

(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2011-502954

(P2011-502954A)

(43) 公表日 平成23年1月27日(2011.1.27)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	4 B 02 4
C07K 16/24 (2006.01)	C 07 K 16/24	4 C 08 4
A61P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	4 C 08 5
A61K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	N
A61K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 H 04 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁)	最終頁に続く

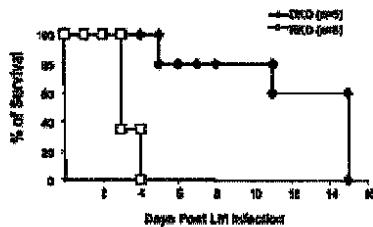
(21) 出願番号	特願2009-544272 (P2009-544272)	(71) 出願人	505011280 ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシティ アメリカ合衆国 メリーランド州 バルティモア 5ス フロアーエヌ. チャーリーズ ストリート 100
(86) (22) 出願日	平成19年12月27日 (2007.12.27)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成21年8月14日 (2009.8.14)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2007/088979	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02008/083239		
(87) 國際公開日	平成20年7月10日 (2008.7.10)		
(31) 優先権主張番号	60/877,319		
(32) 優先日	平成18年12月27日 (2006.12.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/949,742		
(32) 優先日	平成19年7月13日 (2007.7.13)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫応答を刺激する組成物および方法

## (57) 【要約】

宿主において免疫応答を刺激、増強又は促進する組成物及び方法を提供する。一実施態様では有効量の B 7 - H 4 アンタゴニスト、好ましくは sH4 又はその改変体を投与することによって宿主の免疫応答を刺激、増強又は促進する組成物及び方法を提供する。免疫応答を増強して感染、癌を処置するために、又はワクチンの一部として sH4 の組成物を用いることができる。他の好適な B 7 - H 4 アンタゴニストとしては、B 7 - H 4 又は B 7 - H 4 受容体特異的抗体、B 7 - H 4 又は B 7 - H 4 受容体特異的阻害核酸及び B 7 - H 4 活性をインビボで阻害又は妨害する他の分子が挙げられるが、これらに限定されない。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

医薬組成物投与単位であって、これを必要とする個体において B7-H4 活性を阻害するのに有効な量の B7-H4 アンタゴニスト及び医薬用として許容可能な担体を含む医薬組成物投与単位。

**【請求項 2】**

前記 B7-H4 アンタゴニストが sH4 又はその改変体である請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【請求項 3】**

前記 B7-H4 アンタゴニストが抗 B7-H4 抗体、抗 B7-H4 受容体抗体、B7-H4 又は B7-H4 受容体抗体に特異的な阻害核酸、sH4 をコードする核酸及びこれらの組合せからなる群から選択される請求項 1 に記載の医薬組成物。 10

**【請求項 4】**

前記阻害核酸がアンチセンスDNA、アンチセンスRNA、siRNA 及びミクロRNA からなる群から選択される請求項 3 に記載の医薬組成物。

**【請求項 5】**

前記 B7-H4 活性が細胞表面受容体への B7-H4 の結合である請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【請求項 6】**

前記細胞表面受容体が T 細胞上の受容体である請求項 5 に記載の医薬組成物。 20

**【請求項 7】**

前記 B7-H4 活性が T 細胞活性の阻害である請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

第 2 の治療剤をさらに含む請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【請求項 9】**

前記第 2 の治療剤が成長因子受容体又は腫瘍特異抗原に特異的な抗体又はその抗原結合断片、サイトカイン、ケモカイン、増殖阻害剤及び細胞毒性剤からなる群から選択される請求項 8 に記載の医薬組成物。

**【請求項 10】**

個体において免疫応答を刺激又は増強する方法であって、

該個体において B7-H4 活性を阻害するのに有効な量の B7-H4 アンタゴニストを該個体に投与する工程を含む方法。 30

**【請求項 11】**

前記 B7-H4 アンタゴニストが sH4 又はその改変体である請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記 B7-H4 アンタゴニストが抗 B7-H4 抗体、抗 B7-H4 受容体抗体、B7-H4 又は B7-H4 受容体に特異的な阻害核酸、sH4 をコードする核酸及びこれらの組合せからなる群から選択される請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記阻害核酸がアンチセンスDNA、アンチセンスRNA、siRNA 及びミクロRNA からなる群から選択される請求項 12 に記載の方法。 40

**【請求項 14】**

前記 B7-H4 活性が細胞表面受容体への B7-H4 の結合である請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 15】**

前記細胞表面受容体が T 細胞上の受容体である請求項 14 に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記 B7-H4 活性が T 細胞活性の阻害である請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記方法が前記個体において感染又は癌を処置するために用いられる請求項 10 に記載

50

の方法。

【請求項 18】

前記癌が膀胱、脳、乳腺、頸部、結腸 - 直腸、食道、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、脾臓、前立腺、皮膚、胃、子宮、卵巣及び精巣の癌からなる群から選択される請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記感染がウイルス、細菌、真菌及び原生動物によるものである感染を処置するための請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

ワクチン組成物であって、

抗原及び個体において B7-H4 活性を阻害するのに有効な量の B7-H4 アンタゴニストを含む組成物。

【請求項 21】

前記抗原が該抗原をコードする発現ベクターである請求項 20 に記載のワクチン組成物。

【請求項 22】

前記抗原が抗原性ポリペプチドを含む請求項 20 に記載のワクチン組成物。

【請求項 23】

前記抗原性ポリペプチドがウイルス性、真菌性、細菌性又は原生動物性である請求項 2 20 に記載のワクチン組成物。

【請求項 24】

前記抗原性ポリペプチドが腫瘍特異抗原を含む請求項 2 2 に記載のワクチン組成物。

【請求項 25】

癌を処置する方法であって、

腫瘍細胞上の B7-H4 分子に結合するのに有効な量の B7-H4 アンタゴニストを被検体に投与して該 B7-H4 分子が免疫細胞上の B7-H4 受容体に結合するのを阻害する工程を含む方法。

【請求項 26】

前記 B7-H4 アンタゴニストが抗体又はその抗原結合断片及び sH4 からなる群から選択される請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 27】

前記被検体に第 2 の治療剤を投与する工程をさらに含む請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 2 の治療剤が成長因子受容体又は腫瘍特異抗原に特異的な抗体又はその抗原結合断片、サイトカイン、ケモカイン、増殖阻害剤及び細胞毒性剤からなる群から選択される請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 29】

有効量の放射線を投与する工程をさらに含む請求項 2 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連する出願への相互参照

本願は、2006年12月27日に出願された米国特許出願第 60/877,319 号および 2007 年 7 月 13 日に出願された米国特許出願第 60/949,742 号の利益と米国特許出願第 60/877,319 号および米国特許出願第 60/949,742 号に対する優先権を主張する。米国特許出願第 60/877,319 号および米国特許出願第 60/949,742 号の両方は、その許される全体が参考として援用される。

【0002】

政府の支援

明細書中に記載される研究のための基金は、Liping Chen に対して国立衛

10

20

30

40

50

生研究所により与えられた補助金番号第 R 0 1 C A 9 8 7 3 1 により一部は提供された。連邦政府は、本発明における一定の権利を有し得る。

#### 【 0 0 0 3 】

本発明は、宿主の免疫応答を増強する組成物及び方法、特に癌又は感染症を処置又は抑制する組成物及び方法に関する。

#### 【 背景技術 】

#### 【 0 0 0 4 】

免疫応答を調節することは多くの疾患及び障害の重要な処置法である。例えば、癌又は感染症に罹患している患者の免疫応答を増強することは有益であると考えられる。現在の癌治療は複製細胞を無差別に殺傷する薬物及び／又は放射線の使用をベースとしている。その考え方は、患者の正常細胞を殺傷するより癌細胞よりも速やかに殺傷することである。外科手術は腫瘍塊を減少させるのに用いられるが、癌が一旦転移してしまうと効果はほとんどない。放射線は限局部分においてのみ有効である。

10

#### 【 0 0 0 5 】

癌処置は、維持療法の場合でさえ、それ自体患者を殺傷し、又は不具にする可能性がある。例えば、一部のタイプの癌の場合、普通なら致命的となる量の化学療法剤による処置後の患者を維持するために、骨髄移植が行われている。しかしながら、固形腫瘍の処置の場合、有効性が証明されていない。攻撃的な癌を処置するためには、各種化学治療剤の「カクテル」並びに超高用量の化学治療剤と回復推進剤、例えば、血小板及び白血球レベルを回復させる顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「G M - C S F 」）、エリスロポエチン、トロンボポエチン（*t h r o m b o p o e t i n*）、顆粒球刺激因子（「G - C S F 」）、マクロファージコロニー刺激因子（「M - C S F 」）及び幹細胞因子（「S C F 」）、との併用が用いられている。こうした支持的治療又は制限的治療の場合でも副作用は重篤である。

20

#### 【 0 0 0 6 】

死亡率及び罹患率を低下させようとして他の処置法が試行してきた。患者の免疫系を刺激するワクチンが試みられてきたが、大して成功していない。癌を殺すために腫瘍壞死因子、インターフェロンガンマ、インターロイキン - 2（「I L - 2」）などの各種サイトカインが単独又は併用で用いられてきたが、治癒をもたらすには至っていない。最近になって、サリドマイドなどの抗血管新生化合物が例外的使用の許可を得た（*c o m p a s s i o n a t e u s e*）症例において試みられ、腫瘍の寛解をもたらすことが示されている。動物実験では、プロテインCの阻害剤などの凝固促進状態を誘導する化合物を用いて腫瘍の寛解が得られている。新たな研究によって、正常細胞に比し高い濃度で腫瘍細胞から可溶型として放出される腫瘍壞死因子受容体（「T N F R 」）などのサイトカイン受容体の阻害剤が腫瘍細胞に対する免疫系の攻撃を回復し得ることが示された（非特許文献1；非特許文献2）。

30

#### 【 0 0 0 7 】

マウス及びヒトにおける研究は、免疫応答のより特異的な賦活因子としてのサイトカイン蛋白を*i . p.* 又は静脈内（*i . v.*）投与するものであった（非特許文献3；非特許文献4）。マウス卵巣腫瘍を組換えI L - 2蛋白とG M - C S F蛋白との併用により処置すると、腹水生成の阻害にある程度有益な効果があったが、I L - 2は、G M - C S Fと併用した場合にのみ有効であった（非特許文献5）。同様に、I L - 2とリンホカイン活性化キラー（L A K）細胞との併用によってマウスの*i . p.*肉腫を縮小させることができたが、I L - 2蛋白単独では有効ではなかった（非特許文献6）。卵巣癌患者のI L - 2蛋白治療を評価したヒト臨床試験では、ある程度の抗腫瘍効果が示された（非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9；非特許文献10；非特許文献11）。

40

#### 【 0 0 0 8 】

マウスにおける他の研究は、「自殺」遺伝子をコードするD N A構築物を注射後、プロドラッグで処置するものであった。この方法により一部の小さな腫瘍の退縮をもたらすことに成功したが、より大きな腫瘍塊に対しては余りうまくいかなかった（非特許文献12

50

; 非特許文献 13)。別の研究において、HER-2/neuを過剰発現する卵巣癌を有するマウスに対しリポソーム媒介性E1A遺伝子治療が行われた結果、こうした担腫癌マウスの死亡率が低下した(非特許文献14)。同様に、i.p.注射によりIFNガンマをコードするDNA構築物のシスプラチニン誘導遺伝子移入を行ってマウス卵巣癌の処置(MOT)に成功したことが明らかにされている(非特許文献15)。しかしながら、この研究から、腫瘍がIFNガンマ遺伝子又はシスプラチニン単独に対しては反応性に乏しいことが明らかとなり、シスプラチニン利用の遺伝子治療プロトコルの有効性は、主にIFN遺伝子によるトランスフェクションに対するシスプラチニン曝露腫瘍細胞の感受性上昇の増強によるものであることが示唆された(非特許文献16)。

## 【0009】

10

従って、本発明の目的は、宿主において免疫応答を増強又は促進する組成物及び方法を提供することにある。

## 【0010】

別の目的は、感染症又は癌を処置するために宿主の免疫応答を増強する方法及び組成物を提供することにある。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0011】

【非特許文献1】Jablonska及びPeitruska、Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz) 1997年、45(5-6) : p. 449-453

20

【非特許文献2】Chenほか、J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1997年、56(5) : p. 541-550

【非特許文献3】Adachiほか、Cancer Immunol. Immunother. 37 : p. 1-6、(1993年)

【非特許文献4】Lissoniほか、Tumori. 78 : p. 118-20 (1992年)

【非特許文献5】Kikuchiほか、Cancer Immunol. Immunother. 43 : p. 257-261 (1996年)

【非特許文献6】Ottowほか、Cellular Immunology 104 : p. 366-376 (1987年)

【非特許文献7】Chapmanほか、Investigational New Drugs 6 : p. 179-188. (1988年)

【非特許文献8】Lissoniほか、Tumori. 78 : p. 118-120 (1992年)

【非特許文献9】Sparanoほか、J. of Immunotherapy. 16 : 216-223 (1994年)

【非特許文献10】Freedmanほか、J. of Immunotherapy. 16 : p. 198-210 (1994年)

【非特許文献11】Edwardsほか、J. Clin. Oncol.. 15 : p. 3399-3407 1997年)

【非特許文献12】Szalaiほか、Gene Therapy. 3 : p. 1025-1031 (1996年)

【非特許文献13】Sugayaほか、Hum. Gene Ther.. 7 : p. 223-230 (1996年)

【非特許文献14】Yuほか、Oncogene. 11 : p. 1383-1388 (1995年)

【非特許文献15】Son、Cancer Gene Therapy. 4 : p. 391-396 (1997年)

【非特許文献16】Son、Cancer Gene Therapy. 4 : 391-

40

50

396 (1997年)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

有効量のB7-H4アンタゴニスト、好ましくはsH4又はその改変体を投与することにより宿主の免疫応答を刺激、増強又は促進する組成物及び方法を開発した。sH4の組成物は、感染症、癌を処置するために、又はワクチンの一部として、免疫応答を増強するために用いることができる。他の好適なB7-H4アンタゴニストとしては、B7-H4又はB7-H4受容体特異的抗体、B7-H4又はB7-H4受容体特異的阻害核酸及びB7-H4活性をインビボで阻害又は妨害する他の分子が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0013】

一実施態様において、癌は、宿主の免疫応答を刺激、増強又は促進するのに有効な量のB7-H4アンタゴニストを宿主に投与することによって処置する。処置することができる代表的な癌としては、膀胱、脳、乳腺、頸部、結腸直腸、食道、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、脾臓、前立腺、皮膚、胃、子宮、卵巣及び精巣の癌が挙げられるが、これらに限定されるものではない。さらに別の実施態様では、宿主の免疫応答を刺激、増強又は促進するのに有効な量のB7-H4アンタゴニストを宿主に投与することによって感染症を処置又は抑制する組成物及び方法を提供する。処置することができる好適な感染症としては、細菌、ウイルス、真菌及び原生動物感染症が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0014】

別の実施態様では、B7-H4アンタゴニスト、好ましくはsH4を含むワクチン組成物を提供する。このワクチンは抗原供給源をも含む。この抗原供給源はウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原又は原生動物抗原を供給することができる。好ましい実施態様では、この抗原は腫瘍特異的抗原である。上記ワクチン組成物は任意選択的にアジュバントを含む。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】B7-H4遺伝子の破壊を示す概略図である。マウスB7-H4遺伝子のIgV及びIgCドメインをコードするエクソンを含有する4.7kb DNA断片がネオマイシン耐性(Neo)遺伝子をコードする1.7kb断片によって置換されている。閉四角形はB7-H4をコードするエクソンを表す。エクソン間の線はインtron配列を表す。開四角は非翻訳エクソンを表す。Neoは斜線を施した四角により表されている。

【図2a】野生型マウス( )又はB7-H4KOマウス( )におけるListeria monocytogenes(LM)感染後日数に対する生残百分率を示す折れ線グラフである。

【図2b】LMを感染させた野生型マウス( )又はB7-H4KOマウス( )の2又は3日目における脾臓1g当たりのCFU( $\times 10^8$ )を示すグラフである。

【図2c】LMを感染させた野生型マウス( )又はB7-H4KOマウス( )におけるLM感染後日数に対する脾臓顆粒球百分率を示す折れ線グラフである。

【図2d】リステリア菌感染の24時間前に150pgのGr-1mAb又は対照ラットIgG(LPS不含)をi.p.注射した3匹のB7-H4KOマウス又は同腹仔対照における肝臓1g当たりのCFU $\times 10^4$ を示す棒グラフである。次いで、マウスに $3 \times 10^6$ CFUのリステリア菌をi.p.注射した。感染後24時間に、マウスを屠殺し、肝臓中のリステリア菌を計数した。

【図3】野生型マウス( )又はB7-H4KOマウス( )におけるLM感染後の時間に対する顆粒球当たりのLM CFUを示す棒グラフである。

【図4】RKOマウス( )又はB7-H4KOマウス( )におけるLM感染後の日数に対する生存百分率を示す折れ線グラフである。

10

20

30

40

50

【図5a】図に示した濃度の組換えG-CSFと3日間平板培養した野生型マウス( )又はB7-H4KOマウス( )の $2 \times 10^6$ 個の骨髄細胞におけるG-CSF(n g / m l)に対するCPMを示す折れ線グラフである。培養液は、培養終了前18時間<sup>3</sup>H TdRでパルスし、収集してシンチレーションカウンターにより計数した。

【図5b】フローサイトメトリーにより分析したゲートされたGr-1+CD11b+顆粒球中のCFSEの希釈度の線グラフのパネルである。そこに示したマウスからの $2 \times 10^6$ 個の骨髄細胞をCFSEで標識し、5日間培養した。細胞は収集してGr-1/CD11b mAbで二重に染色した。

【図6】日数に対するCPMの折れ線グラフである。正常B6マウスからの $2 \times 10^6$ 個の骨髄細胞を、組換えマウスG-CSFの非存在下(A)、0.1n g / m lの存在下(B)又は1n g / m lの存在下(C)に20μg / m lの組換えマウスB7-H4Ig( )又はマウスIg対照蛋白( )で被覆した96-穴プレート中で平板培養した。図に示したように、2乃至5日目に細胞を収集した。培養液は培養終了前18時間<sup>3</sup>H TdRでパルスし、収集してシンチレーションカウンターにより計数した。\*P < 0.05。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0016】

###### I. 定義

本明細書に用いている科学技術用語は全て、別に定義しない限り、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されているのと同じ意味を有する。本発明を実施するために本明細書に記載したものと同様もしくは同等の方法および材料を用いることができるが、以下では好適な方法および材料を記載する。本明細書に記載した刊行物、特許出願、特許その他の文献は全て、許容される場合その全体が参照として本明細書に援用される。係争の場合には、定義を含めて、本明細書が制限するであろう。なお、これらの材料、方法および実施例は、単に例示的なものであり、それに限定することを意図するものではない。

##### 【0017】

「有効量」又は「治療的有効量」という用語は、宿主の免疫応答を刺激又は増強するか、そうでない場合は所望の薬理学的及び/又は生理学的效果をもたらすのに十分な投与量を意味する。正確な投与量は、対象に依存する変数(例えば、年齢、免疫系の健全性など)、疾患及び実施される処置などの種々の要因によって異なることになる。

##### 【0018】

sH4ポリペプチドの「断片」とは完全長のsH4ポリペプチドよりも短いsH4ポリペプチドの断片である。一般に、断片は長さがアミノ酸5個以上である。抗原断片は抗体によって認識され、結合される能力を有する。

##### 【0019】

「個体」、「宿主」、「対象」及び「患者」という用語は、本明細書では互換可能に用いており、マウス、サル、ヒト、家畜用哺乳動物、スポーツ用哺乳動物及びペット用哺乳動物を含む哺乳動物を意味するが、それに限定するものではない。

本明細書に用いている「動作可能なように連結された」とは、発現制御配列が所望のコーディング配列の発現を効果的に制御するように遺伝子構築物に組み込まれることを意味する。

##### 【0020】

「ポリペプチド」及び「蛋白」という用語は互換可能に用いており、長さ又は翻訳後修飾の有無とは関係なく、アミノ酸の任意のペプチド結合鎖のことを意味する。実施態様としては、保存的置換を有するsH4ポリペプチドが挙げられる。保存的置換としては、通常、以下のグループ内での置換が挙げられる：グリシン及びアラニン；バリン、イソロイシン及びロイシン；アスパラギン酸及びグルタミン酸；アスパラギン、グルタミン、セリン及びスレオニン；リジン、ヒスチジン及びアルギニン；並びにフェニルアラニン及びチロシン。

##### 【0021】

「sH4」又は「sH4ポリペプチド」という用語は、B7-H4の細胞外ドメインの

10

20

30

40

50

生物活性断片を含むB7-H4の可溶性断片を意味する。可溶性断片は、一般に細胞内及び/又は膜貫通ドメインの一部又は全部を欠落している。

#### 【0022】

本明細書に用いている「処置する」という用語は、処置対象の疾患に伴う1種以上の症状を軽減、予防又は除去することを含む。

#### 【0023】

「B7-H4」アンタゴニストという用語は、B7-H4の生物活性を妨げもしくは阻害し、B7-H4の発現もしくはバイオアベイラビリティを低下させ、もしくは阻害し、又はB7-H4とその天然のリガンド/受容体との相互作用を阻害する化合物を意味する。

10

#### 【0024】

##### I I . 組成物

1種以上のB7-H4アンタゴニストを含む組成物を提供する。好適なB7-H4アンタゴニストとしては、sH4、B7-H4に対する抗体とその抗原結合断片、B7-H4受容体に対する抗体とその抗原結合断片、B7-H4の発現を下方制御する阻害核酸、及びB7-H4受容体の発現を下方制御する阻害核酸が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0025】

##### A . 可溶性H4 (sH4)

可溶性H4(sH4)は免疫応答を促進することが見出されている。sH4がインビボでB7-H4受容体と結合することによりB7-H4とB7-H4受容体との相互作用が低下又は阻害されると考えられる。可溶性H4はB7-H4に由来するものである。B7-H4は、細胞内ドメイン、1回膜貫通ドメイン及び細胞外ドメインを有する、膜貫通蛋白として細胞で発現される。本明細書ではsH4を含む組成物を提供する。

20

#### 【0026】

一実施態様において、B7-H4受容体へのB7-H4の結合を、対照に比し、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%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上低下させるsH4ポリペプチドを提供する。別の実施態様では、B7-H4受容体をその表面に発現する細胞においてB7-H4受容体活性を活性化しないか、または検出可能な量のB7-H4活性を生じるsH4組成物を提供する。一部の実施態様において、sH4組成物はB7-H4受容体をその表面に発現する細胞においてB7-H4受容体の1種以上の活性を低下させ、又は阻害することができる。さらに別の実施態様において、この細胞はリンパ球、T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、Th1細胞、B細胞、形質細胞、マクロファージ、好中球又はNK細胞である。

30

#### 【0027】

sH4ポリペプチドとしては、B7-H4の細胞外ドメイン全体又はその断片を挙げることができる。他の実施態様では、sH4ポリペプチドとしてB7-H4の細胞外ドメインの断片が挙げられる。sH4ポリペプチドは任意の元の種に由来することができる。好ましい実施態様では、そのsH4ポリペプチドはヒト起源のものである。

40

#### 【0028】

本明細書に開示したsH4ポリペプチドには改変体ポリペプチドが含まれる。本明細書に用いている「改変体」ポリペプチドは、対応する野生型ポリペプチドのアミノ酸配列と比較して少なくとも1つのアミノ酸配列改変を含有する。アミノ酸配列改変は、例えば、1個以上のアミノ酸の置換、欠失、又は挿入であり得る。

#### 【0029】

改変体sH4ポリペプチドは任意の組み合せのアミノ酸置換、欠失又は挿入を有することができる。一実施態様において、単離されたsH4改変体ポリペプチドには、そのアミノ酸配列が対応する野生型アミノ酸配列のアミノ酸配列と少なくとも60、70、80、85、90、95、97、98、99、99.5又は100%の同一性を共有するような

50

整数個のアミノ酸の改変がある。好ましい実施態様では、SH4改変体ポリペプチドは対応する野生型ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも60、70、80、85、90、95、97、98、99、99.5又は100%の同一性を共有するアミノ酸配列を有する。

#### 【0030】

配列同一性百分率はコンピュータプログラム又は直接配列比較法を用いて算出することができる。2つの配列間の同一性を測定するための好ましいコンピュータプログラムによる方法としては、GCGプログラムパッケージ、FASTA、BLASTP及びTBLASTN(例えば、D.W. Mount、2001年、Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. 参照)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。BLASTP及びTBLASTNプログラムはNCBI及び他の供給源から公入手可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性測定に用いることができる。

#### 【0031】

アミノ酸配列比較のための例示的なパラメータとしては、以下のものが挙げられる：1)Needleman及びWunschのアルゴリズム(J Mol. Biol.、48:p.443-453(1970年))；2)Hentikoff及びHentikoffのBLOSSUM62比較マトリックス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、89:p.10915-10919(1992年))；3)ギャップペナルティ=12；及び4)ギャップ長ペナルティ=4。これらのパラメータを用いる有用なプログラムが「ギャップ」プログラムとして公入手可能である(Genetics Computer Group、Madison、Wis.)。上記のパラメータ類は、(末端ギャップに対するペナルティのない)ポリペプチド比較のためのデフォルトパラメータ類である。

#### 【0032】

或いは、ポリペプチド配列の同一性は、式：同一性% = (同一残基数)/(アミノ酸残基のアラインメント長) \* 100を用いて算出することができる。この計算において、アラインメント長には内部ギャップを含めるが、末端ギャップは含めない。

#### 【0033】

SH4改変体ポリペプチドにおけるアミノ酸置換は「保存的」でも「非保存的」でもよい。本明細書に用いている「保存的」アミノ酸置換とは、置換アミノ酸が同様な構造的又は化学的性質を有する置換であり、「非保存的」アミノ酸置換とは置換アミノ酸の電荷、疎水性又は嵩が著しく変化する置換である。非保存的置換は、(a)置換領域のペプチド主鎖の、例えばシートもしくはヘリカル構造としての構造、(b)標的部位におけるその分子の電荷もしくは疎水性、又は(c)その側鎖の嵩、の維持に及ぼす影響がさらにいちじるしく異なる。

#### 【0034】

保存的アミノ酸置換の例としては、置換が以下の5グループのうちの1つ内で行われる置換が挙げられる：1)小型で脂肪族の非極性又は軽度極性残基(Ala、Ser、Thr、Pro、Gly)；2)極性の負荷電残基及びそれらのアミド(Asp、Asn、Glu、Gln)；極性の正荷電残基(His、Arg、Lys)；大型で脂肪族の非極性残基(Met、Leu、Ile、Val、Cys)；及び大型の芳香族残基(Phe、Tyr、Trp)。非保存的アミノ酸置換の例には、1)親水性残基、例えばセリルもしくはスレオニルが疎水性残基、例えばロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルもしくはアラニルと置換する、もしくはこれによって置換される置換；2)システインもしくはプロリンが任意の他の残基と置換する、もしくはこれによって置換される置換；3)電気的陽性側鎖を有する残基、例えばリジル、アルギニルもしくはヒスチジルが電気的陰性残基、例えばグルタミルもしくはアスパルチルと置換する、もしくはこれによって置

10

20

30

40

50

換される置換；又は4) 嵩高い側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンが側鎖を有しない残基、例えばグリシンと置換する、もしくはこれによって置換される置換がある。

#### 【0035】

sH4ポリペプチドは、正常な細胞環境でポリペプチド中に存在し得る化学的機能基によって改変することができる：例えば、リン酸化、メチル化、アミド化、硫酸化、アシル化、グリコシリ化、SUMO化及びユビキチン化。sH4改変体ポリペプチドも検出可能なシグナルを直接又は間接にもたらすことができる標識で改変することができ、この標識としては、放射性同位体及び蛍光化合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0036】

また、sH4ポリペプチドは細胞環境においてポリペプチドに正常には付加されない化学的機能基によって改変することもできる。このような改変は、特定の側鎖又は末端残基と反応することができる有機誘導体化剤とポリペプチドの標的アミノ酸残基とを反応させることによって分子中に導入することができる。別の改変はその蛋白の環化である。

#### 【0037】

そのポリペプチドの化学的誘導体の例としては、リジニル(lysine)及びアミノ末端残基を無水コハク酸又は他の無水カルボン酸で誘導体化したポリペプチドが挙げられる。無水環状カルボン酸(cyclic carboxylic anhydride)による誘導体化には、リジニル残基の電荷を反転させる効果がある。アミノ含有残基を誘導体化するための他の好適な試薬としては、メチルピコリニミデート(methylpicolinimidate)などのイミドエステル類、ピリドキサールリン酸、ピリドキサール、クロロボロハイドライド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソウレア、2,4-ペンタンジオン、およびグリオキシレートによるトランスアミナーゼ触媒反応が挙げられる。カルボキシル側鎖基アスパルチル又はグルタミルは、1-シクロヘキシリ-3-(2-モルホリニル-(4-エチル)カルボジイミド、1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドなどのカルボジイミド類(R-N=C=N-R')との反応によって選択的に修飾することができる。さらに、アスパルチル及びグルタミル残基はアンモニアと反応させることによりアスパルチル及びグルタミル残基に変換することができる。また、ポリペプチドとしては、1種以上のL-アミノ酸を置換する1種以上のD-アミノ酸も含み得る。

#### 【0038】

sH4ポリペプチドは他のポリペプチドと結合させることにより融合蛋白を形成させることができる。sH4ポリペプチドとして、(i) 第2のポリペプチドに直接融合した、又は(ii) 任意選択的に、第2のポリペプチドに融合するリンカーペプチド配列に融合した、sH4ポリペプチドの全部又は一部を含む、第一の融合パートナーを有するsH4ポリペプチドを提供する。この融合パートナーが存在することによってsH4ポリペプチドの溶解度、親和性及び/又は結合価を変化させることができる。本明細書に用いている「結合価(valency)」とは、分子当たり利用可能な結合部位の数を意味する。本明細書に記載したsH4融合蛋白は、上記のようなアミノ酸の改変(即ち、置換、欠失又は挿入)、断片及び/又は修飾の任意の組合せを含む。

#### 【0039】

その第2のポリペプチド結合パートナーは上記sH4ポリペプチドに対してN末端又はC末端側とすることができます。好ましい実施態様では、この第2のポリペプチドは上記sH4ポリペプチドに対してC末端側にある。

#### 【0040】

融合蛋白結合パートナーとして日常的に用いられる多数のポリペプチド配列が当該分野で周知である。有用なポリペプチド結合パートナーの例としては、緑色蛍光蛋白(GFP)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、ポリヒスチジン、myc、ヘマグルチニン、Flag<sup>TM</sup>タグ(Kodak, New Haven, CT)、マルトースE結合蛋白、プロテインA、並びに、好ましくはヒト免疫グロブリンC鎖のヒンジ、CH

10

20

30

40

50

<sub>2</sub> 及び C<sub>H</sub><sub>3</sub> 領域に相当するアミノ酸配列を有する Ig 重鎖定常領域の 1 種以上のドメインが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0041】

B. B7-H4 及び B7-H4 受容体に対する抗体

B7-H4 又は B7-H4 受容体に対する抗体は B7-H4 アンタゴニストとして用いることができる。B7-H4 又は B7-H4 受容体に特異的に結合する抗体又は抗体断片は T 細胞上の受容体への B7-H4 の結合を低下させ、又は阻害するのに用いることができる。抗体を作製する方法は周知であり、当業者の能力の範囲内にあるが、以下にさらに詳細に記載する。

#### 【0042】

本明細書に開示した抗体は B7-H4 又は B7-H4 受容体に特異的に結合し、B7-H4 の結合を低下又は阻害することができる。こうした抗体は「遮断」、「機能阻害」又は「アンタゴニスト」抗体と定義される。好ましい実施態様では、上記アンタゴニスト抗体は B7-H4 の細胞外ドメインの一部に特異的に結合する。

#### 【0043】

上記抗体を作製するために用いる免疫原は、B7-H4 又は B7-H4 受容体の任意の免疫原性部分とすることができます。好ましい免疫原としては、ヒト B7-H4 の細胞外ドメインの全部又は一部が挙げられ、この場合、それらの残基は天然の B7-H4 又は B7-H4 受容体に見られるグリコシル化などの翻訳後修飾を含有する。上記細胞外ドメイン又はその免疫原性断片を含む免疫原は、当該分野で公知の各種方法、例えば、従来の組換え法を用いたクローニング遺伝子の発現、元の細胞、高レベルの B7-H4 又は B7-H4 受容体を発現する細胞集団からの単離によって作製する。

#### 【0044】

本明細書に開示した抗体は、GENBANK・受託番号 AAP37283 のヒト B7-H4 と少なくとも約 70%、より好ましくは 75%、80%、85%、90%、95% の同一性を有する B7-H4 又は B7-H4 受容体ポリペプチドに結合することができる。

#### 【0045】

その抗体はポリクロナール抗体であってもモノクロナール抗体であってもよい。こうした抗体は、異種抗体、同種異系抗体、同系抗体又はヒト化もしくはキメラ抗体などのこれらの変形体であってよい。その抗体は抗イディオタイプ抗体とすることもできる。本明細書に用いている抗体としては、Fab 及び F(ab)<sub>2</sub> 断片を含む抗体断片並びに正常の多量体構造ではなく一本鎖抗体又は scFv として作製される抗体も含まれる。その抗体は IgG1、IgG2、IgG3 もしくは IgG4 のような IgG 又は IgM、IgA、IgE もしくは IgD アイソタイプであってよい。抗体重鎖の定常ドメインは所望のエフェクター機能に応じて選択することができる。軽鎖定常ドメインはカッパ又はラムダ定常ドメインであってよい。

#### 【0046】

C. B7-H4 又は B7-H4 受容体に特異的な阻害核酸

別の実施態様において、B7-H4 又は B7-H4 受容体の発現は 1 種以上の阻害核酸を供給することによって下方制御され、このような核酸としては、B7-H4 又は B7-H4 受容体をコードする核酸に特異的なリボザイム、三重鎖形成 (triplex-forming) 性オリゴヌクレオチド (TFO)、アンチセンスDNA、siRNA 及びミクロRNA が挙げられるが、これらに限定されるものではない。B7-H4 又は B7-H4 受容体アンタゴニストは、上記のような他の免疫調節剤と組み合わせて供給することができる。

#### 【0047】

「siRNA」という用語は、毒性のない長さの短い二本鎖 RNA である低分子干渉 RNA を意味する。一般に、siRNA の長さは、これが毒性を示さない限り特に限定されない。「siRNA」は、例えば、15 乃至 49 bp、好ましくは 15 乃至 35 bp、より好ましくは 21 乃至 30 bp 長とすることができます。或いは、発現対象の siRNA の

10

20

30

40

50

最終転写産物の二本鎖RNA部分は、例えば、15乃至49bp、好ましくは15乃至35bp、より好ましくは21乃至30bp長とすることができる。2本のRNA鎖が対になるsiRNAの二本鎖RNA部分は完全に対をなすものに限定されず、ミスマッチ（対応するヌクレオチドが相補性でない）、バルジ（一方の鎖に対応する相補性ヌクレオチドに欠落がある）などによる対にならない部分を含有していてもよい。対にならない部分は、siRNAの形成を妨げない程度であれば含有してもよい。本明細書に用いている「バルジ」は、好ましくは対にならないヌクレオチドを1乃至2個含み、2本のRNA鎖が対となるsiRNAの二本鎖RNA領域は、バルジを好ましくは1乃至7箇所、より好ましくは1乃至5箇所含有する。さらに、本明細書に用いている「ミスマッチ」は、2本のRNA鎖が対となるsiRNAの二本鎖RNA領域中に好ましくは1乃至7箇所、より好ましくは1乃至5箇所含有される。好ましいミスマッチとしては、そのヌクレオチド対のうちの一方がグアニンであり、他方がウラシルである。このようなミスマッチは、センスRNAをコードするDNAにおけるCからTもしくはGからAへの改変又はこれらの組合せによるものであるが、特にこれらに限定されるものではない。さらに、特定の実施態様では、2本のRNA鎖が対となるsiRNAの二本鎖RNA領域にはバルジ及びミスマッチの両方を合計で、好ましくは1乃至7箇所、より好ましくは1乃至5箇所含有する。

#### 【0048】

siRNAの末端構造は、siRNAがそのRNAi効果によって標的とする遺伝子発現をサイレンシングし、低下させ、又は阻害し得る限り、平滑末端でも付着（オーバーハング）末端でもよい。この付着（オーバーハング）末端構造は3'側のオーバーハングのみに限定されるものではなく、RNAi効果を誘導することができる限り、5'側のオーバーハング構造を含めることができる。さらに、オーバーハングヌクレオチド数は、既に報告されている2又は3に限定されず、そのオーバーハングがRNAi効果を誘導することができる限り、任意の数とすることができます。例えば、このオーバーハングは1乃至8個、好ましくは2乃至4個のヌクレオチドからなる。本明細書では、付着末端構造を有するsiRNAの全長は、対を形成する二本鎖部分の長さと両端のオーバーハング一本鎖を含む対の長さの和として表している。例えば、両端に4個のオーバーハングヌクレオチドを有する19bpの二本鎖RNA部分の場合、全長は23bpとして表される。さらに、このオーバーハング配列は、標的遺伝子に対する特異性が低いので、標的遺伝子配列と必ずしも相補的（アンチセンス）又は同一（センス）ではない。さらに、siRNAが標的遺伝子に対する遺伝子サイレンシング作用を維持することができる限り、siRNAには、例えばその一端のオーバーハング部分に、低分子量RNA(tRNA、rRNAもしくはウイルスRNAのような天然RNA分子であっても人工RNA分子であってもよい）を含有してよい。

#### 【0049】

さらに、siRNAの末端構造は、両端が必ずしも上記のようにカットオフ構造ではなく、二本鎖RNAの片側の両端がリンカーRNAによって結合されているステム・ループ構造を有していてもよい。この二本鎖RNA領域（ステム・ループ部分）の長さは、例えば、15乃至49bp、好ましくは15乃至35bp、より好ましくは21乃至30bp長とすることができる。或いは、発現対象のsiRNAの最終転写産物である二本鎖RNA領域の長さは、例えば、15乃至49bp、好ましくは15乃至35bp、より好ましくは21乃至30bp長である。さらに、そのリンカーの長さは、これがステム部分の対形成を妨げないような長さを有する限り、特に限定されない。例えば、ステム部分の対形成を安定させ、この部分をコードするDNA間の組換えを抑制するために、そのリンカー部分はクローバー葉tRNA構造を有することができる。そのリンカーがステム部分の対形成を妨げる長さを有していても、例えば、前駆体RNAから成熟RNAへのプロセッシングの過程でイントロンが切り取られるようにイントロンを含ませてこのリンカーを構築することによりステム部分に対形成させることが可能である。ステム・ループsiRNAの場合、ループ構造を含まないRNAのどちらか一方の端（頭部または尾部）は低分子量RNAを有し得る。上記のように、この低分子量RNAは、tRNA、rRNAもしくは

10

20

30

40

50

ウイルス RNA のような天然 RNA 分子又は人工 RNA 分子とすることができます。

【0050】

MiRNA は短ステム - ループ前駆体を Dicer 様酵素によって切斷することにより作製されるが、 siRNA は長二本鎖 RNA 分子の切斷によって作製される。 MiRNA は一本鎖であるが、 siRNA は二本鎖である。

【0051】

siRNA を作製する方法は当該分野で公知である。 B7-H4 の配列は知られているので、当業者は、公に入手可能な情報を利用して宿主の B7-H4 発現を下方制御する siRNA を容易に作成することができる。

【0052】

D. sH4 含有ワクチン 10

宿主に対してワクチン接種するために、 sH4 及び / 又はこれをコードしている核酸を単独又は任意の他の好適な処置との組合せで投与することができる。一実施態様では、 sH4 及び / 又はこれをコードしている核酸は、ワクチン組成物と共に、又はその一成分として投与することができる。ワクチン組成物の好適な成分としては抗原及び任意選択的にアジュvant が挙げられる。本明細書に記載した sH4 組成物は、ワクチン又はその成分の投与前、投与と同時、又は投与後に投与することができる。一実施態様では、その sH4 組成物はワクチンの投与と同時に投与する。 sH4 は免疫応答を増大させるので、 sH4 は、そのワクチンの特定の抗原に対する免疫応答を促進することによってワクチンの効果を増大させることができると考えられる。 20

【0053】

本明細書に記載した sH4 組成物は、病原体に接触した場合に備えて対象に抵抗性を付与する予防ワクチンとの併用で、又は癌を患う被検体の腫瘍抗原もしくはウイルスに感染している被検体のウイルス抗原などのすでに存在する抗原に対する被検体の免疫応答を惹起もしくは増強するのに用い得る処置ワクチンとの併用で投与することができる。

【0054】

予防的、処置的又は脱感作免疫応答の望まれる結果は、当該分野で周知の原則に従って疾患により異なり得る。例えば、病原体に対する免疫応答は病原体のコロニー形成及び複製を完全に阻止し得、「滅菌免疫性 (sterile immunity)」に作用して及び疾患の如何なる症状も非存在となる。しかしながら、病原体に対するワクチンを有効とみなすことができるのは、これが症状の数、重症度もしくは持続期間を減少させる場合、症状を有する集団の個体数を減少させる場合、又は病原体の伝播を抑える場合である。同様に、癌、アレルゲンもしくは病原体に対する免疫応答は疾患を完全に処置することができ、症状を軽減することができ、又は疾患に対する全体的な治療的介入における一側面とすることができる。例えば、癌に対する免疫応答の刺激は、処置に影響を及ぼすために外科的、化学療法的、放射線学的、ホルモン的及び他の免疫学的方法を併用することができる。 30

【0055】

1. 抗原

上記ワクチン組成物に用いることができる抗原は、ペプチド、蛋白、多糖、糖、脂質、核酸又はこれらの組合せとすることができます。この抗原はウイルス、細菌、寄生生物、植物、原生動物、真菌、組織、又は癌もしくは白血病細胞などの形質転換細胞から得ることができ、細胞全体又はその免疫原性成分、例えば、細胞壁成分もしくはその分子成分であり得る。 40

【0056】

好適な抗原は当該分野で公知であり、商業的、政府機関及び科学的供給源から入手可能である。一実施態様では、こうした抗原は、完全に不活化又は弱毒化した有機体である。これらの有機体はウイルス、寄生生物、細菌などの感染性有機体とすることができます。こうした有機体は腫瘍細胞でもよい。その抗原は腫瘍又はウイルスもしくは細菌供給源由來の精製又は部分精製ポリペプチドとすることができます。その抗原は、異種発現系において 50

ポリペプチド抗原をコードするDNAを発現させることにより作製する組換えポリペプチドとすることができる。その抗原は抗原性蛋白の全部又は一部をコードするDNAとすることができる。このDNAはプラスミドDNAなどのベクターDNAの形をとることができる。

#### 【0057】

抗原は单一抗原として与えることができ、又は組み合わせて与えることができる。また、抗原はポリペプチド又は核酸の複合混合物として与えることもできる。

#### 【0058】

##### i. ウィルス抗原

ウィルス抗原は、以下の任意のウイルス科のウイルスを含むがそれに限定されない任意のウイルスから単離し、又はこのウイルスからの核酸によってコードさせることができるもの：Arenaviridae、Arterivirus、Astroviridae、Baculoviridae、Barnaviridae、Birnaviridae、Bromoviridae、Bunyaviridae、Caliciviridae、Capillivirus、Carlavirus、Caulimovirus、Circoviridae、Closterovirus、Comoviridae、Coronaviridae（例えば、重症急性呼吸器症候群（SARS）ウイルスなどのCoronavirus）、Corticoviridae、Cystoviridae、Deltavirus、Dianthovirus、Enamovirus、Filoviridae（例えば、マルブルクウイルス及びエボラウイルス（例えば、ザイール、レストン、象牙海岸もしくはスーダン株））、Flaviviridae（例えば、C型肝炎ウイルス、デング熱ウイルス1型、デング熱ウイルス2型、デング熱ウイルス3型及びデング熱ウイルス4型）、Hepadnaviridae、Herpesviridae（例えば、ヒトヘルペスウイルス1、3、4、5及び6並びにサイトメガロウイルス）、Hypoviridae、Iridoviridae、Leviviridae、Lipothrixviridae、Microviridae、Orthomyxoviridae（例えば、インフルエンザウイルスA、B及びC）、Paramyxoviridae、Parvoviridae、Picornaviridae（例えば、ポリオウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルス及びアフトウイルス）、Poxviridae（例えば、ワクシニア及び痘瘡ウイルス）、Reoviridae（例えば、口タウイルス）、Retroviridae（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）1及びHIV2などのレンチウイルス）、Rhabdoviridae（例えば、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、RSウイルスなど）、Togaviridae（例えば、風疹ウイルス、デング熱ウイルスなど）並びにTotiviridae。また、好適なウイルス抗原としては、デング蛋白M、デング蛋白E、デングD1NS1、デングD1NS2及びデングD1NS3の全部又は一部も挙げられる。

#### 【0059】

ウィルス抗原は、例えば以下の特定の株から得ることができる：パピローマウイルス、ヘルペスウイルス、即ち、単純疱疹1及び2；肝炎ウイルス、例えばA型肝炎ウイルス（HAV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、デルタ肝炎Dウイルス（HDV）、E型肝炎ウイルス（HEV）及びG型肝炎ウイルス（HGV）、ダニ媒介脳炎ウイルス；パラインフルエンザ、水痘帯状疱疹、サイトメガロウイルス、エブスタイン・バー、口タウイルス、ライノウイルス、アデノウイルス、コクサッキーウィルス、ウマ脳炎、日本脳炎、黄熱病、リフトバレー熱及びリンパ球性脈絡髄膜炎。

#### 【0060】

##### ii. 細菌抗原

細菌抗原は、以下に挙げるがそれに限定されない任意の細菌から由来し得、又はこれらの細菌からの核酸によってコードさせることができる：Actinomycetes、Anaerobes，Bacillus、Bacteroides、Bdellovibrio

10

20

30

40

50

、*Bordetella*、*Borrelia*、*Campylobacter*、*Caulobacter*、*Chlamydia*、*Chlorobium*、*Chromatium*、*Clostridium*、*Corynebacterium*、*Cytophaga*、*Deinococcus*、*Escherichia*、*Francisella*、*Halobacterium*、*Helio bacter*、*Haemophilus*、*Hemophilus influenzae type B (HIB)*、*Hyphomicrobium*、*Legionella*、*Leptospiro sis*、*Listeria*、*Meningococcus A, B 及び C*、*Methanobacterium*、*Micrococcus*、*Myobacterium*、*Mycoplasma*、*Myxococcus*、*Neisseria*、*Nitrobacter*、*Oscillat oria*、*Prochloron*、*Proteus*、*Pseudomonas*、*Photospirillum*、*Rickettsia*、*Salmonella*、*Shigella*、*Spirillum*、*Spirochaeta*、*Staphylococcus*、*Streptococcus*、*Streptomyces*、*Sulfolobus*、*Thermoplasma*、*Thiobacillus*及び*Treponema*、*Vibrio*並びに*Yersinia*。  
10

#### 【0061】

##### i i i . 寄生生物抗原

寄生生物抗原は、限定されない例として挙げられる以下の寄生生物由来の抗原などの寄生生物抗原から得られ、又はこれらによりコードされる核酸によってコードさせることができる：*Cryptococcus neoformans*、*Histoplasma capsulatum*、*Candida albicans*、*Candida tropicalis*、*Nocardia asteroides*、*Rickettsia rickettsii*、*Rickettsia typhi*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Chlamydial psittaci*、*Chlamydial trachomatis*、*Plasmodium falciparum*、*Trypanosoma brucei*、*Entamoeba histolytica*、*Toxoplasma gondii*、*Trichomonas vaginalis*及び*Schistosoma mansoni*。こうした抗原としては、胞子虫抗原、スプロゾイト周囲蛋白、種虫表面蛋白、肝臓段階抗原(liver stage antigen)、頂端膜関連蛋白(apical membrane associated protein)又はメロゾイト表面蛋白の全部又は一部のようなマラリア原生動物抗原が挙げられる。  
20  
30

#### 【0062】

##### i v . アレルゲン及び環境抗原

限定されない例として挙げられる花粉アレルゲン(樹木、ハーブ、雑草及び草花粉アレルゲン)、昆虫アレルゲン(吸入抗原、唾液抗原及びハチ毒抗原)、動物の毛及びふけアレルゲン並びに食物アレルゲンなどの天然アレルゲン由来抗原などの抗原は、アレルゲン又は環境抗原とすることができます。樹木、草及びハーブからの重要な花粉アレルゲンは、とりわけ樺の木(*Betula*)、ハンの木(*Alnus*)、ハシバミ(*Corylus*)、クマシデ(*Carpinus*)及びオリーブ(*Olea*)、ヒマラヤスギ(*Cryptomeria and Juniperus*)、スズカケノキ(*Platanus*)を含む*Fagales*、*Oleales*、*Pinales*及び*platanaceae*の分類上の目、とりわけ*Lolium*、*Phleum*、*Poa*、*Cynodon*、*Dactylis*、*Holcus*、*Phalaris*、*Secale*及び*Sorghum*属の草を含むイネ目、とりわけ*Ambrosia*、*Artemisia*及び*Parietaria*属のハーブを含む*Asterales*及び*Urticales*目から得られる。用いることができる他のアレルゲン抗原としては、*Dermatophagoides*及び*Euroglyphus*属の室内塵ダニ、貯蔵庫ダニ、例えば*Lepidoglyphus*、*Glycyphagus*及び*Tyrophagus*からのアレルゲン、ゴキブリ、ヌカカ及びノミ、例えば*Blattella*、*Periplaneta*、*Chironomus*及び*Ct*  
40  
50

*enocephhalides*からのアレルゲン、ネコ、イヌ、ウマなどの哺乳類、鳥類からのアレルゲン、ミツバチ（上科`Apidae`）、スズメバチ（上科`Vespidae`）及びアリ（上科`Formicoidae`）を含む`Hymenoptera`の分類上の目からのものなどの刺咬昆虫に由来するようなものを含む毒物アレルゲンが挙げられる。用いることができるさらに別のアレルゲン抗原としては`Alternaria`及び`Claadosporium`属からなどの真菌からの吸入アレルゲンが挙げられる。

### 【0063】

#### v. 腫瘍抗原

好みしい実施態様において、以下のものが挙げられるがそれに限定されない腫瘍関連又は腫瘍特異的抗原を含む抗原は、腫瘍抗原とすることができます：アルファ-アクチニン-4、`Bcr-Abl`融合蛋白、`Casp-8`、ベータ-カテニン、`cdc27`、`cdk4`、`cdkn2a`、`coa-1`、`dek-can`融合蛋白、`EF2`、`ETV6-AML1`融合蛋白、`LDLR`-フコシルトランスフェラーゼAS融合蛋白、`HLA-A2`、`HLA-A11`、`hsp70-2`、`KIAAO205`、`Mart2`、`Mum-1`、2及び3、`neo-PAP`、クラスIミオシン、`OS-9`、`pml-RAR`融合蛋白、`PTPRK`、`K-ras`、`N-ras`、トリオースホスフェートイソメラーゼ、`Bage-1`、`Gage-3`、`4`、`5`、`6`、`7`、`GnTV`、`Herv-K-mel`、`Lage-1`、`Mage-A1`、`2`、`3`、`4`、`6`、`10`、`12`、`Mage-C2`、`NA-88`、`NY-Eso-1/Lage-2`、`SP17`、`SSX-2`及び`TRP2-Int2`、`MelanA`(`MART-I`)、`gp100`(`Pmel17`)、チロシナーゼ、`TRP-1`、`TRP-2`、`MAGE-1`、`MAGE-3`、`BAGE`、`GAGE-1`、`GAGE-2`、`p15(58)`、`CEA`、`RAGE`、`NY-Eso(LAGE)`、`SCP-1`、`Hom/Mel-40`、`PRA`ME、`p53`、`H-Ras`、`HER-2/neu`、`BCR-ABL`、`E2A-PRL`、`H4-RET`、`IGH-IGK`、`MYL-RAR`、エブスタイン バーウイルス抗原、`EBNA`、ヒト・パピローマウイルス(`HPV`)抗原E6及びE7、`TSP-180`、`MAGE-4`、`MAGE-5`、`MAGE-6`、`p185erbB2`、`p180erbB-3`、`c-met`、`nm-23H1`、`PSA`、`TAG-72-4`、`CA19-9`、`CA72-4`、`CAM-17.1`、`Numa`、`K-ras`、-カテニン、`CDK4`、`Mum-1`、`p16`、`TAGE`、`PSMA`、`PSCA`、`CT7`、テロメラーゼ、`43-9F`、`5T4`、`791Tgp72`、-フェトプロテイン、`13HCG`、`BCA225`、`BTAA`、`CA125`、`CA15-3`(`CA27.29/BCAA`)、`CA195`、`CA242`、`CA-50`、`CAM43`、`CD68/KP1`、`CO-029`、`FGF-5`、`G250`、`Ga733(EpCAM)`、`HTgp-175`、`M344`、`MA-50`、`MG7-Ag`、`MOV18`、`NB/70K`、`NY-CO-1`、`RCAS1`、`SDCCAG16`、`TA-90`(`Mac-2`結合蛋白/シクロフィリンC関連蛋白)、`TAAL6`、`TAG72`、`TLR`並びに`TPS`。

### 【0064】

#### 2. アジュvant

上記ワクチンには、任意選択的に1種以上のアジュvantを含ませることができます。こうしたアジュvantは、ワクチン組成物に添合、又はこの組成物と共に投与、又はこの組成物とは別々に投与することができる。そのアジュvantは、限定されない例として挙げられる以下のもののうちの1種以上とすることができます：油乳剤(例えば、フロイントアジュvant)；サポニン調合物；ビロソーム(`virosome`)及びウイルス様粒子；細菌及び微生物誘導体；免疫刺激性オリゴヌクレオチド；`ADP`-リボシリ化毒素及び無毒化誘導体；ミョウバン；`BCG`；無機物含有組成物(例えば、アルミニウム塩、カルシウム塩などの無機塩類、水酸化物、リン酸塩、硫酸塩など)；生体付着剤及び/又は粘膜付着剤；微小粒子；リポソーム；ポリオキシエチレンエーテル及びポリオキシエチレンエステル調合物；ポリフォスファゼン(`polyphosphazene`)、ムラミルペプチド；イミダゾキノロン化合物；並びに界面活性物質(例えば、リゾレシチン、フルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン

10

20

30

40

50

及びジニトロフェノール)。

【0065】

また、アジュバントとして、サイトカイン、インターロイキン(例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12など)、インターフェロン(例えば、インターフェロン-ガンマ)、マクロファージコロニー刺激因子、および腫瘍死因子などの免疫調節因子；及びB7ファミリーの分子などの共刺激分子も挙げることができる。蛋白性アジュバントは、完全長ポリペプチドもしくはその活性断片として、又はプラスミドDNAなどのDNAの形で供給することができる。

【0066】

I II I . 免疫応答を刺激する方法

宿主、好ましくはヒト宿主において、宿主のB7-H4の生物活性を阻害することによって免疫応答を刺激又は増強することができる。sH4はB7-H4リガンドに対してB7-H4と競合する。従って、治療的有効量のsH4又はその改変体を宿主に投与することにより免疫応答を増強又は促進することができる。

10

【0067】

別の実施態様では、B7-H4アンタゴニストを宿主のB7-H4の量又はバイオアベイラビリティを減少させるのに有効な量で宿主に投与する。B7-H4の代表的なアンタゴニストとしては、B7-H4又はB7-H4受容体に特異的な抗体及びB7-H4又はB7-H4受容体をコードする核酸に特異的な阻害核酸が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0068】

A . 感染症の処置方法

一実施態様では、宿主において、宿主のB7-H4活性を阻害するのに有効な量のsH4を投与することにより免疫応答を刺激又は増強する。B7-H4の他のアンタゴニストを単独又はsH4との組合せで用いることもできることはいうまでもない。B7-H4をsH4で阻害すると、宿主の免疫応答が促進又は増強されると考えられる。通常、B7-H4活性の阻害については従来の方法を用いて適切な対照又は所定量の活性と比較する。例えば、sH4の投与前に宿主におけるB7-H4の閾値活性を測定することができる。sH4投与後のB7-H4活性がB7-H4閾値活性よりも低いことにより、B7-H4活性の阻害及び免疫応答の刺激又は増強が明らかとなる。

30

【0069】

宿主の免疫応答を刺激することは、例えば、その宿主がウイルス感染症、細菌感染症、真菌、原生動物感染症又は癌などの過剰増殖性症候に罹患している場合に望ましい。従つて、一実施態様として、宿主のB7-H4活性を阻害するのに有効な量のsH4を投与することにより感染症を処置する方法を提供する。

【0070】

処置することができる代表的な感染症としては、以下に挙げるがそれに限定するものではない微生物を含む微生物によって引き起こされた感染症が挙げられるが、これらに限定されるものではない：Actinomycetes、Anabaena、Bacillus、Bacteroides、Bdellovibrio、Bordetella、Borrelia、Campylobacter、Caulobacter、Chlamydia、Chlorobium、Chromatium、Clostridium、Corynebacterium、Cytophaga、Deinococcus、Escherichia、Francisella、Halobacterium、Helio bacter、Haemophilus、Hemophilus influenza type B (HIB)、Hyphomicrobium、Legionella、Leptospirosis、Listeria、Meningococcus A、B及びC、Methanobacterium、Micrococcus、Myobacterium、Mycoplasma、Myxococcus、Neisseria、Nitrobacter、Oscillatoriopsis、Prochloron、Proteus、Pse

40

50

u domonas、Phodospirillum、Rickettsia、Salmonella、Shigella、Spirillum、Spirochaeta、Staphylococcus、Streptococcus、Streptomyces、Sulfolobus、Thermoplasma、Thiobacillus 及び Treponema、Vibrio、Yersinia、Cryptococcus neoformans、Histoplasma capsulatum、Candida albicans、Candida tropicalis、Nocardia asteroides、Rickettsia rickettsii、Rickettsia typhi、Mycoplasma pneumoniae、Chlamydial psittaci、Chlamydial trachomatis、Plasmodium falciparum、Trypanosoma brucei、Entamoeba histolytica、Toxoplasma gondii、Trichomonas vaginalis並びにSchistosoma mansoni。

#### 【0071】

##### B. 癌の処置方法

別の実施態様として、宿主においてB7-H4活性を阻害するのに有効な量のsH4を投与することにより癌を処置するための宿主の免疫応答を刺激又は増強する方法及び組成物を提供する。B7-H4の他のアンタゴニストを単独又はsH4との組合せで用いることもできることはいうまでもない。その提供する組成物及び方法で処置することができる癌の型としては、以下の癌が挙げられるが、これらに限定されるものではない：膀胱、脳、乳腺、頸部、結腸・直腸、食道、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、脾臓、前立腺、皮膚、胃、子宮、卵巣、精巣など。投与は既に存在する腫瘍又は感染性疾患の処置に限定されるではなく、個体におけるそのような疾患の発症のリスクを阻止又は低下させるために、即ち、予防的用途のために行うこともできる。予防的ワクチン接種のための有力候補としては、癌発症のリスクが高い、即ち、特定の型の癌の既往歴又は家族歴を有する個体が挙げられる。

#### 【0072】

処置することができる悪性腫瘍を、本明細書ではその腫瘍が由来する組織の胚起源によって分類する。カルチノーマは、皮膚又は内部器官及び腺の上皮内層などの内胚葉又は外胚葉性組織から生じる腫瘍である。肉腫は、生じる頻度は少ないが、骨、脂肪、軟骨などの中胚葉結合組織由来である。白血病及びリンパ腫は骨髄の造血細胞の悪性腫瘍である。白血病は単一細胞として増殖するのに対して、リンパ腫は腫瘍塊として成長する傾向がある。悪性腫瘍は体の多くの臓器又は組織に現れて癌を確立することができる。

#### 【0073】

別の実施態様として、宿主においてB7-H4活性を阻害するのに有効な量のsH4を投与することにより宿主の感染を処置する方法を提供する。この感染はウイルス性、細菌性又は原生動物性であり得る。一つの理論にとらわれるわけではないが、B7-H4の、例えばその天然のリガンドに結合する活性に干渉すると、B7-H4によるT細胞応答の阻害が阻止され、又は低下すると考えられる。B7-H4の活性を阻害することによって、免疫応答は向上し、感染と闘う能力を高めることができる。

#### 【0074】

##### C. 遺伝子治療

sH4アンタゴニストをコードする核酸は、これを必要とする個体に対して炎症反応又は自己免疫疾患を処置するのに有効な量で投与することができる。DNAの送達では「外来」DNAを細胞内に、最終的には生きている動物体内に導入することが含まれる。遺伝子の送達はウイルスベクター又は非ウイルスベクターを用いて達成することができる。1つの方法は、培養一次細胞中に核酸を移入した後、この生体外で形質転換された細胞を個体に、全身性又は特定の器官又は組織中へ自家移植することを含む。

#### 【0075】

核酸による治療は、哺乳動物の体細胞組織又は器官中にインビボで機能的に活性なDN

10

20

30

30

40

50

Aを直接移入することにより達成することができる。DNAの移入は以下に記載するいくつかの方法を用いて実現することができる。こうした系について選択可能なマーカ（例えば、G 4 1 8 抵抗性）を用いてインビトロでの発現に成功するかどうかを試験し、そのDNAを発現する形質移入された（*transfected*）クローンを選択した後、（誘導系の場合は誘導剤で処理した後）B 7 - H 4 発現産物の存在を適切なイムノアッセイでその産物に対する抗体を用いて検出することができる。DNAの取り込み、プラスミドの組込み及び組込みプラスミドの安定性を含むこの方法の効率性は、既知の方法を用いてプラスミドDNAを線状化し、「担体」として高分子量哺乳動物DNAを用いて同時形質移入することにより改善することができる。

## 【0076】

10

レトロウイルス媒介ヒト治療では両栄養性複製欠損性レトロウイルス系が利用される（Weiss及びTaylor、Cell、82：p. 531-533（1995年））。このようなベクターは、機能性DNAをヒトの細胞又は組織に、例えば、アデノシンデアミナーゼ遺伝子をリンパ球に、NPT-II遺伝子及び腫瘍壞死因子遺伝子を腫瘍浸潤リンパ球に導入するのに用いられてきた。一般に、レトロウイルス媒介遺伝子送達では遺伝子移入（*transfer*）のために標的細胞の増殖が必要となる（Boardingtonほか、Science 270：p. 470-475（1995年））。この条件は今回のDNA分子が導入されることになる好ましい細胞の一部、即ち、活発に増殖している腫瘍細胞によって満たされる。いくつかの方法のいずれかを利用するプラスミド及びレトロウイルスベクターによる形質移入を用いた囊胞性線維症の遺伝子治療がCollinsほかの米国特許第5,240,846号に記載されている。

20

## 【0077】

B 7 - H 4 ポリペプチド又は融合蛋白をコードするDNA分子は、当該分野でよく知られているように、複製欠損性レトロウイルスをもたらすパッケージング細胞株を用いてレトロウイルスベクターに詰め込むことができる（例えば、Stone, D.ほか、J. Endocrinology 164：p. 103-118（2000年）参照）。遺伝子送達のための追加のウイルスがReynoldsほか、Molecular Medicine Today、5：p. 25-31（1999年）に記載されている。

## 【0078】

30

また、組換えアデノウイルス（Murphyほか、Proc. Natl. Acad. Sci. 94：p. 13921-13926（1997年））、神経細胞特異的に送達させ存続させるための単純ヘルペスウイルス（HSV）（Lowensteinほか、Brain Res. Molec. Brain Res.、30：p. 169-175（1995年））を含む他のウイルスベクターを用いることもできる。ヒト遺伝子処置におけるアデノウイルスベクターの利点としては、組換えがまれであり、このようなウイルスとヒトの悪性腫瘍とに関連がなく、アデノウイルスのゲノムが最大7.5kbの大きさの外来遺伝子を受け入れるように操作することができる二本鎖DNAであり、生アデノウイルスが安全なヒトワクチン有機体であるという事実が挙げられる。また、アデノ関連ウイルスもまたヒトの治療用に有用である（Samulski, R. J.ほか、EMBO J. 10：p. 3941（1991年））。

40

## 【0079】

上記の開示されたDNA分子を発現することができ、特にヒトにおける今回の治療設定に有用である別のベクターは、複製しないようにすることができるワクシニアウイルスである（Pepelniski, G. R.ほか、Surgical Oncology Clinics of North America、p. 7575-588 1998年）。組換えワクシニアウイルス及び異種DNAを含有する他のウイルス並びに免疫化及びDNA治療におけるそれらの使用に関する記載については、Moss, B.、Curr. Opin. Genet. Dev. 3：p. 86-90（1993年）；Moss, B.、Biotechnology 20：p. 345-362（1992年）；Moss, B.、Curr. Top. Microbiol. Immunol. 158：p. 25

50

- 38 (1992年) ; Moss, B.、Science 252 : p. 1662 - 1667 (1991年) ; Piccinni, Aほか、Adv. Virus Res. 34 : p. 43 - 64 (1988年) ; Moss, B.ほか、Gene Amplif Anal 3 : p. 201 - 213 (1983年) に概説されている。

## 【0080】

裸のDNAもしくはRNA又はウイルスベクターの他に、設計された細菌をベクターとして使用することができる。Salmonella、BCG及びListeria monocytogenes (LM) を含む多くの細菌株 (Hoiseth & Stocker, Nature 291 : p. 238 - 239 (1981年) ; Poirier, T. Pほか、J. Exp. Med. 168 : p. 25 - 32 (1988年) ; (Sadoff, J. C.ほか、Science 240, p. 336 - 338 (1988年) ; Stover, C. K.ほか、Nature 351, p. 456 - 460 (1991年) ; Aldovini, A.ほか、Nature 351, p. 479 - 482 (1991年) ; Schaefer, R.ほか、J. Immunol. 149, p. 53 - 59 (1992年) ; Ikonomidis, G.ほか、J. Exp. Med. 180, p. 2209 - 2218 (1994年) )。これらの微生物はワクチンベクターとして用いるための2つの有望な特性を示す：(1) 経口的にワクチンを送達させる能力をもたらす腸内感染経路；及び(2) 単球／マクロファージの感染により抗原がフェッショナルAPCの標的となる、というものである。

## 【0081】

インビオでのウイルス媒介遺伝子移入の他に、DNAを直接的に移入するために、プラスミドDNAの投与 (Wolffほか、Science, 247 : p. 1465 - 1468 (1990年) ; Hickman, M. A.ほか、Hum. Gene Ther. 5 : p. 1477 - 1483 (1994年) ) 及び微粒子銃 (particle bombardment) 媒介遺伝子移入 (O'Brien, J.ほか、Brain Res Brain Res Protoc. 10 : p. 12 - 15 (2002年) ) を含む、当該分野で周知の物理的手段を用いることができる。さらに、インビトロで遺伝子を細胞中に移入するための周知の手段である電気穿孔法を用いてDNA分子をインビオで組織に移入することができる (Titomirov, A. V.ほか、Biochim. Biophys. Acta 1088 : p. 131 ((1991年) ) )。

## 【0082】

「担体媒介遺伝子移入」についても記載がある (Wu, C. H.ほか、J. Biol. Chem. 264 : p. 16985 (1989年) ; Wu, G. Y.ほか、J. Biol. Chem. 263 : p. 14621 (1988年) ; Soriano, P.ほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : p. 7128 (1983年) ; Wang, C-Y.ほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : p. 7851 (1982年) ; Wilson, J. M.ほか、J. Biol. Chem. 267 : p. 963 (1992年) )。好ましい担体は、アシル化mAbを脂質二重層に取り込むことができる免疫リポソームなどの標的化リポソーム (Liu et al. Curr. Med. Chem. 10 : p. 1307 - 1315 (2003年) ) である。アシアログリコプロテイン／ポリリジン (Wuほか、1989年、上掲) などのポリカチオンを用いることができ、この場合、この結合体は標的組織を認識する分子（例えば、肝臓用のアシアロオロソムコイド）及びDNAに結合して形質移入されるDNA結合性化合物を含む。ポリリジンは、DNAに損傷を与えることなくそれに結合するDNA結合性分子の1例である。次に、この結合体はプラスミドDNAと複合体を形成して移入される。

## 【0083】

形質移入又は微量注入のために用いるプラスミドDNAは、当該分野で周知の方法を用いて、例えば、Quiaagen法 (Quiaagen) を用いた後、本明細書に例示した方法などの既知の方法を用いてDNAを精製することにより調製することができる。

## 【0084】

10

20

30

40

50

#### D. 組合せ治療

上記の開示した組成物は単独又は1種以上の追加の治療剤との組合せで投与することができる。例えば、その開示組成物は、成長因子受容体又は腫瘍特異抗原に特異的な抗体又はその抗原結合断片と共に投与することができる。代表的な成長因子受容体としては、上皮成長因子受容体(EGFR; HER1); c-erbB2(HER2); c-erbB3(HER3); c-erbB4(HER4); インスリン受容体; インスリン様成長因子受容体1(IGF-1R); インスリン様成長因子受容体2/マンノース-6-リン酸受容体(IGF-IIIR/M-6-P受容体); インスリン受容体関連キナーゼ(IRK); 血小板由来成長因子受容体(PDGFR); コロニー刺激因子-1受容体(CSF-1R)(c-Fms); スチール(steele)受容体(c-Kit); Flk2(Flt3); 線維芽細胞増殖因子受容体1(Flg/Cek1); 線維芽細胞増殖因子受容体2(Bek/Cek3/K-Sam); 線維芽細胞増殖因子受容体3; 線維芽細胞増殖因子受容体4; 神経成長因子受容体(NGFR)(TrkA); BDNF受容体(TrkB); NT-3受容体(TrkC); 血管内皮成長因子受容体1(Flt1); 血管内皮成長因子受容体2(Flk1/KDR); 肝細胞増殖因子受容体(HGF-R/Met); Eph; Eck; Eek; Cek4/Mek4/HEK; Cek5; Elk/Cek6; Cek7; Sek/Cek8; Cek9; Cek10; HEK11; 9Ror1; Ror2; Ret; Ax1; RYK; DDR; 及び Tieが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

20

#### 【0085】

追加の治療剤としては、化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン及び放射線治療などの通常の癌治療剤が挙げられる。化学療法剤の大部分は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤及びその他の抗腫瘍剤に分類することができる。これらの薬剤はすべて、何らかの方法で細胞分裂又はDNAの合成及び機能に影響を及ぼす。追加の治療剤としてはモノクロナール抗体、並びにある型の癌(慢性骨髓性白血病及び消化管間質腫瘍)において分子異常を直接標的にする新規チロシンキナーゼ阻害剤、例えばメシル酸イマチニブ(GLEEVEC(登録商標)又はGLENCE(登録商標))が挙げられる。

30

#### 【0086】

代表的な化学療法剤としては、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシリ、ピンクリスチン、ピンプラスチン、ビノレルビン、ピンデシン、タキソール及びその誘導体、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド、エピポドフィロトキシン、トラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標))、セツキマブ及びリツキシマブ(RITUXAN(登録商標)又はMABTHERA(登録商標))、ベバシズマブ(AVASTIN(登録商標))並びにこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

#### 【0087】

##### IV. 医薬組成物

##### C. 医薬組成物

B7-H4アンタゴニスト及びこれを含有するベクターを含む医薬組成物を提供する。こうした医薬組成物は、経口、非経口(筋肉内、腹腔内、静脈内(IV)又は皮下注射)、経皮(受動的に、又はイオン電気導入法もしくは電気穿孔法により)、経粘膜(鼻、脣、直腸又は舌下)の投与経路によって、或いは生体内分解性挿入物を用いて投与することができ、各投与経路に適した剤型に調合することができる。

50

#### 【0088】

##### A. 非経口投与用調合物

好みしい実施態様において、上記ペプチドは水溶液として非経口注射により投与する。この調合物は懸濁剤又は乳剤の形態をとることもできる。一般には、有効量のB7-H4アンタゴニスト又は誘導体生成物を含む医薬組成物が提供され、これは、任意選択的に、

50

医薬用として許容可能な希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、佐剤及び／又は担体を含む。このような組成物は、希釈滅菌水、各種緩衝剤含有量（例えば、Tri s - H C l、酢酸塩、リン酸塩）、pHおよびイオン強度の緩衝生理食塩水；並びに任意選択的に、界面活性剤、可溶化剤（例えば、T W E E N 2 0、T W E E N 8 0、ポリソルベート80）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）及び保存剤（例えば、Th i m e r s o l、ベンジルアルコール）及び增量物質（例えば、乳糖、マンニトール）を含む。非水性溶媒又はビヒクルの例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油、とうもろこし油などの植物油、ゼラチン及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルがある。これら調合物は、凍結乾燥し、使用直前に再溶解／再懸濁することができる。上記調合物は、例えば細菌保定フィルターを通して濾過すること、又は滅菌剤を上記組成物に混合すること、又は上記組成物に放射線照射すること、又は上記組成物を加熱すること、によって滅菌することができる。

10

## 【0089】

## B. 経腸的投与用調合物

B 7 - H 4 アンタゴニストは経口送達用に調合物化することができる。経口用固形剤型については、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、1990年(Mack Publishing Co. Easton Pa. 18042)の第89章に概ね記載されている。固形剤型としては、錠剤、カプセル剤、丸剤、トローチ剤もしくはロゼンジ、カシェ剤、ペレット剤、散剤又は顆粒剤、或いは原料をポリ乳酸、ポリグリコール酸などのポリマー化合物の微粒子調製物もしくはリポソームに取り込ませたものが挙げられる。このような組成物は本発明の蛋白質及び誘導体の物理的状态、安定性、インビボ放出速度及びインビボクリアランス速度に影響を与える。例えば、許容される場合に参照として本明細書に援用されるRemington's Pharmaceutical Sciences、第18版(1990年、Mack Publishing Co.、Easton, Pa. 18042) p. 1435-1712を参照されたい。こうした組成物は液状に調製することができ、又は乾燥粉末（例えば、凍結乾燥）状にすることができる。また、リポソームまたはプロテイノイド封入を行うことにより（例えば、米国特許第4,925,673号で報告されているプロテイノイドミクロスフェアとして）その組成物を調合することができる。リポソーム封入を利用することができ、そのリポソームを各種ポリマーで誘導体化することができる（例えば、米国特許第5,013,556号）。Marshall, K. : Modern Pharmaceutics、G. S. Banker及びC. T. Rhodes編、第10章、1979年をも参照されたい。概して、上記調合物は、上記ペプチド（又はその化学的改変体）並びに胃の環境中でペプチドを保護し、腸内でこの生物活性物質を遊離させる不活性成分を含む。

20

## 【0090】

上記ポリペプチドアンタゴニストは、化学的に改変してその誘導体の経口的送達が有効なものであるようにすることができる。概して、想定されている化学的改変とは、少なくとも1つの機能基を上記成分分子自体に結合させることであり、そこでは、所望の機能基が、(a)蛋白分解の阻害及び(b)胃又は腸から血流中への取り込みを可能にする。また、上記成分（単数または複数）の全体的安定性が高まり、体内における循環時間が長くなることも望まれる。PGE化は、医薬的使用に好ましい化学的改変である。用いることができる他の機能基としては、プロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリプロリン、ポリ-1,3-ジオキソラン及びポリ-1,3,6-チオキソカンが挙げられる（例えば、Abuchowski及びDavis(1981年) "Soluble Polymer-Enzyme Adducts," in Enzymes as Drugs. Hocenberg及びRoberts編(Wiley-Interscience: New York, N.Y.) pp. 367-383；並びにNewmarkほか、(1982年) J. Appl. Bi

30

40

50

o c h e m . 4 : p . 1 8 5 - 1 8 9 参照)。

【0091】

別の実施態様として、医薬用として許容可能な乳剤、液剤、懸濁剤及びシロップ剤を含む、経口投与用液状剤型を提供する。こうした剤型には不活性希釈剤；湿潤剤、乳化剤、懸濁化剤などの佐剤；及び甘味剤、矯味矯臭剤及び芳香剤を含む他の成分を含むことができる。

【0092】

徐放性経口調合物が望ましい。上記B7-H4アンタゴニストは、拡散又は浸出機構による放出を可能にする不活性マトリックス、例えばガム、に取り込ませることができる。ゆっくりと変性するマトリックスをその調合物に取り込ませることもできる。別の徐放の形態はOral治療系(Alza Corp.)に基づくものであり、即ち、浸透圧効果により単一の小開口を通って水を侵入させ、薬剤を押し出すことを可能にする半透膜にその薬剤を封入する。経口調合物の場合、放出場所は胃、小腸(十二指腸、空腸もしくは回腸)又は大腸とすることができる。この放出は、そのペプチド(もしくは誘導体)を保護するか、腸内など胃環境を超えた場所でこのペプチドを放出することによって胃環境の有害な影響を避けることが好ましい。胃における抵抗性を完全なものにするためには、少なくともpH5.0に対して不浸透性のコーティングが不可欠である。腸溶コーティングとして用いられるより一般的な不活性成分の例には、トリメリト酸酢酸セルロース(CAT)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート(HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、ポリビニルアセテートフタレート(PVAP)、Eudragit L 30D、Aquateric、酢酸フタル酸セルロース(CAP)、Eudragit L、Eudragit S及びShellacが挙げられる。これらのコーティングは混合膜として用いることができる。

10

20

30

40

【0093】

C. 局所送達用調合物

組成物は局所に適用することができる。この用量は多くのペプチド調合物では働かないが、特に肺、鼻、口(舌下、頬)、膣又は直腸粘膜に適用された場合、有効であり得る。

【0094】

B7-H4アンタゴニストは、吸引しながら肺に送達させることができ、空気動力学的直径が約5ミクロン未満のエアロゾル又は噴霧乾燥粒子として送達させる場合、肺の上皮層を超えて血流まで横断する。

【0095】

治療産物を肺に送達するために設計された様々な機械装置を用いることができ、このようなものとして、当業者にその全てがよく知られている噴霧器、計量吸入器及び粉末吸入器が挙げられるが、これらに限定されるものではない。市販の装置のいくつかの具体例としてはUltivent噴霧器(Mallinckrodt Inc.、St. Louis、Mo.)；Acorn II噴霧器(Marquest Medical Products、Englewood、Colo.)；Ventolin計量吸入器(Glaxo Inc.、Research Triangle Park、N.C.)；及びSpinhaler粉末吸入器(Fisons Corp.、Bedford、Mass.)がある。Nektar、Alkermes及びMannkindは全て吸入用インスリン粉末調製物を有しており、これらは許可されているか、この技術を本明細書に記載した調合物に適用できた臨床試験が行われている。

【0096】

粘膜への投与用調合物は通常、噴霧乾燥薬物粒子となるが、これらは錠剤、ゲル剤、カプセル剤、懸濁剤又は乳剤に取り込ませることができる。標準的な医薬用賦形剤などの製剤業者から入手可能である。経口調合物は、チューアンガム、ゲルストリップ、錠剤又はロゼンジの形をとることができる。

【0097】

経皮調合物を調製することもできる。通常、これは、軟膏剤、ローション剤、噴霧剤又

50

はパッチ剤となるが、これらは全て標準的な技術を用いて調製することができる。経皮調合物には浸透促進剤を含ませることが必要になる。

#### 【0098】

##### D. 送達制御用ポリマーマトリックス

ポリマーのデバイス（棒、円柱、フィルム、円板）又は注入物（微粒子）の埋設後、全身性に長期放出させるための放出制御用ポリマーデバイスを作製することができる。このマトリックスはミクロスフェアなどの微粒子の形をとることができ、この場合、ペプチドが固体のポリマーマトリックス又はマイクロカプセル内に分散され、コアはポリマーシェルと異なる材料のものであり、そのペプチドは本質的に液体又は固体とすることができるコアに分散又は懸濁される。本明細書において明確に定義していない限り、微粒子、ミクロスフェア及びマイクロカプセルは互換可能に用いている。或いは、上記ポリマーは、数ナノメートルから4センチメートルの範囲の薄いスラブもしくはフィルム、磨碎その他の標準的な技法で作製した粉末、又はヒドロゲルなどのゲルとしても成型することができる。

10

#### 【0099】

非生分解性及び生分解性マトリックスのいずれもB7-H4アンタゴニストの送達に用いることができるが、生分解性マトリックスが好ましい。これらは天然又は合成ポリマーとすることができますが、分解及び放出プロフィールがよりよく特徴付けられているため、合成ポリマーが好ましい。このポリマーは、所望の放出期間に基づいて選択する。ある場合には線形放出が最も有用であることがあるが、別の場合にはパルス放出又は「バルク放出」がより効果的な結果をもたらすことがある。上記ポリマーは、（通常、重量で最大約90%の水を吸収する）ヒドロゲルの形をとることができ、任意選択的に、多価イオン又はポリマーと架橋させることができる。

20

#### 【0100】

上記マトリックスは、溶媒蒸発、噴霧乾燥、溶媒抽出及び当業者に公知の他の方法によって形成させることができる。生体内分解性ミクロスフェアは、例えば、Mathiowitz及びLanger、J. Controlled Release 5, p. 13-22(1987年); Mathiowitzほか、Reactive Polymers 6: p. 275-283(1987年); 並びにMathiowitzほか、J. Appl. Polymer Sci. 35, p. 755-774(1988年)に記載されている、薬物送達用ミクロスフェアを作製するために開発された方法のいずれかを用いて調製することができる。

30

#### 【0101】

上記デバイスは、埋設もしくは注入-通常、全身の処置のための投与量よりもはるかに少ない投与量を送達する-領域を処置するための局所放出用、又は全身性送達用に調合物化することができる。これらは皮下、筋肉内、脂肪内に埋設又は注入し、又は飲み込むことができる。

#### 【0102】

##### IV. 製造方法

上記のように、ポリペプチドSH4、sH4をコードする核酸構築物又はこれらの改変体及びB7-H4及びB7-H4受容体に特異的な阻害核酸は当該分野で公知の標準的な分子生物学プロトコルを用いて製造することができる。例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook及びRussel編、第3版) Cold Spring Harbor, New York (2001年)を参照されたい。或いは、sH4又はその改変体は通常の生化学的技法を用いてこれらを発現する宿主から単離及び精製することができる。

40

#### 【0103】

##### A. ポリペプチドの製造方法

単離ポリペプチドは、例えば、化学合成又は宿主細胞における組換え産生によって得ることができる。共刺激ポリペプチドを組換え技術によって製造するために、このポリペプ

50

チドをコードするヌクレオチド配列を含有する核酸を用いて細菌又は真核生物宿主細胞（例えば、昆虫、酵母又は哺乳動物細胞）を形質転換、形質導入又は形質移入することができる。一般に、核酸構築物には共刺激ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に動作可能なように連結した調節配列を含める。通常、調節配列（本明細書では発現制御配列とも称する）は遺伝子産物をコードするのではなく、これが動作可能なように連結している核酸配列の発現に影響を与える。

#### 【0104】

ポリペプチドを発現、產生する有用な原核生物及び真核生物系については、当該分野で周知であり、例えば、B L - 2 1などの大腸菌株及びC H O 細胞などの培養哺乳動物細胞が挙げられる。

10

#### 【0105】

真核生物宿主細胞では、ポリペプチドを発現させるためにウイルスをベースとする多くの発現系を利用することができます。ウイルスをベースとした発現系については当該分野で周知であり、バキュロウイルス、S V 4 0、レトロウイルス又はワクシニアをベースとするウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

#### 【0106】

共刺激ポリペプチド改変体を安定的に発現する哺乳動物細胞株は適切なコントロールエレメント及び選択可能なマーカーを有する発現ベクターを用いて作製することができる。例えば、真核生物細胞発現ベクター p C R 3 . 1 ( I n v i t r o g e n L i f e T e c h n o l o g i e s ) 及び p 9 1 0 2 3 ( B ) ( Wong ほか、( 1 9 8 5 年 ) S c i e n c e 2 2 8 : p . 8 1 0 - 8 1 5 参照 ) は、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞、C O S - 1 細胞、ヒト胎児性腎臓 2 9 3 細胞、N I H 3 T 3 細胞、B H K 2 1 細胞、M D C K 細胞及びヒト培養血管内皮細胞 ( H U V E C : h u m a n v a s c u l a r e n d o t h e l i a l c e l l ) において共刺激ポリペプチド改変体を発現するのに適している。電気穿孔法、リポ移入法、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈法、D E A E デキストラノン法又は他の適切な形質移入法により発現ベクターを導入した後に、安定な細胞株を（例えば、G 4 1 8 、カナマイシンもしくはハイグロマイシンに対する抗生物質耐性によって）選択することができる。形質移入した細胞は目的のポリペプチドが発現されるように培養することができ、このポリペプチドは、例えば、細胞培養上清又は溶解細胞から回収することができる。或いは、ポリペプチドは、( a ) p c D N A 3 ( I n v i t r o g e n L i f e T e c h n o l o g i e s ) などの哺乳動物発現ベクター内に增幅配列を結合させ、( b ) 小麦胚芽抽出物又はウサギ網状赤血球溶血液を用いてインビトロで転写及び翻訳を行うことにより作製することができる。

20

#### 【0107】

ポリペプチドは、例えば、D E A E イオン交換、ゲル濾過、ヒドロキシリアパタイトクロマトグラフィーなどのクロマトグラフ法を用いて単離することができる。例えば、細胞培養上清又は細胞質抽出物中のポリペプチドはプロテイン G カラムを用いて単離することができる。一部の実施態様において、ポリペプチドは、アフィニティーマトリックス上へのこのポリペプチドの捕捉を可能にするアミノ酸配列を含有するよう「設計 ( e n g i n e e r e d ) 」することができる。例えば、c - m y c 、赤血球凝集素、ポリヒスチジン又はF l a g <sup>T M</sup> ( K o d a k ) のようなタグはポリペプチド精製を支援するために用いることができる。このようなタグは、カルボキシ又はアミノ末端のいずれかの位置を含む、そのポリペプチド内のどこにでも挿入することができる。有用であり得る他の融合では、アルカリ性ホスファターゼなどの、そのポリペプチドの検出に役立つ酵素を含むことができる。免疫アフィニティクロマトグラフィーもまたポリペプチドを精製するために用いることができる。

30

#### 【0108】

##### B . 単離核酸分子の製造方法

単離核酸分子は、標準的な技術によって製造することができる。このような技術としては通常の分子クローニング法及び化学的核酸合成法が挙げられるが、これらに限定される

40

50

ものではない。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）技術を用いて共刺激ポリペプチド改変体をコードする単離核酸を得ることができる。P C Rは標的核酸を酵素的に増幅する技術である。通常、目的の領域の両端またはそれを越えたところからの配列情報を用いて、増幅すべき鑄型の向かい合った鎖に対して配列が同一であるオリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。P C Rを用いることによって、全ゲノムD N A又は全細胞R N Aからの配列を含むD N A及びR N Aからの特定の配列を増幅することができる。プライマーは、通常は長さが14乃至40ヌクレオチドであるが、10ヌクレオチドから数百ヌクレオチドの範囲の長さとすることもできる。一般的なP C R技術については、例えば、「P C R Primer : A Laboratory Manual」Dieffenbach及びDveksler編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1995年に記載されている。R N Aを鑄型の供給源として用いる場合、逆転写酵素を用いることにより相補性D N A（c D N A）鎖を合成することができる。リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、自己維持的配列複製又は核酸配列ベース増幅の方法を用いることによって単離核酸を得ることもできる。例えば、Lewis（1992年）Genetic Engineering News 12:p.1; Guatelliほか（1990年）Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 87:p. 1874-1878；及びWeiss（1991年）Science 254:p. 1292-1293を参照されたい。

#### 【0109】

单離核酸は、（例えば、3'から5'方向への自動D N A合成のためのホスホラミダイト技術を用いて）单一核酸分子として、又は一連のオリゴヌクレオチドとして化学的に合成することができる。例えば、各オリゴヌクレオチド対がアニーリングしたときに二本鎖を形成するように、短鎖の相補性部分（例えば、約15ヌクレオチド）を含む各々の対を用いて、所望の配列を含む1つ以上の長鎖オリゴヌクレオチド（例えば、>100ヌクレオチド長）対を合成することができる。D N Aポリメラーゼを用いることによってこれらのオリゴヌクレオチドを延長させることができ、その結果、オリゴヌクレオチド対当たり单一の二本鎖核酸分子が得られ、次いで、これをベクターに結合させることができる。单離核酸は変異誘発によっても得ることができる。核酸は、P C Rによるオリゴヌクレオチド特異的変異誘発及び/又は部位特異的変異誘発を含む標準的な技術を用いて改変させることができる。「Short Protocols in Molecular Biology.」第8章、Green Publishing Associates and John Wiley & Sons、Ausubelほか編、1992年を参照されたい。改変することができるアミノ酸の位置の例としては、本明細書に記載したものが挙げられる。

#### 【0110】

##### C . 抗体の製造方法

基本的な抗体構造単位はサブユニットの四量体を含むことが知られている。各四量体はポリペプチド鎖の2つの同一対からなり、各対は1本の「軽」鎖（約25kDa）及び1本の「重」鎖（約50乃至70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主として抗原認識に関与するアミノ酸約100乃至110個以上の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主としてエフェクター機能に関与する定常領域を定めている。

#### 【0111】

軽鎖はカッパ又はラムダのいずれかに分類される。重鎖はガンマ、ミュー、アルファ、デルタ又はイプシロンに分類され、それぞれ抗体のアイソタイプIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEを規定する。軽及び重鎖内では、上記可変及び定常領域がアミノ酸約12個以上の「J」領域によって結合されており、重鎖はアミノ酸がさらに約10個の「D」領域をも含んでいる。（通例、Fundamental Immunology、Paul, W., ed. 第2版 Raven Press, N.Y.、1989年、第7章参照）。

#### 【0112】

10

20

30

40

50

各軽／重鎖対の可変領域は抗体結合部位を形成する。従って、完全な状態の抗体には結合部位が2箇所ある。二価又は二重特異性抗体の場合を除き、これら2箇所の結合部位は同じである。これらの鎖は全て、相補性決定領域もしくはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域により結合された比較的保存されたフレームワーク領域(FR)という同じ一般的構造を示す。各対の2本の鎖からのCDRはフレームワーク領域によって整列化され、これによって特定のエピトープへの結合が可能となる。N末端からC末端までに、軽鎖及び重鎖のいずれもドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含む。

#### 【0113】

##### 1. ポリクロナール抗体の製造

ポリクロナール抗体はウサギ、ヤギ、齧歯動物などの免疫化動物からの血清として得られ、さらに処理することなく直接使用することができ、又は硫酸アンモニウム沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、および親和性クロマトグラフィーなどの通常の富化又は精製方法にかけることができる。

#### 【0114】

##### 2. モノクロナール抗体の製造

モノクロナール抗体は、Kohler及びMilstein(Nature, 256:p. 495-97(1975年))により導入された手順及びその変法(上記文献参照)などの従来のハイブリドーマ技術を用いて製造することができる。動物、好ましくはマウスに上記のような免疫原で免疫することにより開始してこの特発された動物に所望の抗体反応を惹起させる。特発された動物のリンパ節、脾臓又は末梢血からのBリンパ球を、一般にポリエチレングリコール(PEG)などの融合促進剤の存在下に骨髄腫細胞と融合させる。いく種かのマウス骨髄腫細胞、即ち、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-k0Ag8.653、Sp2/0-Ag14又はHL1-653骨髄腫細胞(ATCC、Rockville、Md.から入手可能)のいずれもそのような用途に利用できる。その後の工程には、未融合の親骨髄腫細胞及びドナーのリンパ球細胞は最終的に死滅するが、ハイブリドーマ細胞のみが生残するように選択培地で増殖させることが含まれる。生残した細胞をクローニングし、増殖させ、その上清を所望の特異性を有する抗体の存在について、例えば免疫測定技術によりスクリーニングする。陽性のクローンは、例えば限界希釈法によりサブクローニングし、モノクロナール抗体を単離する。

#### 【0115】

こうした方法によって作製したハイブリドーマは当該分野で公知の技術(通例、Finckほか、Prog. Clin. Pathol., 9:p. 121-33(1984年)参照)を用いてインビトロ又はインビボ(腹水中)で増殖させることができる。一般には、個々の細胞株を培養で増殖させ、高濃度の單一モノクロナール抗体を含有する培養培地をデカンテーション、濾過又は遠心分離によって採集することができる。

#### 【0116】

##### a. キメラ及びヒト化モノクロナール抗体の製造

キメラ及びヒト化抗体は、キメラ又はヒト化抗体構築の出発原料となるマウス又は他の非ヒト抗体と同一又は同様の結合特異性及び親和性を有する。キメラ抗体は、異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子部分から、通常遺伝子操作によってその軽及び重鎖遺伝子が構築されている抗体である。例えば、マウスモノクロナール抗体からの遺伝子の可変(V)部分をIgG1、IgG4などのヒト定常(C)部分に結合させることができる。ヒトイソタイプIgG1が好ましい。一部の方法では、この抗体のアイソタイプはヒトイgG1である。一部の方法では、IgM抗体を用いることもできる。従って、代表的なキメラ抗体はマウス抗体からのV、即ち、抗原結合ドメイン及びヒト抗体からのC、即ち、エフェクタードメインからなるハイブリッド蛋白である。

#### 【0117】

ヒト化抗体は、実質的にヒト抗体(アクセプタ抗体と称する)からの可変領域フレームワーク残基及び実質的にマウス抗体(ドナー免疫グロブリンと称する)からの相補性決定

10

20

30

40

50

領域を有する。Queenほか、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : p. 10029 - 10033 (1989年)、国際公開第90/07861号、米国特許第5,693,762号、米国特許第5,693,761号、米国特許第5,585,089号、米国特許第5,530,101号及びWinter、米国特許第5,225,539号を参照されたい。定常領域も、存在する場合、実質的又は完全にヒト免疫グロブリン由来である。通常、ヒト可変ドメインは、フレームワーク配列が上記CDRが由来するマウス可変領域ドメインと高度の配列一致性を示すヒト抗体から選ばれる。重及び鎖可変領域フレームワーク残基は同一又は異なるヒト抗体配列由来でよい。ヒト抗体配列は、天然のヒト抗体の配列とすることができる、又はいく種かのヒト抗体のコンセンサス配列とすることができる。CDRの高次構造及び/又は抗原への結合に及ぼし得る影響に基づいて、置換のために、上記ヒト可変領域フレームワーク残基からの特定のアミノ酸を選択する。このような影響の可能性の検討は、モデリング、特定位置のアミノ酸の特性調査又は特定アミノ酸の置換もしくは変異誘発の影響の経験的観察により行う。

10

## 【0118】

例えば、マウス可変領域フレームワーク残基と選択されたヒト可変領域フレームワーク残基との間でアミノ酸が異なる場合、このアミノ酸が

- (1) 抗原と直接非共有結合し、
- (2) CDR領域に隣接し、
- (3) そうでない場合は、CDR領域と相互作用し（例えば、CDR領域の約6Å内にある）、又は

20

- (4) VL - VHインターフェースに関与する

ことが合理的に予想されるのであれば、このヒトフレームワークアミノ酸は、通常、マウス抗体からの等価のフレームワークアミノ酸によって置換すべきである。

## 【0119】

置換のための他の候補は、その位置でヒト免疫グロブリンの場合には異常であるアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。こうしたアミノ酸は、マウスドナー抗体の等価な位置又はより代表的なヒト免疫グロブリンの等価な位置からのアミノ酸で置換することができる。置換のための他の候補は、その位置でヒト免疫グロブリンにおいて異常であるアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。ヒト化免疫グロブリンの可変領域フレームワークは、通常、ヒト可変領域フレームワーク配列又はそのような配列のコンセンサスに対して少なくとも85%の配列同一性を示す。

30

## 【0120】

## b. ヒトモノクロナール抗体の製造

B7-H4又はB7-H4受容体に対するヒト抗体は、下記の各種の技術によって提供される。一部のヒト抗体は、競合的結合実験により選択するか、そうでない場合は、特定のマウス抗体と同じエピトープ特異性を有するように選択する。ヒト抗体はアイソタイプ特異性ヒトIgG1を有することが好ましい。

40

## 【0121】

ヒトモノクロナール抗体を製造する1つの方法はトリオーマ法である。この基本的方法及びこの方法に用いる例示的な細胞融合パートナーSPAZ-4についてはOestbergほか、Hybridoma 2 : p. 361 - 367 (1983年) ; Oestberg、米国特許第4,634,664号；及びEnglemanほか、米国特許第4,634,666号に記載されている）。この方法によって得られる抗体産生細胞株は、3種の細胞 - 2種のヒト及び1種のマウス細胞 - に由来するので、トリオーマと呼ばれる。最初に、マウス骨髄腫細胞株をヒトBリンパ球と融合させて、SPAZ-4細胞株などの非抗体産生異種ハイブリッド細胞を得る。次いで、この異種細胞を免疫されたヒトBリンパ球と融合させて抗体産生トリオーマ細胞株を得る。トリオーマはヒト細胞から作製される通常のハイブリドーマよりも安定的に抗体を産生することが見出されている。

## 【0122】

免疫されたそのBリンパ球はヒトドナーの血液、脾臓、リンパ節又は骨髄から得られる

50

。特定の抗原又はエピトープに対する抗体を所望する場合には、免疫化のためにその抗原又はそのエピトープを用いることが好ましい。免疫化はインビボ又はインビトロとすることができます。インビボ免疫化の場合、通常、B細胞はB7-H4又はB7-H4受容体で免疫したヒトから単離する。一部の方法では、B細胞は、最終的に抗体治療を施行されることになる同じ患者から単離する。インビトロ免疫化の場合、通常、Bリンパ球は、10%ヒト血漿を補充したRPMI-1640などの培地中、7乃至14日間抗原に曝露される。

#### 【0123】

免疫されたBリンパ球は、周知の方法によってSPAZ-4などの異種ハイブリッド細胞と融合させる。例えば、これらの細胞を約37度約5乃至10分間40乃至50%のMW1,000乃至4,000のポリエチレンギリコールで処理する。その融合混液から細胞を分離し、これを所望のハイブリッドの選択培地（例えば、HAT又はAH）中で増殖させる。このトリオーマ培養培地をB7-H4又はB7-H4受容体への結合能について測定することにより必要な結合特異性を有する抗体を分泌するクローニングを同定する。所望の特異性を有するヒト抗体を産生するトリオーマを限界希釈法によりサブクローニングし、培養培地中インビトロで増殖させる。次いで、得られたトリオーマ細胞株をB7-H4又はB7-H4受容体への結合能について試験する。

10

#### 【0124】

トリオーマは遺伝的に安定であるが、余り高レベルで抗体を産生しない。トリオーマからの抗体遺伝子を1種以上の発現ベクター中にクローニングし、このベクターを標準的な哺乳動物、細菌又は酵母細胞株中に形質転換することによって発現レベルを上昇させることができる。

20

#### 【0125】

B7-H4又はB7-H4受容体に対するヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも一部分をコードする導入遺伝子を有する非ヒトトランスジェニック哺乳動物から產生させることもできる。通常、このようなトランスジェニック哺乳動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座は機能的に不活性化される。ヒト免疫グロブリン遺伝子座の部分は重及び軽鎖成分の再配列されていない配列を含むことが好ましい。内因性免疫グロブリン遺伝子の不活性化及び外因性免疫グロブリン遺伝子の導入はいずれも標的相同組換え又はYAC染色体の導入によって達成することができる。この工程から得られるトランスジェニック動物は、免疫グロブリン成分の配列を機能的に再配列し、内因性免疫グロブリン遺伝子を発現することなく、ヒト

30

免疫グロブリン遺伝子によりコードされている各種アイソタイプの抗体レパートリを発現することができる。こうした特性を有する哺乳動物の作製及び性質については、例えば、Lonbergほか、国際公開第93/1222号、米国特許第5,877,397号、米国特許第5,874,299号、米国特許第5,814,318号、米国特許第5,789,650号、米国特許第5,770,429号、米国特許第5,661,016号、米国特許第5,633,425号、米国特許第5,625,126号、米国特許第5,569,825号、米国特許第5,545,806号、Nature 148:p.1547-1553(1994年)、Nature Biotechnology 14:p.826(1996年)、Kucherlapati、国際公開第91/10741号に詳細に記載されている。

40

#### 【0126】

トランスジェニックマウスが特に適している。抗B7-H4及び抗B7-H4受容体抗体は、完全長のB7-H4に相当するポリペプチドもしくはB7-H4受容体ポリペプチド又はこれらの免疫原性断片でトランスジェニック非ヒト哺乳動物を免疫することによって得られる。モノクロナール抗体は、例えば、そのような哺乳動物からのB細胞を通常のKohler-Milstein技術を用いて適切な骨髄腫細胞株と融合させることによって調製する。また、ヒトポリクロナール抗体は、免疫原作用物質で免疫したヒトからの血清として供給することができる。任意選択的に、このようなポリクロナール抗体は、B

50

7 - H 4 もしくは B 7 - H 4 受容体ポリペプチド又はこれらの断片を親和性試薬として用いる親和性精製によって濃縮することができる。

#### 【0127】

ヒト抗 B 7 - H 4 及び抗 B 7 - H 4 受容体抗体を得る別の方法は、H u s e ほか、S c i e n c e 2 4 6 : p . 1 2 7 5 - 1 2 8 1 ( 1 9 8 9 年 ) に概説されている一般的プロトコルに従ってヒト B 細胞からの D N A ライブライアリをスクリーニングすることである。トリオーマ法の場合に記載したように、そのような B 細胞は完全長 B 7 - H 4 もしくは B 7 - H 4 受容体ポリペプチド又はこれらの免疫原性断片で免疫したヒトから得ることができる。任意選択的に、そのような B 細胞は最終的に抗体処置を受けることになる患者から得る。B 7 - H 4 、 B 7 - H 4 受容体又はこれらの断片に結合する抗体を選択する。次いで、このような抗体(又は結合断片)をコードする配列をクローニングし、増幅させる。H u s e により記載されたプロトコルは、ファージ - ディスプレイ技術との組合せにより効率的なものにされている。例えば、D o w e r ほかの国際公開第 9 1 / 1 7 2 7 1 号、M c C a f f e r t y ほかの国際公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号、米国特許第 5 , 8 7 7 , 2 1 8 号、米国特許第 5 , 8 7 1 , 9 0 7 号、米国特許第 5 , 8 5 8 , 6 5 7 号、米国特許第 5 , 8 3 7 , 2 4 2 号、米国特許第 5 , 7 3 3 , 7 4 3 号及び米国特許第 5 , 5 6 5 , 3 3 2 号を参照されたい。これらの方法では、メンバーがその外表面に種々の抗体を表示するファージのライブライアリを作製する。通常、抗体は F v 又は F a b 断片として表示される。B 7 - H 4 もしくは B 7 - H 4 受容体ポリペプチド又はこれらの断片に対する親和性富化によって所望の特異性を有する抗体を表示するファージを選択する。

10

20

30

#### 【0128】

上記ファージ - ディスプレイ法の変法では、選択したマウス抗体の結合特異性を有するヒト抗体を作製することができる ( W i n t e r の国際公開第 9 2 / 2 0 7 9 1 号 ) 。この方法では、上記選択したマウス抗体の重又は軽鎖可変領域を出発原料として用いる。例えば、軽鎖可変領域を出発原料として選択する場合は、メンバーが同じ軽鎖可変領域(即ち、上記マウス出発原料)及び異なる重鎖可変領域を表示するファージライブライアリを構築する。こうした重鎖可変領域は再配列したヒト重鎖可変領域のライブライアリから得られる。

S y n 対する強い特異結合(例えば、少なくとも  $10^{-8}$  、好ましくは少なくとも  $10^{-9} M^{-1}$  )を示すファージを選択する。次いで、このファージからのヒト重鎖可変領域をさらなるファージライブライアリを構築するための出発原料とする。このライブライアリでは、各ファージは同じ重鎖可変領域(即ち、第 1 のディスプレイライブライアリから確認された領域)及び異なる軽鎖可変領域を表示する。こうした軽鎖可変領域は再配列したヒト軽鎖可変領域のライブライアリから得られる。この場合も、B 7 - H 4 又は B 7 - H 4 受容体に対する強い特異結合を示すファージを選択する。こうしたファージは完全にヒトの抗 B 7 - H 4 もしくは抗 B 7 - H 4 受容体抗体の可変領域を表示する。通常、これらの抗体は上記マウス出発原料と同一又は同様のエピトープ特異性を有する。

40

#### 【0129】

キメラ、ヒト化又はヒト抗体の重及び軽鎖可変領域はヒト定常領域の少なくとも一部分に連結させることができる。定常領域の選択は、抗体依存性補体及び/又は細胞媒介性毒性が所望されるかどうかにある程度依存している。例えば、アイソタイプ I g G 1 及び I g G 3 は補体活性を有するが、アイソタイプ I g G 2 及び I g G 4 は有しない。また、アイソタイプの選択は抗体の脳内への通過に影響し得る。ヒトイソタイプ I g G 1 が好ましい。軽鎖定常領域はラムダ又はカッパとすることができます。抗体は、2 本の軽鎖及び 2 本の重鎖を含有する四量体として、別々の重鎖、軽鎖として、F a b 、 F a b ' 、 F ( a b ' ) 2 及び F v として、又は重鎖および軽鎖可変ドメインがスペーサを介して連結されている単一鎖抗体として、発現させることができる。

50

#### 【0130】

##### 3. 組換え抗体の発現

キメラ、ヒト化及びヒト抗体は、通常、組換え発現によって製造する。通常、組換えポリヌクレオチド構築体は、天然で結合されているまたは異種のプロモータ領域を含む、抗

50

体鎖のコーディング配列に動作可能なように連結した発現制御配列を含む。この発現制御配列は真核生物宿主細胞を形質転換又は形質移入することができるベクター中の真核生物生物プロモータ系であることが好ましい。一旦このベクターを適切な宿主に取り込ませると、この宿主を上記スクレオチド配列の高レベル発現並びに上記交差反応抗体の収集及び精製に適した条件下に維持する。通常、こうした発現ベクターは、エピソーム又は宿主染色体DNAの構成要素の一部として宿主有機体中で複製可能である。通例、発現ベクターには所望のDNA配列で形質転換した細胞の検出が可能となるように選択マーカ、例えばアンピシリン抵抗性又はハイグロマイシン抵抗性マーカを含有させる。

#### 【0131】

E. coliは、DNA配列をクローニングするのに特に有用な原核生物宿主の1種である。酵母などの微生物も発現に有用である。Saccharomycesは、所望通り発現制御配列、複製起点、終止配列などを有する好適なベクターを含有する好ましい酵母宿主である。代表的なプロモータとしては3-ホスホグリセリン酸キナーゼ及び他の糖分解酵素が挙げられる。誘導可能な酵母プロモータとしては、特に、アルコール脱水素酵素、イソチトクロームC並びにマルトース及びガラクトース利用に関与する酵素からのプロモータが挙げられる。

#### 【0132】

哺乳動物細胞は免疫グロブリン又はその断片をコードするスクレオチド部分を発現するための好ましい宿主である(Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, NY, 1987年)。無傷の異種蛋白を分泌することができる多くの適切な宿主細胞株が当該分野で開発されており、このようなものとしてはCHO細胞株、各種COS細胞株、HeLa細胞、L細胞、ヒト胎児性腎臓細胞及び骨髄腫細胞株が挙げられる。こうした細胞は非ヒトであることが好ましい。これらの細胞のための発現ベクターには複製起点、プロモータ、エンハンサ(Queenほか、Immuno Rev. 89:p. 49(1986年))などの発現制御配列及びリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、転写終結配列などの必要なプロセッシング情報部位を含めることができる。好ましい発現制御配列はサイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルスを含む内因性遺伝子由來のプロモータである(Coほか、J. Immunol. 148:p. 1149(1992年))。

#### 【0133】

或いは、抗体をコードする配列を導入遺伝子に組み込み、トランスジェニック動物のゲノム中に導入した後、このトランスジェニック動物のミルクにおいて発現させることができる(例えば、米国特許第5,741,957号、米国特許第5,304,489号、米国特許第5,849,992号参照)。導入遺伝子には、カゼインもしくはベータラクトグロブリンなどの乳腺特異的な遺伝子からのプロモータ及びエンハンサと動作可能なよう連結した軽及び/又は重鎖のコーディング配列を含ませるのが適切である。

#### 【0134】

目的のDNA部分を含有するベクターは、宿主細胞の種類に応じて周知の方法を用い、宿主細胞中に移入させることができる。例えば、原核生物細胞では塩化カルシウムトランスフェクション法が一般に利用されるのに対し、他の細胞宿主ではリン酸カルシウム処理法、電気穿孔法、リポフェクション法、微粒子銃法又はウイルス利用トランスフェクション法を用いることができる。哺乳動物細胞を形質転換するのに用いられる他の方法としては、ポリブレン、プロトプラスト融合、リボソーム、電気穿孔及び微量注入の使用が挙げられる(通例、Sambrookほか、上掲)。トランスジェニック動物を作製する場合、導入遺伝子を受精卵母細胞中に微量注入するか、胚性幹細胞のゲノム中に取り込ませることができ、そのような細胞の核を除核卵母細胞に移入させる。

#### 【0135】

一旦発現させれば、抗体を、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、当該分野の標準的な方法に従って精製することができる(通例、Scope

10

20

30

40

50

s , Protein Purification ( Springer - Verlag , N Y , 1982年 ) 参照 ) 。

### 【 0136 】

本明細書に開示したポリペプチド免疫原は、適切な担体分子と連結させて免疫応答の惹起を助ける結合体を形成させることができる。好適な担体としては血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、オボアルブミン、破傷風トキソイドもしくはジフテリア、E . coli 、 cholera 、又はH . pyloriなどの他の病原体からのトキソイド又は弱毒化毒素誘導体が挙げられる。T細胞エピトープも好適な担体分子である。結合体によっては、作用物質を免疫促進性ポリマー分子（例えば、トリパルミトイール - S - グリセリンシスティン（Pam<sub>3</sub>Cys）、マンナン（マンノースポリマー）もしくはグルカン（ベータ1 - 2ポリマー）、サイトカイン（例えば、IL - 1、IL - 1アルファ及びベータペプチド、IL - 2、ガンマ - INF、IL - 10、GM - CSF）並びにケモカイン（例えば、MIP1アルファ及びベータ、及びRANTES））に連結させることによって形成させることができるものもある。また、免疫原作用物質は、O ' Mahony の国際公開第97 / 17613号及び国際公開第97 / 17614号に記載されているような、組織を通過する輸送を増強するペプチドに連結することもできる。免疫原は、スペーサアミノ酸（例えば、gly - gly）を有し、又は有しない担体に連結させることができる。

10

### 【 0137 】

結合体によっては、作用物質を少なくとも1つのT細胞エピトープに連結させることによって形成させることができるものもある。一部のT細胞エピトープは乱交雑（promiscuous）であるが、他のT細胞エピトープは万能（universal）である。乱交雑T細胞エピトープは種々のHLA型を表示する多種多様な被検体においてT細胞免疫の誘導を増強することができる。乱交雑T細胞エピトープとは対照的に、万能T細胞エピトープは、種々のHLA - DR対立遺伝子によりコードされる各種HLA分子を表示する大きな割合（例えば、少なくとも75%）の被検体においてT細胞免疫の誘導を増強することができる。

20

### 【 0138 】

天然のT細胞エピトープには、破傷風トキソイド（例えば、P2及びP30エピトープ）、B型肝炎表面抗原、百日咳、トキソイド、麻疹ウイルスF蛋白、Chlamydia trachomatis主要外膜蛋白、ジフテリアトキソイド、Plasmodium falciparumスロゾイト周囲蛋白T、Plasmodium falciparum CS抗原、Schistosoma mansoniトリオースリン酸イソメラーゼ、Escherichia coli TraT、およびインフルエンザウイルスヘマグルチニン（HA）など多数存在する。また、上記免疫原性ペプチドをSindingaglia F. ほか、Nature 336 : p. 778 - 780 (1988年) ; Chicz R. M. ほか、J. Exp. Med. 178 : p. 27 - 47 (1993年) ; Hammer J. ほか、Cell 74 : p. 197 - 203 (1993年) ; Falk K. ほか、Immunogenetics 39 : p. 230 - 242 (1994年) ; 国際公開第98 / 23635号；及びSouthwood S. ほか、J. Immunology 160 : p. 3363 - 3373 (1998年) に記載されているT細胞エピトープと結合体を形成させることもできる。

30

40

### 【 0139 】

或いは、上記結合体は、汎DRエピトープ（「PADRE」）のような、MHCクラスII分子の大部分と結合することができる人工T細胞エピトープの少なくとも1種に作用物質を連結させることによって形成させることができる。PADREについて米国特許第5,736,142号、国際公開第95 / 07707号及びAlexander Jほか、Immunity 1 : p. 751 - 761 (1994年) に記載されている。好ましいPADREペプチドはAKXVAAWTLKAAA（配列番号1）であり、Xは好ましくはシクロヘキシリラニン、チロシン又はフェニルアラニンであり、最も好ましくは

50

シクロヘキシリアルアラニンである。

【0140】

免疫原作用物質は、化学的架橋によって担体に連結させることができる。免疫原を担体に連結させる技術としては、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジル-チオ)プロピオネート(S P D P)及びスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(S M C C)を用いてジスルフィド結合を形成させる(ペプチドがスルフヒドリル基を欠く場合は、シンテイン残基の添加によってこれを供給することができる)ことが挙げられる。これらの試薬はそれら自身と1種のタンパク質上のペプチドシスティン残基との間にジスルフィド結合を、および、リシン上のイブシロン-アミノ若しくは他のアミノ酸中の他の遊離アミノ基によりアミド結合を創出する。多様なこうしたジスルフィド/アミド形成剤がImmunn. Rev. 62:p. 185(1982年)に記載されている。他の二官能性カップリング剤はジスルフィド結合ではなく、チオエーテルを形成する。これらのチオエーテル形成剤の多くは市販されており、6-マレイミドカブロン酸、2-プロモ酢酸および2-ヨード酢酸、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸の反応性エステルが挙げられる。カルボキシル基は、スクシンイミド若しくは1-ヒドロキシ-2-ニトロ-4-スルホン酸ナトリウム塩と組合せることにより活性化することができる。

10

【0141】

免疫原性は、T<sub>h</sub>エピトープと上記ペプチド免疫原との間にスペーサ残基(例えば、G1y-G1y)を付加することにより向上させることができる。上記B細胞エピトープ(即ち、ペプチド免疫原)から上記T<sub>h</sub>エピトープを物理的に分離することに加え、これらのグリシン残基は、上記ペプチド免疫原との上記T<sub>h</sub>エピトープの結合により創出されるいかなる人工的二次構造も阻害することにより、T及び/B細胞応答間の干渉をなくすことができる。上記のヘルパーエピトープと抗体誘導ドメインとを立体構造的に分離させることによって、提示された免疫原と該当するT<sub>h</sub>及びB細胞とのより効率的な相互作用が可能となる。

20

【0142】

多様なHLA型を表示する被検体の大きな割合において開示の作用物質に対するT細胞免疫の誘導を増強するために、種々のT<sub>h</sub>細胞エピトープとの結合体の混合物を調製することができる。この混合物には、種々のT<sub>h</sub>細胞エピトープとの少なくとも2種の結合体の混合物、種々のT<sub>h</sub>細胞エピトープとの少なくとも3種の結合体の混合物、又は種々のT<sub>h</sub>細胞エピトープとの少なくとも4種の結合体の混合物を含有させることができる。この混合物は、アジュバントと共に投与することができる。

30

【0143】

免疫原性ペプチドは、担体(即ち、異種ペプチド)との融合蛋白として発現させることもできる。この免疫原性ペプチドは、そのアミノ末端もしくはそのカルボキシ末端又はこれらの両者において担体と連結させることができる。任意選択的に、この融合蛋白中にこの免疫原性ペプチドの多重反復を存在させることができる。任意選択的に、免疫原性ペプチドを異種ペプチドの複数のコピーに、例えばこのペプチドのN及びC末端で連結させることができる。担体ペプチドによっては、この担体ペプチドに対するヘルパーT細胞応答を誘導する働きをするものもある。誘導されたヘルパーT細胞は上記担体ペプチドに連結した免疫原性ペプチドに対するB細胞応答を誘導する。

40

【0144】

本発明は、以下の限定されない実施例を参照することによってさらに理解されよう。

【実施例】

【0145】

(実施例1)

B7-H4KOマウスの作製

マウス

6乃至8週令のC57BL16(B6)マウスをJackson Laboratory

50

y から入手した。R A G - 1 K O マウスは T a c o n i c F a r m s から購入した。実験には雌雄マウスとも使用した。全てのマウスは、 J o h n s H o p k i n s A n i m a l F a c i l i t y において施設内動物管理使用委員会により承認された全てのプロトコルを用いて特定病原体感染防止条件下で飼育した。相同組換えによって遺伝子 K O マウスを作製する一般的な方法については、以前に記載された ( D o n g , H . ほか、 I mm u n i t y 2 0 : p . 3 2 7 - 3 3 6 ( 2 0 0 4 年 ) ; T a m a d a , K . ほか、 J . I mm u n o l . 、 1 6 8 : p . 4 8 3 2 - 4 8 3 5 ( 2 0 0 2 年 ) ) 。 B 7 - H 4 K O マウスを作製するために、 1 2 9 S v J 細菌人工染色体 ( B A C ) ライブリ ( I n v i t r o g e n 、 C a r l s b a d 、 C A ) からマウス B 7 - H 4 ゲノム D N A の I g V ドメイン ( エクソン 3 ) の上流の 5 . 0 9 k b D N A 断片を P C R 増幅し、 p K O スクランブルベクター-NTKV-1907 ( S t r a t a g e n e 、 L a J o l l a 、 C A ) の 5 ' アーム位中にクローニングした。同じライブリから B 7 - H 4 ゲノム D N A の I g C ドメイン ( エクソン 4 ) の下流の 5 . 5 7 k b D N A 断片を P C R 増幅し、同じベクターの 3 ' アーム位中にクローニングして B 7 - H 4 遺伝子からの I g V 及び I g C ドメインの除去をもたらす標的プラスミドを作製した ( 図 1 A ) 。 B 7 - H 4 遺伝子の 5 ' アーム及び 3 ' アーム配列、ポジティブ選択マーク N E O 及びネガティブ選択マーク T K を含有する標的断片を 1 2 9 S v I E 胚幹 ( E S ) 細胞中に形質移入した。 E S 細胞形質移入体をネオマイシン薬剤選択にかけた。標的とするクローンは、 3 ' 外部プローブを用いるサザンプロット分析によって同定した。 B 6 宿主の胚盤胞中に標的 E S 細胞を注入することによりキメラマウスを作製した。キメラマウスを B 6 マウスと交配してヘテロ接合体 B 7 - H 4 (+ I - ) マウスを得た。野生型及び B 7 - H 4 対立遺伝子欠失を識別するために P C R 分析を行った。 3 種の P C R プライマーの配列は以下の通りとした。

## 【 0 1 4 6 】

## 【 化 1 】

- (1) 5'-GTTAGATAGGGTCTCACTGGGTAGC ( 配列番号 2 ),
- (2) 5'-CCTACAGCCTTCAGTATGCCAGAGA ( 配列番号 3 ),
- (3) 5'-AGACTAGTGAGACGTGCTACTTCCA ( 配列番号 4 ).

10 世代超の間 B 6 へ戻し交配することによりホモ接合体マウスを作製した後、更なる分析に用いた。 B 7 - H 4 K O マウスと R A G - 1 K O マウスとを戻し交配することにより B 7 - H 4 K O / R A G - 1 K O マウスを得た。

## 【 0 1 4 7 】

B 7 - H 4 遺伝子の I g V 及び I g C 領域全体を欠損させてその潜在的な受容体とのこれらの相互作用を完全になくすことで 1 2 9 E S 細胞における相同組換えを行って B 7 - H 4 K O マウスを作製した。 B 7 - H 4 遺伝子の I g V 及び I g C ドメインをコードするエクソンは N e o 遺伝子カセットで置換した ( 図 1 ) 。 E S 細胞の標的組換えはサザンプロット分析によって確認し、 4 つの独立した E S クローンからのデータを図に示した。

## 【 0 1 4 8 】

B 7 - H 4 + 対立遺伝子は 1 2 . 2 5 k b S p e 1 断片を有し、 B 7 - H 4 - 対立遺伝子は 8 . 9 k b S p e 1 断片を有すると予測される。両断片を有するクローン ( 2 及び 3 ) は組換えが生じたことを示す。これらの E S クローンから標準的な手順によりキメラ雄性マウスを得た。こうしたマウスを C 5 7 B L 1 6 ( B 6 ) 雌へ戻し交配し、 2 つの独立した標的 E S クローンからヘテロ接合体改変マウスを確立した。次いで、 B 7 - H 4 改変マウスがヘテロ接合体であるかホモ接合体であるかについて、尾部生検試料から単離したゲノム D N A の P C R 分析により確認した。サザンプロット分析によってゲノム D N A が置換されていることを確認した。 R T - P C R 分析によって B 7 - H 4 欠損マウスの肝臓では B 7 - H 4 m R N A が発現されていないことが明らかとなった。 B 7 - H 4 K O

10

20

30

30

40

50

マウスは正常に成長し、正常な同腹仔数が得られた。こうしたマウスを10世代の間、B6バックグラウンドへ戻し交配した後、下記の実験に用いた。

(実施例2)

B7-H4KOマウスにおけるリステリア菌感染に対する顆粒球媒介抵抗性の増強抗体、組換え蛋白及びフローサイトメトリー分析

FITC、PE又はAPCと直接結合体を形成する、マウスGr-1及びCD11bに対する一次及び二次抗体はBD Pharmingen (San Diego, CA) 又はeBiosciences (San Diego, CA) から購入した。結合体を形成していない一次抗体をハイブリドーマ培養上清から精製した。B7-H4 Ig融合蛋白はSica, G.L. ほか、Immunity、18:p.849-861(2003年)に記載されているのと同様にして調製した。細胞は全て標準的なプロトコルを用いて染色し、FACSCaliburフローサイトメトリーで分析した(同上文献)。そのデータはSoftware CellQuest (BD) 又はFlowJo (TreeStar Inc.、Ashland、OR) を用いて解析した。インビボ実験の場合、mAbは、以前に記載された様に(同上文献)調製し、精製した。抗NK1.1ハイブリドーマ(PK136)及び抗IFN-ハイブリドーマ(R4-6A2)はATCCから購入した。抗Gr-1ハイブリドーマ(RB6-8C5)はシカゴ大学のHans Schreiber博士から親切な提供を受けた。対照マウスIgG、ラットIgG及びハムスターIgGはSigma (St. Louis, MO) から購入し、さらに、以前に記載された様に(同上文献)精製した。カラゲナンはSigmaから購入した。全ての細胞培養培地及び抗体はCellgro (Herndon, VA) から購入した。ウシ胎仔血清(FBS)はHyclone (Logan, UT) から購入した。

【0149】

リステリア菌感染及びコロニー計数

*Listeria monocytogenes*株DP-L4056はCerus Corp.のThomas W. Dubensky Jr.博士から親切な提供を受けた。リステリア菌のストックを調製するため、リステリア菌細胞をD1FCO Listeria Enrichment Broth (Becton Dickinson Co.、Spark's, MD) 中、OD600nmで0.8乃至1となるまで増殖させた。培養物を遠心分離により採集しPBSで2度洗浄した。次いで、ペレットをストック用溶液(15乃至20%グリセロール含有PBS)に再懸濁し、マイクロチューブ当たり200μlのアリコートにして-80°で貯蔵した。リステリア菌ストックのコロニー形成単位(CFU)は、BBL CHROMagar Listeriaプレート(Becton Dickinson Co.、Spark's, MD)上で増殖する上記アリコートの希釈系列液のコロニーを計測することにより求めた。感染させる前に、リステリア菌ストックを解凍してPBSで適切なCFU/ml濃度に希釈し、示したようにしてマウス又は細胞に適用した。6乃至8週令のマウスに対して、示したCFUのリステリア菌を腹腔内(i.p.)又は静脈内(i.v.)注射して感染させた。感染後の示した時点で、マウスの肝臓又は脾臓の一片を取り取り、重量を計ってPBS中ですり潰した。得られた肝臓懸濁液はBBL CHROMagar Listeriaプレート又はListeria Enrichment Brothの寒天プレート上で平板培養した。平板培養後2日にコロニーを計数し、肝臓又は脾臓のCFU Igに調整した。

【0150】

インビトロにおける顆粒球のリステリア菌感染

顆粒球は、Chen, L.Y. ほか、Hum. Mol. Genet. 12:p.2547-2558 (2003年)に記載の方法と同様にして単離した。つまり、マウスに3%チオグリコレート培地をi.p.注射した。注射後4乃至5時間に、各マウスの腹膜腔を5mlのPBSで洗浄し、遠心分離により細胞を収集した。この方法では、採取細胞の>90%がGr-1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>顆粒球であった。 $1 \times 10^6$ 個の顆粒球を $1 \times 10^8$ CFUのLMと37°で10分間インキュベートした。培養は、Penicil

10

20

30

30

40

50

lin-Streptomycin (Cellgro) の添加によって終結した。次いで、遠心分離によって細胞を収集し、これを 96 穴プレートで平板培養した。プレートを 37 度でインキュベートし、示した時点で採集した。細胞は、1 ml の滅菌水中に再懸濁して直ちに溶解させた。細胞溶解液又は希釈細胞溶解液を Listeria Enrichment Broth の寒天プレート上に平板培養してコロニーを計数した。

#### 【0151】

##### 顆粒球の呼吸バースト及び貪食

Radsak, M. P. ほか、J. Immunol. 172: p. 4956-4963 (2004年); Radsak, M. P. ほか、Blood 101: p. 2810-2815 (2003年) に記載の方法と同様にして、顆粒球の貪食活性及び酸化的バースト活性を測定した。つまり、 $1 \times 10^6$  個の顆粒球を  $5 \times 10^7$  個の赤色蛍光マイクロビーズ (Fluoresbrite Polychromatic Red 1.0 Micron Microspheres, Polysciences Inc., Warrington, PA) 及び 25 μM の DCFH-DA (2', 7'-ジヒドロクロロフルオレセイン二酢酸、Sigma-Aldrich) と共に 37 度 30 乃至 60 分間インキュベートした。次いで、細胞を FACS 緩衝液 (1% FBS を含む PBS) で 2 度洗浄し、1% パラホルムアルデヒドを含む PBS で固定した。分析はフローサイトメトリーによって行った。

10

#### 【0152】

##### 病理学

組織の処理及び染色の方法については Dong, H.、Nature Med. 8: p. 793-800 (2002年) に記載されている。簡単に言えば、6 乃至 8 週令のマウスの脾臓試料を OCT 化合物 (Sakura Finetek USA, Torrance, CA) で包埋し、-80 度凍結した。凍結組織はスライスにし、固定して 5 μg / ml の Gr-1-ビオチン抗体で染色した。次いで、ABC ペルオキシダーゼ (Vector laboratories Inc., Burlingame, CA) 及び DA B ペルオキシダーゼ基質 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) をメーカーのプロトコルに従ってスライドに適用した。最後に、ヘマトキシリソ液を用いて Gr-1 ネガティブ細胞を染色した。

20

#### 【0153】

##### 結果

B7-H4KOマウスは正常な数及び率の T、B、NK、NKT 細胞及びマクロファージを示す。さらに、CD3 架橋による精製 T 細胞のインビトロ増殖、同種抗原刺激又は同種抗原に対する細胞傷害性 T 細胞の応答により判断して、T 細胞応答に明白な変化は認められない。これらの結果から、抗原に対する多クローニング T 細胞の応答は B7-H4KO マウスでは損なわれないことが示される。こうしたインビトロの知見と符合して、B7-H4KO マウスは Con-A 誘導肝炎 (Dong, H. ほか、Immunity 203: 27-33 (2004年))、ハブテン誘導過敏症 (Tsushima, F. ほか、Eur. J. Immunol. 33: p. 2773-2782 (2003年)) 及び OVA 誘導気道炎症 (Kamata, T. ほか、J. Clin. Invest. 111: p. 109-119 (2003年)) に対して正常な応答を示すことも見出した。また、B7-H4 欠損マウスは OVA 蛋白に対する OT-I 及び OT-II 細胞の増殖 (Sica, G. L. ほか、Immunity 18: 849-861 (2003年))、超抗原に対する CD4-V8.118.2 T 細胞の増殖 (Tamada, K. ほか、J. Immunol. 168: p. 4832-4835 (2002年)) 並びにインビボにおける同種抗原に対する CTL 活性 (Tamada, K. ほか、Nature Med. 6: p. 283-289 (2000年)) において野生型マウスと同等であることも見出した。また、正常な B 細胞応答が TNF-KLH による免疫化 (Tamura, H. et al.、Blood 97: p. 1809-1816 (2001年)) 後に認められた。最後に、B7-H4KO マウスは、SPF 条件で最長 1.5 年、自然発生の自己免疫疾患を発症しない。

30

40

50

## 【0154】

これらのデータからB7-H4はアッセイにおける抗原駆動T及びB細胞応答に最小の関与であることが分かるが、これらの応答は、活動性感染の非存在下に行われたものであり、活動性感染が存在すれば、通常、自然免疫と適応免疫との精巧な協調を必要とする。この可能性を検証するために、B7-H4を除いた場合の影響を*Listeria monocytogenes* (LM)に感染させたマウスで評価してB7-H4が感染に対する免疫に寄与するかどうかを調べた。マウスに、致死性を誘導するのに十分な腹腔内(i.p.)用量( $2 \times 10^6$  CFU)のLMを感染させた。次に、こうしたマウスの生残について評価した。B7-H4KOマウスはLM感染に対して有意により抵抗性であった。即ち、B7-H4KOマウスは野生型(WT)同腹仔よりもはるかに長く生残し、マウスの最大40%が細菌を除去し、いつまでも生存したのに対して、全ての同腹仔は9日前後で死亡した(図2a)。この効果は、B7-H4KOマウスの脾臓(図2b)及び肝臓中のリストリア菌数の減少と相関性がある。興味深いことに、大部分のマウスは、適応免疫が通常まだ発達していない時点である3乃至4日以内に死んでいた。従って、これらの結果から、B7-H4は自然免疫応答の状況を変えることに関与することが示唆される。

10

## 【0155】

この抵抗性のメカニズムに取り組むために、自然免疫及び適応免疫の細胞組成を調べた。マウスをリストリア菌に感染させ、末梢血及びリンパ系器官中のT細胞、B細胞、NK細胞、マクロファージ及び顆粒球を特異的mAbによって調べた。LM感染後最初の3日以内ではNK、マクロファージ、T細胞及びB細胞に有意な差違は見られなかったが、脾臓中の顆粒球は、感染3日目で、同一に感染させたWT同腹仔よりもLM感染B7-H4KOマウスから有意により多く見出された(図2c)。同様な結果は、感染後の肝臓から単離される顆粒球及び末梢血の顆粒球においても得られた。しかしながら、未感染のB7-H4KOマウスでは、顆粒球数はWT対照の正常範囲内にあった。これらの結果から、B7-H4の役割はLM感染時の顆粒球応答を阻害することにあることが分かる。

20

## 【0156】

B7-H4KOマウスにおけるLM感染の抵抗性に顆粒球が必要とされるかどうかを明らかにするために、Gr-1mAbを接種することにより顆粒球を枯渇させた。Gr-I mAbを注射すると、2日目の脾臓において顆粒球が検出不可能なレベルにまで急速に減少した。Gr-I+顆粒球を枯渇させると、PBS又はアイソタイプ適合対照mAbで処置したマウスと比較して、B7-KOマウスからの肝臓におけるLM負荷は有意に増大した(図2d)。NK細胞をNKI.1mAbによって枯渇させても肝臓におけるLMのコロニー形成に影響を及ぼさなかつたが、マクロファージをカラゲナンにより枯渇させると、LMコロニーは中等度に増殖したが、Gr-I細胞枯渇の場合に比し、より重要性の低いレベルであった。従って、これらの結果は、Gr-I+顆粒球がB7-H4非存在下におけるLM感染に対する抵抗性に重要な役割を果たしているという概念を支持するものである。

30

## 【0157】

B7-H4欠乏顆粒球では機能性が改変されているかどうかについて精製顆粒球とLMとの共培養により明らかにした。B7-H4欠乏顆粒球は培養系中のLMの正常な取り込み及び増殖阻害を示した(図3)。さらに、B7-H4KO顆粒球による呼吸バースト及び貪食も正常であり、B7-H4KO顆粒球はWT顆粒球と機能的に異なることが示された。従って、B7-H4KOマウスにおいてLM感染に対する抵抗性が増大するのは、顆粒球の機能的能力の増大によるものではなく、顆粒球数の増加による可能性が高い。

40

## (実施例3)

B7-H4KOマウスの顆粒球媒介自然抵抗性は適応免疫と無関係である。

## 【0158】

活性化及び記憶T細胞はLMに対する免疫における重要な構成要素である(Nathan, C. Nature Rev. Immunol. 6: p. 173-182 (2006))。

50

年)。データはLM感染に対するB7-H4KOマウスの抵抗性が顆粒球を必要とすることを支持しているが、適応免疫もこの抵抗性に寄与しているかどうかは不明である。LM感染後の顆粒球数の増加はB7-H4KOマウスに見出される主要な表現型であるので、LM感染に対するB7-H4KOマウスの反応を適応免疫の非存在下に調べた。B7-H4KOマウスは、RAG-1KOバックグラウンドへ戻し交配してT及びB細胞を除去した。

#### 【0159】

##### 結果

小さな脾臓を有するRAG-1KO(RKO)マウスと異なって、B7-H4/RAG-1二重KO(DKO)マウスは脾臓の拡大を呈する。DKOマウスの脾臓サイズはB6バックグラウンドにおけるWT及びB7-H4KOマウスと同様である。脾臓、末梢血、肝臓及び骨髄の細胞成分をさらに分析すると、Gr1+CD11b+顆粒球が劇的に増加することが明らかとなった。

10

#### 【0160】

RKO及びDKOマウスに対して致死量のLMを投与して感染させ、これらの自然抵抗性を検討した。LMによりRKOマウスを感染させることによって肝臓のLMは指数関数的に増殖し、4日目には死亡率100%となった(図4)。これとは際立って対照的に、DKOマウスは2日目の肝臓における細菌負荷が有意に少なく、大部分のマウスはLM感染後10日を超えて生残することができた(図4)。脾臓を含む他の器官でも同様なLMの指数関数的増殖が認められ、LM感染の播種が示された。感染B6バックグラウンドB7-H4KOマウスのかなりの割合が長期間生残した(図2a)のとは対照的に、DKOマウスは全て最終的に15日目に感染死し、適応免疫の重要な役割を確認した(図4)。LMが2日目という早期にDKOマウスの肝臓その他の器官から速やかに除去されたことと相俟って、以上の結果から、B7-H4の欠乏によってLM感染に対する自然免疫が増強され、これは主として顆粒球の増加によって媒介されることが示唆される。

20

#### (実施例4)

B7-H4は顆粒球の増殖を直接阻害する。

#### 【0161】

##### 骨髄細胞の培養並びに顆粒球の増殖及び阻害試験

骨髄細胞を吸引し、Willcox, R.A.ほか、Blood, 103:p.177-184(2004年)に記載されている方法と同様にして調製した。B7-H4媒介増殖阻害の場合、96穴プレート中でB7-H4 Ig又は対照マウスIgを一夜コーティングした。十分洗浄した後、組換えマウスG-CSF(Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ)を示した濃度で含み、又は含まない24穴プレート中でBM細胞を $2 \times 10^6$ 個/穴平板培養した。示した時点で細胞を採取し、Beckman Coulter Counter(Beckman, Fullerton, CA)で細胞数を計数した。細胞増殖を調べるために、 $2 \times 10^5$ /穴のBM細胞をG-CSFを含む96穴プレート中で平板培養した。 $^3$ HTdRでパルスした後、細胞を $^3$ HTdRパルス後16時間にFilterMateセルハーベスター(Perkin Elmer, Shelton, CT)で収集した。取り込まれた $^3$ HTdRはTrillux Liquid Scintillation及びLuminescence Counter(Wallac, Turku, Finland)によって検出した。細胞分裂試験の場合、まず、BM細胞を $2 \mu M$ のカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンimidyl ester(CFSE, Invitrogen, Carlsbad, CA)で標識し、次いで96穴又は24穴プレートに添加し、培養した。示した時点で細胞を収集し、mAb Gr-1及びCD11bで染色し、種々の時点のCFSE含量(2)についてフローサイトメトリー分析を行った。

30

40

#### 【0162】

##### 結果

50

B7-H4KOマウスにおいて顆粒球が増加したことから、B7-H4は顆粒球に増殖阻害シグナルを送達することに関与していることが分かる。B7-H4KOマウスからの顆粒球について、これがWT顆粒球よりも増殖能に優れているかどうかを明らかにするための検討を行った。これを行うために、多数の顆粒球前駆体を含有する骨髄(BM)細胞をWT又はB7-H4KOマウスから調製し、G-CSFの存在又は非存在下に3日間培養して顆粒球/好中球の分化を促進した。次いで、BM細胞の増殖を<sup>3</sup>HTdRの取り込みにより測定した。図5aに示したように、BM細胞は用量依存性に増殖することでG-CSFに反応するが、B7-H4KOマウスからのBM細胞の増殖はWT細胞からの場合よりも有意に高かった。培養の最後においてG-CSFに反応するBM細胞のフローサイトメトリー分析を行った結果から、生残細胞の95%超はCD11b+Gr-1+顆粒球であることを示している。

10

#### 【0163】

このデータは顆粒球におけるB7-H4の阻害効果と一致しているが、BM細胞中の他の細胞成分が増殖に寄与することも考えられる。この可能性を明確に排除するために、BM細胞をCFSEで標識し、G-CSFで3日間刺激した後、この細胞を抗Gr-1+/CD11b+mAbで染色することにより細胞分裂に関して顆粒球を観察した。図5bは、B7-H4KOマウス(B6)からの70%のGr-1+CD11b+顆粒球が少なくとも1回分裂するのに対し、WT B6マウスからのわずか56%の顆粒球がCSFEの希釈を示した。同様ではあるがより大きな有意差がRAG-1KOバックグラウンドを有するマウスで見出された。即ち、DKOマウスの86%の顆粒球が分裂を始めたのに対し、RKOマウスからのわずか64.8%の顆粒球がCSFEの希釈を示した。従って、これらの結果から、BM細胞においてB7-H4が欠乏すると、BM由来顆粒球の増殖が増大することが示唆される。

20

#### 【0164】

B7-H4の欠乏がBM由来顆粒球の増殖増大をもたらし得ることを考慮して、B7-H4がその増殖を直接阻害することができるかどうかを調べた。これを検証するために、組換えB7-H4Ig融合蛋白の存在下にWT BM由来顆粒球を培養し、顆粒球の増殖について調べた。WT BM細胞の増殖は、B7-H4の細胞外部分と免疫グロブリンFcとの融合蛋白であるB7-H4Igによって有意に阻害された。この阻害は培養3日目で明らかであり、4及び5日目でより著しくなった(図6a)。培養液に0.1ng/mlのG-CSFを添加すると、BM細胞の増殖が中等度に増大したにもかかわらず、B7-H4Ig媒介の抑制は有意には覆されなかった(図6b)。しかしながら、培養液中のG-CSFを1ng/mlに増加させると、BM細胞のB7-H4Ig媒介増殖阻害を大きく回復させることができた(図6c)。同様な阻害はB7-H4欠乏顆粒球でも認められた。集約すると、これらの結果から、さらに、B7-H4は顆粒球の増殖に対して阻害的であるが、これをG-CSFが逆転させ得るという証拠が得られる。

30

#### 【0165】

B7-H4がリステリア菌感染に対する自然免疫を負に調節し得ることを思いがけなく発見した。B7-H4の効果は顆粒球の増殖抑制によって媒介されると考えられる。末梢組織におけるB7-H4の広範な発現パターンとの関連で、これまでに記載したT細胞応答の阻害におけるB7-H4の役割の他に、B7-H4が末梢組織の自然免疫の制御において重要な調節分子であることをデータは裏付けている。

40

#### 【0166】

B7-H4KOマウスでは、B7-H4蛋白の細胞外部分の大部分が欠損することにより内因性B7-H4とその推定上の受容体との相互作用が完全に排除される。しかしながら、この遺伝子を除去すると、インビトロにおける多クローニング及び異種抗原刺激に対するT細胞応答に強い影響はない。最近の研究でも同様な観察がなされている(Suh, W.K.ほか、Mol. Cell. Biol., 26:p.6403-6411(2006年))。これらの知見からB7-H4はCD3架橋又は異種抗原に対する強い多クローニングT細胞応答の阻害に実質的には影響を及ぼさないことが示唆されるが、B7-H4がT

50

細胞応答のカスケードにおけるより選択的な段階に影響する可能性がある。例えば、最近の研究では、B7-H4KOマウスは数種の気道炎症反応並びにLCMV及びインフルエンザ感染に対して正常に反応するが、Leishmania major感染に対してはこのマウスはT細胞免疫応答の軽度の増強を示すことが分かっている。しかしながら、このノックアウト系では顆粒球の応答については検討されていない。今回の実験から、リストリア菌感染におけるB7-H4の主要な役割は顆粒球媒介自然免疫を抑制することであり、この効果は適応免疫系の非存在下のRAG-1KOマウスでも認め得ることが示唆される。従って、これまでに報告されたT細胞免疫の阻害の他に、B7-H4は細菌感染に対する自然免疫の負の調節に重要な役割を果たし得る。

## 【0167】

B61B7-H4KOマウスの脾臓では顆粒球が軽度に増加するが、LM感染時には顆粒球は劇的に増加する(図2)。しかしながら、この増加は、単にLM誘導性炎症による動員の増大によるものではない。B6バックグラウンドのB7-H4KOマウスは感染のない血液、骨髄及び脾臓において顆粒球のわずかな増加を示す。RAG-1KOバックグラウンドではより劇的な顆粒球増加が認められる。さらに、B7-H4KOマウスからの骨髄細胞はG-CSF刺激存在下により多くの顆粒球を産生する。最後に、培養液にB7-H4蛋白を含めると骨髄由来顆粒球の増殖が有意に阻害される。興味深いことに、顆粒球の阻害におけるB7-H4の役割は、培養液により高濃度のG-CSFを添加することで少なくともある程度逆転し得る。G-CSFはインビボにおける顆粒球の増殖及び恒常性のための重要な因子である。この結果から、B7-H4はインビボにおけるG-CSFの役割に拮抗する負の調節因子として働き得ることが示唆される。集約すると、これらの結果から、B7-H4は、顆粒球の第一位の増殖因子であるG-CSFに対する顆粒球の反応性の阻害シグナルを供給することにより、顆粒球の恒常性を調節できることが確認される。

10

## 【0168】

顆粒球のB7-H4媒介増殖阻害のメカニズムについてはまだ明らかにされていない。B7-H4は、その推定上の受容体に結合すると、T細胞の細胞周期の進行を阻害することが示されている(Sica, G.L.ほか、Immunity 18:p.849-861(2003年); Kryczek, I.、J. Eicp. Med.、203:p.871-881(2006年))。この細胞培養系では、CFSEの希釈及び<sup>3</sup>H-TdRの取り込みが明らかに阻害される(図6a)。骨髄細胞は、顆粒球の重要な増殖因子であるG-CSFを外因的に供給しなくても増殖(図6a)及び細胞分裂(図5g)が観察された。内因性G-CSFが骨髄細胞によって産生され、インビトロにおける基底レベルの増殖を維持している可能性がある。この抑制はG-CSFを添加することで大きく逆転し得た(図6c)。培養中、細胞アポトーシスの有意な増加は最長5日間認められなかった。従って、B7-H4結合による顆粒球において増殖阻害が主要なメカニズムであり得る。B7-H4 mRNAは種々の細胞によって広く発現されるが、その細胞表面発現は、卵巣癌及び浸潤性マクロファージにおいて観察されたように(Kryczek, I.ほか、J. Eicp. Med.、203:p.871-881(2006年))、大部分は細胞質内に含み得る。B7-H4の表面発現が骨髄微小環境内のサイトカインによって調節されて顆粒球の増殖を阻害し得る。

20

30

## 【0169】

好中球を含む顆粒球は感染部位に最も早期に達する細胞の一つであり、貪食能を介した宿主の感染防御の最前線である(Nathan, C. Nature Rev.、Immuno1.、6:p.173-182(2006年))。B7-H4KOマウスにおいてリストリア菌感染に対する抵抗性が増大することを示す上記知見は、リストリア菌及び恐らく他の病原体による感染に対する自然免疫を増強する新たなアプローチを包含する。また、RAG-1バックグラウンドのB7-H4KOマウスが、B6バックグラウンドのB7-H4KOマウスと比較して顆粒球数のより顕著な増加を示し、初期相のLM感染に対してより抵抗性であることも興味深い。こうしたデータは、顆粒球の恒常性及びリストリ

40

50

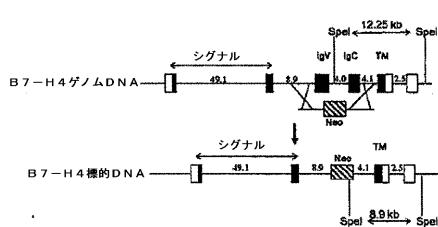
ア菌感染に対する応答におけるT及びB細胞を含む適応免疫の構成要素の抑制的な役割の可能性を包含している。従って、アンタゴニスト活性を有する中和mAb又は適切に設計されたB7-H4蛋白のような、B7-H4発現を選択的に遮断する方法は、顆粒球を増加させ、病原体感染に対する自然免疫を増強する新しいアプローチを示し得る。

## 【図1】

当業者は、本明細書に記載されている特定の実施態様に対する多くの均等物を、通常の実験作業を超えることなくして、認識し、確認できる。このような均等物は、以下の特許請求の範囲に包含されるものである。

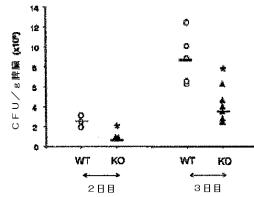
【図1】

Figure 1



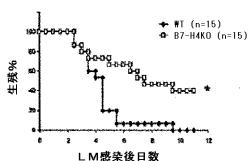
【図2 b】

Figure 2b



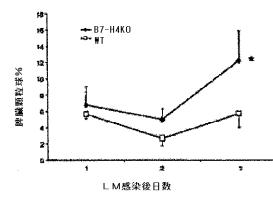
【図2 a】

Figure 2a



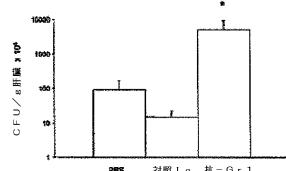
【図2 c】

Figure 2c



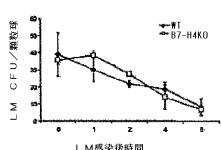
【図2 d】

Figure 2d



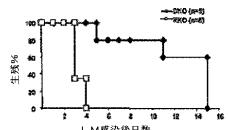
## 【図3】

Figure 3



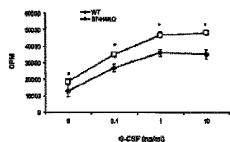
## 【図4】

Figure 4



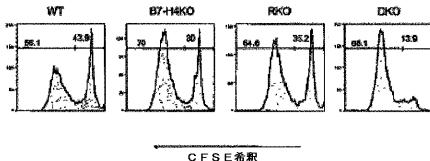
## 【図5a】

Figure 5a



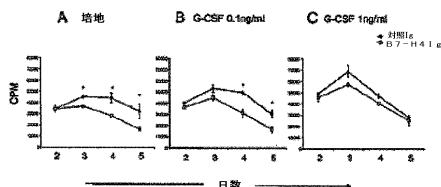
## 【図5b】

Figure 5b



## 【図6】

Figure 6



## 【配列表】

2011502954000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成21年8月31日(2009.8.31)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 4】

別の実施態様では、B7-H4アンタゴニスト、好ましくはsH4を含むワクチン組成物を提供する。このワクチンは抗原供給源をも含む。この抗原供給源はウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原又は原生動物抗原を供給することができる。好ましい実施態様では、この抗原は腫瘍特異的抗原である。上記ワクチン組成物は任意選択的にアジュバントを含む。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

医薬組成物投与単位であって、これを必要とする個体においてB7-H4活性を阻害するのに有効な量のB7-H4アンタゴニスト及び医薬用として許容可能な担体を含む医薬組成物投与単位。

(項目2)

前記B7-H4アンタゴニストがsH4又はその変形体である項目1に記載の医薬組成物。

(項目3)

前記B7-H4アンタゴニストが抗B7-H4抗体、抗B7-H4受容体抗体、B7-

H 4 又は B 7 - H 4 受容体抗体に特異的な阻害核酸、 s H 4 をコードする核酸及びこれらの組合せからなる群から選択される項目 1 に記載の医薬組成物。

(項目 4 )

前記阻害核酸がアンチセンス D N A 、アンチセンス R N A 、 s i R N A 及びミクロ R N A からなる群から選択される項目 3 に記載の医薬組成物。

(項目 5 )

前記 B 7 - H 4 活性が細胞表面受容体への B 7 - H 4 の結合である項目 1 に記載の医薬組成物。

(項目 6 )

前記細胞表面受容体が T 細胞上の受容体である項目 5 に記載の医薬組成物。

(項目 7 )

前記 B 7 - H 4 活性が T 細胞活性の阻害である項目 1 に記載の医薬組成物。

(項目 8 )

第 2 の治療剤をさらに含む項目 1 に記載の医薬組成物。

(項目 9 )

前記第 2 の治療剤が成長因子受容体又は腫瘍特異抗原に特異的な抗体又はその抗原結合断片、サイトカイン、ケモカイン、増殖阻害剤及び細胞毒性剤からなる群から選択される項目 8 に記載の医薬組成物。

(項目 10 )

個体において免疫応答を刺激又は増強する方法であつて、

該個体において B 7 - H 4 活性を阻害するのに有効な量の B 7 - H 4 アンタゴニストを該個体に投与する工程を含む方法。

(項目 11 )

前記 B 7 - H 4 アンタゴニストが s H 4 又はその変形体である項目 8 に記載の方法。

(項目 12 )

前記 B 7 - H 4 アンタゴニストが抗 B 7 - H 4 抗体、抗 B 7 - H 4 受容体抗体、 B 7 - H 4 又は B 7 - H 4 受容体に特異的な阻害核酸、 s H 4 をコードする核酸及びこれらの組合せからなる群から選択される項目 8 に記載の方法。

(項目 13 )

前記阻害核酸がアンチセンス D N A 、アンチセンス R N A 、 s i R N A 及びミクロ R N A からなる群から選択される項目 12 に記載の方法。

(項目 14 )

前記 B 7 - H 4 活性が細胞表面受容体への B 7 - H 4 の結合である項目 10 に記載の方法。

(項目 15 )

前記細胞表面受容体が T 細胞上の受容体である項目 14 に記載の方法。

(項目 16 )

前記 B 7 - H 4 活性が T 細胞活性の阻害である項目 10 に記載の方法。

(項目 17 )

前記方法が前記個体において感染又は癌を処置するために用いられる項目 10 に記載の方法。

(項目 18 )

前記癌が膀胱、脳、乳腺、頸部、結腸 - 直腸、食道、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、脾臓、前立腺、皮膚、胃、子宮、卵巣及び精巣の癌からなる群から選択される項目 17 に記載の方法。

(項目 19 )

前記感染がウイルス、細菌、真菌及び原生動物によるものである感染を処置するための項目 17 に記載の方法。

(項目 20 )

ワクチン組成物であつて、

抗原及び個体において B 7 - H 4 活性を阻害するのに有効な量の B 7 - H 4 アンタゴニストを含む組成物。

(項目 2 1 )

前記抗原が該抗原をコードする発現ベクターである項目 2 0 に記載のワクチン組成物。

(項目 2 2 )

前記抗原が抗原性ポリペプチドを含む項目 2 0 に記載のワクチン組成物。

(項目 2 3 )

前記抗原性ポリペプチドがウイルス性、真菌性、細菌性又は原生動物性である項目 2 2 に記載のワクチン組成物。

(項目 2 4 )

前記抗原性ポリペプチドが腫瘍特異抗原を含む項目 2 2 に記載のワクチン組成物。

(項目 2 5 )

癌を処置する方法であって、

腫瘍細胞上の B 7 - H 4 分子に結合するのに有効な量の B 7 - H 4 アンタゴニストを被検体に投与して該 B 7 - H 4 分子が免疫細胞上の B 7 - H 4 受容体に結合するのを阻害する工程を含む方法。

(項目 2 6 )

前記 B 7 - H 4 アンタゴニストが抗体又はその抗原結合断片及び s H 4 からなる群から選択される項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7 )

前記被検体に第 2 の治療剤を投与する工程をさらに含む項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 8 )

前記第 2 の治療剤が成長因子受容体又は腫瘍特異抗原に特異的な抗体又はその抗原結合断片、サイトカイン、ケモカイン、増殖阻害剤及び細胞毒性剤からなる群から選択される項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9 )

有効量の放射線を投与する工程をさらに含む項目 2 5 に記載の方法。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

医薬組成物投与単位であって、これを必要とする個体において B 7 - H 4 活性を阻害するのに有効な量の B 7 - H 4 アンタゴニスト及び医薬用として許容可能な担体を含む医薬組成物投与単位。

【請求項 2】

前記 B 7 - H 4 アンタゴニストが s H 4 又はその改変体である請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記 B 7 - H 4 アンタゴニストが抗 B 7 - H 4 抗体、抗 B 7 - H 4 受容体抗体、B 7 - H 4 又は B 7 - H 4 受容体抗体に特異的な阻害核酸、s H 4 をコードする核酸及びこれらの組合せからなる群から選択される請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記阻害核酸がアンチセンス DNA、アンチセンス RNA、siRNA 及びミクロ RNA からなる群から選択される請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記 B 7 - H 4 活性が細胞表面受容体への B 7 - H 4 の結合である請求項 1 に記載の医

薬組成物。

【請求項 6】

前記細胞表面受容体がT細胞上の受容体である請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記B7-H4活性がT細胞活性の阻害である請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

第2の治療剤をさらに含む請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記第2の治療剤が成長因子受容体又は腫瘍特異抗原に特異的な抗体又はその抗原結合断片、サイトカイン、ケモカイン、増殖阻害剤及び細胞毒性剤からなる群から選択される請求項8に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

個体において免疫応答を刺激又は増強するための組成物であって、B7-H4活性を阻害するのに有効な量のB7-H4アンタゴニストを含む、組成物。

【請求項 11】

前記B7-H4アンタゴニストがsH4又はその変形体である請求項10に記載の組成物。

【請求項 12】

前記B7-H4アンタゴニストが抗B7-H4抗体、抗B7-H4受容体抗体、B7-H4又はB7-H4受容体に特異的な阻害核酸、sH4をコードする核酸及びこれらの組合せからなる群から選択される請求項10に記載の組成物。

【請求項 13】

前記阻害核酸がアンチセンスDNA、アンチセンスRNA、siRNA及びミクロRNAからなる群から選択される請求項12に記載の組成物。

【請求項 14】

前記B7-H4活性が細胞表面受容体へのB7-H4の結合である請求項10に記載の組成物。

【請求項 15】

前記細胞表面受容体がT細胞上の受容体である請求項14に記載の組成物。

【請求項 16】

前記B7-H4活性がT細胞活性の阻害である請求項10に記載の組成物。

【請求項 17】

前記組成物が前記個体において感染又は癌を処置するために用いられる請求項10に記載の組成物。

【請求項 18】

前記癌が膀胱、脳、乳腺、頸部、結腸-直腸、食道、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、脾臓、前立腺、皮膚、胃、子宮、卵巣及び精巣の癌からなる群から選択される請求項17に記載の組成物。

【請求項 19】

前記感染がウイルス、細菌、真菌及び原生動物によるものである感染を処置するための請求項17に記載の組成物。

【請求項 20】

ワクチン組成物であって、

抗原及び個体においてB7-H4活性を阻害するのに有効な量のB7-H4アンタゴニストを含む組成物。

【請求項 21】

前記抗原が該抗原をコードする発現ベクターである請求項20に記載のワクチン組成物。

。

【請求項 22】

前記抗原が抗原性ポリペプチドを含む請求項20に記載のワクチン組成物。

**【請求項 2 3】**

前記抗原性ポリペプチドがウイルス性、真菌性、細菌性又は原生動物性である請求項 2 2 に記載のワクチン組成物。

**【請求項 2 4】**

前記抗原性ポリペプチドが腫瘍特異抗原を含む請求項 2 2 に記載のワクチン組成物。

**【請求項 2 5】**

癌を処置するための組成物であって、

腫瘍細胞上の B 7 - H 4 分子に結合するのに有効な量の B 7 - H 4 アンタゴニストを含み、該 B 7 - H 4 分子が免疫細胞上の B 7 - H 4 受容体に結合するのを阻害する、組成物。

**【請求項 2 6】**

前記 B 7 - H 4 アンタゴニストが抗体又はその抗原結合断片及び s H 4 からなる群から選択される請求項 2 5 に記載の組成物。

**【請求項 2 7】**

前記組成物が、第 2 の治療剤とともに投与されることで特徴づけられる、請求項 2 5 に記載の組成物。

**【請求項 2 8】**

前記第 2 の治療剤が成長因子受容体又は腫瘍特異抗原に特異的な抗体又はその抗原結合断片、サイトカイン、ケモカイン、増殖阻害剤及び細胞毒性剤からなる群から選択される請求項 2 7 に記載の組成物。

**【請求項 2 9】**

前記組成物が、有効量の放射線とともに投与されることで特徴づけられる、請求項 2 5 に記載の組成物。

**【請求項 3 0】**

個体において免疫応答を刺激又は増強するための医薬の製造における、B 7 - H 4 活性を阻害するのに有効な量の B 7 - H 4 アンタゴニストの使用。

**【請求項 3 1】**

前記 B 7 - H 4 アンタゴニストが s H 4 又はその改変体である請求項 3 0 に記載の使用。

**【請求項 3 2】**

前記 B 7 - H 4 アンタゴニストが抗 B 7 - H 4 抗体、抗 B 7 - H 4 受容体抗体、B 7 - H 4 又は B 7 - H 4 受容体に特異的な阻害核酸、s H 4 をコードする核酸及びこれらの組合せからなる群から選択される請求項 3 0 に記載の使用。

**【請求項 3 3】**

前記阻害核酸がアンチセンス DNA、アンチセンス RNA、siRNA 及びミクロ RNA からなる群から選択される請求項 3 2 に記載の使用。

**【請求項 3 4】**

前記 B 7 - H 4 活性が細胞表面受容体への B 7 - H 4 の結合である請求項 3 0 に記載の使用。

**【請求項 3 5】**

前記細胞表面受容体が T 細胞上の受容体である請求項 3 4 に記載の使用。

**【請求項 3 6】**

前記 B 7 - H 4 活性が T 細胞活性の阻害である請求項 3 0 に記載の使用。

**【請求項 3 7】**

前記医薬が、前記個体において感染又は癌を処置するためのものである、請求項 3 0 に記載の使用。

**【請求項 3 8】**

前記癌が膀胱、脳、乳腺、頸部、結腸 - 直腸、食道、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、脾臓、前立腺、皮膚、胃、子宮、卵巣及び精巣の癌からなる群から選択される請求項 3 7 に記載の使用。

**【請求項 3 9】**

前記感染がウイルス、細菌、真菌及び原生動物によるものである感染を処置するための請求項 3 7 に記載の使用。

**【請求項 4 0】**

癌を処置するための医薬の製造における、腫瘍細胞上の B 7 - H 4 分子に結合するのに有効な量の B 7 - H 4 アンタゴニストの使用であって、該 B 7 - H 4 分子が免疫細胞上の B 7 - H 4 受容体に結合するのを阻害する、使用。

**【請求項 4 1】**

前記 B 7 - H 4 アンタゴニストが抗体又はその抗原結合断片及び s H 4 からなる群から選択される請求項 4 0 に記載の使用。

**【請求項 4 2】**

前記医薬が、第 2 の治療剤とともに投与されることで特徴づけられる、請求項 4 0 に記載の使用。

**【請求項 4 3】**

前記第 2 の治療剤が成長因子受容体又は腫瘍特異抗原に特異的な抗体又はその抗原結合断片、サイトカイン、ケモカイン、増殖阻害剤及び細胞毒性剤からなる群から選択される請求項 4 2 に記載の使用。

**【請求項 4 4】**

前記医薬が、有効量の放射線とともに投与されることで特徴づけられる、請求項 4 0 に記載の使用。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/088979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A61K38/17 A61P37/00 A61P31/00 A61P35/00

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).  
A61K

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, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/133396 A (DANA FARBER CANCER INST INC [US]; BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; UNIV) 14 December 2006 (2006-12-14)  claims 1,25,30	1,3, 5-10,12, 14-19, 25-29
X	WO 2004/113500 A (UNIV WASHINGTON [US]; DONG CHEN [US]; PRASAD DURBAKA V R [JP]) 29 December 2004 (2004-12-29) paragraphs [0012], [0132], [0146], [0147]	1-7, 10-19, 25,26

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 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

\*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

26 June 2008

Date of mailing of the International search report

03/07/2008

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

Bocheten, Damien

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No PCT/US2007/088979
---

**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 2004/000221 A (UNIV CALIFORNIA [US]; UNIV WASHINGTON [US]; ALLISON JAMES P. [US]; MURP) 31 December 2003 (2003-12-31) page 6, lines 11-19; claims 4,8,10; figure 1 page 42; line 16 - line 28 page 60, lines 25-39 page 16, line 3 - line 5 page 56, line 25 - line 29	1-7, 10-18, 20-26
X	US 2004/152105 A1 (VOGT LORENZ [CH] ET AL) 5 August 2004 (2004-08-05) paragraphs [0076], [0089], [0103]; claims 5,13,23,21; examples 3,18	1-3,5-7, 10-12, 14-18
X	SALCEDA S ET AL: "The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation" EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, SAN DIEGO, CA, US, vol. 306, no. 1, 15 May 2005 (2005-05-15), pages 128-141, XP004876369. ISSN: 0014-4827 page 136	1-7, 10-18, 25-27

International Application No. PCT/US2007 /088979

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

The present claims 1, 10, 20 and 25 relate to an extremely large number of possible compounds. Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of the compounds, see claims 3 and 4. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claims 1, 10, 20 and 25 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23). The search of claims 1, 10, 20 and 25 was restricted to those claimed compounds which appear to be supported by claims 3-4 and pages 9, 15-19 of the description..

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2007/088979

**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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
  
  
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:

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 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**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2007/088979

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2006133396 A	14-12-2006	AU 2006254902 A1		14-12-2006
		CA 2611861 A1		14-12-2006
		EP 1907000 A2		09-04-2008
WO 2004113500 A	29-12-2004	NONE		
WO 2004000221 A	31-12-2003	AU 2003245615 A1		06-01-2004
		CA 2489803 A1		31-12-2003
		EP 1539218 A2		15-06-2005
US 2004152105 A1	05-08-2004	NONE		

## 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 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G

(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,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,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,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,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,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 チェン , リーピン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 1 5 2 , スパークス グレンコー , サイジウッド コート 1 1 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA04 CA05 DA02 HA17  
 4C084 AA11 AA13 AA17 AA19 MA02 NA14 ZB091 ZB261 ZB321 ZB331  
 ZB351 ZB371 ZC021 ZC751  
 4C085 AA03 AA14 BB01 BB11 CC07 CC08 EE01 EE03  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZB09 ZB26 ZB32  
 ZB33 ZB35 ZB37 ZC02 ZC75  
 4H045 AA11 AA30 CA40 DA01 DA50 DA76 EA22 EA31 FA74