細胞を活性化するのに適切な条件が、前記T細胞を抗CD3抗体と接觸させることを含み

50

、また任意で前記T細胞を抗CD28抗体と接触させてもよい、請求項19～22のいずれか1項記載の方法。

【請求項24】

表面にSema4A受容体を発現しているT細胞が、脾細胞から調製されるCD4+T細胞である、請求項19～23のいずれか1項記載の方法。

【請求項25】

Sema4A融合タンパク質が配列番号3からなる配列のSema4A-Fcである、請求項19～24のいずれか1項記載の方法。

【請求項26】

Sema4Aタンパク質がヒトSema4Aタンパク質である、請求項19～25のいずれか1項記載の方法。 10

【請求項27】

T細胞媒介性免疫応答の調節が、Sema4A共刺激経路を介する樹状細胞とT細胞との相互作用の調節である、請求項19～26のいずれか1項記載の方法。

【請求項28】

請求項1～5のいずれか1項記載の抗体又は抗体誘導体、請求項10記載のSema4Aタンパク質、請求項11記載の可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体、請求項12又は13記載の哺乳動物Sema4A融合タンパク質及び請求項19記載の方法によって同定される化合物からなる群より選択される物質の使用であって、

T細胞共刺激経路の研究のため又はT細胞活性化異常に関連する疾患の治療用医薬品の調製のための、前記使用。 20

【請求項29】

請求項1～5のいずれか1項記載の抗体又は抗体誘導体、請求項10記載のSema4Aタンパク質、請求項11記載の可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体、請求項12又は13記載の哺乳動物Sema4A融合タンパク質及び請求項19記載の方法によって同定される化合物からなる群より選択される物質を、T細胞に投与することを含む、T細胞応答を調節する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、樹状細胞表面上に選択的に発現される新規な共刺激タンパク質、免疫調節性物質を同定する方法における前記タンパク質の使用、前記タンパク質及び免疫調節性物質の機能的誘導体、それぞれの共刺激経路に干渉する作用物質(agent)、並びに前記誘導体及び干渉作用物質の使用に関する。 30

【背景技術】

【0002】

Tリンパ球応答の発生は、細胞-細胞相互作用及び可溶性介在物質(サイトカイン又はリンフォカイン)の産生を含む複雑な過程である。Tリンパ球の最適な活性化は、2つの細胞-細胞相互作用シグナルを必要とすることが信じられている。それらのシグナルは、抗原提示細胞(APC)上のペプチド-MHCに結合しているときの抗原特異的すなわちクローニングT細胞受容体(TCR)シグナル伝達、及び第二の抗原非特異的“共刺激性”シグナルである。 40

T細胞が、共刺激分子による共刺激なしで抗原のみと遭遇する場合には、与えられた抗原に対する免疫応答の有意な増幅は起らない。さらに、共刺激がなければ、TCR結合は免疫応答の誘導に失敗するだけでなく、T細胞アナジー又はアポトーシスによる機能的T細胞不活性化を導き、その結果トレランスを生じる。共刺激シグナルが提供される場合、T細胞は、刺激となる抗原に対して特異的なクローニング増殖で応答するであろう。

免疫応答の質及び作用強度は、抗原をプロセッシングしてT細胞に提示するAPCの種類、TCRの結合に利用可能なペプチド抗原/MHCリガンドの密度、並びにT細胞の結合及び活性化の際のAPCによる可溶性及び/又は膜結合性共刺激シグナルの提供に依存する。T細胞の活

性化に必要とされるシグナルを提供するAPCとしては、単球/マクロファージ、Bリンパ球及び樹状細胞(DC)が挙げられる。これらの異なる種類のAPCの中で、DCは、in vivoの抗原特異的T細胞応答の最も強力な発動因子として考えられている。DCは、最も効率的に抗原を捕捉して、種々の共刺激シグナルと組合せて、前記抗原をMHC-ペプチド複合体としてT細胞に提示する。DCは、活性化マクロファージとは異なる表現型を有し、識別可能な免疫応答を開始し得る異なるサブタイプに分類される。in vitroにおいて、DCは、マクロファージよりおよそ100倍大きな作用強度を示して、ナイーブ(naive)T細胞を活性化する。

【0003】

DCのようなAPC上に発現される共刺激分子の典型的且つ最も特徴付けられている例は、いわゆるB7ファミリーのメンバーである。このファミリーとしては、B7-1又はCD80としても知られているB7、CD86とも呼ばれているB7-2が挙げられる。これらは、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーのメンバーであり、2つの細胞外Igドメイン、N-末端可変(V)様ドメイン、それに続く定常(C)様ドメインを含む。T細胞表面上に発現されているB7のリガンドすなわち対応受容体(counter receptor)は、CD28及びCTLA-4である。CD28は、T細胞活性化に機能する最も成熟なヒトT細胞上に見出されるIgスーパーファミリーのホモ二量体糖タンパク質であり、休止T細胞上に構成的に発現されており、活性化の後に増加する。T細胞受容体を介するシグナル伝達の後、CD28の連結が、T細胞を増殖させIL-2を分泌させる。CTLA-4は、CD28に非常に類似するT細胞表面分子であるが、休止T細胞上には発現されておらず、T細胞活性化に続いて現れる。

しかしながら、B7-CD28/CTLA-4経路が、全ての共刺激的活性の原因ではない。実際、腫瘍壞死因子(TNF)とTNF受容体ファミリーのメンバーとの間の相互作用が、T細胞-DC相互作用を介するT細胞共刺激に関与していることも実証されている。前記相互作用としては、CD40_CD154、CD30_CD30L、CD27_CD70、4-1BB4-1BBL、RANK_RANKL(OPGL)及び0x40-0x40Lが挙げられる。しかしながら、明らかに、質的及び量的T細胞応答を決定する共刺激分子の枠組みは、未だ完全に解明されてはいない。このようにT細胞活性化は高度に複雑な分野のままであり、従ってT細胞機能異常は現在までのところ、幾つかの治療的介入によって非常に不充分に対処され得るのみである。

【0004】

免疫系の中心的機能は、身体組織の自己構成成分から病原菌のような外来抗原を識別することである。免疫系は、周産期における胸腺での自己反応性T細胞のクローン除去によって、また発育の後期における自己反応性のT細胞及びB細胞の機能的抑制によって、自己トレランス(自己に対する不応答性)を正常に獲得する。それにもかからず、時に自己トレランスの維持における機能不全が存在し、自己反応性リンパ球の活性化及びクローン増殖と自己抗体の產生とによって特徴付けられる自己抗原と非自己抗原との間の識別不能及び自己免疫応答が、正常な身体組織の自己抗原に対して引き起こされる。多くの自己免疫疾患は自己抗体に関連しており、またそれに伴ってB細胞に関連しているが、T細胞はB細胞の発生及び機能に作用し得ることから、T細胞は前記自己免疫疾患の病理学的条件においても重要な役割を果たし得る。

自己免疫疾患は起点において多元的であって、臓器特異的自己免疫疾患と臓器非特異的(すなわち全身性)自己免疫疾患とに分類され得る。臨床例としては、次のものが挙げられる：自己免疫性溶血性貧血、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、グレーヴズ病、グッドパスチャーリー症候群、クローン病、ギヤン-バレー症候群、乾癬、重症筋無力症、糸球体腎炎、自己免疫肝炎、ブドウ膜炎、I型(インシュリン依存性)糖尿病、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、全身性エリテマトーデス(SLE)及び多発性硬化症。

T細胞活性の増強に関連する疾患の別のグループは、アレルギー及び喘息である。1型ヘルパーT細胞(TH1細胞)は自己免疫において重要な役割を果たしていると想定されているが、一方アレルギー及び喘息は、主として2型ヘルパーT細胞(TH2細胞)応答に付随するようである。

【0005】

他方では、数多くの病理状態が、不充分な免疫応答に付隨する。免疫不全は、一次的又

10

20

30

40

50

は二次的であり得る。一次的免疫不全は、免疫系のどの成分が欠損しているかに依存して、4つの主たるグループに分類される：B細胞、T細胞、貪食細胞又は補体。70を超える一次的免疫不全が記述されている。T細胞欠損としては、例えばディ・ジョージ奇形、慢性粘膜皮膚カンジダ症、ネゼロフ症候群、ナチュラルキラー細胞欠損及び特発性CD4リンパ球減少症である。患者数の点でおそらく最も重要な形態の一次的免疫不全である重症複合免疫不全（SCID）では、T細胞及びB細胞の反応が妨害されている。

かなり一般的な二次的免疫不全は、以前には正常な人において病気から生じた免疫系の障害である。この部類の最も重要な疾患は、当然のことながら、AIDS及びAIDS関連疾患である。免疫不全が関係し得る他の感染性疾患は、サイトメガロウイルス感染症、伝染性単核球症、急性細菌性疾患及び重症なミコバクテリア症又は真菌症である。

免疫不全の他の原因是、放射線及び免疫抑制剤のような免疫抑制作用物質を用いる治療である。勿論、免疫抑制状態の治療に有用な薬物は、健康な個体のT細胞応答を刺激することにも役立ち得る。

T細胞活性化の分子メカニズムに関する上の説明を考慮すると、T細胞とAPCとの間の相互作用に非特異的な抗原は、自己免疫疾患、一次的及び二次的免疫不全、アレルギー並びに喘息の治療における新規な治療的アプローチ、特に薬理学的アプローチの重要な標的であることが予測され得る。

従って、本発明の目的は、T細胞活性化を調節するための新規な手段及び方法を提供することである。

特に、本発明の目的は、自己免疫疾患、免疫不全、アレルギー及び喘息のような病理状態を治療するために、T細胞-APC相互作用、特にT細胞-DC相互作用を調節する薬物を調製するための小型分子又はバイオ医薬品のような物質を提供することである。

本発明の更なる目的は、T細胞-DC相互作用を調節することによってT細胞活性化を調節する物質を同定する方法を提供することである。

【発明の開示】

【0006】

（発明の要約）

上記目的は、T細胞-APC相互作用を調節する作用物質を提供する本発明の第一の態様によって解決され、前記作用物質は、哺乳動物Sema4Aタンパク質を選択的に認識して結合する単離抗体又は抗体誘導体である。好ましくは、前記抗体又は抗体誘導体が、ヒトSema4Aタンパク質に結合する。

本発明の第二の態様として、T細胞-APC相互作用を調節する作用物質が提供され、前記作用物質は、哺乳動物Tim-2タンパク質を選択的に認識して結合する単離抗体又は抗体誘導体である。好ましくは、前記抗体又は抗体誘導体が、ヒトTim-2タンパク質に結合する。

上述する2つの態様は、前記抗体又は抗体誘導体がT細胞活性化におけるSema4Aタンパク質の共刺激効果を阻害するという共通点を有する。

さらに、本発明によると、上述のようなSema4Aタンパク質又はTim-2タンパク質に結合する抗体又は抗体誘導体と、賦形剤、アジュバント、希釈剤及び/又は担体とを含む医薬組成物が提供される。

本発明には、

(i)自己免疫疾患、アレルギー及び喘息から選択される疾患の治療用医薬品を調製するための、上述のようなSema4Aタンパク質又はTim-2タンパク質に結合する抗体又は抗体誘導体の使用；並びに

(ii)自己免疫疾患、アレルギー及び喘息から選択される疾患の治療を必要とする患者に対し、上述のような抗体又は抗体誘導体を治療上有効な量で投与することを含む、自己免疫疾患、アレルギー及び喘息から選択される疾患を治療する方法；も含まれる。

本発明の別の観点によると、配列番号1からなる配列の単離精製タンパク質が提供される。さらに、配列番号1に対して少なくとも95%同一、好ましくは少なくとも98%同一な

10

20

40

50

アミノ酸配列を有するタンパク質が提供され、前記タンパク質は共刺激分子として作用する生物学的機能を有し、前記生物学的機能は下記で詳細に説明されるアッセイを用いて試験され得る。

【0007】

配列番号1(本発明のヒトSema4Aタンパク質)

MALPALGLDP WSLLGLFLFQ LLQLLLPTTT AGGGGQGPMP RVKYYAGDER RALSFFHQKG
 LQDFDTLLLS GDGNTLYVGA REAILALDIQ DPGVPRLKNM IPWPASDRKK SECAFKKKSN
 ETQCFNFIRV LVSYNVTHLY TCGTFAFSPA CTFIELQDSY LLPISEDKVM EGKGQSPFDP
 AHKHTAVLVD GMLYSGTMNN FLGSEPILMR TLGSQPVLKT DNFLRWLHHD ASFVAAIPST
 QVVFYFFFEET ASEFDFFERL HTSRVARVCK NDVGGEKLLQ KKWTFLKAQ LLCTQPGQLP
 FN VIRQAVLL AADSPTAPHI YGSSTSSGKV DGTRSSAVCA FSLLDIERAL KGEYKELNKE
 TSRWTTYRGP ETNPRPGSCS VGPSSDKALT FMKDHFLMDE QVVGTPLLVK SGVEYTRLAV
 ETAQGLDGHS HLVMYLGEEI QLFPDPEPVR NLQLAPLTQGA VFVGFSGGVW RVPRANCSVY
 ESCVDCVLR DPHCAWDPE RTCCLLSAPN LNSWKQDMER GNPEWACASG PMSRSLRPQS
 RPQIIKEVLT VPNSILELPC PHLSALASYY WSHGPAAVPE ASSTVYNGSL LLIVQDGVGG
 LYQCWATENG FSYPVISY WV DSQDQTLALD PELAGIPREH VKVPLTRVSG GAALAAQQSY
 WPHFVTVTVL FALVLSGALI ILVASPLRAL RAAGSRFRAV RPCGPGEKAP LSREQHLQSP
 KECRTSASDV DADNNCLGTE VA

【0008】

TANGO 265と名付けられ、上記配列と類似するアミノ酸配列(配列番号2)を有するヒトタンパク質は、既に記載されている(DERWENT(登録商標)遺伝子配列データベース、アクセシション番号:AAB66043)。配列番号1と配列番号2との間の同一性の程度は、94%である(スコアリング行列:BLOSUM62)。先行技術では、TANGO 265タンパク質の生物学的機能の明確な表示が与えられてはいない。TANGO 265タンパク質は、今回発見されたヒトSema4Aタンパク質の対立形質又はスプライスバリエントを表し得る。

配列番号2(ヒトTANGO 265タンパク質)

MALPALGLDP WSLLGLFLFQ LLQLLLPTTT AGGGGQGPMP RVRYAGDER RALSFFHQKG
 LQDFDTLLLS GDGNTLYVGA REAILALDIQ DPGVPRLKNM IPWPASDRKK SECAFKKKSN
 ETQCFNFIRV LVSYNVTHLY TCGTFAFSPA CTFIELQDSY LLPISEDKVM EGKGQSPFDP
 AHKHTAVLVD GMLYSGTMNN FLGSEPILMR TLGSQPVLKT DNFLRWLHHD ASFVAAIPST
 QVVFYFFFEET ASEFDFFERL HTSRVARVCK NDVGGEKLLQ KKWTFLKAQ LLCTQPGQLP
 FN VIRHAVLL PADSPTAPHI YAVFTSQWQV GGTRSSAVCA FSLLDIERVF KGKYKELNKE
 TSRWTTYRGP ETNPRPGSCS VGPSSDKALT FMKDHFLMDE QVVGTPLLVK SGVEYTRLAV
 ETAQGLDGHS HLVMYLGTTT GSLHKAVVSG DSSAHLVEEI QLFPDPEPVR NLQLAPLTQGA
 VFVGFSGGVW RVPRANCSVY ESCVDCVLR DPHCAWDPE RTCCLLSAPN LNSWKQDMER
 GNPEWACASG PMSRSLRPQS RPQIIKEVLA VPNSILELPC PHLSALASYY WSHGPAAVPE
 ASSTVYNGSL LLIVQDGVGG LYQCWATENG FSYPVISY WV DSQDQTLALD PELAGIPREH
 VKVPLTRVSG GAALAAQQSY WPHFVTVTVL FALVLSGALI ILVASPLRAL RARGKVQGC
 TLRPGEKAPL SREQHLQSPK ECRTSASDVD ADNNCLGTEV A

【0009】

好ましい態様として、少なくともSema4Aタンパク質の細胞外セマ(sema)ドメインを含み、且つSema4Aタンパク質の膜貫通ドメインの少なくとも一部分を欠いている、単離された可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体が提供される。

別の好ましい態様では、別のタンパク質又はタンパク質ドメインに融合されている哺乳動物Sema4Aタンパク質の全部又は一部を含む、Sema4A融合タンパク質が提供される。特に好ましいのは、配列番号3の配列を有する融合タンパク質、又は本質的には配列番号3で示されるが、それぞれのタンパク質構成要素のヒト対応物を含む融合タンパク質である。

配列番号3(mSema4A-Fc)

MALPSLGQDS WSLLRVFFFQ LFLLPSLPPA SGTGGQGPMP RVKYHAGDGH RALSFFQQKG
 LRDFDTLLLS DDGNTLYVGA RETVLALNIQ NPGIPRLKNM IPWPASERKK TECAFKKKSN

ETQCFNFIRV LVSYNATHLY ACGTFAFSPA CTFIELQDSL LLPILIDKVM DGKGQSPLTL
 FTSTQAVLVD GMLYSGTMNN FLGSEPILMR TLGSHPVLK DIFLRWLHAD ASFVAAIIPST
 QVVFYFFFET ASEFDFFEE YISRVAQVCK NDVGGEKLLQ KKWTFLKAQ LLCAQPGQLP
 FNIIRHAVLL PADSPSVSRI YAVFTSQWQV GGTRSSAVCA FSLTDIERVF KGKYKELNKE
 TSRWTTYRGS EVSPRPGSCS MGPSSDKALT FMKDHFLLMDE HVVGTPLLVK SGVEYTRLAV
 ESARGLDGSS HVVMYLGTST GPLHKAVVPQ DSSAYLVEE IQLSPDSEPVR NLQLAPAQGA
 VFAGFSGGIW RVPRANCSVY ESCVDCVLAR DPHCAWDPE RLCSSLGSGT KPWKQDMERG
 NPEWVCTRGP MARSPRRQSP PQLIKEVLTV PNSILELRCP HLSALASYHW SHGRAKISEA
 SATVYNGSLL LLPQDGVGGL YQCVATENGY SYPVVSYWVD SQDQPLALDP ELAGVPRERV
 QVPLTRVGGG ASMAA - Fc

10

【0010】

また、本発明のこの観点によると、対象者に投与されるときに前記対象者のT細胞媒介性免疫応答を刺激する医薬組成物が提供され、前記医薬組成物は、

- (i)配列番号1記載のSema4Aタンパク質、その機能的断片又はそれらの誘導体（例えば上に概要を述べたような可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体若しくは上述のような哺乳動物Sema4A融合タンパク質）からなる群より選択される医薬的に有効な成分；及び
- (ii)賦形剤、アジュバント、希釈剤及び担体からなる群より選択される、1又はそれ以上の成分；を含む。

この態様の状況において、医薬組成物は、T細胞媒介性免疫応答を刺激する生理学的作用を示す。前記作用は、例えば、

- (i)前記医薬的に有効な成分の存在下又は非存在下で、固定化されている抗CD3抗体及び抗CD28抗体を用いて、ナイーブCD4+T細胞を刺激する工程；及び

- (ii)このように処理されたT細胞の活性化を、T細胞増殖又はIL-2分泌を測定することによって、測定する工程；

を含むアッセイによって評価され得る。前記化合物の存在下でのT細胞増殖又はIL-2分泌が、前記化合物の含まれていないアッセイと比較して増加する場合、前記化合物は、本発明の文脈上、T細胞媒介性免疫応答を刺激する生物学的作用を有する化合物として分類される。

【0011】

また、

30

- (i)配列番号1記載のSema4Aタンパク質、その機能的断片又はそれらの誘導体（特に、上に概要を述べるような可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体若しくは上述のような哺乳動物Sema4A融合タンパク質）からなる群より選択され、且つT細胞媒介性免疫応答を刺激する生物学的作用を有する医薬的に活性な物質の使用であって、一次的若しくは二次的免疫不全の治療用医薬品又は正常なT細胞応答を刺激するための医薬品を調製するための前記使用；及び

- (ii)一次的若しくは二次的免疫不全から選択される疾患を治療する方法又はT細胞応答を刺激する方法であって、前記治療又は刺激を必要とする患者に対し、上述の群より選択される物質を治療上有効な量で投与することを含む前記方法；

も本発明の範囲内である。

40

本発明の更なる態様は、T細胞表面上に存在するTim-2抗原に反応性である哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体によって表される。

本発明の更なる観点によると、ヒトを含む哺乳動物におけるT細胞媒介性免疫応答を調節し得る化合物を同定する方法が提供され、その方法は(i)候補化合物を調製する工程；(ii)Sema4A受容体を表面に発現しているT細胞を、前記候補化合物と接触させる工程；(iii)前記T細胞の活性化に適切な条件下で、前記T細胞をSema4A作用因子と接触させる工程；及び(iv)前記候補化合物が、前記T細胞の活性化を調節するかどうかを決定する工程；を含み、前記Sema4A作用因子は、哺乳動物Sema4Aタンパク質、配列番号1により与えられるヒトSema4Aタンパク質、それらの機能的断片又はそれらの誘導体、上に概要を述べるような可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体、上述のような哺乳動物Sema4A融合タンパク質

50

、及びSema4Aタンパク質若しくはSema4Aタンパク質誘導体を表面に発現している細胞からなる群より選択され、前記Sema4Aタンパク質誘導体は、少なくともSema4Aタンパク質の細胞外セマドメインを含む。

【0012】

前記方法では、前記T細胞の活性化の調節が、好ましくはT細胞増殖又はT細胞による培地中へのサイトカイン（例えば、インターロイキン-2、インターフェロン- 及びインターロイキン-4）の分泌を測定することによって、決定される。

本発明の好ましい態様では、骨髄由来の樹状細胞がSema4A作用因子として用いられる。また好ましくは、T細胞を活性化するのに適切な状況を作り出すために、T細胞が抗CD3抗体と接触させられ、また任意で抗CD28抗体と接触させられてもよい。さらに、Sema4A受容体を表面に発現しているT細胞は、好ましくは、脾細胞から調製されるCD4+T細胞である。
10

別の好ましい態様では、Sema4A融合タンパク質が上述の方法に用いられ、より好ましくは配列番号3のSema4A-Fc融合タンパク質が上述の方法に用いられる。特に、機能的ヒトSema4Aタンパク質又はタンパク質誘導体の使用が好ましい。

上述の方法では、活性な物質が、DC-T細胞共刺激経路と相互作用することによって、T細胞媒介性免疫応答を調節する。

本発明の更なる観点によると、抗Sema4A及び抗Tim-2の抗体又は抗体誘導体、哺乳動物Sema4Aタンパク質、配列番号1により与えられるヒトSema4Aタンパク質、それらの機能的断片又はそれらの誘導体、上に概要を述べるような可溶性哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体、及び上述の態様で説明されるような方法により同定される化合物からなる群より選択される物質が、T細胞共刺激経路の研究のため又はT細胞活性化異常に関連する疾患の治療用医薬品を調製するために用いられる。T細胞応答は、前記の群から選択される物質をT細胞に投与することによって、in vitro及びin vivoで調節され得る。
20

【0013】

(発明の詳細な説明)

本発明をより詳細に説明する前に、文脈上明らかに指示されている場合を除き、単数形“a”、“an”及び“the”は、複数への言及も含む。従って、例えば、“細胞株(a cell line)”への言及は、一つ又はそれ以上の細胞株への言及である。アミノ酸の略語は、標準的な1文字又は3文字表記に従っている。明細書及び特許請求の範囲で用いられている他の略語は、最初に登場する箇所で説明される。
30

リンパ球活性化の分子メカニズムの研究中に、本発明者らは、驚くべきことに、セマフォリン(semaphorin)ファミリーのメンバーによって媒介される新規な種類のT細胞共刺激経路を同定した。セマフォリンファミリーは、系統学的に保存されているタンパク質を数多く含み、また細胞外領域に大きな“セマドメイン”（およそ500アミノ酸残基）を有する分泌性及び膜貫通タンパク質群を含む。多くの分泌型セマフォリンは、ニューロン発達の間に、化学反発性因子として作用して又は遊走性(migrating)軸索に対する誘導合図を送達して、軸索誘導(axon guidance)に関与することが示されている。驚くべきことに、今回、セマフォリンが病原性免疫反応を含むT細胞共刺激にも重大に関与していることが立証された。
40

特に、本発明者らは、重要な共刺激分子としてセマフォリンファミリーのメンバーであるSema4Aを同定した。Sema4Aは、DCの細胞表面上に優先的に発現しており、強力な共刺激活性を有する。前記共刺激活性としては、in vitroのT細胞活性化及びin vivoの抗原特異的T細胞の発生が挙げられる。さらに、Sema4Aが自己免疫疾患の治療のための重要な標的であり、抗Sema4A抗体の投与が実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE)の発生を効果的に阻害することが実証できた。

【0014】

また本発明に関連して、本発明者らは、T細胞上でSema4Aの対応受容体を同定することができた。最初に、神経系における軸索誘導に関与しているセマフォリンに対する受容体であるニューロピリン(neuropilin)及びプレキシン(plexin)は、Sema4A媒介性共刺激経路
50

に関与していないことが明らかとなつた。次に、驚くべきことに、本発明者らは、既に既知のT細胞表面抗原Tim-2がT細胞上におけるSema4Aの受容体であることを同定した。Tim-2は活性化T細胞上に発現されていることは知られていたが、その機能は未知であった。Tim-2は、T細胞の細胞表面上での発現並びに免疫グロブリンDメイン及びムチンドメインの保存によって特徴付けられているTim遺伝子ファミリーに属している。近年、Tim-1は、気道反応性亢進の調節遺伝子としてTH2細胞応答に関与していることが同定されている。さらに、Tim-3は、TH1細胞上にのみ発現されていること、並びにTH1細胞応答及びマクロファージ活性化に重大に関与していることが実証されている。

これらのことと実施例に概要を述べる更なる結果とに基づいて、次の範例(paradigm)が示唆される。T細胞活性化の直後、Sema4Aの結合部位(推定受容体:Tim-2)が、活性化T細胞の表面上に誘導される。続いて、前記結合部位は、DC上に発現されているSema4Aと結合して、T細胞-DC接触におけるT細胞活性化に影響をもたらし(それがTCRシグナルの活性化を強化するかもしれないが)、T細胞の機能的エフェクター細胞への分化を促進する結果となる。これらの発見は、T細胞活性化の早期局面におけるSema4Aの重要性を示唆している。実際、in vivoのT細胞初回免疫は、Sema4A-Fcの投与によって増強された。加えて、抗Sema4Aは、抗原特的T細胞の発生を有意に阻害した。これらの結果も、Sema4AがT細胞とDCとの間の初回免疫初期段階に関与しているという意見を支持している。

【0015】

上記の発見に基づいて、本発明のある観点によると、Sema4A、Tim-2又はSema4AとTim-2との間の相互作用を標的として用いるモジュレーターを同定する方法が提供される。

Sema4A-T細胞相互作用に対する調節効果について化合物を試験するために、ナイープCD4+T細胞を、それぞれの試験化合物と一緒にインキュベートしてから、固定化されている抗CD3抗体、抗CD28抗体及び例えばSema4A-Fcを用いて刺激してもよい。コントロールとして、添加される試験化合物なしに、同じアッセイが行われる。読み出しとして、T細胞増殖及びインターロイキン-2(IL-2)産生が決定されてもよい。あるいは、インターフェロン- γ (IFN- γ)又はIL-4分泌が測定されてもよい。当業者であれば、適切なやり方でアッセイ系の残りのパラメータを設定するであろう。Sema4A-T細胞相互作用の評価及び試験化合物による前記相互作用の調節に適するアッセイ系の一例は、下記の実施例6及び7並びに方法で、詳細に説明されている。

上のアッセイは、高速大量処理スクリーニング(HTS)法として行われてもよい。HTSは、多数の化合物を連続的に試験する実験構成に関する。好ましくは、前記HTS構成が、マイクロプレート上で行われてもよく、部分的又は完全に自動化されていてもよく、またデータ保存、解析、及びバイオインフォマティクスを用いる解釈のために、コンピュータのような電子装置に接続されていてもよい。好ましくは、前記自動化が、多数のマイクロプレートを操作することができて1日あたり何千もの試験を行い得るロボットを含み得る。好ましくは、所望の調節機能又は阻害機能を示すことが知られている試験化合物も、ポジティブコントロールとしてアッセイに含まれるであろう。HTSという用語は、超高速大量処理スクリーニング形式(UHTS)も含む。好ましくは、前記UHTS形式が、384ウェル又は1536ウェルのマイクロプレート、マイクロリットル以下又はナノリットル以下のピベッタ-、改良型プレートリーダー及びエバポレーション処理の手段を用いて行われてもよい。HTS法は、例えば米国特許第5,876,946号及び第5,902,732号明細書に記載されている。本技術分野の専門家であれば、創意に富む工程を行う必要なく、上述の方法をHTS形式又はUHTS形式に適応させることができる。

【0016】

上記スクリーニングアッセイによって同定される化合物は、T細胞共刺激経路の更なる研究に有用であり、またT細胞活性化異常に関連する疾患の治療用医薬品の調製に有用であり、また最終的には前記疾患の治療に有用である。

Sema4A共刺激経路を調節する化合物によって対処され得る疾患としては、自己免疫疾患、例えば自己免疫性溶血性貧血、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、グレーヴズ病、グッドパスチャー症候群、クローン病、ギヤン-バレー症候群、乾癬、重症筋無力症、糸球体腎炎

10

20

30

40

50

、自己免疫性溶血性貧血、ブドウ膜炎、I型（インシュリン依存性）糖尿病、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、全身性エリテマトーデス（SLE）及び多発性硬化症といったものが挙げられる。更なる例は、アレルギー性疾患及び喘息である。これらの場合、Sema4A共刺激経路を阻害し、その結果としてT細胞活性化を妨げる化合物が、ヘルパーT細胞系の反応性亢進を阻害することに役立ち得る。

他方で、一次的及び二次的免疫不全は、ヘルパーT細胞系の活性化によって対処され得る。一次的T細胞免疫不全は、例えば、ディ・ジョージ奇形、慢性粘膜皮膚カンジダ症、ネゼロフ症候群、ナチュラルキラー細胞不全症、特発性CD4リンパ球減少症及びSCIDである。二次的免疫不全は、AIDS及びAIDS関連疾患、サイトメガロウイルス感染症、伝染性単核球症、急性細菌性疾患、及び重症のミコバクテリア症又は真菌症である。免疫不全の他の原因は、放射線及び免疫抑制性薬物のような免疫抑制剤での治療である。最後に、ある特定の場合には、健康な生物体の免疫応答の全身的刺激が有用であり得ることが予想される。そのような免疫応答の刺激は、抗体非特異的T細胞刺激によって達成され得る。これら全ての場合において、共刺激経路を活性化及び/又は増強する化合物が、有用であろう。

【0017】

実際に、上の理論的根拠に基づいて、本発明者らは、Sema4A共刺激経路を阻害する作用因子（この場合は、抗Sema4A抗体である）を投与することによって、自己免疫疾患を治療することに成功した。このように、本発明の別の重要な観点によると、自己免疫疾患の治療に有用な作用因子が提供される。前記自己免疫疾患としては、自己免疫性溶血性貧血、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、グレーヴズ病、グッドパスチャー症候群、クローン病、ギヤン-バレー症候群、乾癬、重症筋無力症、糸球体腎炎、自己免疫性溶血性貧血、ブドウ膜炎、I型（インシュリン依存性）糖尿病、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、全身性エリテマトーデス（SLE）及び多発性硬化症が挙げられるが、これだけに限られない。

Sema4A共刺激経路の遮断はモノクローナル抗Sema4A抗体SK31の投与によって達成されたが（実施例5及び方法において、より詳細に説明されている）、同様な結果は、他の阻害作用因子（例えば、上述のスクリーニングアッセイにおいて同定されるような小型分子のような）又はバイオ医薬品（例えば、他のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体及び抗体誘導体）を投与することで達成されるであろうことが認められるであろう。

このように、抗体SK31を用いて得られた上述の結果に基づき、本発明の重要な態様は、Sema4Aを認識して結合し、それによってSema4A媒介性共刺激経路を遮断する、抗Sema4A抗体及び抗体誘導体である。抗体は、好ましくはヒトSema4Aタンパク質に向けられており、いずれの種から得られてもよく、ポリクローナル抗体であっても又はモノクローナル抗体であってもよい。特に好ましくは、ヒト化モノクローナル抗体タンパク質である。そのような抗体又は抗体誘導体の結合及びT細胞活性化に対する阻害効果は、下の実施例及び方法に記述されるように評価され得る。

【0018】

“抗体又は抗体誘導体”という用語は、例えば、Fabフラグメント（Fab=抗体結合性フラグメント）を含むことを意味し、前記Fabフラグメントは、それぞれに隣接する定常領域により一緒に保持されている両鎖の可変領域を含む。Fabフラグメントは、例えばパパインを用いるプロテアーゼ消化によって通常の抗体から形成されてもよいが、その一方、同様なFabフラグメントが遺伝子操作によって生成されてもよい。ペプシンを用いるタンパク分解性切断によって調製され得るF(ab')₂フラグメントも、前記用語に含まれる。

遺伝子操作法を用いて、重鎖（VH）及び軽鎖（VL）の可変領域のみからなる短縮抗体フラグメントを生成することが可能である。これらは、Fvフラグメント（可変性フラグメント=可変部のフラグメント）と呼ばれている。これらFvフラグメントは、定常鎖のシステインによる二鎖の共有結合を欠くことから、しばしば安定化される。短いペプチド断片、例えば10-30アミノ酸、好ましくは15アミノ酸によって、重鎖及び軽鎖の可変領域を連結することが有利である。このような方法で、ペプチドリンカーによって連結されているVH及びVLからなるペプチド一本鎖が得られる。この種類の抗体タンパク質は、単鎖Fv（scFv）

10

20

30

40

50

)として知られている。先行技術において既知である前記種類のscFv抗体タンパク質の例は、Hustonらの文献(1988, PNAS 16: 5879-5883)に記載されている。近年、scFvを多量体(multimeric)誘導体として調製するために、種々のストラテジーが開発されている。これは、特に、改良された薬物動態特性及び体内分布特性並びに増加された結合親和力を有する組換え抗体をもたらすことを意図している。scFvの多量体化(multimerisation)を獲得するために、scFvは、多量体化ドメインを有する融合タンパク質として調製された。多量体化ドメインは、例えば、IgGのCH3領域又はロイシンジッパードメインのようなコイルドコイル構造(ヘリックス構造)であってもよい。

【0019】

しかしながら、scFv自体のVH/VL領域間の相互作用が多量体化(例えば、二量体、三量体及び五量体)に用いられるストラテジーも存在する。従って、いわゆる二重特異性抗体(diabody)も、上の用語に包含されるべきフラグメントである。二重特異性抗体は、二価ホモ二量体scFv誘導体(Hu et al., 1996, PNAS 16: 5879-5883)を意味する。scFv分子中のリンカーを5-10アミノ酸まで短縮することは、鎖間VH/VL重ね合わせ(inter-chain VH/VL-superimposition)が起るホモ二量体の形成をもたらす。二重特異性抗体は、ジスルフィド架橋の組込みによって、さらに安定化されてもよい。先行技術における二重特異性抗体の抗体タンパク質の例は、Perisicらの文献(1994, Structure 2: 1217-1226)において見出され得る。

抗体誘導体の別の種類は、いわゆるミニボディ(minibody)によって代表される。ミニボディは、ヒンジ領域(例えば、これもIgG1由来である)及びリンカー領域を介してscFvと接続されている免疫グロブリンのCH3領域、好ましくはIgGのCH3領域、最も好ましくはIgG1のCH3領域を二量体化領域として含む融合タンパク質からなる二価ホモ二量体scFv誘導体である。ヒンジ領域におけるジスルフィド架橋は、主に高等細胞において形成されており、原核生物においては形成されていない。先行技術におけるミニボディ抗体タンパク質の例は、Huらの文献(1996, Cancer Res. 56: 3055-61)において見出され得る。VH-VLがリンカー配列なしで直接的に融合されているscFv誘導体は、三量体の形成をもたらす。当業者であれば、二量体、三量体又は五量体コイルドコイル構造によって多量化が行われている二価、三価又は五価構造を有する小型抗体(miniantibody)にも精通しているであろう(Pack et al., 1993 Biotechnology 11:1271-1277; Lovejoy et al., 1993 Science 259: 1288-1293; Pack et al., 1995 J. Mol. Biol. 246: 28-34)。

【0020】

別の観点によると、本発明は、上述の抗体又は抗体誘導体を活性な物質として含む医薬組成物に関し、また既に上で詳細に概要を述べたような自己免疫疾患、アレルギー性疾患及び喘息のような疾患の治療用医薬品を調製するための上述の抗体又は抗体誘導体の使用に関する。本発明の更なる観点は、前記自己免疫疾患、アレルギー性疾患及び喘息を治療する方法における、上述の抗体又は抗体誘導体の使用である。医薬組成物に用いられ得る適切な賦形剤、アジュバント、希釈剤及び担体は、本技術分野において知られている。それらの例は、例えば次のハンドブックから挙げることができる: Gennaro, Alfonso R.; "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1990。

本発明の更なる観点により、またTim-2がSema4Aの対レセプターであるという上述の発見に基づくと、Sema4Aによって媒介される共刺激経路は、抗Tim-2抗体、上に概要を述べるそれぞれの抗体誘導体、及びSema4A-Tim-2相互作用を遮断する小型分子の投与によっても遮断され得る。

本発明の別の観点によると、T細胞をSema4Aタンパク質(例えばヒトSema4A)又はその機能的フラグメント又はそれらの誘導体に接触させることにより免疫応答を調節する方法が提供される。“機能的断片又は誘導体”という用語は、哺乳動物のSema4A、好ましくはヒトSema4Aの一次構造の一部又は全部を有し、且つ少なくともT細胞上のSema4A受容体に結合する生物学的特性を有するタンパク質を意味する。

【0021】

10

20

30

40

50

好ましくは、前記機能的フラグメント又は誘導体が、可溶性Sema4Aタンパク質、より好ましくは可溶性ヒトSema4Aタンパク質である。組換え可溶性Sema4Aタンパク質は、本技術分野で既知の標準的なクローニング技術によって、例えば天然のSema4Aタンパク質（機能的断片）の膜貫通ドメインの全部又は一部を欠損させることによって、生成することができる。

機能的誘導体の好ましい例は、少なくともSema4Aタンパク質の細胞外ドメインの一部分と別のタンパク質とを含む融合タンパク質構築物であり、前記別のタンパク質は、例えばSema4Aタンパク質の可溶性、結合親和性及び/又は結合価を変化させるヒト免疫グロブリンC₁である。

可溶性機能的誘導体の例は、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するSema4A-Fcである。
10

また、本発明のこの観点によると、対象者に投与されたときに、前記対象者のT細胞媒介性免疫応答を刺激する医薬組成物が提供される。前記医薬組成物は、(i)配列番号1に記載のSema4Aタンパク質、上に概要を述べるような哺乳動物Sema4Aタンパク質の機能的断片及び誘導体からなる群より選択される医薬的に有効な成分；と(ii)賦形剤、アジュバント、希釈剤及び担体からなる群より選択され得る一つ以上の成分；とを含む。

【0022】

この態様の状況において、医薬組成物は、T細胞媒介性免疫応答を刺激する生理的作用を示す。前記作用は、例えば、(i)前記医薬的に有効な成分の存在下又は非存在下で、固定化されている抗CD3抗体及び抗CD28抗体を用いてナイ-ブCD4+T細胞を刺激する工程；及び(ii)そのように処理されたT細胞の活性化を、T細胞増殖又はIL-2分泌を測定することによって測定する工程；を含むアッセイによって、評価され得る。化合物の存在下でのT細胞増殖又はIL-2分泌が、その化合物が含まれていないアッセイと比較して増加する場合、その化合物は、本発明の状況においては、T細胞媒介性免疫応答を刺激する生物学的作用を有する化合物として分類される。実施例で示されるように、上に規定するような機能的Sema4A誘導体は、抗CD3抗体及び/又は抗CD28抗体と一緒に投与される場合に、強力なin vitro T細胞活性化を引き起す。T細胞の刺激を最適化するために、サイトカインが添加されてもよい。
20

【0023】

(i)配列番号1に記載のSema4Aタンパク質、上に概要を述べるような哺乳動物Sema4Aタンパク質の機能的断片及び機能的誘導体からなる群より選択され、且つT細胞媒介性免疫応答を刺激する生物学的作用を有する医薬的に活性な物質の使用であって、一次的若しくは二次的免疫不全の治療用医薬品の調製のため又は正常なT細胞応答を刺激するための前記使用；及び(ii)一次的若しくは二次的免疫不全から選択される疾患を治療するため又はT細胞応答を刺激するための方法であって、前記治療又は刺激を必要とする患者に対して、上述の群より選択される物質を治療上有効な量で投与することを含む前記方法；も本発明の範囲内である。
30

本発明に包含される機能的哺乳動物Sema4Aタンパク質誘導体は、T細胞表面上に存在するTim-2抗原に対して特異的に結合することが期待される。従って、本発明は、Tim-2抗原に結合することによりT細胞と反応するSema4Aタンパク質、機能的断片又は機能的誘導体（可溶性ヒトSema4A融合タンパク質を含む）を投与することによって、免疫系の疾患を治療する方法も提供する。
40

更に別の態様では、対宿主性移植片病におけるT細胞増殖を阻害する方法が提供され、この方法では、Tim-2陽性T細胞が、Tim-2受容体に結合するSema4A、好ましくは可溶性ヒトSema4Aタンパク質断片又は誘導体に反応させられて、免疫抑制剤が投与される。

【実施例】

【0024】

（実施例1：マウスSema4A及びヒトSema4Aの単離）

DCに発現しているセマフォリンを理解する試みにおいて、セマフォリンファミリーのメンバー間で保存されているモチーフに基づく縮重オリゴヌクレオチドプライマーを用いた
50

PCRクローニングを行った。これにより、セマフォリンファミリーのクラスIVに分類されているSema4AのcDNA断片を単離した。Sema4Aは、もともとはマウス胚において発現が観察されているSemBとして同定されたが、その機能に関する情報は報告されていなかった。そのときまでSema4Aのヒト相同意体は同定されていなかったことから、マウスSema4Aのヌクレオチド配列を用いて、全米バイオテクノロジー情報センター(NCBI)のデータベースを検索した。得られたヒトSema4Aの不完全なヌクレオチド配列に基づき、ヒト脳cDNAライブラリーから相補的cDNAの完全長を単離し、その完全なヌクレオチド配列を決定した。図1に示すように、ヒトSema4AとマウスSema4Aとの間では、アミノ酸配列で78%の同一性が見出された。ヒトSema4Aのアミノ酸配列は、より短い(20アミノ酸)細胞外領域を有する点で、マウスSema4Aのアミノ酸配列と僅かに異なっている。Sema4Aは、その構造的特徴に基づいて、セマフォリンファミリーのクラスIVに分類されている。アミノ末端シグナル配列に続いて、セマドメイン、Ig様ドメイン、疎水性膜貫通領域及び細胞質内末端が存在する。興味深いことに、セマフォリンドメインにおけるシステイン残基群は、セマフォリンファミリーの別のメンバーであるCD100と、Sema4Aとの間に保存されている。

10

20

30

40

【0025】

(実施例2:Sema4Aの発現)

胚発生の間のマウスSema4Aの発現は報告されているが、成体組織におけるマウスSema4Aの発現プロフィールは報告されていない。ノーザンプロット分析の場合におけるセマフォリンファミリー間のクロスハイブリダイゼーションの可能性を排除するために、クロンテック(Clontech)のマウス多重組織cDNAパネル(multiple tissue cDNA panel)を用いたSema4A発現解析のためのRT-PCRを行った。その結果は、次のようにあった:Sema4Aは、広範な組織で発現しており、脳、脾臓、胚、腎臓及び精巣では突出したレベルであった。加えて、Sema4Aの発現は7日目の胚では検出できないが、胚発生の間に検出可能となり徐々に増加した。胚の発現プロフィールは先に報告されたものと一致している。

免疫系におけるSema4Aの機能及び発現を研究するために、ヒトIgG1Fcと融合させたマウスSema4Aの推定上の細胞外領域からなる組換え可溶性マウスSema4Aタンパク質(Sema4A-Fc)を調製した。得られた生成物の同一性は、SDS-PAGEによって示された。還元条件下又は非還元条件下で、0.1% SDSの存在のもとでのグラジエントPAGE(4%-20%)によって、2μgの精製Sema4A-Fcタンパク質を分離し、銀染色によって可視化した。還元条件下でのSema4A-Fcについてはおよそ120kDaのバンドが観察され、非還元条件下では二量体形態が明らかに見えた。

種々の種類の細胞におけるSema4Aの細胞表面発現を解析するため、Sema4A-Fcを用いてラットを免疫すること及びフローサイトメトリー分析によりマウスSema4A発現CHO細胞形質移入体(Sema4A-CHO)を有するハイブリドーマを選択することによって、抗マウスSema4Aモノクローナル抗体(抗Sema4A)を産生させた。抗Sema4A(SK31、ラットIgG2a)は、Sema4A-CHOに特異的に結合するが、ネオマイシン耐性プラスミドのみを有するCHO細胞形質移入体(CHOneo)又はCD100発現CHO細胞(CD100-CHO)のどちらのコントロールにも結合しないことが確かめられた。マウスSema4AのcDNAのクローニング方法から予想されるように、抗Sema4Aを用いたフローサイトメトリー分析により、Sema4Aが骨髄由来の脾臓DCの表面上に大量に発現されていることが確かめられた。Sema4Aの発現は、B細胞表面上では中程度に検出された。しかしながら、Sema4Aの発現は、CD100が大量に発現されているT細胞表面上では検出されなかった。

【0026】

(実施例3:T細胞活性化におけるSema4Aの関与)

Sema4Aタンパク質がT細胞活性化に影響を及ぼすかどうかについて試験するために、Sema4A-Fcの存在下又は非存在下において、固定化されている抗CD3+抗CD28を用いてCD4+T細胞を刺激した。結果として、Sema4A-Fcは、抗CD3誘導性T細胞増殖及びIL-2産生を増強した。

次に、Sema4Aタンパク質が、個々の培養条件下で、T細胞のTh-1様又はTh-2様エフェクター集団への分化を促進するかどうかについて研究した。IL-12+抗IL-4の存在下(Th-1

50

条件) 又は IL-4 の存在下 (Th-2 条件) で、ナイーブ T 細胞を抗 CD3 + 抗 CD28 と共に 6 日間培養し、得られた細胞を、抗 CD3 + 抗 CD28 で 48 時間再刺激した。IFN- 又は IL-4 の產生は、ELISA によって測定した。Sema4A-Fc の存在下では、IFN- 又は IL-4 產生細胞の誘導が、Sema4A-Fc の非存在下の場合と比較して有意に増強された。しかしながら、Sema4A-Fc は、Th-1 様又は Th-2 様エフェクター集団に何の影響も及ぼさなかった。これらの知見から、Sema4A は、T 細胞活性化の初期段階にとって重要であることが示唆される。

これに関連して、抗 CD28 の非存在下では、Sema4A が抗 CD3 誘導性 T 細胞応答に効果的でないことが注目される。抗 CD28 の存在下では、Sema4A が抗 CD3 誘導性 T 細胞活性化に対して著しい効果を示した。これらの知見から、Sema4A は、DC 上に発現されている他の共刺激分子、特に B7 ファミリーメンバー (CD80 及び CD86) と共同して T 細胞を共刺激することが示唆される。10

さらに、Sema4A-Fc が同種 T 細胞と DC との間のリンパ球混合反応 (MLR) に影響を及ぼすかどうかについて調べた。C57BL/6 のバックグラウンドを有する骨髓由来 DC を MLR における刺激因子として、レスポンダーとしての BALB/c のバックグラウンドを有する脾臓から単離した CD4 + T 細胞と共に用いた。Sema4A-Fc は、MLR における T 細胞増殖を有意に増強した。培養上清における IL-2 產生も、Sema4A-Fc によって増強された。さらに、抗 CD40 処理によって完全に成熟させられてからパラホルムアルデヒドで固定された DC を、MLR の刺激因子として用いた場合であっても、Sema4A-Fc は MLR に対する効果を増強し、このことは、Sema4A が直接的に T 細胞に作用することを示している。まとめて、これらの結果は、DC 上の Sema4A 発現が、T 細胞 - DC 相互作用を通じて T 細胞活性化において役割を果たすことを示している。20

クラス IV のセマフォリンである CD100 が B 細胞及び DC の活性化に関与していることは、既に示されている。従って、我々は、CD100 の場合と同様に、Sema4A-Fc が B 細胞 (増殖) 及び DC (成熟) に対して影響を及ぼすかどうかについて試験した。Sema4A-Fc 又は CD100-Fc どちらかの存在下で、抗 CD40 及び IL-40 を用いて又は用いずに、C57BL/6 マウスから精製した小型の休止 B 細胞を 72 時間刺激した。[³H] チミジンで、細胞をパルスした。CD100-Fc は、B 細胞の CD40 誘導性 増殖及び DC の IL-12 產生を有意に増強したが、Sema4A-Fc は、前記細胞に対してそのような効果を示さなかった。これらの結果から、Sema4A が CD100 とは異なる役割を果たしていることが示される。30

【 0 0 2 7 】

(実施例 4 : Sema4A の免疫刺激効果)

Sema4A が *in vivo* の抗原特異的 T 細胞応答において役割を果たすかどうかを決定するために、マウスを、完全フロイントアジュバント中のキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) で後足パットへ皮下的に免疫してから、4 日ごとに Sema4A-Fc で経静脈的に処置した。免疫後 5 日目、流入領域リンパ節から CD4 + T 細胞を調製して、T 細胞の抗原特的応答について *in vivo* で試験した。Sema4A-Fc で処置したマウスでは、流入領域リンパ節由来 CD4 + T 細胞の増殖並びに IL-4 及び IFN- の両分泌において劇的な増加が観察されたが、コントロールのヒト IgG1 で処置したマウスでは観察されなかった。これらの知見から、Sema4A は、抗原特異的 T 細胞の *in vivo* 初回免疫に対して増強効果を及ぼすことが示される。40

【 0 0 2 8 】

(実施例 5 : Sema4A 共刺激経路を遮断することによる自己免疫疾患の処置)

ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質 (MOG) に由来するペプチドを百日咳毒素と一緒に用いる皮下免疫は、先に記述した実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を、一様且つ再現的に誘導する。従って、このモデルを用いて、生理学的及び病理学的免疫応答における Sema4A の関与を調べた。マウスを、百日咳毒素とともに CEF 中の MOG ペプチド 100 μg で 0 日目に免疫して、先に記述した EAE の臨床的症状を記録した。0 日目から免疫後 4 日目まで毎日、腹腔的に 100 μg の抗体 (抗 Sema4A 又はコントロールのラット IgG) でマウスを処置した。免疫後の時間経過に対して、各群の平均的臨床スコアを評価してプロットした。図 2 A に示すように、抗 Sema4A で処置したマウスにおける EAE の発生は、コントロールのラット IgG で処置したマウスにおけるものと比較して、有意に抑制された。50

抗Sema4Aで処置したマウスにおけるEAEに対する抵抗性を担うメカニズムを決定するために、免疫後5日目に流入領域リンパ節からCD4+T細胞を調製して、C57BL/6マウスの放射線照射脾細胞の存在下、種々の濃度のMOGペプチドで72時間刺激した。培養の最後12時間の間、2 μCi [³H]チミジンでパルスすることによって、増殖を評価した。培養上清におけるIL-4及びIFN-γの産生を、ELISAによって測定した。図2Bに示すように、抗原特異的T細胞応答は、抗Sema4Aで処置したマウスにおいてひどく損なわれており、抗Sema4Aの投与によって抗原特異的T細胞の発生が阻害されたことを示していた。この結果は、Sema4Aが生理学的及び病理学的細胞性免疫応答に重大に関与していることを示唆している。

【0029】

(実施例6：Sema4A-T細胞相互作用において調節効果を有する化合物を同定するためのスクリーニングアッセイ) 10

Sema4A-T細胞相互作用における調節的効果について、また前記効果によるT細胞活性化の調節的効果について、化合物を試験するために、それぞれの試験化合物と共にナイーブCD4+T細胞をインキュベートし、固定化されている抗CD3+抗CD28抗体及びSema4A-Fcを用いて刺激した。コントロールは、試験化合物の添加なしに行った。読み出しとして、T細胞増殖及びIL-2産生を測定した。

T細胞増殖の増加又はIL-2産生の増加をもたらす化合物をT細胞刺激活性化物質として分類し、一方、T細胞増殖の減少又はIL-2産生の減少をもたらす化合物をT細胞刺激阻害物質として分類する。これらは、例えば、自己免疫疾患、アレルギー若しくは喘息の治療用小型分子医薬品を開発するため(阻害物質)又は一次的及び二次的免疫不全の治療用小型分子医薬品を開発するため(活性化物質)のリード化合物として有用である。 20

(実施例7：HTSアッセイ)

アッセイは、本技術分野で充分既知の上述するHTS条件下で行ったことを除いて、本質的に実施例6に記述する通りに行った。

【0030】

(実施例8：T細胞上のSema4A対応受容体の同定)

Sema4Aの推定上の対応受容体(以下ではSema4A受容体とする)の発現を決定するために、ビオチン化Sema4A-Fcを用いて種々の細胞(脾臓B細胞、骨髄由来DC、脾臓T細胞又はEL-4細胞)を染色した。プライマリー(primary)T細胞、B細胞又はDC上では、ビオチン化Sema4A-Fcの結合は検出されなかった。抗CD40で刺激した後のB細胞及びDCであっても、ビオチン化Sema4A-Fcの結合は検出されなかった。しかしながら、コンカナバリンA(ConA)刺激を受けたT細胞においてビオチン化Sema4A-Fcの結合が検出できるようになり、活性化T細胞上のSema4A受容体の発現を示唆していた。さらに、Sema4A結合部位が、EL-4細胞のような幾つかのT細胞株の表面上で観察された。これらの結果は、活性化T細胞上におけるSema4A受容体の発現を示唆している。 30

Sema4A受容体の発現クローニングのため、EL-4細胞由来のcDNAライブラリーを構築した。ライブラリー由来のプラスミドDNAをCOS7細胞中に導入した。形質移入したCOS7細胞を、ビオチン化Sema4A-Fc又はビオチン化ヒト免疫グロブリンFcの画分と結合させ、続いてストレプトアビシン複合磁気ビーズに結合させた。磁気ソーティングにより、Sema4A-Fc結合細胞を濃縮させた。第3ラウンドのソーティングの後に、960 bpの挿入断片に対応する分離したバンドが現れたが、一方ヒト免疫グロブリンFc画分に結合している細胞に対応するバンドは見られなかった。これらクローンの960 bpのcDNA挿入断片をシークエンシングして、Tim-2をコードするcDNAの完全長を同定した。 40

【0031】

(方法)

[マウスSema4AのcDNA断片の単離]

セマフォリンファミリーのメンバー間に保存されている配列に基づいて、縮重オリゴヌクレオチド5'-AARTGGACIACITYYTIAARGC-3'(配列番号5)及び5'-TCCCAIGCRCARTRIGGRTC-3'(配列番号6; R=G又はA; Y=T又はC; I=イノシン)を用い、CD100欠損マウスの骨髄由来DCから調製したcDNAでPCR增幅を行った(94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間)。 50

にて1分間；を30サイクル）。増幅産物をT/Aベクター（Novagen）へクローニングして、シークエンシングした。全米バイオテクノロジー情報センターのマウスESTデータベースのBLAST検索は、マウスSema4AのcDNA（X85991）を同定した。この配列を用い、骨髓由来DCから作製したcDNAライブラリーから、SalI部位を含むセンス配列5'-AGGTCGACCCATCTGGTGA
CATCTCAGGCTGACCATGGC-3'（配列番号7）及びNotI部位とFLAG（DYKDDDDK；配列番号8）配列とを含むアンチセンス配列5'-ATGC
GGCCGCTTACTTGTCATCGTCGT
CCTGTAGTCAGCAC
TTCGGCGCCCAGATGGTTG-3'（配列番号9）を含むプライマーを用いたPCRによって、完全長cDNAをクローニングした。得られたSalI-NotI断片をpEFBosベクターへクローニングした。

[Sema4A発現のRT-PCR解析]

マウス組織におけるSema4Aの発現プロフィールを、マウス多重組織cDNAパネル（Clontech）を用いたRT-PCRによって解析した。Sema4Aの配列に基づいて、センスオリゴヌクレオチドプライマー5'-AGACTGGCCTTACCACTGGAGTCATG-3'（配列番号10）及びアンチセンスオリゴヌクレオチドプライマー5'-TAGTTGTCGGCATCTACGTCACTG-3'（配列番号11）を用いてRT-PCRを行った（94にて30秒、60にて30秒、72にて30秒；を30サイクル）。

【 0 0 3 2 】

[可溶性Sema4Aタンパク質の產生]

SalI部位を含むセンス配列5'-AGGTCGACCCATCTGGTGA
CCATCTCAGGCTGACCATGGC-3'（配列番号12）及びBgIII部位を含むアンチセンス配列5'-ATAGATCTGTACTTACTTTGGGCAGCCATGG
AAGCTCCGC-3'（配列番号13）を含むオリゴヌクレオチドプライマー対を用いたPCRによって、完全長Sema4A cDNAから、Sema4A cDNAの短縮型を調製した。得られたSalI-BgIII断片を用いて、pEFBosヒトIgG1 FcカセットのSalI-BamHI DNA断片を置き換えた。Sema4A-Fcタンパク質を產生させるために、発現プラスミドを有する安定なP3U1プラズマ細胞種形質移入体をエレクトロポーレーションによって樹立した。手短に言うと、HindIIIで消化したプラスミドDNA 50 μg及びBamHIで消化したpMC1neoベクター5 μgを、エレクトロポーレーションによって10⁷個の細胞のアリコートに形質移入した。10%FCS及び0.3 mg/mLのG418を含むRPMI培地内で10日間の選択を行った後、個々のG418耐性コロニーを単離してクローニングした。プロテインA-セファロース（Amersham Pharmacia）によって、培養上清からSema4A-Fcタンパク質を精製した。

【 形質移入体 】

リポフェクトアミンプラス（Lipofectamine Plus）2000（Life Technologies）を用いて、FLAGタグ付き完全長Sema4A cDNAを含むpEFBosベクター及びFLAGタグ付き完全長Sema4A cDNAを含むpMC1neoベクターを導入して、Sema4A-CHOを作製した。抗FLAG mAb（M2、Sigma）によってSema4A-CHOを選択して、クローニングした。コントロールの形質移入体として、pMC1neoベクターのみでのCHO細胞の形質移入によりCHOneoを作製した。

【 抗Sema4A mAb 】

抗Sema4A（SK31、ラットIgG2a）は、次のように確立した。100 mgのSema4A-Fcタンパク質を用いて、ラットを3回免疫し、1回追加免疫した。ラット脾細胞をp3U1細胞と融合させ、7日後に、Sema4A-CHOを用い、フローサイトメトリーにより、ハイブリドーマを特異的抗体の產生について試験した。

【 0 0 3 3 】

[Sema4A及びその対応受容体の発現についてのフローサイトメトリー分析]

抗Sema4A、Sema4A-Fc及びアイソタイプ適合型コントロールIgを、ビオチン化キット（Boehringer Mannheim）を用いてビオチン化した。Sema4A又はその対応受容体についてのフローサイトメトリー分析のため、10⁶個の細胞のアリコートを、5 mg/mLのFcブロック（PharMingen）を含むビオチン化抗Sema4A、ビオチン化Sema4A-Fc又はビオチン化コントロールIgと共に氷上で1時間インキュベートした。染色緩衝液で洗滌した後、FITC複合ストレプトアビシン（PharMingen）で前記細胞を20分間染色した。次に細胞を洗滌し、フローサイトメトリーによって分析した。

[in vitroのT細胞刺激]

10

20

30

40

50

T細胞増殖アッセイのため、磁気細胞ソーティング（MACS）（Miltenyi Biotech, Germany）を用いて脾細胞からCD4+T細胞を調製した。細胞（ 1×10^5 個）を、抗CD28（10 μg/mL）の非存在下又は存在下、5 μg/mLの抗CD3（2C11; PharMingen）でコーティングした平底96ウェルプレートを用いて48時間刺激した。T細胞分化解析のため、Sema4A-Fcの非存在下又は存在下、ナイーブT細胞を抗CD3+抗CD28で6日間刺激した。これにIL-12+抗IL-4を追加したものはTh-1様細胞を生じ、IL-4を追加したものはTh-2様細胞を生じた。次に、収集した細胞を、抗CD3+抗CD28で48時間再刺激した。MLRのため、GM-CSFを用いて、先に記述するように、C57BL/6マウスの骨髓前駆体からDCを発生させた。C57BL/6マウス由来の放射線照射(3000 rad)DCを、Sema4A-Fc又はヒトIgG1(PharMingen)を用いて又は用いずに、BALB/cマウス由来のCD4+T細胞（ 5×10^4 細胞/ウェル）と共に平底96ウェルプレートで72時間培養した。インキュベーションの最後12時間は、細胞を2 mCiの [³H]チミジンでパルスした。IL-2産生のため、ELISAキット(Endogen)を用いて、培養上清中のIL-2レベルを測定した。固定した完全に成熟なDCを用いるMLRのため、C57BL/6マウスの骨髓由来DCを抗CD40（5 mg/mL）で24時間処理して、次に0.8%パラホルムアルデヒドで固定して、刺激因子として用いた。

10

【0034】

[B細胞増殖アッセイ]

抗Thy1.2(F7D5, Seroteck Ltd, U.K.)とウサギ補体(Wako, Japan)との組合せを用いて、C57BL/6マウス(6-8週齢)由来の非接着性脾臓B細胞を単離した。残りのB細胞を、50%、60%、66%及び70%のパーコール(Percoll)勾配によってさらに分画し、66%層と70%層との間の界面の細胞を集めた。得られた小型休止B細胞（ 1×10^5 細胞/ウェル）を平底96ウェルプレートで、Sema4A-Fc又はCD100-Fcどちらかの存在下、1 mg/mLの抗CD40(HM40-3, PharMingen)及び10 U/mLのIL-4(Genzyme, Cambridge, MA)を伴って又は伴わずに、72時間培養した。その最後16時間は、細胞を2 mCiの [³H]チミジンでパルスした。

20

[IL-12産生アッセイ]

DC（ 1×10^6 細胞/ウェル）を24ウェルプレートで72時間、抗CD40（5 mg/mL）+Sema4A-Fc又はCD100-Fcのどちらかを伴って又は伴わずに培養した後、IL-12を定量した。マウスIL-12 ELISAキット(Amersham Pharmacia)を用いて、成熟IL-12p70ヘテロ二量体を検出した。

30

【0035】

[in vivoのT細胞初回免疫]

8週齢のC57BL/6マウスを、CFA中のKLH(Sigma)10 mgで後足フットパッドに免疫した。免疫後4日間、Sema4A-Fc(100 mg/マウス/日)又はヒトIgG1(50 mg/マウス/日)どちらかを静脈内注射した。免疫後5日目、MACSによって流入領域リンパ節からCD4+T細胞を精製し、 1×10^5 個の細胞を平底96ウェルプレートで、C57BL/6マウスの放射線照射(3000 rad)脾細胞（ 1×10^6 細胞/ウェル）の存在下、種々の濃度のKLHを用いて72時間刺激した。増殖アッセイのため、最後の16時間は、細胞を2 mCiの [³H]チミジンでパルスした。培養上清におけるIL-4レベル及びIFN-γレベルを、ELISAによって測定した(R and D systems)。

40

[EAEの誘発及び阻止]

熱不活性化結核菌(Mycobacterium tuberculosis)を含むCFA中のマウス/ラットMOGペプチド(MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK(配列番号14)Kurabo, Japan)100 mg/mLを両側大腿部へ皮下注射することによって、8~12週齢のC57BL/6マウスにEAEを誘発させた。加えて、百日咳毒素(100 ng; List Biological Labs, Campbell, CA)を0日目及び2日目に静脈内注射した。免疫後5日間、抗Sema4A又はラットIgG(ICN Pharmaceuticals, Inc)(各々、100 mg/マウス/日)どちらかを毎日腹腔内注射した。動物を毎日観察し、恣意的な臨床的尺度(arbitrary clinical scale)で神経学的欠陥を定量化した。MOG特異的T細胞のin vitro応答は、次のように決定した：同様の手順での免疫後7日目、MACSによって流入領域リンパ節からCD4+T細胞を精製し、 1×10^5 個の細胞を平底96ウェルプレートで、C57BL/6マウスの放射線照射(3000 rad)脾細胞（ 1×10^6 細胞/ウェル）の存在下、種々の濃度のMOGペプチド

50

チドを用いて72時間刺激した。増殖アッセイのため、最後の16時間は、細胞を2 mCiの [³H]チミジンでパルスした。培養上清におけるIL-4レベル及びIFN-γレベルを、ELISAキット(R and D systems)を用いて測定した。

【0036】

[cDNAライブラリーの構築及び発現クローニング]

グアニジニウムイソチオシアネート勾配遠心法によってEL-4細胞から総細胞質RNAを単離し、オリゴ(dT)-結合磁気ビーズ(PolyA Tract mRNA Isolation System, Promega)を用いてmRNAを選択した。スーパースクリプト(SuperScript)II cDNA合成キット(Invitrogen)を用いて、オリゴ(dT)でプライムされた二重鎖cDNAを合成した。そのcDNAにBstXIアダプター(Invitrogen)を付加して、1%アガロースゲル上で電気泳動によってサイズ分画した。800 bpより大きいcDNAを回収して、BstXI消化したpME18Sベクターに連結した。連結したDNAを、エレクトロポーレーションによってE.coli DH10B細胞(Invitrogen)に形質転換した。2.0 × 10⁷個の独立なクローンのアリコートを、COS7細胞に形質移入するのに用いた。リポフェクトアミンプラス(Invitrogen)を用いて、プラスミドDNAをCOS7細胞に形質移入した。形質移入の3日後、細胞を収集して、5%FCS、2.5 μg/mLのFcブロック(PharMingen)及び5 μg/mLのビオチン化Sema4A-Fc又はビオチン化ヒト免疫グロブリンFcを含むPBS中に5 × 10⁶細胞/mLの濃度で再懸濁して、氷上で1時間インキュベートした。この細胞を氷冷PBSで洗滌し、ダイナビーズ(Dynabeads)M-280ストレプトアビシン(Dyna I A.S.)を含むPBS中に5 × 10⁶細胞/mLで再懸濁した。30分間のインキュベーションの後、磁気粒子濃縮機(Magnetic Particle Concentrator)(Dynal A.S.)を用いて、細胞を氷冷PBSで10回洗滌した。Hirt法により、結合している細胞から染色体外プラスミドDNAを抽出した。そのプラスミドDNAを、エレクトロポーレーションによってE.coli DH10B細胞に導入し、次に、プロトプラスト融合による第二及び第三の形質移入に用いた。磁気ソーティングは、上述のように3回繰り返した。
10
20
30

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】ヒトSema4A(上列；配列番号1)及びマウスSema4A(下列；配列番号4)の配列アラインメントを示す。中央の列は、同一なアミノ酸残基を表示している。予測されるシグナル配列(小さい破線)、Semaドメイン(実線)、Ig様ドメイン(大きい破線)及び膜貫通領域(太線)が表示されている。

【図2】実施例5の実験結果を示す。抗Sema4A抗体での処置が、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発生を阻止している。A：抗Sema4A(白抜きの円)又はコントロールのラットIgG(黒塗りの円)で処置したマウスでのEAE臨床疾患の経過。B：ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質(MOG)ペプチドで刺激したCD4+T細胞のin vitro応答(増殖、IL-4及びIFN-γ産生)。

【 図 1 】

Fig. 1

【 図 2 】

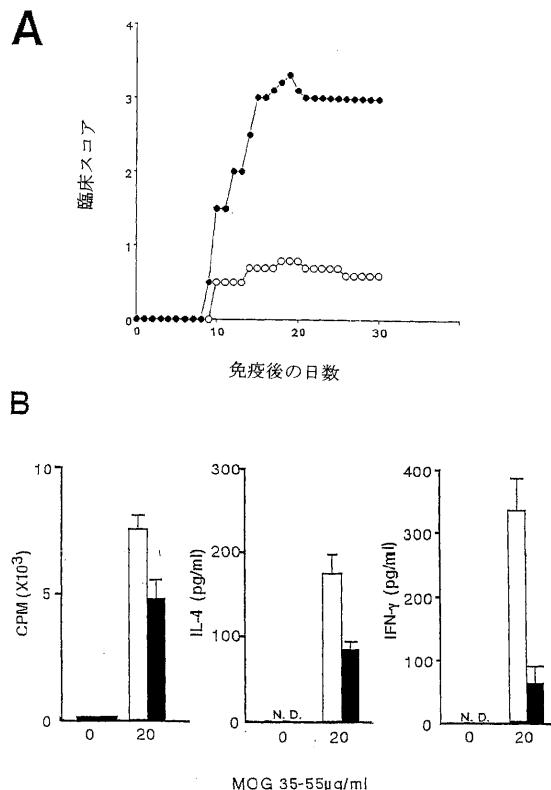


Fig. 2

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | Internal Application No PCT/EP 03/02785 | | | | | | | | | | | | |
|--|---|--|------------|--|-----------------------|---|---|----------------------|-----|--|--------|---|---|-----------------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/24 | | | | | | | | | | | | | | |
| 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) IPC 7 C07K C12N | | | | | | | | | | | | | | |
| 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) WPI Data, EMBASE, BIOSIS, EPO-Internal | | | | | | | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding-right: 10px;">Category °</th> <th style="padding-right: 10px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="padding-right: 10px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>WO 00 77239 A (MILLENNIUM PHARM INC) 21 December 2000 (2000-12-21) the whole document ----</td> <td style="text-align: center;">1,2,5-8, 10,12,14</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A,P</td> <td>WO 02 062841 A (INCYTE GENOMICS INC ;RICHARDSON THOMAS W (US); DING LI (US); LEE S) 15 August 2002 (2002-08-15) page 132 -page 133 claim 1 ----</td> <td style="text-align: center;">1,2,12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">X</td> <td>WO 00 55371 A (FLORENCE KIMBERLY ;HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); BIRSE CHARLES () 21 September 2000 (2000-09-21) abstract claim 11 page 392 -page 394 ----</td> <td style="text-align: center;">1,2,5-8, 10,12,14 -/-</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | A | WO 00 77239 A (MILLENNIUM PHARM INC) 21 December 2000 (2000-12-21) the whole document ---- | 1,2,5-8, 10,12,14 | A,P | WO 02 062841 A (INCYTE GENOMICS INC ;RICHARDSON THOMAS W (US); DING LI (US); LEE S) 15 August 2002 (2002-08-15) page 132 -page 133 claim 1 ---- | 1,2,12 | X | WO 00 55371 A (FLORENCE KIMBERLY ;HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); BIRSE CHARLES () 21 September 2000 (2000-09-21) abstract claim 11 page 392 -page 394 ---- | 1,2,5-8, 10,12,14 -/- |
| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | | | | |
| A | WO 00 77239 A (MILLENNIUM PHARM INC) 21 December 2000 (2000-12-21) the whole document ---- | 1,2,5-8, 10,12,14 | | | | | | | | | | | | |
| A,P | WO 02 062841 A (INCYTE GENOMICS INC ;RICHARDSON THOMAS W (US); DING LI (US); LEE S) 15 August 2002 (2002-08-15) page 132 -page 133 claim 1 ---- | 1,2,12 | | | | | | | | | | | | |
| X | WO 00 55371 A (FLORENCE KIMBERLY ;HUMAN GENOME SCIENCES INC (US); BIRSE CHARLES () 21 September 2000 (2000-09-21) abstract claim 11 page 392 -page 394 ---- | 1,2,5-8, 10,12,14 -/- | | | | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" 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 *Z* document member of the same patent family | | | | | | | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search 18 July 2003 | | Date of mailing of the international search report 04/08/2003 | | | | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Panzica, G | | | | | | | | | | | | |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | Internal Application No PCT/EP 03/02785 |
|--|--|--|
| 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 02 06339 A (ALSOBROOK JOHN II ;BURGESS CATHERINE E (US); SPADERNA STEVEN K (US) 24 January 2002 (2002-01-24) abstract sequence 10. claim 1 page 41 | 1,2,5-8, 10,12,14 |
| T | KUMANOGOH ATSUSHI ET AL: "Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2." NATURE (LONDON), vol. 419, no. 6907, 10 October 2002 (2002-10-10), pages 629-633, XP002247271 10 October, 2002 ISSN: 0028-0836 the whole document | 1-29 |
| A | PUESCHEL A W ET AL: "MURINE SEMAPHORIN D/COLLAPSIN IS A MEMBER OF A DIVERSE GENE FAMILY AND CREATES DOMAINS INHIBITORY FOR AXONAL EXTENSION" NEURON, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 14, May 1995 (1995-05), pages 941-948, XP002929750 abstract | 1 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l application No.
PCT/EP 03/02785

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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:
Although claims 8, 9, 17 are directed to a method of treatment of 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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 | | | | Internal PCT/EP 03/02785 | Application No |
|---|---------------------|------------|----------------------------------|--|--|
| Patent document cited in search report | Publication date | | Patent family member(s) | | Publication date |
| WO 0077239 | A | 21-12-2000 | AU EP WO US US | 5305000 A 1210416 A2 0077239 A2 2002182675 A1 2003022279 A1 | 02-01-2001 05-06-2002 21-12-2000 05-12-2002 30-01-2003 |
| WO 02062841 | A | 15-08-2002 | WO WO WO WO WO | 02062841 A2 03016506 A2 02086069 A2 03004615 A2 03046196 A1 | 15-08-2002 27-02-2003 31-10-2002 16-01-2003 05-06-2003 |
| WO 0055371 | A | 21-09-2000 | AU CA EP JP WO US | 4010400 A 2368068 A1 1181390 A1 2002538841 T 0055371 A1 2003104400 A1 | 04-10-2000 21-09-2000 27-02-2002 19-11-2002 21-09-2000 05-06-2003 |
| WO 0206339 | A | 24-01-2002 | AU WO | 1453102 A 0206339 A2 | 30-01-2002 24-01-2002 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 P 3/06 | A 6 1 P 3/06 | |
| A 6 1 P 3/10 | A 6 1 P 3/10 | |
| A 6 1 P 5/14 | A 6 1 P 5/14 | |
| A 6 1 P 7/06 | A 6 1 P 7/06 | |
| A 6 1 P 11/06 | A 6 1 P 11/06 | |
| A 6 1 P 13/12 | A 6 1 P 13/12 | |
| A 6 1 P 17/06 | A 6 1 P 17/06 | |
| A 6 1 P 19/02 | A 6 1 P 19/02 | |
| A 6 1 P 21/04 | A 6 1 P 21/04 | |
| A 6 1 P 25/00 | A 6 1 P 25/00 | |
| A 6 1 P 27/02 | A 6 1 P 27/02 | |
| A 6 1 P 29/00 | A 6 1 P 29/00 | |
| A 6 1 P 31/04 | A 6 1 P 29/00 | 1 0 1 |
| A 6 1 P 31/10 | A 6 1 P 31/04 | |
| A 6 1 P 31/12 | A 6 1 P 31/10 | |
| A 6 1 P 31/18 | A 6 1 P 31/12 | |
| A 6 1 P 37/02 | A 6 1 P 31/18 | |
| A 6 1 P 37/04 | A 6 1 P 37/02 | |
| A 6 1 P 37/06 | A 6 1 P 37/04 | |
| A 6 1 P 37/08 | A 6 1 P 37/06 | |
| C 0 7 K 14/705 | A 6 1 P 37/08 | |
| C 0 7 K 16/18 | C 0 7 K 14/705 | |
| C 0 7 K 19/00 | C 0 7 K 16/18 | |
| // C 1 2 N 15/09 | C 0 7 K 19/00 | |
| C 1 2 Q 1/02 | A 6 1 K 37/02 | |
| | C 1 2 N 15/00 | A |
| | C 1 2 Q 1/02 | |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 菊谷 仁

大阪府吹田市千里山東2-17-B-504

(72)発明者 熊ノ郷 淳

大阪府池田市五月丘1-8-3-2-604

(72)発明者 バースミアン エドワード レオン

大阪府豊中市西緑丘2-6-18-801

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 BA63 BA80 CA04 CA05 CA06 CA07 DA02
EA04 FA02 FA10 GA11 GA18 HA03 HA08 HA09 HA14
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ20 QQ79 QR48 QR69 QR77 QS12 QS24
QS28 QS36 QX01
4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 CA25 DC50

NA14 ZA02 ZA33 ZA55 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94
ZA96 ZB05 ZB08 ZB11 ZB13 ZB15 ZB32 ZB33 ZB35 ZC06
ZC33 ZC35 ZC55
4C085 AA13 AA14 CC03 CC04 CC05
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA45 DA50 DA75 DA86 EA20
EA22 EA50 FA72 FA74