

(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2010-506921

(P2010-506921A)

(43) 公表日 平成22年3月4日 (2010. 3. 4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	2 G 0 4 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 O 1	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-533352 (P2009-533352)
 (86) (22) 出願日 平成19年10月16日 (2007. 10. 16)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年6月16日 (2009. 6. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/022103
 (87) 国際公開番号 W02008/057171
 (87) 国際公開日 平成20年5月15日 (2008. 5. 15)
 (31) 優先権主張番号 60/852, 022
 (32) 優先日 平成18年10月16日 (2006. 10. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/917, 561
 (32) 優先日 平成19年5月11日 (2007. 5. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501244222
 ザ スクリプス リサーチ インスティテ
 ユート
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92
 037, ラ ホヤ, ノース トーリー
 パインズ ロード 10550
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男
 (74) 代理人 100114591
 弁理士 河村 英文

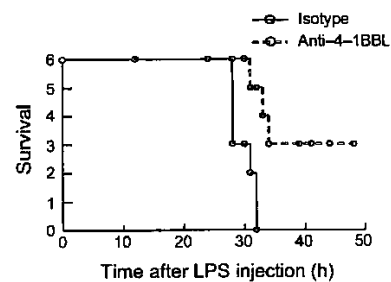
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性疾患における 4 - 1 B B リガンド

(57) 【要約】

本発明は、4 - 1 B B L 遮断薬、ならびに持続性炎症における新規の治療的介入としてのそのような遮断薬を含む医薬組成物および製品を提供する。したがって、本発明は、腫瘍壊死因子の持続的産生を減少させるための方法も提供する。

FIG. 2B



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

4-1 B B L 遮断薬および製薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物であって、前記 4-1 B B L 遮断薬が、(a) 4-1 B B L に対して特異的なアンタゴニスト抗体と、(b) 細胞中の 4-1 B B L 核酸からの発現を減少させるために有効なオリゴヌクレオチドと、(c) 可溶性 4-1 B B とからなる群より選択される医薬組成物。

【請求項 2】

前記アンタゴニスト抗体が、4-1 B B L に対して特異的なキメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記 4-1 B B L が、配列番号 1 または 2 に示される配列を有する、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 10～15、22～38、および 45～56 からなる群より選択される配列を有する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記可溶性 4-1 B B が、(a) ヒト 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 186、(b) ヒト 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 23 からアミノ酸 186、(c) マウス 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 187、または (d) マウス 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 24 からアミノ酸 187 に対応する配列を有する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記可溶性 4-1 B B が、配列番号 7、8、20 または 21 に示される配列を有する、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

担体、請求項 1 に記載の 4-1 B B L 遮断薬、および抗炎症薬である第 2 薬剤を含む医薬配合物。

【請求項 8】

前記抗炎症薬が、腫瘍壊死因子に対して特異的な抗体である、請求項 7 に記載の医薬配合物。

【請求項 9】

前記アンタゴニスト抗体が、4-1 B B L に対して特異的なキメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 7 または 8 に記載の医薬配合物。

【請求項 10】

前記 4-1 B B L が、配列番号 1 または 2 に示される配列を有する、請求項 7 または 8 に記載の医薬配合物。

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 10～15、22～38、および 45～56 からなる群より選択される配列を有する、請求項 7 または 8 に記載の医薬配合物。

【請求項 12】

前記可溶性 4-1 B B が、(a) ヒト 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 23 からアミノ酸 186、(b) ヒト 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 23 からアミノ酸 186、(c) マウス 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 187、または (d) マウス 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 24 からアミノ酸 187 に対応する配列を有する、請求項 7 または 8 に記載の医薬配合物。

【請求項 13】

前記可溶性 4-1 B B が、配列番号 7～8、および 20～21 からなる群より選択される配列を有する、請求項 12 に記載の医薬配合物。

【請求項 14】

4-1 B B L に対して特異的なキメラ抗体またはヒト化抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 15】

前記抗体が、配列番号 1 または 2 を含む 4-1 B B L ポリペプチドに結合できる、請求項 14 に記載の抗体。

【請求項 16】

配列番号 10～15、22～38、および 45～56 からなる群より選択される配列を有する 4-1 B B L 遮断薬。

【請求項 17】

(a) ヒト 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 186、(b) ヒト 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 23 からアミノ酸 186、(c) マウス 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 187、または (d) マウス 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 24 からアミノ酸 187 に対応する配列を有する可溶性 4-1 B B。

10

【請求項 18】

配列番号 7、8、20 または 21 の配列を有する請求項 17 記載の可溶性 4-1 B B。

【請求項 19】

哺乳動物における炎症性サイトカインの産生を減少させるための方法であって、4-1 B B L 遮断薬を前記哺乳動物に投与する工程を含み、前記 4-1 B B L 遮断薬が、(a) 4-1 B B L に対して特異的なアンタゴニスト抗体と、(b) 細胞中の 4-1 B B L 核酸からの発現を減少させるために有効なオリゴヌクレオチドと、(c) 可溶性 4-1 B B とからなる群より選択される方法。

20

【請求項 20】

前記 4-1 B B L 遮断薬を投与する工程の前に、炎症状態にある哺乳動物、または炎症状態の危険性がある哺乳動物を同定する工程をさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記炎症性サイトカインが、腫瘍壊死因子または IL-6 である、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 23】

前記アンタゴニスト抗体が、4-1 B B L に対して特異的なキメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 19 または 20 に記載の方法。

30

【請求項 24】

前記 4-1 B B L が、配列番号 1 または 2 の配列を有する、請求項 19、20 または 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記 4-1 B B L 遮断薬が、配列番号 10～15、22～38、および 45～56 からなる群より選択される配列を有する、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 26】

前記可溶性 4-1 B B が、(a) ヒト 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 186、(b) ヒト 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 23 からアミノ酸 186、(c) マウス 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 187、または (d) マウス 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 24 からアミノ酸 187 に対応する配列を有する、請求項 19 または 20 に記載の方法。

40

【請求項 27】

前記可溶性 4-1 B B が、配列番号 7、8、20 または 21 の配列を有する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

哺乳動物細胞による炎症性サイトカインの産生を減少させるための方法であって、前記細胞を 4-1 B B L 遮断薬と接触させる工程を含み、前記 4-1 B B L 遮断薬が、(a) 4-1 B B L に対して特異的なアンタゴニスト抗体と、(b) 細胞中の 4-1 B B L 核酸からの発現を減少させるために有効なオリゴヌクレオチドと、(c) 可溶性 4-1 B B と

50

からなる群より選択される方法。

【請求項 29】

前記炎症性サイトカインが、腫瘍壊死因子または IL-6 である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記アンタゴニスト抗体が、4-1BBL に対して特異的なキメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 28、29、または 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記 4-1BBL が、配列番号 1 または 2 の配列を有する、請求項 28、29 または 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記 4-1BBL 遮断薬が、配列番号 10～15、22～38、および 45～56 からなる群より選択される配列を有する、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 34】

前記可溶性 4-1BB が、(a) ヒト 4-1BB ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 186、(b) ヒト 4-1BB ポリペプチドのアミノ酸 23 からアミノ酸 186、(c) マウス 4-1BB ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 187、または (d) マウス 4-1BB ポリペプチドのアミノ酸 24 からアミノ酸 187 に対応する配列を有する、請求項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 35】

前記可溶性 4-1BB が、配列番号 7、8、20 または 21 の配列を有する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

哺乳動物における炎症を緩和させるための方法であって、4-1BBL 遮断薬を前記哺乳動物に投与する工程を含み、前記 4-1BBL 遮断薬が、(a) 4-1BBL に対して特異的なアンタゴニスト抗体と、(b) 細胞中の 4-1BBL 核酸からの発現を減少させるために有効なオリゴヌクレオチドと、(c) 可溶性 4-1BB とからなる群より選択される方法。

【請求項 37】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記炎症が、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病、関節リウマチ、全身発症性若年性慢性関節炎、骨粗鬆症、または過敏性腸症候群に関連する、またはそれらに起因する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記 4-1BBL が、配列番号 1 または 2 の配列を有する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

前記アンタゴニスト抗体が、4-1BBL に対して特異的なキメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】

前記 4-1BBL 遮断薬が、配列番号 10～15、22～38、および 45～56 からなる群より選択される配列を有する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 42】

前記可溶性 4-1BB が、(a) ヒト 4-1BB ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 186、(b) ヒト 4-1BB ポリペプチドのアミノ酸 23 からアミノ酸 186、(c) マウス 4-1BB ポリペプチドのアミノ酸 1～アミノ酸 187、または (d) マウス 4-1BB ポリペプチドのアミノ酸 24 からアミノ酸 187 に対応する配列を有する、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記可溶性 4-1 B B が、配列番号 7、8、20 または 21 の配列を有する、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

4-1 B B L 遮断薬を含有する容器および炎症性サイトカインの産生を減少させるために 4-1 B B L 遮断薬を使用するための取扱説明書を含む製品であって、前記 4-1 B B L 遮断薬が、(a) 4-1 B B L に対して特異的なアンタゴニスト抗体と、(b) 細胞中の 4-1 B B L 核酸からの発現を減少させるために有効なオリゴヌクレオチドと、(c) 可溶性 4-1 B B とからなる群より選択される製品。

【請求項 4 5】

前記 4-1 B B L 遮断薬を使用するための取扱説明書が、炎症状態の治療において 4-1 B B L 遮断薬を使用するための取扱説明書を含む、請求項 4 4 に記載の製品。

【請求項 4 6】

前記炎症状態が、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病、関節リウマチ、全身発症性若年性慢性関節炎、骨粗鬆症、または過敏性腸症候群である、請求項 4 5 に記載の製品。

【請求項 4 7】

前記炎症性サイトカインが、腫瘍壊死因子または I L-6 である、請求項 4 4、4 5、または 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 4-1 B B L が、配列番号 1 または 2 の配列を有する、請求項 4 4、4 5 または 4 6 に記載の製品。

【請求項 4 9】

前記アンタゴニスト抗体が、4-1 B B L に対して特異的なキメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 4 4、4 5、または 4 6 に記載の製品。

【請求項 5 0】

前記 4-1 B B L 遮断薬が、配列番号 10~15、22~38、および 45~56 からなる群より選択される配列を有する、請求項 4 4、4 5、または 4 6 に記載の製品。

【請求項 5 1】

前記可溶性 4-1 B B が、(a) ヒト 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 186、(b) ヒト 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 23 からアミノ酸 186、(c) マウス 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 187、または (d) マウス 4-1 B B ポリペプチドのアミノ酸 24 からアミノ酸 187 に対応する配列を有する、請求項 4 4、4 5 または 4 6 に記載の製品。

【請求項 5 2】

前記可溶性 4-1 B B が、配列番号 7、8、20 または 21 の配列を有する、請求項 4 4、4 5、または 4 6 に記載の製品。

【請求項 5 3】

4-1 B B L 遮断薬についてスクリーニングを行う方法であって、
(a) 4-1 B B L を発現する細胞を候補薬剤と接触させる工程と、
(b) 前記候補薬剤が炎症性サイトカインの産生を減少させるかどうか、または前記候補薬剤が 4-1 オリゴマー化を防止するかどうかを判定する工程と
を含み、前記候補薬剤が、炎症性サイトカインの産生を減少させるか、4-1 B B L オリゴマー化を防止する場合は、前記候補薬剤が 4-1 B B L 遮断薬である方法。

【請求項 5 4】

前記細胞がヒト細胞である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記細胞がマクロファージである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記細胞が R A W 2 6 4. 7 細胞である、請求項 5 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 57】

4-1 B B L 遮断薬についてスクリーニングを行う方法であって、

(a) 哺乳動物に候補薬剤を投与する工程と、

(b) 前記候補薬剤が炎症を緩和させるかどうか、または炎症性サイトカインの産生を減少させるかどうかを判定する工程と

を含み、前記候補薬剤が、前記哺乳動物において炎症を緩和させるか、炎症性サイトカインの産生を減少させる場合は、前記候補薬剤が 4-1 B B L 遮断薬である方法。

【請求項 58】

前記炎症が、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病、関節リウマチ、全身発症性若年性慢性関節炎、骨粗鬆症、または過敏性腸症候群に関連する、またはそれらに起因する、請求項 57 に記載の方法。

10

【請求項 59】

前記炎症性サイトカインが、腫瘍壊死因子または I L - 6 である、請求項 53 ~ 58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

前記炎症性サイトカインの産生が、20%、25%、30%、または30%以上減少する、請求項 53 ~ 58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記 4-1 B B L が、配列番号 1 または 2 の配列を有する、請求項 53 ~ 58 にのいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 62】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 57 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願]

本出願は、2006年10月16日に出願された米国仮特許出願第60/852,022号明細書、および2007年5月11日に出願された米国仮特許出願第60/917,561号明細書に対する優先権を主張するものであり、該出願はいずれも全体として参照することにより本明細書の一部をなすものとする。

30

【0002】

[連邦政府による資金提供を受けた研究開発に関する記載]

本願に関連する研究は、米国政府からの補助金(GM67101、AI41637、およびAI54696)による支援を受けている。米国政府は、本発明においてある一定の権利を有する場合がある。

【背景技術】

【0003】

マクロファージ中の腫瘍壊死因子(TNF)などの前炎症性サイトカインの産生は、先天的免疫応答を開始するため、そして敗血症などの疾患に付随する全身性炎症状態を維持するために不可欠である(Beutler, Nature 430:257-63(2004); Cohen, Nature 420:885-91(2002))。トール様受容体(TLR)は、各々が微生物起源の特異的分子に応答する、主要な先天性免疫センサーである(Janeway & Medzhitov, Annu. Rev. Immunol. 20:197-216(2002))。TLR4は、リポ多糖(LPS)エンドトキシンに対する受容体であり、例えば骨髄分化一次応答遺伝子88(MyD88)およびToll/インターロイキン-1受容体/耐性アダプタータンパク質(TRIF)(TICAM-1としても公知である)などのシグナリングアダプターを動員することによってLPSに応答する。この動員は、IRAKファミリーメンバーおよびTNF受容体関連因子6(TRAF6)の相互作用および活性化を可能にさせ、これらは引き続いて炎症性サイトカイン産生を制御するNF-κBおよびMAPキナーゼ経路を活性化する(Akira

40

50

& Takeda, Nat. Rev. Immunol. 4:499-511 (2004)))。

【0004】

NF-κBおよびMAPキナーゼ経路は、リポ多糖(LPS)処置から数時間以内にマクロファージ内で一時的に活性化されるが、TNFのような前炎症性サイトカインの産生は24時間まで持続することができる。したがって、炎症性サイトカインの産生は、開始後に「持続」期が続くことを特徴とする炎症プロセスの一部である。持続期は、通常は炎症誘因の分解が生じると終了する。持続的なサイトカインの産生は、炎症状態を維持すること、および炎症性疾患の発生において極めて重要であるが、それは炎症の調節の崩壊を結果として生じさせる事象の多数が持続性炎症反応の終了時の近辺に発生するからである。このため、持続的なTNFの産生は、多数の炎症性疾患の病態と関連している。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、持続的TNF産生に影響を及ぼせる薬剤は、炎症性疾患を治療するための治療薬を開発するために有用である。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、マクロファージ活性化を媒介する際に重要な前炎症性サイトカインの産生において、4-1BBリガンド(4-1BBL)が果たす役割の発見に関連する。特に、本発明は、4-1BBLが、炎症を生じさせる腫瘍壊死因子(TNF)の持続的生成のために重要である後期シグナリング事象において作用するという発見に関連している。後期サイトカイン産生における4-1BBLの機能は、4-1BBとは無関係である。したがって、本発明は、その公知の受容体である4-1BBとは無関係である4-1BBLの新規機能に関連し、炎症性サイトカインの産生を減少させる方法を提供する。本発明は、4-1BBLアンタゴニストおよび遮断薬、ならびにそのようなアンタゴニストおよび遮断薬を含む医薬組成物および製品をさらに提供する。さらに、本発明は、4-1BBL遮断薬およびアンタゴニストについてスクリーニングを行う方法を提供する。

20

【0007】

本発明の1つの態様は、4-1BBL遮断薬および製薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物であって、該4-1BBL遮断薬が、(a)4-1BBLに対して特異的なアンタゴニスト抗体と、(b)細胞中の4-1BBL核酸からの発現を減少させるために有効なオリゴヌクレオチドと、(c)可溶性4-1BBとからなる群より選択される医薬組成物である。本組成物中では、治療有効量の遮断薬を使用できる。

30

【0008】

本発明の1つの態様は、4-1BBL遮断薬および抗炎症薬である第2薬剤を含む医薬配合物であって、該4-1BBL遮断薬が、(a)4-1BBLに対して特異的なアンタゴニスト抗体と、(b)細胞中の4-1BBL核酸からの発現を減少させるために有効なオリゴヌクレオチドと、(c)可溶性4-1BBとからなる群より選択される医薬配合物である。本組成物中では、治療有効量の遮断薬および/または抗炎症薬を使用できる。抗炎症薬は、腫瘍壊死因子に対して特異的な抗体であり得る。

40

【0009】

本発明の別の態様は、4-1BBLに対して特異的なキメラ抗体またはヒト化抗体である。

【0010】

本発明の別の態様は、哺乳動物4-1BBLと特異的に結合する可溶性4-1BBである。いくつかの実施形態では、哺乳動物4-1BBLは、ヒト、マウス、ウサギ、ブタまたはウマの4-1BBLである。いくつかの実施形態では、可溶性4-1BBは、ヒト4-1BBポリペプチドのアミノ酸23からアミノ酸186、マウス4-1BBポリペプチドのアミノ酸24からアミノ酸187、ヒト4-1BBポリペプチドのアミノ酸1からア

50

ミノ酸 186、マウス 4-1 BB ポリペプチドのアミノ酸 1 からアミノ酸 187、または別の哺乳動物 4-1 BB における対応する領域に対応する配列を有する。いくつかの実施形態では、可溶性 4-1 BB は、配列番号 7、8、20 または 21 の配列を有する。

【0011】

本発明の別の態様は、4-1 BB L 遮断薬を含有する容器および炎症を緩和させるためおよび／または炎症性サイトカインの産生を減少させるために 4-1 BB L 遮断薬を使用するための取扱説明書を含む製品である。いくつかの実施形態では、4-1 BB L 遮断薬を使用するための取扱説明書は、炎症状態の治療において 4-1 BB L 遮断薬を使用するための取扱説明書を含む。容器内には、治療有効量の遮断薬を用意できる。

【0012】

いくつかの実施形態では、炎症状態は、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病、関節リウマチ、全身発症性若年性慢性関節炎、骨粗鬆症、または過敏性腸症候群である。

【0013】

本発明の別の態様は、哺乳動物における炎症性サイトカインの産生を減少させるための方法であって、該哺乳動物に 4-1 BB L 遮断薬を投与する工程を含む方法である。治療有効量の遮断薬を投与できる。いくつかの実施形態では、本方法は、炎症状態にある哺乳動物、または炎症状態の危険性がある哺乳動物を同定する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒト、マウス、ウサギ、ブタまたはウマである。

【0014】

本発明の別の態様は、哺乳動物における炎症を緩和させるための方法であって、4-1 BB L 遮断薬を該哺乳動物に投与する工程を含む方法である。治療有効量の遮断薬を投与できる。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、ヒト、マウス、ウサギ、ブタまたはウマである。

【0015】

本発明の別の態様は、4-1 BB L 遮断薬についてスクリーニングを行う方法であって、(a) 4-1 BB L を発現する細胞を候補薬剤と接触させる工程と、(b) 該候補薬剤が炎症性サイトカインの産生を減少させるかどうか、または該候補薬剤が 4-1 BB L オリゴマー化を防止するかどうかを判定する工程とを含み、該候補薬剤が、炎症性サイトカインの産生を減少させるか、4-1 BB L オリゴマー化を防止する場合は、該候補薬剤が 4-1 BB L 遮断薬である方法である。いくつかの実施形態では、炎症性サイトカインは、腫瘍壊死因子もしくは IL-6 である。いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞、マクロファージ、および／または RAW 264.7 細胞である。

【0016】

本発明の別の態様は、4-1 BB L 遮断薬についてスクリーニングを行う方法であって、(a) 候補薬剤を哺乳動物に投与する工程と、(b) 該候補薬剤が、該哺乳動物において、炎症を緩和させるかどうか、または炎症性サイトカインの産生を減少させるかどうかを判定する工程とを含み、該候補薬剤が、該哺乳動物において、炎症を緩和させるか、炎症性サイトカインの産生を減少させる場合は、該候補薬剤が 4-1 BB L 遮断薬である方法である。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、炎症状態を有する。いくつかの実施形態では、炎症性サイトカインは、腫瘍壊死因子もしくは IL-6 である。いくつかの実施形態では、炎症性サイトカインの産生は、20%、25%、30% もしくは 30% 以上減少する。いくつかの実施形態では、哺乳動物は、マウス、ラット、ウサギ、またはブタである。

【0017】

本発明のいくつかの実施形態では、4-1 BB L は、哺乳動物 4-1 BB L である。いくつかの実施形態では、4-1 BB L は、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタまたはウマの 4-1 BB L である。いくつかの実施形態では、4-1 BB L は、配列番号 1 または 2 に示される配列を有する。いくつかの実施形態では、遮断薬は、4-1 BB L に対して特異的なキメラ抗体またはヒト化抗体である。いくつかの実施形態では、遮断薬は配列番

10

20

30

40

50

号10～15、22～38、および45～56からなる群より選択される配列を有するオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、遮断薬は、ヒト4-1BB Lに結合する可溶性4-1BBである。いくつかの実施形態では、可溶性4-1BBは、ヒト4-1BBポリペプチドのアミノ酸23からアミノ酸186、マウス4-1BBポリペプチドのアミノ酸24からアミノ酸187、ヒト4-1BBポリペプチドのアミノ酸1からアミノ酸186、またはマウス4-1BBポリペプチドのアミノ酸1からアミノ酸187に対応する配列を有する。いくつかの実施形態では、遮断薬は、配列番号7、8、20または21の配列を有する可溶性4-1BBである。いくつかの実施形態では、炎症性サイトカインは、腫瘍壊死因子もしくはIL-6である。

【0018】

10

別段の規定がない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明の属する分野の当業者であれば一般に理解する意味と同一の意味を有する。本発明を实践するためには本明細書に記載したものと類似もしくは同等の方法および材料を使用できるが、以下では、適切な方法および材料について記載する。本明細書に言及したすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、全体として参照することにより本明細書の一部をなすものとする。アミノ酸の名称は、本発明が属する分野の当業者であれば一般に理解する正式名称、3文字、もしくは1文字名称を含むことができる。不一致がある場合は、用語の定義を含む本明細書が優先されることになる。さらに、材料、方法、および実施例は、例示することのみを目的とし、限定することは意図されていない。

【0019】

20

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

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1A-Dは、4-1BB LがTLR4-相互作用タンパク質であることを示す結果を表す図である。(A) ヒスチジンが欠如する培地上での、TLR4のアミノ酸653～839および4-1BB Lのアミノ酸5～254 (クローン1)、4-1BB Lのアミノ酸3～254 (クローン2)、ドミナントネガティブp38α (AF)、p53またはLaminをコードする発現プラスミドでトランスフェクトした酵母細胞の増殖。4-1BB Lは、TLR4細胞内ドメインと相互作用するが、非関連タンパク質は相互作用しない。(B) トランスフェクションの24時間後に溶解した、空のプラスミド (対照) または赤血球凝集素タグ付き4-1BB L (HA-4-1BB L) およびFlagタグ付きTLR4またはIL-3Rを発現するプラスミドでトランスフェクトした293T細胞のイムノアッセイを示す。溶解物の3分の2は、抗赤血球凝集素 (HA) を用いて免疫沈降 (IP) させられた。TLR4は、4-1BB Lによって沈降したが、IL-3Rは沈降しなかった。(C) GFPタグ付き4-1BB LおよびFlagタグ付きTLR4、細胞質ドメインが欠損しているTLR4 (TLR4-ΔCyt)、細胞外ドメイン (TLR4-ΔExt) が欠損しているTLR4またはIL-3R (左側) またはMycタグ付きTLR4もしくはP712H置換を伴うTLR4 (TLR4-P712H、右側) を発現するプラスミドでトランスフェクトした293T細胞のイムノアッセイを示す。溶解物は、抗Flagもしくは抗Mycを用いて免疫沈降させた。TLR4細胞内ドメインは4-1BB Lとの相互作用に関係し、TLR4 ToI1-IL-IRドメインの別個の部分が4-1BB LおよびMyD88と相互作用する。(D) Flagタグ付きTLR4およびGFP単独もしくはGFPタグ付き4-1BB L、細胞質ドメインが欠損している4-1BB L (4-1BB L-ΔCyt)、細胞外ドメインが欠損する4-1BB L (4-1BB L-ΔExt) または細胞質ドメインのみを含有する4-1BB L (4-1BB L-Cyt) を発現するプラスミドでトランスフェクトした293T細胞のイムノアッセイを示す。4-1BB LがTLR4と相互作用するためには、4-1BB Lの細胞質ドメインおよび細胞膜との会合が必要とされる。IPは免疫沈降法であり、IBは免疫ブロット法である。結果は、2～3回の独立した実験を表している。

30

40

50

【図 2】図 2 A-D は、4-1 BBL のインビボでの阻害作用を示す結果を表す図である。(A) 0.5 mg/25 g (体重) の LPS を腹腔内注射した野生型マウスおよび 4-1 BBL 欠損マウスの生存率を示す。4-1 BBL KO (ノックアウト) マウスは、LPS の致死作用に対して耐性であった。アイソタイプ対照である IgG2a もしくは抗 4-1 BBL (250 μ g/25 g (体重)) と一緒に 300 μ g/25 g (体重) の LPS (B) もしくは 500 μ g/25 g (体重) の LPS (C) を腹腔内注射した野生型マウスの生存率を示す。LPS が野生型マウスに及ぼす致死作用は、抗 4-1 BBL の投与によって軽減された。(D) LPS を注射した野生型マウスもしくは 4-1 BBL 欠損マウス由来の血清中の TNF についての ELISA を示す。LPS 誘導性 TNF 産生は、野生型マウスと比較して 4-1 BBL KO マウスでははるかに低かった。(A) および (B) では対数順位検定を使用した。(A) では $P=0.0017$ であり、(B) の左側パネルでは $P=0.018$ であり、(B) の右側パネルでは $P=0.048$ である。(C) におけるデータは、平均値 $\pm$ s.d. として表示した。* は $P<0.005$ であり、** は $P<0.001$ である (スチューデント t 検定)。

【図 3】図 3 A-H は、LPS 刺激マクロファージ中の持続的 TNF 産生のために 4-1 BBL が必要とされることを示す結果を表す図である。(A) 未処置で放置した (なし) 野生型 (WT) 腹腔マクロファージもしくは 4-1 BBL 欠損 (4-1 BBL KO) 腹腔マクロファージ、または 24 時間かけて LPS (100 ng/mL、LPS) で処置した野生型腹腔マクロファージもしくは 4-1 BBL 欠損腹腔マクロファージの培養培地中の TNF、IL-6、IL-1 β または IL-12 の p40 鎖 (IL-12 p40) の ELISA を示す。右下、IL-1 β (10 ng/mL、対照) によって誘導された IL-6 の産生。4-1 BBL 欠損マクロファージは、野生型マクロファージより少ない TNF、IL-6 および IL-12 を産生した。(B および C) 野生型マクロファージおよび 4-1 BBL 欠損マクロファージ (B) または LPS で処置した 4-1 BBL 欠損マクロファージ (4-1 BBL KO、C) の培養培地中での TNF についての ELISA (時間、横軸) を示す。4-1 BBL は LPS 刺激後の後期に TNF 産生のために必須であったが、4-1 BBL は持続的 LPS 誘導性 TNF 産生を促進するために必要とされなかった。(D) LPS で処置した野生型および 4-1 BBL 欠損マクロファージによる TNF の mRNA の定量的 PCR を示す。AU は任意単位を示す。TNF の mRNA は、LPS 刺激の 2 時間後に 4-1 BBL 欠損マクロファージおよび野生型マクロファージと同様の量でピークに達したが、LPS 刺激後の後期には 4-1 BBL 欠損細胞では野生型マクロファージにおける TNF の mRNA の量がはるかに少なかった。(E) LPS で刺激した野生型マクロファージおよび 4-1 BBL 欠損マクロファージ中の TNF およびグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH、対照) の転写速度についての核ランオン分析の RNA ドットプロット (100 ng/mL、時間は上方のレーン) を示す。LPS は、4-1 BBL 欠損および野生型のマクロファージ両方における LPS 刺激 1 時間後に Tnf 転写を誘発したが、Tnf 転写は LPS 処置後の後期には 4-1 BBL 欠損マクロファージ中では減少した。(F) LPS 刺激の 3 時間後の野生型マクロファージおよび 4-1 BBL 欠損マクロファージにおける TNF の mRNA の安定性についてのリアルタイム PCR 解析を示す。転写を阻害するためにアクチノマイシン D (10 μ g/mL) を使用した。数値は、0 時間 (100% に設定) での数値に対する残留率である。4-1 BBL の欠損は、TNF の mRNA の安定性に相当に大きな影響を及ぼした。(G) 放射性標識プローブ (左端) を用いて評価した、LPS で刺激した野生型マクロファージおよび 4-1 BBL 欠損マクロファージからの核抽出物の ELISA (時間、上方レーン) を示す。4-1 BBL 欠損は、LPS 誘導性 NF- κ B 活性化または転写因子 AP-1 の LPS 誘導性活性化に影響を及ぼさなかった。(H) 野生型または LPS で処置した 4-1 BBL 欠損マクロファージの溶解物のイムノプロット (時間、上方のレーン) を示す。NF- κ B および MAP キナーゼ経路は、4-1 BBL 欠損によって有意な影響を受けなかった。p- はリン酸化を示す。対照と対比して、* は $P<0.01$ であり、** は $P<0.005$ である (スチューデント t 検定)。データは 3 回の平均値 $\pm$ s.d. (A~D) であり

、2～3回の実験（A～H）を表している。

【図4】図4A～Dは、4-1BBLがRAW264.7マクロファージにおける持続的TNF産生のために必要とされることを示す結果を表す図である。（A）RAW264.7細胞は、対照siRNA、または4-1BBL-siRNA#1もしくは4-1BBL-siRNA#2を含むpSuppressorを用いて安定的にトランスフェクトした。4-1BBLのタンパク質レベルは、免疫ブロット法によって測定した。（B）TNF産生を指定の時間において、LPS（100ng/mL）で処置した対照細胞および4-1BBLノックダウン細胞中で測定した。（C）TNF産生を、ペプチドグリカン（PG、10μg/mL）、ポリI:C（25μg/mL）、LPS（100ng/mL）、CpG（5μg/mL）、もしくは培養培地で24時間かけて処置した対照細胞および4-1BBLノックダウン細胞中で測定した。いずれのsiRNAもRAW264.7細胞中の4-1BBL発現を効果的にノックダウンし（A）、LPSおよび他のTLRリガンド誘導性TNF産生を阻害した（BおよびC）。4-1BBLは、I-κB-α分解に反映されるようにRAW264.7細胞におけるLPS誘導性NF-κB活性化に何の役割も果たさなかった（D）。データは、2回ずつ実施した3例の独立した実験の平均値±s.d.として表示した。対照と対比して、*はP<0.05であり、**はP<0.01である。（a）における結果は、3例の実験を表している。

【図5】図5A～Bは、4-1BBがRAW264.7マクロファージ中のLPS誘導性TNF産生に関係していないことを示す結果を表す図である。（A）RAW264.7細胞は、対照siRNA、4-1BB-siRNA#1もしくは4-1BB-siRNA#2を含むpSuppressorを用いて安定的にトランスフェクトした。4-1BBのmRNAはRT-PCRによって試験した。（B）TNF産生を24時間にわたるLPS（100ng/mL）処置後に対照および4-1BBノックダウン細胞中で測定した。低分子干渉RNAはRAW264.7細胞における4-1BB産生を効果的にノックダウンしたが（A）、LPS誘導性TNF産生に及ぼす作用は観察されなかった（B）。データは、2回ずつ実施した3例の独立した実験の平均値±s.d.として表示した。

【図6】図6A～Dは、4-1BBLがマクロファージ中のTLRリガンド誘導性TNF産生に関係していることを示す結果を表す図である。（A）293T細胞は、Flag-TLR2、Flag-TLR3、Flag-TLR4、もしくはFlag-TLR9と一緒に、空の発現ベクター（対照）またはHA-4-1BBL発現ベクターを用いてトランスフェクトした。細胞は、トランスフェクションの24時間後に溶解した。細胞溶解物は抗Flag抗体を用いて免疫ブロットするか、抗HAを用いて免疫沈降させて抗HAおよび抗Flag抗体を用いて免疫ブロットした。試験した全TLRは、共免疫沈降アッセイにおいて4-1BBLによって沈降した。（B）野生型マクロファージおよび4-1BBL欠損マクロファージは、Pam3（1μg/mL）、ポリI:C（25μg/mL）、LPS（100ng/mL）、R848（100nM）、CpG（5μg/mL）、IL-1β（10ng/mL）、または培養培地（なし）を用いて処置した。TNF産生は、処置24時間後に測定した。TNFのPam3（TLR2リガンド）、ポリI:C（TLR3リガンド）、R848（TLR7&8リガンド）、CpG（TLR9リガンド）誘導性産生は、4-1BBL KO細胞中では減少した。（C）野生型マクロファージおよびTLR4欠損マクロファージは0、1、2、5もしくは5μg/mLのCpG DNAで処置し、24時間かけてインキュベートするか、（D）1μg/mLのCpGのDNAで処置し、培養上清を指定の時点で採取してTNF産生を測定した。低用量のCpG（1μg/mL）を使用した場合は、TLR4欠損マクロファージ中のTLR9誘導性TNF産生における小規模ではあるが統計学的に有意な減少が見られた。データは、3回行った実験の平均値±s.d.として表示した。*はP<0.05であり、**はP<0.01であり、***はP<0.005である。結果は、2～4回の実験を表している。

【図7】図7A～Fは、4-1BBL誘導および細胞表面局在がLPS処置マクロファージ中での持続的TNF産生のために必要とされることを示す結果を表す図である。（A）LPSで処置した、野生型マクロファージおよびTLR4（TLR4 KO）、MyD8

8 (MyD88 KO) または TRIF (TRIF KO) が欠損するマクロファージからの溶解物中の 4-1 BBL の免疫プロット (時間、上方のレーン) を示す。LPS は、TLR4、MyD88、および TRIF に依存的にマクロファージ中の 4-1 BBL の迅速な発現を誘導する。(B) 前処理を行わずに放置 (なし)、または 1 時間かけて NF- κ B (20 μ M のスルファサラジン)、p38 (10 μ M の SB203580)、Jnk (5 μ M の SP600125) もしくは MEK (10 μ M の PD98059) の阻害剤を用いて前処置して、次に LPS を用いて処置した野生型マクロファージ中の 4-1 BBL mRNA の半定量 PCR (時間、上方のレーン) を示す。LPS 誘導性 4-1 BBL mRNA は、NF- κ B 阻害剤であるスルファサラジンおよびプロテアソーム阻害剤 MG-132 (データは示していない) によって効果的に阻害された。さらに、p38 阻害剤 SB203580、Jnk 阻害剤 SP600125、および Mek 阻害剤 PD98059 もまた 4-1 BBL 発現に対しある程度の阻害作用を示していた。(C) 4-1 BBL をコードする組換えアデノウイルス (Adv) による感染 18 時間後の LPS 誘導性 4-1 BBL mRNA (処置 1 時間、LPS) もしくは異所的に発現した 4-1 BBL mRNA の安定性についてのリアルタイム PCR 解析を示す。転写を阻害するためにアクチノマイシン D を使用した。数値は、0 時間 (100% に設定) での数値に対する残留率である。mRNA の安定性における LPS 誘導性の変化もまた LPS 誘導性 4-1 BBL 発現に関係していた。(D) LPS を用いて処置した野生型腹腔マクロファージによる 4-1 BBL 発現のフローサイトメトリー (時間、キー) を示す。右は表面での発現を示し、左は 0.1% サポニンで透過性にされた細胞中の全発現を示す。LPS 誘導性 4-1 BBL は、細胞表面上に局在する。(E) 1 時間かけてブレフェルジン A (3 μ g/mL) を用いて (+) または用いずに (-) プレインキュベートし、次に LPS で処置し (時間、左端)、抗 4-1 BBL で免疫染色した野生型腹腔マクロファージの免疫蛍光顕微鏡検査を示す。原倍率は 100 倍である。ブレフェルジン A は、小胞体からゴルジ (Golgi) 装置への転位を阻害することによって細胞表面へのタンパク質転位を遮断する。(F) E において記載した方法で処置した細胞の溶解物中の 4-1 BBL および TNF の mRNA の半定量 PCR を示す。ブレフェルジン A は、1 時間後における 4-1 BBL mRNA の LPS 誘導性増加にも LPS 誘導性 TNF mRNA にも影響を及ぼさなかったが、2、4 および 6 時間後には TNF mRNA を減少させた。GAPDH (A、B、F) はグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ (ローディング対照) である。データは、3 例の独立した実験を表している。

【図 8】図 8 A-F は、TLR リガンドはマクロファージ中の 4-1 BBL 発現を誘導するが、IL-1 β は誘導しないことを示している結果を表す図である。野生型マクロファージは、指定の時間にわたって、LPS、IL-1 β 、ポリ I:C、ペプチドグリカン、CpG DNA、または R848 で処置した。何も処置していない細胞 (なし)、または LPS、もしくは IL-1 β で処置した細胞の培養上清を採取し、IL-6 レベルを ELISA によって測定した。(B) におけるデータは、3 回の実験の平均値 $\pm$ s.d. として表示した。4-1 BBL の発現は、抗 4-1 BBL 抗体を用いたウェスタンブロット法によって分析した。GAPDH を対照として使用した。結果は、2~3 回の実験を表している。

【図 9】図 9 A-G は、4-1 BBL の発現および架橋結合が TNF 産生を誘発することを示す結果を表す図である。様々な用量 (上方レーンおよび横軸) のなし (対照) もしくは 4-1 BBL を発現するアデノウイルスで感染させた野生型マクロファージ (A)、野生型および 4-1 BBL 欠損マクロファージ (B)、野生型および TLR4 欠損マクロファージ (C)、野生型および TLR2 欠損マクロファージ (D) または野生型および TRIF 欠損マクロファージ (E) による 4-1 BBL の免疫プロット (上方)、ならびに TNF 産生の ELISA (下方) を示す。PFU はプラーク形成単位である。4-1 BBL 発現は、用量依存的に TNF 産生を誘導し (A)、4-1 BBL を必要としなかった (B)。TNF 誘導は TLR4-マウスから単離したマクロファージ中では部分的に低下し (C)、TLR2 欠損マクロファージ中では低かった (D)。TRIF 欠損症が 4-1 BBL

L誘導性TNF産生に影響を及ぼさなかったので(E)、TNF誘導はTRIFとは無関係であった。(F)野生型マクロファージ、またはヤギ抗ヒト(抗Fc、 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)、 $4-1\text{BB}-\text{Fc}$ ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$)を培養培地と一緒にもしくは培養培地を単独(なし)で用いて24時間かけて処置し、 $4-1\text{BBL}$ 、MyD88、TRIF、TLR2、TLR4、またはMyD88とTRIFとの両方が欠損するマクロファージによるTNFについてのELISAを示す。TNF産生を誘発するためには、2つより多い $4-1\text{BBL}$ 分子の架橋結合が必要とされる。(G)培養培地(なし)、あるいはLPS単独またはLPSと、Fc、 $4-1\text{BB}-\text{Fc}$ もしくは抗 $4-1\text{BBL}$ ($\alpha-4-1\text{BBL}$ 、0、2もしくは $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、各々計 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に加えたアイソタイプ抗体IgG2aとともに)との組み合わせと、24時間インキュベートした野生型マクロファージによるTNF産生についてのELISAを示す。 $4-1\text{BB}-\text{Fc}$ および抗 $4-1\text{BBL}$ 抗体は、LPS誘導性のTNF産生を阻害した。対照と対比して、*は $P<0.05$ であり、**は $P<0.01$ であり、***は $P<0.005$ である(スチューデントt-検定)。データは3例ずつのサンプルの平均値 $\pm$ s.d.であり、2~4例の実験を表している。

【図10】図10A-Iは、2つの連続するTLR4複合体が存在することを示す図である。(A)LPSで処置した野生型マクロファージのイムノアッセイ(時間、上方のレーン)を示す。全細胞溶解物(溶解物、上)または抗TLR4、抗MyD88もしくは抗 $4-1\text{BBL}$ を用いて免疫沈降させた溶解物は、抗 $4-1\text{BBL}$ 、抗TLR4および/または抗MyD88を用いた免疫ブロット法によって分析した。破線はアイソタイプ抗体(免疫沈降法における陰性対照)であり、実線は $4-1\text{BBL}$ もしくはMyD88の免疫ブロットにおける陽性対照である。LPS処置マクロファージでは、MyD88-TLR4複合体は初期細胞応答の原因であり、 $4-1\text{BBL}-\text{TLR4}$ 複合体は持続的TNF産生に関係している。(B)Flag-TLR4は、MyD88によって沈降したがFlag- $4-1\text{BBL}$ によっては沈降しないので、これはMyD88が $4-1\text{BBL}$ とは相互作用できないことを示している。(C) $4-1\text{BBL}$ は、TRAF6とは相互作用するが、TRAF2とは相互作用しない。(D)TRAF6のノックダウンは、LPS、ポリI:C、およびIL-1 β 誘導性サイトカイン産生を低下させたが、TNF誘導性IL-6産生には影響を及ぼさない。(E)放射性標識プローブ(左端)を用いて分析した、GFP(Adv-GFP)もしくは $4-1\text{BBL}$ (Adv- $4-1\text{BBL}$)を発現するアデノウイルスで感染させた野生型マクロファージからの核抽出物のEMSA(時間、上方のレーン)を示す。LPS(右下)は、LPS処置サンプル(NF- κ Bに対する陽性対照)である。 $4-1\text{BBL}$ の発現はCREBおよびC/EBPを活性化させたが、NF- κ Bは活性化させなかった。(F)Eに記載した方法で処置した細胞の全溶解物中の様々なタンパク質(左端)の免疫ブロットを示す。(G) $4-1\text{BBL}$ を発現するアデノウイルスで感染させた野生型マクロファージによるTNF産生についてのELISAを示す。野生型マクロファージは感染6時間後にNF- κ B($20 \mu\text{M}$ スルファサラジン)、p38($10 \mu\text{M}$ のSB203580)、Jnk($5 \mu\text{M}$ のSP600125)もしくはMEK($10 \mu\text{M}$ のPD98059)の阻害剤で処置し、感染24時間後に分析した。対照と対比して、*は $P<0.01$ であり、**は $P<0.005$ である(スチューデントt-検定)。

(H)上は、 $4-1\text{BBL}$ を発現するアデノウイルスで感染させた野生型マクロファージ中のTNF mRNAの半定量PCR(時間、上方のレーン)を示す。下は、アデノウイルスを用いて18時間かけて感染させた野生型マクロファージ、またはLPSを用いて1時間かけて処置した野生型マクロファージ中のTNF mRNAの安定性を示す。転写を阻害するためにアクチノマイシンDを使用した。数値は、0時間(100%に設定)での数値に対する残留率である。データは、3回行った平均値 $\pm$ s.d.を表し(G)、2例(A、G、H)、3例(E)または4例(F)の実験を表している。IkB α の分解は、 $4-1\text{BBL}$ を過剰発現する細胞中では観察されなかった(F)。 $4-1\text{BBL}$ の発現はp38、JnkおよびErkのある程度のリン酸化を誘発し(F)、そしてp38、JnkおよびErkの阻害は $4-1\text{BBL}$ 媒介性TNF産生を減少させた(しかしNF- κ Bは減少させなかった)(G)。 $4-1\text{BBL}$ の欠損は後期において低いLPS誘導性TNF

10

20

30

40

50

F mRNA 転写を生じさせたが、4-1 BBL 過剰発現はより多くの TNF mRNA を生じさせた (H)。TNF 転写産物は 4-1 BBL を過剰発現する細胞および LPS 処置細胞中で類似の半減期を有していた (H)。(I) LPS 処置マクロファージ中の連続シグナリングのモデルを示す。TLR 4-LPS の連結反応は、数時間以内に TNF を含む炎症遺伝子の MyD88 および TRIF に依存性の発現を導く。4-1 BBL はこの早期応答によって誘導され、細胞表面へ転位し、そこで TLR と相互作用して、TNF などの炎症遺伝子の持続発現についてのシグナリングを開始する。

【図 11A-F】IL-6 の誘導における 4-1 BBL の関与を例示するデータを要約している図である。4-1 BBL-ノーマウスは、LPS に応答して野生型マウスより有意に少ない IL-6 を産生する (A)。野生型マウスからのマクロファージは、4-1 BBL-ノーマウスからのマクロファージより有意に多い IL-6 を産生した (B)。Pam3、ポリ I:C、LPS、R848、および CpG で処置した野生型マクロファージは、同一の誘導因子で処置した 4-1 BBL-ノーマクロファージより有意に多い IL-6 を産生した (C)。LPS および 4-1 BBL-Fc とともにインキュベートしたマクロファージは、LPS 単独とともにインキュベートしたマクロファージより有意に少ない IL-6 を産生し、LPS および増加する濃度の抗 4-1 BBL 抗体とともにインキュベートしたマクロファージは、減少するレベルの IL-6 産生を示した (D)。4-1 BBL 発現が 4-1 BBL-特異的 siRNA によって減少する RAW264.7 細胞は、対照 siRNA を用いて処置した RAW264.7 細胞より有意に少ない IL-6 を産生する (E)。4-1 BBL の発現が 4-1 BBL-特異的 siRNA によって減少する細胞であって、ペプチドグリカン (PG、10 µg/mL)、ポリ I:C (25 µg/mL)、LPS (100 ng/mL)、CpG (5 µg/mL) で処置した細胞は、対照 siRNA でトランスフェクトした細胞であって、ペプチドグリカン (PG、10 µg/mL)、ポリ I:C (25 µg/mL)、LPS (100 ng/mL)、CpG (5 µg/mL) で処置した細胞より有意に少ない IL-6 を産生する (図 11F)。

【図 12】マウス 4-1 BBL (A) およびヒト 4-1 BBL (B) の構造ドメインを示す概略図である。「Cyt」は細胞質ドメインを示し、「TM」は膜貫通ドメインを示し、「Ext」は細胞外ドメインを示し、そして「Sig」はシグナルペプチドを示している。

【図 13】マウス 4-1 BBL (A)、ヒト 4-1 BBL (B)、および可溶性マウス 4-1 BBL-ヒト Ig-Fc 融合タンパク質 (C) の構造ドメインを示す概略図である。「Cyt」は細胞質ドメインを示し、「TM」は膜貫通ドメインを示し、「Ext」は細胞外ドメインを示し、そして「Sig」はシグナルペプチドを示している。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、マクロファージ活性化における前炎症性サイトカインの産生において 4-1 BBL リガンド (4-1 BBL) が果たす役割の発見に関連している。詳細には、本発明は、4-1 BBL が後期シグナリング事象において作用し、過剰持続性炎症を導く TNF などの炎症性サイトカインの持続的産生を生じさせるという発見に関連している。後期サイトカイン産生における 4-1 BBL の機能は、4-1 BBL とは無関係である。したがって、本発明は、4-1 BBL に非依存的に TNF および IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を減少させるための方法において使用可能な 4-1 BBL 遮断薬、ならびにそのような遮断薬を含む医薬組成物および製品を提供する。本発明は、炎症を緩和させるための方法、炎症性サイトカインの産生を減少させるための方法、ならびに 4-1 BBL 遮断薬についてスクリーニングを行うための方法を提供する。

【0022】

[4-1 BBL ポリペプチドおよび核酸]

本明細書に記載した試験は、マクロファージ中での TNF 発現の初期誘導および持続的 TNF 産生が早期および後期のシグナリング事象によって調節されることを示している。マクロファージ中での Toll 様受容体 (TLR) 4-媒介性 TNF 産生は一般には数時

10

20

30

40

50

間以内に発生し、ほぼ1日間にわたり持続する（例えばGalanos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5939-43 (1979)を参照されたい）。持続的TNF産生は、細胞表面4-1BBリガンド（4-1BBL）によって制御される後期TLRシグナリングを含む。4-1BBLは骨髄分化一次応答遺伝子88（MyD88）およびToll/インターロイキン-1受容体/耐性アダプタータンパク質（TRIF）とは無関係に機能するが、TNF受容体関連因子6（TRAF6）には依存する。したがって、シグナルソームTLR4/MyD88/TRIFは炎症遺伝子の開始および早期発現の原因であり、4-1BBLは後期の持続的TNF産生の原因である。4-1BBLは、炎症性刺激に応答するマクロファージ中の早期誘導性タンパク質の1つであり、マクロファージ活性化の早期においてのみ誘導される。新規に合成した4-1BBLは細胞表面上に転位して後期持続的TNF産生のための新規のシグナリング期を引き起こす。そこで、例えば、TNFもしくはIL-6などの炎症性サイトカインの過剰産生に関連する疾患、または、持続的炎症反応の調節におけるその他の機能停止に関連する疾患は、4-1BBLポリペプチドの活性もしくは4-1BBL核酸からの発現を阻害もしくは減少させることができる薬剤で治療することができる。

10

【0023】

4-1BBL（4-1BBリガンド）は、例えば活性化B細胞およびマクロファージなどの活性化した抗原提示細胞上で発現するII型細胞表面糖タンパク質のTNFファミリーのメンバーである。4-1BBLポリペプチドは当分野において公知であり、例えば、マウス、ウサギ、ブタ、イヌ、ウシ、サル、またはヒト由来のような、任意の起源由来であってもよい。マウス4-1BBLポリペプチドの1つの例は、以下である（GenBankアクセッション番号：NP_033430）。

20

【化1】

```

1 MDQHTLDVED TADARHPAGT SCPSDAALLR DTGLLADAAL LSDTVRPTNA
51 ALPTDAAYPA VNVRDREAAW PPALNFCSRH PKLYGLVALV LLLLIAACVP
101 IFTRTEPRPA LTITTSPNLG TRENNADQVT PVSHIGCPNT TQQGSFVFAK
151 LLAKNQASLC NTTLNWHSQD GAGSSYLSQG LRYEEDKKEL VVDSPGLYYV
201 FLELKLSPTF TNTGHKVQGW VSLVLQAKPQ VDDFDNLALT VELFPCSMEN
251 KLVDRSWSQL LLLKAGHRLS VGLRAYLHGA QDAYRDWELS YPNTTSFGLF
301 LVKPDNPWE (配列番号1)

```

30

【0024】

ヒト4-1BBLポリペプチドの1つの例は、以下（GenBankアクセッション番号：P41273）である。

【化2】

```

1 MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA
51 CPWAVSGARA SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV
101 LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR
151 RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA LTVDLPPASS EARNSAFGFQ
201 GRLLHLSAGQ RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV TPEIPAGLPS
251 PRSE (配列番号2)

```

40

【0025】

4-1BBLは、機能もしくは配列に基づいて同定できる。例えば、本発明は、一部には、マクロファージ中において、4-1BBLが4-1BBとは無関係にTNF産生を媒介するという発見に基づいているが、4-1BBLは、T細胞受容体の活性化時に共刺激シグナルを生成するために活性化CD4およびCD8 T細胞上で発現した膜貫通タンパク質のTNF受容体スーパーファミリーのメンバーである4-1BBと相互作用することも公知である。Watts, Annu. Rev. Immunol. 23:23-68 (2005)。さらに、ヒトおよびマウスの4-1BBLの機能的ドメインを、図12に示している。

50

【0026】

本明細書で使用する「4-1 B B L」もしくは「4-1 B B L ポリペプチド」は、全長ポリペプチドの任意の生物活性フラグメント、ならびに生物活性4-1 B B Lに対する抗体を生ぜしめるための免疫原として使用するために適切な任意のフラグメントを含む。したがって、4-1 B B L ポリペプチドは、配列番号1または2に示す配列と実質的に同一であるアミノ酸配列を有していてもよい。一般に、用語「実質的に同一」は、アミノ酸配列が参照配列とは保存的アミノ酸置換のみが、例えば1つのアミノ酸と他の同一クラスのアミノ酸（例、バリンとグリシン、アルギンとリシン）との置換のみが、もしくはそのタンパク質の機能を破壊しないアミノ酸配列の位置に局在する1つ以上の非保存的置換、欠損もしくは挿入のみが相違することを意味する。ポリペプチド（もしくは核酸）配列は、それが参照配列と約50%の相同性、例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または95%以上の相同性を示す場合は、その参照配列と実質的に同一である。4-1 B B L ポリペプチドは、例えば、配列番号1および2と少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%または90%以上同一である場合がある。

10

【0027】

4-1 B B L 核酸は、4-1 B B L ポリペプチドをコードするDNAもしくはRNAのポリマーである。4-1 B B L 核酸は、ゲノムDNAならびにメッセンジャーRNAであってもよい。4-1 B B L 核酸は、プラスミドベクターもしくはウイルスDNA内に組み込むことができる。4-1 B B L 核酸は、一本鎖もしくは二本鎖、環状もしくは直鎖状であってもよい。4-1 B B L 核酸の例には、制限なく、配列番号1および2に規定したマウスおよびヒトの4-1 B B L ポリペプチド配列をコードするものが含まれる。マウス4-1 B B L ポリペプチド（配列番号1）をコードする4-1 B B L 核酸の例は、アクセッション番号NM_009404を付与してGenBankにおいて見いだすことができる以下の配列である。

20

【化3】

```

1  atggaccagc acacacttga tgtggaggat accgcggatg ccagacatcc
51  agcagggtact tcgtgcccct cggatgcggc gctcctcaga gataccgggc
101 tcctcgcgga cgctgcgctc ctctcagata ctgtgcgccc cacaaatgcc
151 gcgctcccca cggatgctgc ctaccctgcg gttaatgttc gggatcgcga
201 ggccgcgtgg ccgcctgcac tgaacttctg ttcccgccac ccaaagctct
251 atggcctagt cgctttggtt ttgctgcttc tgatcgccgc ctgtgttctt
301 atcttcaccc gcaccgagcc tcggccagcg ctcaaatca ccacctcgcc
351 caacctgggt acccgagaga ataatgcaga ccaggtcacc cctgtttccc
401 acattggctg ccccaacact acacaacagg gctctcctgt gttcgccaag
451 ctactggcta aaaaccaagc atcgttgtgc aatacaactc tgaactggca
501 cagccaagat ggagctggga gctcatacct atctcaaggt ctgaggtacg
551 aagaagacaa aaaggagtgt gtggtagaca gtcccgggct ctactacgta
601 ttttttgaac tgaagctcag tccaacattc acaaacacag gccacaaggt
651 gcagggctgg gtctctcttg ttttgcaagc aaagcctcag gtagatgact
701 ttgacaactt ggccctgaca gtggaactgt tcccttgctc catggagaac
751 aagttagtgg accgttcctg gagtcaactg ttgctcctga aggctggcca
801 ccgcctcagt gtgggtctga gggcttatct gcatggagcc caggatgcat
851 acagagactg ggagctgtct tatcccaaca ccaccagctt tggactcttt
901 cttgtgaaac ccgacaaccc atgggaatga (配列番号3)

```

30

40

【0028】

ヒト4-1 B B L ポリペプチド（配列番号2）をコードする4-1 B B L 核酸の例は、アクセッション番号U03398を付与してGenBankにおいて見いだすことができる以下の配列である。

【化 4】

```

1  gtcattggaat acgcctctga cgtttcactg gacccccgaag ccccgtagggc
51  tccccgcgcc cgcgctcgcg cctgcccgtg actgccttgg gccctgggtcg
101 cggggctgct gctgctgctg ctgctcgctg ccgcctgcgc cgtcttccctc
151 gcctgcccct gggccgtgtc cggggctcgc gcctcgcccg gctccgcggc
201 cagccccgaga ctccgcgagg gtcccagact ttcccccac gatccgcgcg
251 gcctcttgga cctgcggcag ggcattgttg cgcagctggg ggcccaaat
301 gttctgctga tcgatgggccc cctgagctgg tacagtgacc caggcctggc
351 aggcgtgtcc ctgacggggg gcctgagcta caaaggaggc acgaaggagg
401 tgggtgggtgg caaggctgga gtctactatg tcttctttca actagagctg
451 cggcgcggtg tggccggcga gggctcaggc tccgtttcac ttgcgctgca
501 cctgcagcca ctgcgctctg ctgctggggc cgcgccttg gctttgaccg
551 tggacctgcc acccgccctc tccgaggctc ggaactcggc cttcggtttc
601 cagggcgcgt tgcctgcact gaggcgccgc cagcgccctg gcgtccatct
651 tcacactgag gccagggcac gccatgcctg gcagcttacc cagggcgcca
701 cagtccttgg actcttccgg gtgacccccg aaatcccagc cggactccct
751 tcaccgaggt cgggaataacg ccagcctgg gtgcagccca cctggacaga
801 gtccgaatcc tactccatcc ttcatggaga cccctgggtg tgggtccctg
851 ctgctttctc tactcaagg ggcttggcag gggctccctg tgcctgacctc
901 ccttgaggga cctcctcac ccaactcctc cccaagttgg acctgatata
951 ttattctgag cctgagctca gataatatat tatatatatt atatatatat
1001 atatatattct atttaaagag gatcctgagt ttgtgaatgg acttttttag
1051 aggagttggt ttgggggggg ggtcttcgac attgccgagg ctggtcttga
1101 actcctggac ttagacgac ctctgcctc agcctccaa gcaactggga
1151 ttcactcctt ctattaattc attgtactta tttgcctatt tgtgtgtatt
1201 gagcatctgt aatgtgccag cattgtgccc aggctagggg gctatagaaa
1251 catctagaaa tagactgaaa gaaaatctga gttatggtaa tacgtgagga
1301 atttaaagac tcatccccag cctccacctc ctgtgtgata cttgggggct
1351 agcttttttc tttctttctt ttttttgaga tggctctgtt ctgtcaacca
1401 ggctagaatg cagcggtgca atcatgagtc aatgcagcct ccagcctcga
1451 cctcccagag ctcaggtgat cctcccatct cagcctctcg agtagctggg
1501 accacagttg tgtgccacca cacttggtga actttttaat ttttttgagg
1551 agacgggtatt gctatgttgc caaggttgtt tacatgccag tacaatttat
1601 aataaacact catttttcc (配列番号4)

```

10

20

【0029】

30

4-1 B B L 核酸はさらにまた、その核酸が上記で考察したように4-1 B B L に特異的な抗体を生ぜしめるための免疫原として使用するために適切な生物活性ポリペプチドもしくはフラグメントをコードすることを前提に、配列番号1および2に規定したポリペプチド配列のフラグメントをコードしてもよい。

【0030】

[一般的な4-1 B B L 遮断薬]

4-1 B B L 遮断薬は、4-1 B B L の発現および／または活性を阻害および／または減少させる高分子または低分子であってもよい。4-1 B B L 遮断薬は、4-1 B B L の活性を阻害または減少させることができる。そのような4-1 B B L 遮断薬の例には、4-1 B B L 特異的抗体、4-1 B B の可溶形態、および例えばプレフェルジンAなどの細胞表面へのタンパク質転位を妨害する薬剤もしくは低分子が含まれるが、これらに限定されない。これらの4-1 B B L 遮断薬は、4-1 B B L のオリゴマー化を遮断すること、および／またはTNF産生に関係する後期シグナリング事象において例えばTLRおよびTRAF6などの適切なシグナリング分子との相互作用を妨害するとによって作用する。本明細書で使用する用語「4-1 B B L オリゴマー化」は、例えばTNFもしくはIL-6などの炎症性サイトカインの4-1 B B L 媒介性産生のために必要とされる4-1 B B L 分子の凝集体の形成を意味する。4-1 オリゴマー化は、2つより多い4-1 B B L 分子の凝集体、例えば3つもしくは4つの4-1 B B L 分子の凝集体の形成を意味する。4-1 B B L 遮断薬もまた細胞表面へのタンパク質転位を妨害する場合があるが、これは後期シグナリング期中に適正に機能するためには4-1 B B L の細胞表面局在が必要である

40

50

ためである。

【0031】

4-1BB L遮断薬は、さらに4-1BB L核酸からの発現を阻害または減少させることによって機能することもできる。4-1BB L遮断薬は、細胞が生成する4-1BB Lの量に変化するように、転写レベルもしくは翻訳レベルで作用することができる。4-1BB L遮断薬は、4-1BB LのmRNA転写産物の産生を減少させるか、mRNA転写産物の安定性を減少させることができる。これらの遮断薬には、例えばアンチセンスRNA、siRNAおよびリボザイムなどのオリゴヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。そのようなオリゴヌクレオチドをベースとする4-1BB L遮断薬は、生理学的条件下（例、37℃、pH7〜7.8、および生理的濃度の電解質）またはストリンジェントもしくは高度にストリンジェントな条件下で4-1BB L核酸にハイブリダイズすることができ、そして4-1BB L核酸からの発現を阻害もしくは減少させることができる。これらの遮断薬は、4-1BB Lの発現または活性に関係する他の分子の阻害剤をもまた含むことができる。

10

【0032】

オリゴヌクレオチドは、3ヌクレオチドより長い長さを有するリボースヌクレオチドもしくはデオキシリボースヌクレオチドのポリマーである。オリゴヌクレオチドは天然型ヌクレオチド、合成、修飾、もしくは疑似ヌクレオチド、例えばホスホロチオレート、ならびに例えばP³、²、ビオチンもしくはジゴキシゲニンなどの検出可能な標識を有するヌクレオチドを含むことができる。

20

【0033】

本発明のオリゴヌクレオチドである、4-1BB L核酸の発現を減少させることができるオリゴヌクレオチドは、4-1BB L核酸と完全に相補的であってもよい。代替的には、配列間のある程度の変動性は許容できる。例えば生理的温度および塩濃度の生理的条件下、またはストリンジェントもしくは高度にストリンジェントな条件下で4-1BB L核酸にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドは、4-1BB L核酸の発現を阻害するために十分に相補的である。一般に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、規定のイオン強度およびpHでの特異的配列に対する熱融解点（T_m）より約5℃低く選択される。しかし、ストリンジェントな条件は、本明細書の他の場所で適格とする所望のストリンジェンシー度に依存して、選択した配列の熱融解点より約1℃〜約20℃低い範囲内の温度を含む。例えば、4-1BB Lコーディング配列と正確に相補的である2、3、4、もしくは5ストレッチ以上の連続ヌクレオチドを含み、各々が近接するコーディング配列に対して相補的ではない1ストレッチの連続ヌクレオチドによって分離されている阻害性オリゴヌクレオチドは、4-1BB L核酸の機能を阻害できる。一般に、各ストレッチの連続ヌクレオチドは、長さが少なくとも4、5、6、7、もしくは8ヌクレオチド以上である。非相補的な介入配列は、長さが1、2、3、もしくは4ヌクレオチドであってもよい。当業者であれば、センス核酸にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの計算された融点を使用して、特定の標的核酸の発現を阻害するために許容されるミスマッチ度を容易に推定できる。本発明のオリゴヌクレオチドをベースとする4-1BB L遮断薬には、例えば、低分子干渉RNA（siRNA）、アンチセンス核酸またはリボザイムが含まれる。

30

40

【0034】

4-1BB L遮断薬は、4-1BB Lの発現および／または活性を、例えば、2%、5%、10%、20%、40%、60%、80%、95%または100%などの任意の量阻害または減少させる。4-1BB Lの活性は、例えば、持続的TNF産生についてアッセイする方法、4-1BB LがTLRもしくはTRAF6と相互作用するかどうかを判定する方法、および4-1BB Lが細胞表面に局在するかどうかを判定する方法などの本明細書に記載した方法を含む当分野において公知の方法を使用して判定できるが、これらに限定されない。4-1BB Lの発現は、さらにまた、4-1BB L転写産物のレベルを測定するためのノーザンハイブリダイゼーションまたは4-1BB Lポリペプチドのレベルを

50

測定するためのウェスタンハイブリダイゼーションを含む当分野において公知の方法を用いて測定することもできるが、これらに限定されない。

【0035】

様々なタイプの4-1BB L遮断薬の例については、以下で詳細に考察する。

【0036】

[4-1BB L特異的抗体]

4-1BB L遮断薬は、4-1BB Lポリペプチドに対するアンタゴニスト抗体であり得る。用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、例えばモノクローナル抗体、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分を意味する。モノクローナル抗体は、特定の抗原エピトープと特異的に結合する抗体分子の集団である。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分は、F(ab)およびF(ab')の2フラグメントを含む。抗4-1BB L抗体は、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および／または完全ヒト抗体であり得るが、これらに限定されない。マウス抗体は、完全にマウス起源に由来する抗体、例えばマウス骨髓細胞およびマウスBリンパ球の融合から生成したマウスハイブリドーマに由来する抗体である。キメラ抗体は、非ヒト起源、例えばマウスもしくは霊長類由来の可変領域、およびヒト起源由来の定常領域を有する抗体である。ヒト化抗体は、抗原結合領域、例えばマウス起源由来の相補性決定領域、およびヒト起源由来の残りの可変領域および定常領域を有する。完全ヒト抗体は、ヒト細胞に由来する、またはヒト抗体遺伝子を有するトランスジェニックマウスに由来する抗体である。

【0037】

4-1BB Lポリペプチドに対する抗体は、4-1BB L特異的抗体であり、したがってそれは4-1BB Lではないポリペプチドには結合せずに4-1BB Lポリペプチドに結合することになる。4-1BB L特異的抗体は、適正な4-1BB Lの機能を妨害または遮断する点で、アンタゴニスト抗体である。例えば、図2A～Dを参照されたい。アンタゴニスト抗体は、例えば、2つより多い4-1BB Lのオリゴマー化を妨害してもよく、炎症性サイトカインの産生が減少するように、持続的TNF産生に関係する下流シグナリング分子、例えばTLRもしくはTRAF6への結合を遮断してもよい。例えば、そのようなアンタゴニスト抗体は、2つの4-1BB Lと結合することができ、そしてサイトカイン産生を媒介するために必要とされる2つより多い4-1BB Lの凝集体の形成を防止する。そのようなアンタゴニスト抗体は、さらにまた例えば、サイトカイン産生を媒介するために必要とされるTLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8、TLR9およびTRAF6などの下流シグナリング分子への結合を妨害する部位で4-1BB Lに結合することもできる。

【0038】

抗4-1BB L抗体がアンタゴニスト抗体であるかどうかは、本明細書に記載した方法を用いて判定することができる。例えば、TNFなどの炎症性サイトカインの産生は、抗体の存在下または非存在下で測定できる。抗体は、その存在が炎症性サイトカインの産生のレベルもしくは持続時間の減少を生じさせる場合にはアンタゴニスト抗体である。

【0039】

抗体を生成する方法は、当分野において周知である。例えば、4-1BB Lポリクローナル抗体は、適切な哺乳動物を単離4-1BB Lポリペプチドもしくは4-1BB Lポリペプチドの抗原性フラグメントを用いて免疫する工程によって調製できる。哺乳動物は、例えば、ウサギ、ヤギ、もしくはマウスであり得る。4-1BB Lポリペプチドもしくは抗原性フラグメントは、組換えDNA技術を用いて発現させるか、化学合成によって調製するか、標準的なタンパク質精製技術を用いて精製することができる。免疫から適切な時間後に、抗体分子は哺乳動物から、例えば哺乳動物の血液もしくは他の液体から単離することができ、そしてさらに、硫酸アンモニウムを用いる沈降法、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーまたはプロテインAを用いる親和性クロマトグラフィーを含む標準的手法を用いて精製することができるが、これらに限定されない。さらに、哺乳動物の抗体産生細胞を単離し、これを使用して4-1BB Lモノクローナル抗体を

分泌するハイブリドーマ細胞を調製することができる。抗体分泌ハイブリドーマ細胞を調製するための手法は、当分野において公知である。例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495-97 (1975) および Kozbor et al., Immunol Today 4:72 (1983) を参照されたい。4-1 BBL モノクローナル抗体は、例えば、組換え DNA 分子からの発現、または 4-1 BBL ポリペプチドを使用する組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーのスクリーニングなどの当分野において公知の他の方法を用いて調製することもできる。

【0040】

キメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体を生成する方法もまた当分野において周知であり、例えば、組換え DNA 技術に関係する方法が含まれる。キメラ抗体は、抗体分子の非ヒト可変領域およびヒト定常領域をコードする核酸からの発現によって生成できる。例えば、Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 86:6851 (1984) を参照されたい。ヒト化抗体は、非ヒト抗原結合領域（相補性決定領域）ならびにヒト可変量域（抗原結合領域を含まない）およびヒト定常領域をコードする核酸からの発現によって生成できる。例えば、Jones et al., Nature 321:522-24 (1986) ; および Verhoeven et al., Science 239:1534-36 (1988) を参照されたい。完全ヒト抗体は、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子のみを発現する遺伝子組換えトランスジェニックマウスを免疫する工程によって生成できる。この場合、治療上有用なモノクローナル抗体は、さらに従来のハイブリドーマ技術を用いて入手できる。例えば、Lonberg & Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995) を参照されたい。抗体の設計および産生に関係する核酸および手法は、当分野において周知である。例えば、Batra et al., Hybridoma 13:87-97 (1994) ; Berdoz et al., PCR Methods Appl. 4:256-64 (1995) ; Boulianne et al., Nature 312:643-46 (1984) ; Carson et al., Adv. Immunol. 38:274-311 (1986) ; Chiang et al., Biotechniques 7:360-66 (1989) ; Cole et al., Mol. Cell. Biochem. 62:109-20 (1984) ; Jones et al., Nature 321:522-25 (1986) ; Larrick et al., Biochem Biophys. Res. Commun. 160:1250-56 (1989) ; Morrison, Annu. Rev. Immunol. 10:239-65 (1992) ; Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 81:6851-55 (1984) ; Orlandi et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 86:3833-37 (1989) ; Sandhu, Crit. Rev. Biotechnol. 12:437-62 (1992) ; Gavilondo & Larrick, Biotechniques 29:128-32 (2000) ; Huston & George, Hum. Antibodies. 10:127-42 (2001) ; Kipriyanov & Le Gall, Mol. Biotechnol. 26:39-60 (2004) を参照されたい。

【0041】

[可溶性 4-1 BBL]

4-1 BBL 遮断薬はまた、可溶性 4-1 BBL 分子でもあり得る。4-1 BBL は、活性化 T 細胞上に発現した I 型膜貫通タンパク質の TNF 受容体ファミリーのメンバーである。例えば、Watts, Annu. Rev. Immunol. 23:23-68 (2005) を参照されたい。マウス 4-1 BBL の例は、アクセッション番号 NP_035742 を付与して GenBank で見いだすことができる以下の配列である。

【化 5】

```

1  MGNNCYNVVV  IVLLLVGCEK  VGAVQNSCDN  CQPGTFCRKY  NPVCKSCPPS
51  TFSSIGGQPN  CNICRVCAGY  FRFKKFCSS  HNAECECIEG  FHCLGPQCTR
101 CEKDCRPGQE  LTKQGCKTCS  LGTFNDQNGT  GVCRPWTNCS  LDGRSVLKTG
151 TTEKDVVCGP  PVVSFSPSTT  ISVTPEGGPG  GHSLQVLTLE  LALTSALLLA
201 LIFITLLFSV  LKWIRKKFPH  IFKQPFKKT  GAAQEEDACS  CRCPQEEEGG
251 GGGYEL (配列番号5)

```

【0042】

ヒト4-1BBの例は、アクセッション番号NP_001552を付与してGenBankで見いだすことができる以下の配列である。

【化 6】

```

1  MGNSCYNIVA  TLLLVLNFER  TRSLQDPCSN  CPAGTFCDNN  RNQICSPCPP
51  NSFSSAGGQR  TCDICRQCKG  VFRTRKECSS  TSNAECDCTP  GFHCLGAGCS
101 MCEQDCKQGQ  ELTKKGCKDC  CFGTFNDQKR  GICRPWTNCS  LDGKSVLVNG
151 TKERDVVCGP  SPADLSPGAS  SVTPAPARE  PGHSPQIISF  FLALTSTALL
201 FLLFFLTLRF  SVVKRGRKKL  LYIFKQPFMR  PVQTTQEEDG  CSCRFPEEEE
251 GGCEL (配列番号6)

```

【0043】

4-1BBポリペプチドは、典型的には、マウスポリペプチドおよびヒトポリペプチドについて図13に示したように、シグナル配列、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含む。

【0044】

可溶性4-1BBは、これを生成する細胞に膜貫通タンパク質として付着しておらず、4-1BBLの活性を阻害および／または減少させることができる4-1BBポリペプチドを意味する。例えば、可溶性4-1BBは、全長4-1BBの細胞外ドメインからなる単一ポリペプチドであってもよい。本明細書で使用するように、「全長4-1BB」は、それをコードする内因性の核酸を有する細胞によって発現したポリペプチドである。全長4-1BBは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを有することになる。全長4-1BBは、シグナルペプチドを有していても有していなくてもよい。これとは対照的に、可溶性4-1BBは、それが膜貫通タンパク質として細胞に付着していない限り、全長以外の任意の形態での4-1BBである。可溶性4-1BBポリペプチドの例は、全長ポリペプチドまたはそのC末端で例えば免疫グロブリン分子のFcフラグメント、例えばIgG₁ Fcフラグメントなどの非関連ポリペプチドセグメント、または例えばGFP、HA、およびFLAGならびにGSTなどの任意の従来のタンパク質タグもしくは融合成分と融合した4-1BBの細胞外ドメインからなる融合ポリペプチドの細胞外ドメインに対応するポリペプチドである。可溶性4-1BBは、実施例で考察したマウス4-1BB/Fcなどの単一ポリペプチドもしくは二量体であり得る。二量体でもある可溶性4-1BBの例は、実施例のセクションで考察したマウス4-1BB/ヒトIg-Fcポリペプチドである。

【0045】

可溶性4-1BBポリペプチドの例は、以下の配列を有するマウス4-1BBの細胞外ドメインである。

【化 7】

23 VQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS
 51 TFSSIGGQPN CNICRVCAGY FRFKKFCSS HNAECECIEG FHCLGPQCTR
 101 CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG
 151 TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG GHSLQV (配列番号 7)

【0046】

可溶性 4-1 BB ポリペプチドの別の例は、以下の配列を有するヒト 4-1 BB の細胞外ドメインである。

【化 8】

SLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP
 51 NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS
 101 MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG
 151 TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSP (配列番号 8)

【0047】

可溶性 4-1 BB ポリペプチドの他の例には、各々配列番号 20 および 21 に示した、マウス 4-1 BB の最初の 186 アミノ酸またはヒト 4-1 BB の最初の 185 アミノ酸が含まれる。

【化 9】

1 MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS
 51 TFSSIGGQPN CNICRVCAGY FRFKKFCSS HNAECECIEG FHCLGPQCTR
 101 CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG
 151 TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG GHSLQV (配列番号 20)

【化 10】

1 MGNSCYNIVA TLLLVNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP
 51 NSFSSAGGQR TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS
 101 MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG
 151 TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE PGHSP (配列番号 21)

【0048】

可溶性 4-1 BB ポリペプチドは、ポリペプチドが 4-1 BB L の活性を阻害または減少させることができる限り、配列番号 7、8、20 もしくは 21 の N 末端もしくは C 末端でさらに 1 つ以上の追加のアミノ酸を有することができ、ポリペプチドが細胞によって生成される場合は、それは膜貫通タンパク質として細胞の膜内へは組み込まれない。例えば、可溶性 4-1 BB ポリペプチドは、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST)、ヒト IgG の Fc 部分、ヒスチジントグ、または上記で考察したような任意の非関連アミノ酸配列に融合した配列番号 7、8、20 もしくは 21 からなる融合タンパク質であり得る。フラグメントが生物活性であり得る限り、即ちフラグメントが 4-1 BB L 活性を阻害または減少させることができる限りにおいて、可溶性 4-1 BB ポリペプチドは細胞外ドメインのフラグメント、例えば配列番号 7、8、20 および 21 のフラグメントでもあり得る。フラグメントが生物活性を有するかどうか、即ち、フラグメントが 4-1 BB L 活性を阻害または減少させることができるかどうかを判定する方法には、本明細書で考察かつ例示した方法、例えば LPS に反応するマクロファージなどの細胞による炎症性サイトカイン産生を測定する方法が含まれるが、これらに限定されない。

【0049】

4-1BB、可溶性4-1BB、およびそれらの生物活性フラグメントは、任意の起源由来であり得る。例えば、これらは、マウス、ウサギ、ブタ、イヌ、ウシ、サル、またはヒトから単離することができる。それらは、例えば、CHO、S2および大腸菌(E. coli)などの宿主細胞、または例えばブタもしくはサルもしくはウサギなどの宿主動物中の組換え核酸から発現させ、その後当業者には公知のタンパク質精製技術を用いて単離することができる。代替的には、それらはペプチド合成の従来の方法によって合成することができる。可溶性4-1BBは、ペプチダーゼ消化による全長ポリペプチドの調製から入手できる。例えばマウス4-1BB-ヒトIg-Fcポリペプチドなどの融合タンパク質を調製する方法は、当分野において周知であり、例えば組換えDNA技術に係る方法が含まれる。より詳細には、関連4-1BBドメインをコードする核酸配列は、Fcフラグメントをコードする核酸にライゲートさせ、次に適切な宿主細胞中で発現させることができる。4-1BBをコードする核酸またはそれらの生物活性フラグメントをクローニングできる融合成分をコードする多数の発現ベクターは、市販品として入手できる。本発明者らが使用した可溶性4-1BBは、1つの会社から購入した。

10

【0050】

[4-1BB L特異的アンチセンスRNA]

アンチセンスRNAは、例えば、転写および／または翻訳を阻害することによって、4-1BB Lの発現を特異的に減少させるために使用できる。アンチセンスRNAは、4-1BB Lをコードするセンス核酸に相補的である。例えば、アンチセンスRNAは、二本鎖cDNA分子のコーディング鎖に相補的であってもよく、mRNA配列に相補的であってもよい。アンチセンスRNAは、全コーディング鎖に、またはその一部分のみに相補的であってもよい。アンチセンスRNAは、4-1BB Lをコードする核酸の非コーディング領域のすべてまたは一部に相補的であってもよい。非コーディング領域は、コーディング領域をフランキングする5'領域および3'領域、例えば5'非翻訳配列および3'非翻訳配列を含む。アンチセンスRNAは、一般に長さが少なくとも6ヌクレオチドであるが、約8、12、15、20、25、30、35、40、45、もしくは50ヌクレオチド長であってもよい。もっと長いオリゴヌクレオチドもまた使用できる。アンチセンスRNAは、当分野において公知の方法を用いて、例えば、アンチセンスRNAをコードする発現ベクターからの発現、もしくは発現カセットからの発現によって調製できる。代替的には、アンチセンスRNAは、天然型ヌクレオチドまたはRNAの生物学的安定性を高める、もしくはアンチセンスRNAとセンス核酸との間に形成された二本鎖の生理学的安定性を高めるように設計した修飾ヌクレオチドを用いる化学合成によって調製できる。修飾ヌクレオチドの例には、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β-D-ガラクトシルクエオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸、ウィブトキソシン、プソイドウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-oxacetic acidメチルエステル、ウラシル-5-oxacetic acid、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および2,6-ジアミノプリンが含まれる。したがって、本発明のアンチセンスRNAは、修飾ヌクレオチドならびに天然ヌクレオチドを含んでもよく、アンチセンスRNAは、配列番号3および4に提供した配列に相補的で

20

30

40

50

ある、上記で考察した任意の長さであってもよい。

【0051】

[4-1BBL特異的抗体]

低分子干渉RNAを使用すると、4-1BBLポリペプチドのレベルが減少するように4-1BBLの翻訳を特異的に減少させることができる。siRNAは、配列特異的に転写後遺伝子サイレンシングを媒介する。例えば、http://www.ambion.com/techlib/hottopics/rnai/rnai_may2002_print.html（最新検索、2006年5月10日）を参照されたい。RNA誘導サイレンシング複合体に組み込まれると、siRNAは、その複合体を相同性があるmRNA転写産物に誘導し、これは次に複合体によって開裂されることによって、相同性がある内因性mRNA転写産物の開裂を媒介する。siRNAは、Gタンパク質のmRNA転写産物の任意の領域に対して同種であってもよい。相同性の領域は、長さが30ヌクレオチド以下、好ましくは25ヌクレオチド以下、およびより好ましくは長さが約21~23ヌクレオチドであってもよい。siRNAは、典型的には二本鎖であり、2つのヌクレオチド3'オーバーハング、例えば3'オーバーハングUUジヌクレオチドを有しているてもよい。siRNAを設計するための方法は、当業者には公知である。例えば、Elbashir et al., Nature 411: 494-498 (2001); Harborth et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 13: 83-106 (2003)を参照されたい。典型的には、AAから始まり、センスおよびアンチセンスのsiRNA鎖の両方について3'UUオーバーハングを有し、およそ50%のG/C含量を有する標的部位が選択される。siRNAは、化学合成でき、またはインビトロでの転写によって作成でき、またはsiRNA発現ベクターもしくはPCR発現カセットから発現させることができる。例えば、http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html（最新検索、2006年5月10日）を参照されたい。siRNAが発現ベクターもしくはPCR発現カセットから発現させられる場合は、siRNAをコードするインサートはsiRNAヘアピン内へ折り畳まれるRNA転写産物として発現させることができる。したがって、RNA転写産物は、3'末端でヘアピンのループならびにUのストリングを形成するスペーサー配列によってその逆相補的アンチセンスRNA配列に結合しているセンスsiRNA配列を含むことができる。ヘアピンのループは、任意の適切な長さ、例えば長さが3~30ヌクレオチド、好ましくは長さが3~23ヌクレオチドのループであってもよく、そしてAUG、CCC、UUCG、CCACC、CTCGAG、AAGCUU、CCACAC CおよびUUC AAGAGA（配列番号9）を含む様々なヌクレオチド配列のループであってもよい。siRNAは、さらにまた直接に、または導入遺伝子もしくはウイルスを介して導入した二本鎖RNAの開裂によって、インビボで生成することもできる。いくつかの生体内では、RNA依存性RNAポリメラーゼによる増幅が起こる場合がある。

【0052】

4-1BBLのmRNA転写産物にハイブリダイズできるsiRNA配列の例には、以下の配列およびそれらの相補的配列が含まれる。

【化 1 1】

配列番号	配列
10	AAGACGGCGCAGGCGGCAGCG
11	AAGAGGCCGGCGGGATCGTCG
12	ATAGTAGACTCCAGCCTTGGC
13	ATTCCGACCTCGGTGAAGGG
22	AAGAGGCCGGCGGGAUCGUCG
23	AUAGUAGACUCCAGCCUUGGC
24	AUUCCGACCUCGGUGAAGGG

10

【0 0 5 3】

それらの相補的配列は、以下のとおりである。

【化 1 2】

配列番号	配列
25	CGCTGCCGCCTGCGCCGTCTT
26	CGACGATCCCGCCGGCCTCTT
27	GCCAAGGCTGGAGTCTACTAT
28	CCCTTCACCGAGGTCGGAAT
29	CGCUGCCGCCUGCGCCGUCUU
30	CGACGAUCCCGCCGGCCUCUU
31	GCCAAGGCUGGAGUCUACUAAU
32	CCCUUCACCGAGGUCGGAAU

20

30

【0 0 5 4】

マウス 4-1 BBL を標的とする低分子干渉 RNA もまた含まれる。

5' - G C T C T A T G G C C T A G T C G C T - 3' (配列番号 1 4)

5' - G C A A A G C C T C A G G T A G A T G - 3' (配列番号 1 5)

5' - G C U C U A U G G C C U A G U C G C U - 3' (配列番号 3 3)

5' - G C A A A G C C U C A G G U A G A U G - 3' (配列番号 3 4)

40

【0 0 5 5】

それらの相補的配列は、以下である。

A G C G A C T A G G C C A T A G A G C (配列番号 3 5)

C A T C T A C C T G A G G C T T T G C (配列番号 3 6)

A G C G A C U A G G C C A U A G A G C (配列番号 3 7)

C A U C U A C C U G A G G C U U U G C (配列番号 3 8)

【0 0 5 6】

本発明の追加の siRNA 配列には、配列番号 1 8 および 1 9 ならびにそれらの相補的配列、さらに以下が含まれる。

50

A A G A C G G C G C A G G C G G C A G C G T T (配列番号 4 5)
A A G A G G C C G G C G G G A U C G U C G T T (配列番号 4 6)
A U A G U A G A C U C C A G C C U U G G C T T (配列番号 4 7)
A U U C C G A C C U C G G U G A A G G G T T (配列番号 4 8)
C G C U G C C G C C U G C G C C G U C U U T T (配列番号 4 9)
C G A C G A U C C C G C C G G C C U C U U T T (配列番号 5 0)
G C C A A G G C U G G A G U C U A C U A U T T (配列番号 5 1)
C C C U U C A C C G A G G U C G G A A U T T (配列番号 5 2)
G C U C U A U G G C C U A G U C G C U T T (配列番号 5 3)
G C A A A G C C U C A G G U A G A U G T T (配列番号 5 4)
A G C G A C U A G G C C A U A G A G C T T (配列番号 5 5)
C A U C U A C C U G A G G C U U U G C T T (配列番号 5 6)

【0057】

本発明の s i R N A は、例えば血清中、血液循環中、または哺乳動物細胞中などの生理的条件下でその安定性を高めるように化学修飾することができる。本発明の化学修飾 s i R N A は、コレステロールに共役した s i R N A、脂質に被包化された s i R N A、および抗体に結合した s i R N A である s i R N A が含まれる。本発明の低分子干渉 R N A もまた親油性コンジュゲートを形成するために例えば高比重リボタンパク質などの他の疎水性脂質分子に共役させることができ、またはそれらはセンスもしくはアンチセンス鎖状で部分的ホスホロチオエート骨格および 2'-O-メチル糖修飾を有していてもよい。s i R N A の親油性コンジュゲートには、例えばステアロイル (C 1 8) およびドコサニル (C 2 2) などの飽和アルキル鎖に共役したコンジュゲートならびにリトコール酸およびオレイルアミン (リトコール酸オレイル、C 4 3) のハイブリッドに共役したコンジュゲートが含まれる。

【0058】

[4-1 B B L 特異的リボザイム]

4-1 B B L 遮断薬は、さらにまたリボザイムであってもよい。リボザイムは、例えば相同性領域を有する m R N A などの一本鎖核酸を開裂させることができる触媒活性を備える R N A 分子である。例えば、C e c h, S c i e n c e 236:1532-1539 (1987); C e c h, A n n. R e v. B i o c h e m. 59:543-568 (1990); C e c h, C u r r. O p i n. S t r u c t. B i o l. 2:605-609 (1992); C o u t u r e a n d S t i n c h c o m b, T r e n d s G e n e t. 12:510-515 (1996) を参照されたい。リボザイムを使用すると、4-1 B B L m R N A 転写産物を触媒作用により開裂し、それによって m R N A の翻訳を阻害することができる。例えば、H a s e l o f f らの米国特許第 5,641,673 号明細書を参照されたい。4-1 B B L 核酸に対する特異性を有するリボザイムは、配列番号 3 および 4 のヌクレオチド配列に基づいて設計できる。高度に配列特異的に R N A 分子をトランスで開裂することができるリボザイムを設計および構築する方法は、当分野において開発され、報告されている。例えば、H a s e l o f f e t a l., N a t u r e 334:585-591 (1988) を参照されたい。リボザイムは、リボザイム内に別個の「ハイブリダイゼーション」領域を作り上げることによって、特異的 R N A に標的化することができる。ハイブリダイゼーション領域は、リボザイムが標的と特異的にハイブリダイズすることを可能にする標的 R N A に相補的な配列を含有する。例えば、G e r l a c h らの欧州特許第 321,201 号明細書を参照されたい。標的配列は、配列番号 3 および 4 のヌクレオチド配列から選択した約 10、12、15、20、もしくは 50 連続ヌクレオチドのセグメントであってもよい。より長い相補的配列を使用すると、標的に対するハイブリダイゼーション配列の親和性を高めることができる。リボザイムのハイブリダイゼーションおよび開裂領域は一体的に関連している場合がある；したがって、相補的領域を通して標的 R N A にハイブリダイズすると、リボザイムの触媒領域は標的を開裂させることができる。代替的には、4-1 B B L をコードする m R N A を使用すると

、RNA分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択することができる。例えば、Bartel & Szostak, Science 261: 1411-1418 (1993)を参照されたい。

【0059】

〔他の4-1BBL遮断薬〕

4-1BBL遮断薬にはまた、4-1BBL発現もしくは活性に関係する他の分子の阻害剤が含まれ、それらにはこれらの分子の発現を減少させるオリゴヌクレオチドまたは分子自体の活性の阻害剤が含まれる。4-1BBLの発現もしくは活性に関係する分子には、例えば、NF- κ B; CREB; C/EBP; TLR2、TLR3、TLR4、TLR7、TLR8、およびTLR9等のTLR; MyD88; TRIF; p38; Jnk; Mek; およびTRAF6が含まれる。これらの分子の発現を減少させるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドをベースとする4-1BBL遮断薬について上述したものなどのオリゴヌクレオチドに類似する。これらは、siRNA（例、配列番号18および19）、アンチセンス核酸、または4-1BBL発現もしくは活性に関係する選択した分子に対して向けられたリボザイムを含む。活性阻害剤には、例えば、NF- κ B阻害剤であるスルファサラジン、プロテアソーム阻害剤であるMG-132、p38阻害剤であるSB203580、Jnk阻害剤であるSP600125、およびMek阻害剤であるPD98059が含まれる。

【0060】

〔炎症を緩和させる〕

4-1BBL遮断薬を使用すると、炎症性疾患状態を防止または治療することができる。4-1BBL遮断薬は、例えば、TNFもしくはIL-6などの炎症性サイトカインの過剰産生を減少させることによって炎症を緩和させる。したがって、1つの実施形態では、本発明は、哺乳動物における炎症性サイトカインの産生を減少させるための方法を提供する。哺乳動物は、炎症状態にある哺乳動物、またはそのような状態になる危険性が高い哺乳動物であり得る。

【0061】

炎症状態には、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、乾癬、強直性脊椎炎、クローン病、過敏性腸症候群、全身発症性若年性慢性関節炎、および骨粗鬆症が含まれる。炎症状態にある哺乳動物は、その状態の公知の症状に基づいて同定できるが、これらには限定されない。例えば、クローン病もしくは関節リウマチに罹患している哺乳動物は、同一種の子孫哺乳動物と比較して、例えば、IL-1、IL-6、MCP-1およびTNFなどの前炎症性サイトカインの産生のレベルもしくは持続時間における増加を示すことがある。その増加は、例えば、5%、10%、15%、20%、または20%以上などの任意の量であってもよい。炎症状態の他の症状には、病理的炎症および関節破壊が含まれるが、これらには限定されない。炎症状態に対して危険な状態にある哺乳動物は、例えば、Vyse & Todd, Cell 85: 311-18 (1996)、Kinney et al., Arthritis Research 3: 319-330 (2001) および Rioux & Abbas, Nature 435: 584-9 (2005)) において考察された遺伝子異常に基づいて同定できる。

【0062】

4-1BBL遮断薬は、数多くの方法で投与できる。投与経路の例には、非経口、静脈内、皮内、皮下、経口、吸入、経皮（局所）、経粘膜、および経直腸投与が含まれる。全身投与は、経粘膜または経皮手段によって行ってもよい。ポリペプチドをベースとする遮断薬は、例えば、必要に応じて、または医師の判断にしたがって、皮下注射によって投与できる。これらは、数時間にわたる静脈内注射によって注射することもできる。例えばアンチセンスもしくはsiRNAなどのオリゴヌクレオチドをベースとする4-1BBL遮断薬は、ベクター内に挿入し、遺伝子療法ベクターとして使用できる。遺伝子療法ベクターは、静脈内注射、局所投与または定位注射によって被験者に送達できる。例えば、米国特許第5,328,470号明細書およびChen et al., PNAS 91: 3

10

20

30

40

50

054 (1994) を参照されたい。したがって、4-1 BBL 遮断薬は、組織部位への直接注射によって被験者に投与することができ、またはインサイチューで生成することができる。代替的には、4-1 BBL 遮断薬は、選択した細胞に標的化するために修飾し、その後全身投与することができる。例えば、アンチセンス分子は、選択された細胞表面上で発現する受容体もしくは抗原に結合するように修飾することができる。他の低分子タイプの遮断薬は、経口投与することができる。

【0063】

4-1 BBL 遮断薬は、単独で使用でき、または第2薬剤、例えば公知の抗炎症薬、例えばアダリムマブ (Humira (登録商標))、エファリズマブ (Raptiva (登録商標))、エタネルセプト (Enbrel)、インフリキシマブ (Remicade (登録商標))、メトトレキセート (Rheumatrex)、およびオマリズマブ (Xolair (登録商標)) と併用できる。

【0064】

哺乳動物に投与すべき用量は、4-1 BBL の発現もしくは活性を減少させるために適切な任意の量であってもよい。用量は、有効量またはその適切な画分であってもよい。これは、年齢、身体状態、サイズ、体重、治療される症状、症状の重症度、および任意の併用療法を含む個々の患者のパラメーターに左右される。適切な用量を決定する因子は当業者には周知であり、ルーチンの実験により対応することができる。例えば、物理化学的特性、毒性学的特性および薬物動態的特性は、標準の化学的アッセイおよび生物学的アッセイを用いて、さらに化学、薬理学および毒性学の分野において公知の数学モデリング技術を使用することによって決定することができる。治療有用性および投与方法は、そのような技術の結果から、そして適切な薬物動態モデルおよび／または薬力学的モデルを使用することによって外挿することができる。患者に投与すべき正確な量は、担当医師に委ねることになる。しかし、4-1 BBL 遮断薬は、約0.05～約2,000 mg/kg (哺乳動物の体重)、好ましくは約1～約200 mg/kg (哺乳動物の体重) の用量で経口または注射によって投与できる。オリゴヌクレオチドをベースとする遮断薬は、約0.05～約500 mg/kg (哺乳動物の体重)、好ましくは約0.5～約50 mg/kg (哺乳動物の体重) の用量で (例えば、経口または注射によって) 投与できる。ヒト成人における用量範囲は、一般には4～40,000 mg/日、および好ましくは40～4,000 mg/日である。本発明の所定の薬剤は長時間作用型であるため、初日には80～4,000 mg の開始用量で、そしてその後は20～1,000 mg の低用量で投与するのが有利な場合がある。患者はさらに、医学的理由、心理的理由または実質的に任意の他の理由から低用量または耐用量を主張することがある。併用薬の成分として調製される第2薬剤の有効量は、第2薬剤の製造業者の推奨、担当医師の判断に従うことになるが、さらに PHYSICIAN'S DESK REFERENCE に記載される量および投与方法についてのプロトコールおよび管理要因によって誘導される。

【0065】

治療方法の有効性は、障害の公知の徴候もしくは症状における改善について患者を監視することによって評価できる。例えば、炎症の改善は、例えば、IL-1、IL-6、TNF もしくは MCP-1 の産生などの前炎症性サイトカインの産生のレベルおよび持続時間を監視することによって検出できる。前炎症性サイトカインの産生のレベルもしくは持続時間の任意の減少、例えば5%、10%、15%、20% または20%以上の減少は、患者における改善を示している。

【0066】

[4-1 遮断薬の医薬組成物]

4-1 BBL 遮断薬は、哺乳動物に投与するために適切な医薬組成物 (本明細書では、本発明の医薬組成物) 中に組み込むことができる。本発明の医薬組成物は、典型的には、活性な薬剤および医薬的に許容される担体を含む。本明細書で使用する語句「医薬的に許容される担体」は、当分野において哺乳動物への医薬的投与と適合することが公知である、任意およびすべての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤およ

び吸収遅延剤などを意味している。任意の従来の媒質もしくは薬剤は、それらが活性化合物と不適合である場合を除いて、本発明の医薬組成物におけるそれらの使用は企図されている。さらに、補助的活性化合物もまた、本医薬組成物中に含めることができる。例えば、本発明の医薬組成物は、上述したような第2の抗炎症薬をさらに含むことができる。

【0067】

本発明の組成物および方法においては、治療有効量の遮断薬を使用できる。そのような治療有効量の遮断薬は、一般に、対象とする細胞もしくは組織、または哺乳動物中での4-1 BBL発現もしくは活性を減少させるために十分である。いくつかの実施形態では、遮断薬の治療有効量は、炎症を緩和させるために十分な量である。遮断薬の治療有効量の例は、上述のセクションに記載した用量である。したがって、4-1 BBL遮断薬は、約0.05～約2,000 mg/kg（哺乳動物の体重）、好ましくは約1～約200 mg/kg（哺乳動物の体重）の用量で投与できる。オリゴヌクレオチドをベースとする遮断薬は、0.05～約500 mg/kg（哺乳動物の体重）、好ましくは約0.5～約50 mg/kg（哺乳動物の体重）の用量、例えば1、3、5 mg/kgで経口または注射によって投与できる。ヒト成人における用量範囲は、一般には4～40,000 mg/日、および好ましくは40～4,000 mg/日である。本発明のある特定の薬剤は長時間作用型であるため、初日には80～4,000 mgの開始用量で、そしてその後は20～1,000 mgの低用量で投与することが有利な場合がある。

【0068】

本発明の医薬組成物は、ある特定の投与経路と適合するように調製される。非経口、皮内または皮下投与に使用される液剤もしくは懸濁剤は、（1）例えば注射用水、食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールもしくは他の合成溶媒などの無菌希釈剤、（2）例えばベンジルアルコールもしくはメチルパラベンなどの抗菌剤、（3）アスコルビン酸もしくは亜硫酸水素ナトリウムなどの酸化防止剤、（4）エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤、（5）酢酸塩、クエン酸塩もしくはリン酸塩などのバッファおよび例えば塩化ナトリウムもしくはデキストロースなどの等張性を調整するための薬剤を含むことができる。pHは、例えば塩酸もしくは水酸化ナトリウムなどの酸もしくは塩基を用いて調整できる。非経口製剤は、アンプル、ディスポーザブルシリンジもしくは複数回投与バイアル内に封入できる。

【0069】

医薬組成物は、さらにまた4-1 BBL遮断薬の性質に基づいて調製および投与することができる。例えばsiRNAなどのオリゴヌクレオチドタイプの4-1 BBL遮断薬は、例えばLi & Rossi, Methods Mol. Biol. 309:261-72 (2005)に記載されているようなベクターをベースとする送達系を使用して、siRNAならびにSong et al., Nat. Med. 9:347-51 (2003)、Soutschek et al., Nature 432:173-178 (2004)、Morrissey et al., Nat. Biotechnol. 23:1002-1007 (2005)、Song et al., Nat. Biotechnol. 23:709-717 (2005)、およびWolfrum et al., Nat. Biotechnol. 25:1149-1157 (2007)に記載されるようなコレステロールに結合した、脂質に被包化された、そして抗体に結合したものを含む化学修飾siRNAの高圧静脈内注射を使用して送達できる。siRNAなどのオリゴヌクレオチドタイプの4-1 BBL遮断薬およびリポザイムもまた、例えば、Yano et al., In Vivo Antitumor Activity of a New Cationic Liposome siRNA ComplexによってNON-VIRAL GENE THERAPY, Springer Tokyo, 2005において記載されるようなカチオン性リポソームを用いて送達することができる。

【0070】

注射のために適切な医薬組成物には、無菌注射液剤もしくは分散剤の即時の調製のための無菌水溶液もしくは分散液および無菌粉末が含まれる。静脈内投与には、適切な担体に

は、生理的食塩水、静菌水、またはリン酸緩衝食塩水が含まれる。組成物は、無菌である上に製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、例えば細菌および真菌などの微生物による汚染に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール）、および適切なそれらの混合物を含有する溶媒もしくは分散媒であってもよい。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、および分散剤の場合には必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって達成できる。微生物の作用の防止は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、およびチメロサルなどの様々な抗菌剤および抗真菌剤を使用して達成できる。例えば等張剤または吸収を遅延させる薬剤などの他の成分（例、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を含むことができる。

10

【0071】

無菌注射用液は、必要に応じて上述した成分の1つもしくは成分の組み合わせとともに、適切な溶媒中に所要量の活性な薬剤を組み込むことによって調製できる。分散液は、塩基性分散媒および上記で考察した他の必要な成分を含有する無菌ビヒクル中に活性化化合物を組み込み、その後ろ過滅菌することによって調製できる。注射溶液を調製するための無菌分散剤の場合には、好ましい調製方法には、有効成分および事前に無菌濾過した溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末を生成する真空乾燥および凍結乾燥法が含まれる。

【0072】

経口組成物は、不活性希釈剤または食用担体を含むことができる。それらは、ゼラチンカプセル内に封入できる、または錠剤に圧縮できる。経口治療投与のためには、活性化化合物は賦形剤とともに組み込まれてもよく、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用できる。経口組成物は、流体担体を用いて調製することもできる。医薬的に適合する結合剤および／またはアジュバント材料は、本組成物の一部として含むことができる。錠剤、ピル剤、カプセル剤、トローチ剤などは、同様の性質を備える以下の成分もしくは化合物のいずれかを含有することができる。結合剤、例えば微結晶セルロース、トラガントガムもしくはゼラチン。賦形剤、例えばデンプンもしくはラクトース。錠剤崩壊剤、例えばアルギン酸もしくはコーンスターチ。潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム。流動促進剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素。甘味料、例えばスクロースもしくはサッカリン。または、香料添加剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジフレーバー。

20

30

【0073】

吸入による投与において、本組成物は、加圧容器もしくは適切な噴射剤、例えば二酸化炭素などの気体を含有するディスペンサーからのエアロゾルスプレーまたはネブライザーの形態で送達することができる。

【0074】

経粘膜もしくは経皮投与には、バリアへの浸透に適していることが当分野において公知である浸透剤を使用できる。これらには、例えば、鼻スプレーを用いて遂行できる、経粘膜投与のための洗浄剤、胆汁塩およびフシジン酸誘導体が含まれる。経皮投与には、活性化化合物は、当分野において一般に公知である軟膏、膏薬、ゲル剤もしくはクリーム剤に調製される。

40

【0075】

1つの実施形態では、本発明の薬剤は、例えば、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系などの制御放出製剤などの、薬剤を身体からの迅速な消失から保護する担体を用いて調製できる。生分解性生体適合性ポリマーを使用できる。これらには、エチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸が含まれる。そのような製剤を調製する方法は、当業者には明らかである。ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を有する感染した細胞に標的化したりボソーム懸濁液を含むリボソーム懸濁液もまた、製薬学的に許容可能な担体として使用できる。これらは、当分野において公知の方法を用いて調製できる。

50

【0076】

経口組成物または非経口組成物は、投与の容易さおよび用量の一様性のために用量単位形で調製できる。語句「用量単位形」は、治療される被験者における単位用量として適切な物理的に別個の単位を意味し、各単位は必要な医薬担体と会合させて所望の治療作用を生成するために計算された活性化合物の所定量を含有する。単位用量形における仕様は、活性化合物の固有の特性および達成すべき特定の治療作用に依存する。

【0077】

遺伝子療法ベクターの医薬製剤は、許容できる希釈剤中に遺伝子療法ベクターを含むことができる、または遺伝子送達ビヒクルが中に包埋される徐放性マトリックスを含んでいてもよい。

10

【0078】

本発明の医薬組成物は、投与についての説明書と一緒に、容器、パックもしくはディスペンサー内に含めることができる。そのような製品は、持続性炎症を治療するための4-1BBL遮断薬を使用するための説明書を含む。さらに、そのような製品は、炎症を治療するための第2薬剤を使用するための説明書を含んでいてもよい。

【0079】

[スクリーニングアッセイ]

本発明は、新規な4-1BBL遮断薬についてスクリーニングを行う方法も含む。新規な4-1BBL遮断薬は、4-1BBLオリゴマー化、4-1BBLと他のシグナリング分子、例えばTRAF6もしくはTLRと4-1BBLとの相互作用、または細胞膜への4-1BBL転位を妨害する能力に基づいて同定できる。

20

【0080】

4-1BBLのオリゴマー化を防止できる4-1BBL遮断薬は、候補薬剤の存在下および非存在下において細胞をベースとするアッセイにおいて同定できる。その存在が2つの4-1BBLの結合を媒介する候補薬剤は、4-1BBLのオリゴマー化、即ち3つ以上の4-1BBLの凝集体の形成を防止する点で、4-1BBL遮断薬である。一般に、2つの4-1BBLの結合は、酵母ツーハイブリッド系（例えば、Fields & Song, Nature 340: 245-46 (1989)を参照されたい）および例えばβ-ラクタマーゼ相補性アッセイなどのタンパク質フラグメント相補性アッセイ（例えば、<http://www.abrf.org/JBT/Articles/JBT0012/jbt0012.html>（最新アクセス、2006年9月8日）を参照されたい）を含む標準方法を用いて検出できるが、これらに限定されない。酵母ツーハイブリッド系では、2つの4-1BBL融合タンパク質は酵母細胞内で発現させることができる。1つの融合タンパク質は、DNA-結合ドメインに融合した4-1BBLからなり、そして第2融合タンパク質は転写活性化ドメインに融合した4-1BBLからなる。4-1BBLの結合は、レポーター遺伝子の活性化を導き、酵母が規定培地上で増殖することを許容する。β-ラクタマーゼ相補性アッセイでは、2つのβ-ラクタマーゼ酵素フラグメントである、各々アミノ酸26~196および198~290からなるBla(a)およびBla(b)は、(Gly₄ Ser)₃リンカーによって4-1BBLと融合させることができる。1対の4-1BBL-Bla(a)および4-1BBL-Bla(b)でトランスフェクトした細胞にはCCF2/AMを装填する。CCF2/AMは細胞膜を通過して拡散し、細胞質エステラーゼはそのエステル官能基を加水分解し、β-ラクタマーゼ基質CCF2を遊離させる。409nmでのCCF2中のクマリン供与体の励起は、フルオレセイン受容体へのFRETを導き、520nmでの緑色蛍光の発光を発生させる。2つの4-1BBLの結合は、2つのβ-ラクタマーゼフラグメントを近接させ、結果として完全形のβ-ラクタマーゼを生じさせる。このβ-ラクタマーゼは、CCF2をさらに加水分解し、供与体および受容体を分離させ、FRET崩壊をもたらす。結果として、単離クマリン供与体は、447nmで青色蛍光を発光する。これは、顕微鏡下で観察できる、またはフローサイトメーターで測定できる。

30

40

【0081】

50

4-1 B B L とシグナリング分子との相互作用を阻害または減少させることができる 4-1 B B L 遮断薬は、細胞をベースとする方法を用いて同定できる。そのようなアッセイの例は、本明細書に記載されている。4-1 B B L とシグナリング分子、例えば T L R もしくは T R A F 6 との相互作用を阻害または減少させることができる 4-1 B B L 遮断薬を、(b) 候補薬剤を用いて同定し、そして次に 4-1 B B L がシグナリング分子と相互作用するかどうかを判定するための細胞をベースとする方法、代替的には、4-1 B B L と T L R もしくは T R A F 6 との相互作用を阻害する薬剤は、4-1 B B L 凝集について上述したものに類似する細胞をベースとするスクリーンを用いて同定できる。例えば、4-1 B B L-酵母 D N A 結合タンパク質および T R A F 6-酵母転写活性化因子ドメイン、または T R A F 6-酵母 D N A 結合タンパク質および 4-1 B B L-酵母転写活性化因子ドメインを使用すると、上述したように酵母ツーハイブリッド系において使用できる。同様に、4-1 B B L-B l a (a) および T R A F 6-B l a (b) または T R A F 6-B l a (a) および 4-1 B B L-B l a (b) からなる融合タンパク質を使用すると、上述した 4-1 B B L および T R A F 6 の相互作用をアッセイすることができる。

【0082】

細胞表面への 4-1 B B L 転位を阻害または減少させることができる 4-1 B B L 遮断薬は、4-1 B B L を発現する細胞を選択した薬剤と接触させる工程と、4-1 B B L が細胞膜に局在するかどうかを判定する工程とによって同定できる。そのような細胞は、例えば、R A W 2 6 4 . 7 細胞株などの哺乳動物細胞であってもよい。

【0083】

4-1 B B L 遮断薬は、さらにまた細胞をベースとする炎症のモデル、または炎症の動物モデルを用いて同定することもできる。細胞をベースとするアッセイの例は、本明細書に記載されている。例えば、適切な刺激、例えば L P S への曝露に応答して T N F、I L-6、I L-1 もしくは M C P-1 などの炎症性サイトカインを発現する細胞が候補薬剤と接触させられる。候補薬剤と接触させられている細胞による炎症性サイトカインの産生は、候補薬剤と接触させられていない細胞内での産生と比較される。細胞をベースとするアッセイについては、例えば炎症を誘発する L P S などの刺激に応答して炎症性サイトカインを産生できる任意の細胞を使用できる。これらの細胞には、例えば、R A W 2 6 4 . 7 細胞、一次マウスマクロファージ、および一次ヒト単球が含まれる。同様に、4-1 B B L 遮断薬は、炎症の動物モデルを用いて同定できる。例えば、哺乳動物に候補薬剤を投与し、例えば T N F もしくは I L-6 などの炎症性サイトカイン、または体温の上昇もしくは関節腫脹などの過剰持続性炎症と関連する他の観察可能な表現型の産生を測定し、候補薬剤が投与されていない類似動物の産生と比較することができる。

【0084】

以下では、実施例において本発明をより詳細に説明するが、これらは特許請求項に記載した本発明の範囲を限定しない。

【実施例】

【実施例 1】

【0085】

【材料および方法】

マウスおよび試薬。T L R 2、T L R 4、M y D 8 8、T R I F (L P S 2) ならびに T R I F および M y D 8 8 の両方の欠損マウスは、Hoebe et al., Nature 424: 743-48 (2003)、および Kim et al., J. Exp. Med. 197: 1441-52 (2003) に記載のとおりであった。4-1 B B L 欠損マウスは、DeBenedette et al., J. Immunol. 163: 4833-41 (1999) に記載されるように、C 5 7 B L / 6 マウスに戻し交配を 8 回行った。4-1 B B L 欠損マウスは、Vinay, J. Immunol. 173: 4218-29 (2004) に記載されるように、C 5 7 B L / 6 マウスに少なくとも 7 回交配を行った。同一実験では性および年齢が適合するマウスを使用した。

【0086】

腹腔マクロファージであるRAW264.7および293T細胞の調製および培養は、Kim et al., J. Exp. Med. 197:1441-52 (2003)によって記載されている。性別および年齢が一致する4-1BBL欠損および野生型(WT)のマウスにLPSを腹腔内注射した。血清サンプルを採取し、生存を観察した。動物の使用についてのプロトコールは、The Scripps Research Institute (スクリップス研究所)の施設内動物飼育使用委員会によって承認された。

【0087】

以下の試薬を使用した。Pam₃CysSer(Lys)₄ (EMC microcollections社)、大腸菌O111:B4由来のLPS (List Biological Laboratories社)、ホスホロチオエート安定化CpG DNAおよびR-848 (Invivogen社)、ポリI:C (Amersham Biosciences社)、ペプチドグリカン (Fluka社)、IL-1 β およびTNF (R&D systems社)、組換えマウス4-1BB-Fcおよび抗4-1BBL (R&D systems社)、4-1BBLに対するモノクローナル抗体 (クローンTKS-1、e-Bioscience社)、抗Flag (Sigma社)、抗GFP (Clontech社)、HA、Myc、MyD88、TLR4、およびTRAF6に対する抗体 (Santa Cruz Biotechnology社)、Alexa Fluor 594共役ロバ抗ヤギIgG (Molecular Probes社)、抗AU-1 (Covance社)、抗GAPDH (Chemicon社)、ブレフェルジンA (Biolegend社)、およびスルファサラジン、SB203580、SP600125、およびPD98059 (Calbiochem社)。

【0088】

プラスミド、組換えアデノウイルスおよびPCR。哺乳動物発現ベクターは、全長の細胞外ドメイン欠損(Δ Ext)、もしくは細胞質ドメイン欠損(Δ Cyt)のヒト4-1BBL cDNAを用いて構築した、またはそれらは全長のpro712his突然変異体の細胞外ドメイン欠損(Δ Ext)、もしくは細胞質ドメイン欠損(Δ Cyt)のヒトTLR4 cDNAを用いて構築した。これらのcDNAは、GFP (pEGFP-C1中で)、Flag (pcDNA3中で)、またはHA (pcDNA3中で)のいずれかと融合させた。マウス4-1BBLを過剰発現する複製欠損アデノウイルス5 (Adv-4-1BBL)、または対照として導入遺伝子を含まないアデノウイルス (Adv-対照)は、Bukczynski et al., proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:1291-1296 (2004)においてヒト4-1BBLについて記載した「ツープラスミドレスキュー」法を用いて生成した。

【0089】

半定量PCRは、Kim et al., J. Exp. Med. 197:1441-52 (2003)に記載されるように実施した。リアルタイムPCRのために0.5 μ gの全RNAを使用して、プライマーとしてoligo(dT)₁₂を用いてcDNAを調製した。リアルタイムPCR解析では、SYBR green PCR Master Mixキット (Applied Biosystems社)を使用した。

【0090】

全長の細胞質ドメイン、細胞外ドメイン欠損(Δ Ext)、もしくは細胞質ドメイン欠損(Δ Cyt)のヒト4-1BBL cDNAはGFP (pEGFP-C1)、Flag (pcDNA3中で)、もしくはHA (pcDNA3中で)と融合させた哺乳動物発現ベクター内にクローニングした。マウス4-1BBLを発現する複製欠損アデノウイルス5 (Adv-4-1BBL)、または対照として導入遺伝子を含まないアデノウイルス (Adv-対照)は、Bukczynski et al., proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:1291-1296 (2004)によって以前に記載の方法と同一の方法を用いて生成した。オリゴヌクレオチドは、マウス4-1BBL (#1、5'-GCTCTATGGCCTAGTCGCT-3' (配列番号14)、#2、5'-GCAAGCCTCAGGTAGATG-3' (配列番号15))、マウス4-

10

20

30

40

50

1 BB (#1、5'-ACCTGTAGCTTTGGGAACATTT-3' (配列番号16)、#2、5'-AATACAATCCAGTCTGCAAGA-3' (配列番号17))、またはなし(対照)を標的とする siRNA 鎖を発現させるために pSuppressor 内にクローニングした。ヒト IL3R、TLR2、3、4 もしくは 9 cDNA 鎖は、p cDNA 3-Flag 発現ベクター内へクローニングした。

【0091】

トランスフェクション。293T細胞は、製造業者(Invitrogen社)のプロトコールにしたがって Lipofectamine 2000 を用いた発現ベクターを用いてトランスフェクトし、細胞溶解物を24時間後に調製した。siRNA トランスフェクションのためには、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 は、TRAF6 (#1、'-GGAUCAUCAAGUACA UUGUTT-3' (配列番号18)、#2、5'-GGGCUACGAUGUGGAGUUUTT-3' (配列番号19)、前設計した siRNA (Ambion社) もしくは PolyAmine を用いる対照としての GFP (Ambion社) を標的とする siRNA を用いて一時的にトランスフェクトした。トランスフェクションの2日後、細胞は刺激因子を用いてインキュベートした。細胞溶解物および培養上清は24時間後に調製し、ウェスタンブロット法によって TRAF6 のノックダウンおよび ELISA による TNF- α の産生について分析した。

【0092】

電気泳動移動度シフト、核ランオン、および酵母ツーハイブリッドアッセイ。核抽出物は、以前に記載されたプロトコールにしたがって調製した。[γ -³²P] ATP および EMSA を用いた特異的オリゴヌクレオチドの放射性標識は、Promega 社のプロトコールによって推奨されるように実施した。TNF 転写速度は、Han et al., Biochim. Biophys. Acta 1090:22-28 (1991) に記載されるように、ランオン分析によって測定した。ツーハイブリッドスクリーニングは、Han et al., Nature 386:296-299 (1997) に記載されるように、混合ヒト胎児脳および脾臓 cDNA ライブラリーを用いて記載されるように実施した。細胞内タンパク質ドメイン(アミノ酸653~839)の範囲に及ぶヒト Tlr4 の部分を pAS2 ベクター内にサブクローニングし、ベイトとして使用した。5×10の形質転換体についてスクリーニングを行った。

【0093】

4-1 BBL もしくは 4-1 BB ノックダウン安定性細胞株の生成。RAW264.7 細胞は、pSuppressor-4-1 BBL、4-1 BB、または空ベクターを用いて安定的にトランスフェクトした。細胞を選択するために、細胞は、500 μ g/mL の G418 を含有する培養培地中で2週間かけてインキュベートし、その後プールした。細胞は、G418 を含有する培地中で維持した。

【0094】

フローサイトメトリー。腹腔マクロファージは、氷上の PBS、5% FCS、0.01% アジ化ナトリウム (FACS バッファ) 中に懸濁させた。表面 4-1 BBL 発現は、フィコエリトリンと共役した 4-1 BBL 特異的抗体(クローンTKS-1、eBioscience社)を用いて評価した。全 4-1 BBL 発現は、細胞を固定し、固定-透過化バッファ(Biolegend社)中で固定かつ透過化した後に評価した。細胞を透過化バッファ中のフィコエリトリン共役 4-1 BBL 抗体で染色し、次に FACS バッファを用いて洗浄した。アイソタイプ対照として、フィコエリトリン共役ラット IgG2a、 κ を使用した。

【0095】

免疫組織化学的検査およびイムノアッセイ。腹腔マクロファージをカバーガラス上に播種し、4% パラホルムアルデヒドを用いて固定し、次に 0.5% Triton X-100 を含有する PBS 中でインキュベートすることによって透過化した。2% BSA を用いて遮断した後、細胞は抗マウス 4-1 BBL を用いてインキュベートし、次に Alexa Fluor 594-共役ロバ抗ヤギ IgG 中でのインキュベーションを行った。

蛍光画像は、A x i o のバージョン 3.1 ソフトウェア (C a r l Z e i s s 社) を用いて可視化した。マクロファージ培養もしくはマウス血清由来の上清を採取し、T N F もしくは I L - 6 の濃度を酵素結合性免疫吸着検定法 (E L I S A) キット (e B i o s c i e n c e 社) によって製造業者のプロトコールにしたがって測定した。免疫沈降法および免疫プロット法において使用した抗体は、図の説明文に記載した。実験手順は、Z h o u e t a l . , M o l . C e l l . B i o l . 2 6 : 3 8 2 4 - 3 4 (2 0 0 6) に記載のとおりであった。

【0096】

サイトカインの測定。マクロファージ培養もしくはマウス血清由来の上清を採取し、T N F - α もしくは I L - 6 の濃度を酵素結合性免疫吸着検定法 (E L I S A) キット (e B i o s c i e n c e 社) によって製造業者のプロトコールにしたがって測定した。

10

【0097】

統計解析。カプランマイヤー (K a p l a n - M e i e r) プロットを構築し、対数順位検定を使用してマウスの生存率における差を測定した。血清 T N F における統計学的有意差は、S t u d e n t t 検定によって測定した。

【実施例 2】

【0098】

[4 - 1 B B L は T L R 4 相互作用タンパク質である]

酵母ツーハイブリッドスクリーンを使用して、T L R 4 の細胞内ドメインと相互作用するタンパク質を同定した。酵母細胞は、p A S 2 - T L R 4 (6 5 3 ~ 8 3 9 a a) を p G A D 1 0 ベクター中の 4 - 1 B B L (5 ~ 2 5 4 a a) (クローン 1) 、 4 - 1 B B L (3 ~ 2 5 4 a a) (クローン 2) 、 p 3 8 ((A F) 、 p 5 3 、もしくはラミンとともに用いてトランスフェクトした。「ベイトアンドプレイ (b a i t a n d p r e y) 」相互作用は、ヒスチジンが欠如する培地上での酵母増殖によって証明された。7 つの陽性クローン中 2 つは細胞表面 I I 型膜貫通タンパク質である 4 - 1 B B L であることがわかった (G o o d w i n e t a l . , E u r . J . I m m u n o l . 2 3 : 2 6 3 1 - 2 6 4 1 (1 9 9 3) および A l d e r s o n e t a l . , E u r . J . I m m u n o l . 2 4 : 2 2 1 9 - 2 2 2 7 (1 9 9 4) を参照されたい) 。 4 - 1 B B L は、ベイトベクター内でコードされた T L R 4 細胞内ドメインを含有する酵母細胞およびプレイベクター内でコードされた 4 - 1 B B L が H i s 3 レポーター遺伝子の相互作用媒介性発現に起因してヒスチジンが欠如する培地中で増殖できたという観察によって示されるように、T L R 4 細胞内ドメインと相互作用するが、非関連タンパク質とは相互作用しない。(図 1 A) 。

20

30

【0099】

この相互作用を確認するために、H A - 4 - 1 B B L を 2 9 3 細胞中で F l a g - T L R 4 もしくは F l a g - I L - 3 受容体 (I L - 3 R) を用いて、あるいは用いずに共発現させ、それらの関連を共免疫沈降法によって判定した。2 9 3 T 細胞を空 p c D N A 3 ベクター (対照) 、または空 p c D N A 3 ベクター、F l a g - T L R 4 もしくは F l a g - I L - 3 R 発現ベクターと組み合わせた 4 - 1 B B L 発現ベクターを用いてトランスフェクトした。細胞は、トランスフェクションの 2 4 時間後に溶解した。細胞溶解物の 2 / 3 は抗 H A 抗体を用いて免疫沈降した。溶解物および免疫沈降物を抗 F l a g および抗 H A 抗体を用いて免疫プロットすると、結果は、T L R 4 は 4 - 1 B B L によって沈降するが I L - 3 R は沈降しないことを示している (図 1 B) 。

40

【0100】

4 - 1 B B L と T L R 4 との相互作用を特性付けるために、以下の実験を実施した。

【0101】

イムノアッセイを G F P - 4 - 1 B B L 、および F l a g - T L R 4 、細胞質ドメインを含まない F l a g - T L R 4 (Δ C y t) 、細胞外ドメインを含まない F l a g - T L R 4 (Δ E x t) 、 F l a g - I L - 3 R 、 M y c - T L R 4 、もしくは M y c - T L R 4 - P 7 1 2 H (L p s ^d) のいずれかを発現するプラスミドを用いてトランスフェクト

50

した293T細胞を用いて実施した。細胞溶解物を抗Flagもしくは抗Mycを用いて免疫沈降させ、細胞溶解物および免疫沈降物を指定の抗体を用いて免疫ブロットした。結果は、TLR4細胞内ドメインはそれと4-1BBLとの相互作用に関係しているが、TLR4 TIRドメイン内の突然変異(Lps^d、Pro712H)はTLR4と4-1BBLとの相互作用に実質的な作用を及ぼさなかったことを示している(図1C)。Lps^d突然変異はTIRドメイン間の相互作用を崩壊させるが、MyD88はTIRドメインの構造を妨害しないために(Xu et al., Nature 408:111-15 (2000))を参照されたい)、TLR4 TIRドメインの別個の部分が4-1BBLおよびMyD88と相互作用する場合がある。

【0102】

さらに、イムノアッセイは、Flag-TLR4発現ベクターを、GFP、GFP-4-1BBL、細胞質ドメインを含まないGFP-4-1BBL(Δ Cyt)、細胞外ドメインを含まないGFP-4-1BBL(Δ Ext)、または細胞質ドメインのみを含むGFP-4-1BBL(Cyt)を発現するベクターと併用してトランスフェクトした293T細胞を用いて実施した。細胞溶解物は、抗Flag抗体を用いて免疫沈降させ、抗Flagおよび抗GFP抗体を用いて免疫ブロットした。結果は、4-1BBLがTLR4と相互作用するためには細胞質ドメインを含有していなければならない、そして細胞膜と関連していなければならないことを示したが、それは細胞質ドメインを含まない4-1BBLも細胞質ドメイン単独の4-1BBLもTLR4と共免疫沈降しなかったためである(図1D)。

【実施例3】

【0103】

[4-1BBLが欠損するマウスはLPS誘導性の死に対してより耐性である]

4-1BBLのインビボでの作用を測定するために、4-1BBL欠損マウスを分析したが、結果は以下のとおりである。4-1BBL欠損マウスは、生存可能で繁殖性があり、健常である。これらのマウスは正常リンパ系器官を有していたが、ウイルスに対するCD8⁺ T細胞記憶の欠損を示す。野生型および4-1BBL欠損のマウスにおける腹腔マクロファージの数は匹敵している(データは示していない)。4-1BBL欠損マウスおよび野生型マウスへのLPSの腹腔内注射は、4-1BBL欠損マウスが野生型マウスに比較してLPSの致死作用に対してより耐性であることを明らかにした(図2A)。注目すべきことに、LPSが野生型マウスに及ぼす致死作用は、抗4-1BBLの投与によって軽減された(図2B、C)。4-1BBL欠損のインビボでの作用は、マクロファージ中の4-1BBL媒介性TNF産生の欠損、および/または他の系統の細胞中での4-1BBLによる4-1BBの活性化が欠如している結果であり得る。興味深いことに、それらはナチュラルキラー(NK)細胞およびNK T細胞をほとんど有していないため、4-1BBが欠損するマウスもまたLPSおよびガラクトサミンの注射によって誘発される死亡に対して耐性である。しかし、4-1BBL欠損および4-1BB欠損マウスにおけるLPS耐性は、相違する原因の結果として生じるに違いないが、それは4-1BBL欠損マウスが正常数のNKおよびNK T細胞を含有するためである(データは示していない)。

【実施例4】

【0104】

[4-1BBLは、持続的TNF産生に関係している。]

A. インビボ試験

4-1BBLがTLR4媒介性宿主反応に関係しているのかどうかを判定するために、4-1BBL KO(ノックアウト)および野生型マウスへ、以下のように用量0.5mgの大腸菌LPSを惹起投与した。4-1BBL-/-および野生型マウスに0.5mgのLPSを腹腔内注射し、2および6時間後に採取した血清中のTNFレベルを測定した。

【0105】

結果は、L P S 誘導性 T N F 産生が、野生型マウスと比較して 4-1 B B L K O マウスにおいてはるかに低かったことを示している（図 2 D）。詳細には、L P S は血清中 T N F 濃度の迅速な増加を誘導し、これは L P S 注射 1 時間後にピークに達した。4-1 B B L 欠損マウス中の血清 T N F 濃度は L P S 注射 1 時間後には野生型マウスにおける血清 T N F 濃度とほぼ同一であったが、それより後の時点では野生型マウスにおける方が低かった（図 2 D）。これらのデータは以下で考察する、4-1 B B L 欠損のみが L P S 処置後の後期に T N F 産生に影響を及ぼした点でインビトロデータ（図 3 A）と一致している；しかし、L P S によるインビボ T N F 誘導は、インビトロにおける場合より急速であるように思われた。

【0106】

10

B. 一次マクロファージを使用する試験

マクロファージは L P S 惹起投与マウスにおける T N F の一次起源であるので（Beutler et al., Nature 316:552-554 (1985)）、4-1 B B L K O および野生型マウス由来の腹腔マクロファージを単離し、L P S 刺激後の T N F 産生を測定した。

【0107】

最初に、4-1 B B L がマクロファージ中での L P S 誘導性サイトカイン産生に及ぼす作用を、L P S 刺激 24 時間後に 4-1 B B L 欠損マウスおよび野生型マクロファージの培地中でサイトカインを測定することによって判定した。4-1 B B L 欠損マクロファージは、野生型マクロファージより少ない T N F、I L-6 および I L-12 を産生した（図 3 A）。I L-1 β の発現は、4-1 B B L の欠損によって影響を受けなかった、またはほんの僅かにしか影響を受けなかった（図 3 A）。4-1 B B L 欠損マクロファージは I L-1 β を用いた刺激後に野生型量の I L-6 を産生したが、これは 4-1 B B L が L P S 誘導性細胞サイトカイン応答に選択的に関係していることを示唆している（図 3 A）。

20

【0108】

さらに、L P S 誘導の 6、12 および 18 時間後の T N F 産生についてもまた測定した。4-1 B B L-/- および野生型マウス由来の腹腔マクロファージを 6 ウェル培養皿中で 1 ウェルにつき 2×10^6 の密度でプレーティングし、次に L P S (100 ng/mL) で処置した。培地中の T N F レベルは、6、12 および 18 時間後に測定した。興味深いことに、T N F 産生は L P S 刺激の初期 3 時間中には 4-1 B B L K O マクロファージ中で正常であったが、この時点後にはほぼ完全に消失し（図 3 B）、これは T N F 産生におけるそれ以上の、即ち L P S 刺激後のそれ以降の時間中に増加を刺激するためには 4-1 B B L が必須であることを示している。

30

【0109】

4-1 B B L は、最初に共刺激機能を有する T 細胞表面受容体である 4-1 B B のリガンドとしてクロニングした（Goodwin et al., Eur. J. Immunol. 23:2631-2641 (1993)）を参照されたい）。4-1 B B はマクロファージ中でも発現するので、4-1 B B が L P S 処置細胞中での 4-1 B B L 媒介性 T N F 発現に関係するかどうかについて試験した。以下の実験は、L P S 誘導性 T N F 産生に 4-1 B B が関係していることを判定するために実施した。

40

【0110】

予想外にも、4-1 B B L が持続的な L P S 誘導性の T N F 産生を促進するために 4-1 B B の存在は必要とされなかったが、それは L P S 誘導性 T N F の量が野生型および 4-1 B B 欠損のマクロファージにおいて類似していたためである（図 3 C）。このため、4-1 B B L-4-1 B B 相互作用はマクロファージ中で発生しない、またはそれらは単純にマクロファージの T N F 産生を維持することに役割を果たさない。

【0111】

C. RAW 264.7 マクロファージを使用する試験

マクロファージ細胞株 RAW 264.7 における 4-1 B B L の機能が一次マクロファ

50

ージ細胞における機能に類似するかどうかを判定するために、*siRNA*を使用して以下のように4-1BBL発現をノックダウンさせた。簡潔に述べると、RAW264.7細胞は、対照*siRNA*、または4-1BBL-*siRNA* #1もしくは#2を含有するpSuppressorを用いて安定的にトランスフェクトした。4-1BBLのタンパク質レベルは、免疫ブロット法によって測定した。TNF産生は、(1) LPSを用いて3、9および24時間にわたって処置した対照および4-1BBLノックダウン細胞中で、ならびに(2) ペプチドグリカン(PG、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$)、ポリI:C($25\mu\text{g}/\text{mL}$)、LPS($100\text{ng}/\text{mL}$)、CpG($5\mu\text{g}/\text{mL}$)、もしくは未処置培養培地(なし)を用いて24時間かけて処置した対照細胞および4-1BBLノックダウン細胞中で測定した。結果は、いずれの*siRNA*もRAW264.7細胞中での4-1BBL発現を効果的にノックダウンし(図4A)、LPSおよび他のTLRリガンド誘導性TNF産生を阻害した(図4BおよびC)ことを示し、したがって4-1BBLの役割はRAW264.7細胞中および一次マクロファージ細胞中において同一であることを示している。4-1BBLはRAW264.7細胞中でのLPS誘導性NF- κ B活性化には何の役割も及ぼさないが、それはLPS($100\text{ng}/\text{mL}$)を用いて15、30、40、50、60および90分間かけて処置した4-1BBLノックダウンRAW細胞が同等のI- κ B- α 分解を示したためである(図4D)。

【0112】

次に、RAW264.7細胞中での4-1BB発現を以下のとおりに*siRNA*を用いてノックダウンさせた。RAW264.7細胞は、対照*siRNA*、4-1BB-*siRNA* #1もしくは#2を含有するpSuppressorを用いて安定的にトランスフェクトした。4-1BB mRNAはRT-PCRによって試験した。TNF産生は、24時間にわたるLPS処置後に対照および4-1BBノックダウン細胞中で測定した。*siRNA*はRAW264.7細胞中では4-1BBを極めて効果的にノックダウンさせたが、このノックダウンはLPS誘導性TNF産生には影響を及ぼさなかった(図5A~B)。4-1BBはマクロファージ中でのLPS誘導性TNF産生には関係していないに違いないので、4-1BBは持続的TNF産生の調節において4-1BBLとの関連を有していない。まとめると、LPS処置マクロファージ中でのTNF産生を持続させることにおける4-1BB非依存性機能は、*siRNA*を用いて4-1BBLおよび4-1BBをノックダウンさせることによってRAW264.7マクロファージ細胞株においても観察された(図4A~Cおよび図5 A~B)。

【0113】

D. 転写試験

4-1BBLが転写および/または翻訳後段階でのTNF発現に影響を及ぼすかどうかを判定するために、4-1BBL欠損マウスおよび野生型マクロファージ中でのTnf mRNAをLPS処置の様々な期間の後に測定した(図3D)。TNF mRNAの発現は、LPS刺激の2時間後に4-1BBL欠損マウスおよび野生型マクロファージにおいて類似量でピークに達した。しかしLPS刺激後の後期には4-1BBL欠損マウスにおけるTNF mRNAは野生型マクロファージ中よりはるかに少なかった(図3D)。これらのデータはTNFタンパク質データ(図3B)と一致し、4-1BBLがTnf mRNA転写産物の発現に影響を及ぼすことを示している。

【0114】

4-1BBLがTnfの転写に影響を及ぼすかどうかを判定するために、核ランオン分析を実施した。LPSは、野生型および4-1BBL欠損のマクロファージ両方においてLPS刺激1時間後にTnf転写を誘発した。しかしTnf転写はLPS処置後の後期には4-1BBL欠損マクロファージ中では減少した(図3E)。

【0115】

4-1BBL欠損マクロファージ中のLPS刺激後の後期において見いだされた低いTnf mRNA量もまたmRNA安定性の変化の結果として生じたのかどうかを判定するために、本発明者らは、LPS刺激3時間後の4-1BBL欠損マウスおよび野生型マク

ロファージ中での T n f m R N A の半減期を測定した。4-1 B B L 欠損は、T n f m R N A の安定性に実質的な影響を及ぼした（図 3 F）。このため、4-1 B B L は、T N F 産生の転写および翻訳後調節の両方に影響を及ぼす。

【0116】

4-1 B B L 欠損が N F - κ B および他の転写因子の L P S 誘導性活性化に影響を及ぼすかどうかについては、以下のように電気泳動移動度シフトアッセイ（E M S A）によって判定した。4-1 B B L - / - および野生型マクロファージを L P S により 1、2、4、8 および 12 時間かけて刺激し、次に核抽出物調製のために採取した。E M S A は、放射性標識プローブを用いて実施した。結果は、4-1 B B L 欠損が 2 時間後にピークに達する早期応答である L P S 誘導性 N F - κ B 活性化に影響を及ぼさないことを示している（図 3 G）。これは、初期 3 時間中には 4-1 B B L 欠損によって L P S 誘導性 T N F 産生が影響を受けなかったことを示す図 3 B のデータと一致している。4-1 B B L 欠損はさらにまた L P S 誘導性 A P - I 活性にも大半、または全く影響を及ぼさなかった（図 3 G）。これとは対照的に、L P S 刺激の 8 時間後に発生した L P S 誘導性 C R E B および C / E B P 活性化は、4-1 B B L 欠損によって有意に阻害された（図 3 G）。低下した C R E B および C / E B P 活性化は、4-1 B B L 欠損マクロファージ中での持続的 T N F 産生における欠損に帰することができる。

【0117】

L P S 誘導性シグナリング経路、N F - κ B および M A P キナーゼ経路を試験するために、野生型および 4-1 B B L K O マウス由来の腹腔マクロファージを L P S（100 n g / m L）で 0.5、1、2、4 および 6 時間かけて処置し、細胞溶解物を抗 I κ B - α 、抗ホスホ-ERK（p-ERK）、抗ホスホ-JNK（p-JNK）、抗ホスホ-p38（p-p38）、抗 4-1 B B L、もしくは抗 G A P D H 抗体で免疫ブロットした。結果は、N F - κ B の阻害剤（I κ B - α ）の分解速度は 4-1 B B L K O および野生型の細胞中で同一であったが（図 3 H）、4-1 B B L K O 細胞中の ERK 1 / 2、JNK 1 / 2、および p38 M A P キナーゼ活性化（リン酸化）のレベルは野生型細胞におけると同等であるか僅かに低かったことを示している（図 3 H）。

【0118】

したがって、T L R 4 の下流の早期シグナルは 4-1 B B L 欠損による影響を受けないと思われ、シグナリング経路（図 3 H）および転写因子（図 3 G）の活性化の分析から得られたデータは、T N F 産生の分析（図 3 B）から得られたデータと一致している。さらに、これは T L R 4 の早期シグナリングが 4-1 B B L ノックアウトマクロファージ中では無傷であるという見解を支持している。

【実施例 5】

【0119】

[4-1 B B L は T L R 2、T L R 3、T L R 4 および T L R 9 と相互作用し、マクロファージ中での T L R 2、T L R 3、T L R 4 および T L R 9 媒介性 T N F 産生に関係している]

4-1 B B L が T L R 4 媒介性細胞応答に選択的に関係しているかどうかを判定するために、以下のように H A - 4-1 B B L を F l a g - T L R 2、F l a g - T L R 3、F l a g - T L R 4、もしくは F l a g - T L R 9 と共発現させた。293 T 細胞は、F l a g - T L R 2、F l a g - T L R 3、F l a g - T L R 4、もしくは F l a g - T L R 9 と一緒に、空（対照）または H A - 4-1 B B L の発現ベクターを用いてトランスフェクトした。細胞は、トランスフェクションの 24 時間後に溶解させた。細胞溶解物は抗 F l a g 抗体を用いて免疫ブロットした、または抗 H A を用いて免疫沈降させ、次に抗 H A および抗 F l a g 抗体を用いて免疫ブロットした。結果は、試験した全 T L R が、共免疫沈降アッセイにおいて 4-1 B B L によって沈降したことを示している（図 6 A）。この共免疫沈降は特異性を有するが、それは F l a g - I L - 3 R が 4-1 B B L と共免疫沈降しなかったためである（図 6 A）。

【0120】

4-1 B B LがT L R 2、3、4、もしくは9媒介性細胞応答に関係しているかどうかを判定するために、以下の実験を実施した。野生型および4-1 B B L-/-マクロファージは、P a m 3 (1 μ g / m L)、ポリ I : C (25 μ g / m L)、L P S (100 n g / m L)、R 8 4 8 (100 n M)、C p G (5 μ g / m L)、I L - 1 β (10 n g / m L)、または未処置培養培地 (なし) を用いて処置した。T N F 産生は、処置 24 時間後に測定した。結果は、T N F の P a m 3 (T L R 2 リガンド)、ポリ I : C (T L R 3 リガンド)、R 8 4 8 (T L R 7 & 8 リガンド)、C p G (T L R 9 リガンド) 誘導性産生が4-1 B B L K O 細胞中では減少したことを示している (図 6 B)。この作用はT L R 特異的であったが、それはI L - 1 β 誘導性T N F 産生が4-1 B B L K O 細胞中では正常であったためである (図 6 B)。このため、4-1 B B L は、すべてではなくても多数の異なるT L R のシグナリングに関係している。

10

【実施例 6】

【0121】

[L P S 処置マクロファージ中での持続的T N F 産生のためには4-1 B B L の誘導および細胞表面局在が必要とされる]

4-1 B B L は大半の組織中では検出不能であり、マクロファージ中および樹状細胞中でのみ低レベルが発現する (F u t a g a w a e t a l . , I n t . I m m u n o l . 14 : 275-286 (2002) を参照されたい)。L P S 処置マクロファージ中での持続的T N F 産生において4-1 B B L が果たす役割を分析するために、野生型、T L R 4-/-、M y D 8 8-/-、およびT R I F-/-マウスから単離したマクロファージをL P S で0.5、1、2、4、および8時間かけて処置した。4-1 B B L タンパク質は、抗4-1 B B L 抗体を用いた免疫ブロット法によって分析した。G A P D H をローディング対照として使用した。結果は、L P S がマクロファージ中での4-1 B B L の迅速な発現を誘導し、4時間後にピークに達することを示している (図 7 A、左側の1~5 レーン、または全パネルの1~6 レーン)。4-1 B B L 誘導のタイミングは、4-1 B B L ノックアウトマクロファージ中で低下した持続的T N F 産生と明確に相関している (図 3 B)。L P S 誘導性4-1 B B L 発現は、T L R 4-/-、M y D 8 8-/-、およびT R I F-/-マクロファージ中では低下しているために、T L R 4、M y D 8 8、およびT R I F 依存性である (図 7 A)。4-1 B B L 発現は、試験した全T L R リガンドによって誘導されたが、I L - 1 β によっては誘導されなかった (図 8 A~F)。4-1 B B L はその合成後に (おそらくはグリコシル化によって) 翻訳後修飾されると思われるが、それはS D S - P A G E 上でシフトしたタンパク質バンドが観察されたためであった (図 7 A)。

20

30

【0122】

4-1 B B L をコードする遺伝子のプロモーターは多数のN F - κ B 結合部位を含有し、そしてL P S 誘導性4-1 B B L m R N A はN F - κ B 阻害剤であるスルファサラジン (図 7 B) またはプロテアソーム阻害剤であるM G - 1 3 2 (データは示していない) によって効果的に阻害された。p 3 8 阻害剤S B 2 0 3 5 8 0、J n k 阻害剤S P 6 0 0 1 2 5、およびM e k 阻害剤P D 9 8 0 5 9 もまた4-1 B B L 発現に対しある程度の阻害作用を示していた (図 7 B)。L P S 誘導性の4-1 B B L m R N A (T_{1/2} = 67 分間) は非刺激マクロファージ中でアデノウイルスベクターによって発現した4-1 B B L m R N A (T_{1/2} = 33 分間) よりはるかに安定していたが、これはm R N A 安定性におけるL P S 誘導性変化もまたL P S 誘導性4-1 B B L 発現に関係していた (図 7 C)。

40

【0123】

野生型マウス由来のL P S 処置腹腔マクロファージ中での4-1 B B L 発現は、抗4-1 B B L 抗体を用いるフローサイトメトリーによって分析した。アイソタイプ抗体を対照として使用した。全4-1 B B L を測定するためには0.1%サポニンを用いる透過化を使用した。結果は、L P S 誘導性4-1 B B L の大半が細胞表面上に局在することを示している (図 7 D)。

50

【0124】

TNFの発現を調節するためには細胞表面上に新規に合成した4-1BBLが局在する必要があるかどうかを判定するために、腹腔マクロファージを1時間かけてプレフェルジンA (3 μ g/mL)を用いて、あるいは用いずにプレインキュベートし、次に指定の時間かけてLPSで処置した。免疫染色は抗4-1BBL抗体を用いて実施した。4-1BBLおよびTNF mRNAは、半定量PCRによって分析した。GAPDHを対照として使用した。プレフェルジンAは、小胞体からゴルジ装置へのその転位を阻害することによって細胞表面へのタンパク質転位を遮断する特異的阻害剤である (Klausner et al., J. Cell Biol. 116:1071-1080 (1992)) を参照されたい) (図7E)。新規に合成した4-1BBLの細胞表面への転位の遮断は、4-1BBL mRNAにおけるLPS誘導性増加に影響を及ぼさなかった (図7F)。プレフェルジンA処置は1時間後のLPS誘導性TNF mRNAに影響を及ぼさなかったが、2、4および6時間後のTNF mRNAを減少させたので (図7F)、これは4-1BBLの誘導のみではなく細胞表面局在もまた持続的TNF産生のために必要とされることを示唆している。

【実施例7】

【0125】

[4-1BBLの発現および架橋結合はTNF産生を誘発する]

LPS処置マクロファージ中での持続的TNF産生のためには4-1BBLの誘導が必要とされるので、4-1BBLの過剰発現がTNF産生を誘発できるかどうかを試験した。4-1BBLは、Bukczynski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101:1291-1296 (2004)に記載されるように、アデノウイルス媒介性遺伝子送達によってマクロファージ中で発現させた。簡潔に述べると、マクロファージは、なし (対照) もしくは4-1BBLをコードする様々な用量のアデノウイルスで感染させ、4-1BBLの発現を抗4-1BBL抗体を用いて免疫ブロット法によって測定した。ウイルス感染24時間後の培地中のTNFレベルを測定した。結果は、4-1BBL発現が用量依存的にTNF産生を誘導したことを示している (図9A)。TNF誘導は、対照ウイルスで感染させた細胞の培地では検出可能なTNFが存在しなかったもので、4-1BBL特異的であった。4-1BBL発現によるTNFの誘導は、TNF産生が4-1BBLをコードするアデノウイルスで感染させた4-1BBL欠損マウスおよび野生型マクロファージにおいて類似していたため、4-1BBLを必要としなかった。

【0126】

4-1BBL過剰発現によって媒介されたTNF産生がTLR4、MyD88、およびTRIF依存性であるかどうかを試験するために、TLR4-/-およびTRIF-/-マクロファージを対照もしくは4-1BBLを発現するウイルスで感染させ、細胞中の4-1BBLレベルおよび培地中のTNFレベルを測定した。結果は、4-1BBL発現によるTNF産生の誘導が部分的にはTLR4-/-マウスから単離したマクロファージ中では低下していることを示し (図9C)、これはTLR4に加えて、4-1BBLと相互作用できる他のTLRもまた4-1BBL媒介性TNF産生に関係する場合があることを示唆している。実際に、4-1BBLは、TLR2および他のTLRとそれらが293T細胞中で共発現した場合には相互作用し (図6A)、4-1BBL過剰発現によって誘導されたTNF産生はTLR2欠損マクロファージ中では減少した (図9D)。これらの結果は、4-1BBL媒介性のTNF産生に複数のTLRが関係しているという解釈を支持している。TLRが関係しているにもかかわらず、TRIFの欠損は4-1BBL誘導性TNF産生には何の影響も及ぼさなかった (図9E)。MyD88マウスから単離したマクロファージはアデノウイルスによって効果的に感染させることができないため、4-1BBL誘導性TNF産生におけるMyD88の必要性に関しては別の方法によって対処しなければならない (以下を参照されたい)。

【0127】

4-1 B B Lは、T N Fスーパーファミリーメンバーである (W a t t s , T . H . ,
A n n u . R e v . I m m u n o l . 2 3 : 2 3 - 6 8 (2 0 0 5) を参照されたい)。
4-1 B B Lは、それが機能するためには三量体が必要とされる点でこのスーパーファミ
リーの他のメンバーと類似していてもよい (R a b u e t a l . , J . B i o l . C
h e m . 2 8 0 : 4 1 4 7 2 - 4 1 4 8 1 (2 0 0 5) を参照されたい)。この可能性を
試験するために、野生型マクロファージを4-1 B B - F cキメラ (4-1 B Bのジスル
フィド結合ホモ二量体)、抗F c抗体、または4-1 B B - F cおよび抗F cを併用して
処置し、次に培地中のT N Fレベルを測定した。より詳細には、マクロファージをやギ抗
ヒトF c抗体 (抗F c、 $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)、マウス4-1 B B - ヒトI g - F cドメイ
ン融合タンパク質 (4-1 B B - F c、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$)、4-1 B B - F cおよび抗F c
を併用して、または未処置培養培地を用いて処置した。培地中のT N Fレベルは24時間
後に測定した。結果は、4-1 B B - F cは2つの4-1 B B L分子を架橋結合させるこ
とはできるが、T N F産生を誘導しなかったことを示している (図9 F)。その後の4-
1 B B - F cと抗F c抗体との架橋結合はT N F産生を誘導したが、抗F c抗体単独では
何の作用も及ぼさなかった (図9 F)。T N F産生を誘発するためには、2つより多い4
-1 B B L分子の架橋結合が必要とされると思われる。架橋結合誘導性T N F産生におけ
る4-1 B B Lの必要性は、4-1 B B L K O細胞を用いることによって確認された (図9 F)。

10

【0128】

4-1 B B LシグナリングがM y D 8 8およびT R I Fを必要とするかどうかを判定す
るために、M y D 8 8-/-およびT R I F-/-マクロファージを4-1 B B - F c、
抗F c抗体、ならびに4-1 B B - F cおよび抗F c抗体の両方で処置し、培地中のT N
Fレベルを測定した。結果は、4-1 B B L架橋結合媒介性T N F産生がM y D 8 8およ
びT R I F依存性であることを示している (図9 F)。これとは対照的に、4-1 B B L
架橋結合によって誘発されたT N F産生は、野生型マクロファージ中と比較して、T L R
2欠損およびT L R 4欠損マクロファージ中では統計学的に有意な境界まで減少した (図
9 F)。

20

【0129】

これらのデータの1つの解釈は、細胞表面上での4-1 B B Lの発現およびその後のオリ
ゴマー化がM y D 8 8およびT R I F依存性T N F産生を誘発することである。T L R
4および他のT L Rは4-1 B B Lと相互作用するので (図1 A、1 B、1 Dおよび6 A)
、そしてT L Rは二量体を形成するので (M e d z h i t o v e t a l . , N a t
u r e 3 8 8 : 3 9 4 - 3 9 7 (1 9 9 7) を参照されたい)、4-1 B B L過剰発現
によって媒介されるT N F産生におけるT L R 4の部分的依存性 (図9 C)は、4-1 B
B Lの架橋結合に寄与する4-1 B B L-T L R 4相互作用に起因すると考えられる。こ
れは、4-1 B B L過剰発現媒介性T N F産生がT L R 4もしくはT L R 2いずれかの欠
損によって部分的に阻害されるという観察所見によって支持されている (図9 C~F)。

30

【0130】

4-1 B B - F cおよび抗4-1 B B Lは2つの4-1 B B L分子にしか結合せず、そ
れらと4-1 B B Lとの結合は4-1 B B Lオリゴマー化を阻害する、または4-1 B B
Lが例えばT L Rなどの他の分子と相互作用することを防止するはずであるため、それら
を使用してこの仮説を試験した。マクロファージは、以下のように4-1 B B - F cもし
しくは抗4-1 B B L抗体の存在下でL P Sを用いて刺激した。マクロファージをL P S、
4-1 B B - F cを含むL P S、0、2、もしくは $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗4-1 B B Lを含む
L P S、または未処置培養培地とともに24時間かけてインキュベートした。結果は、4
-1 B B - F cおよび抗4-1 B B L抗体がいずれもL P S誘導性T N F産生を阻害した
ことを示している (図9 G)。

40

【0131】

4-1 B B Lは多数のT L Rリガンドによって誘導されたので (図8 A~F)、T L R
2リガンド (P a m 3)、T L R 3リガンド (ポリI : C)、T L R 4リガンド (L P S

50

）、TLR7、8リガンド（R848）およびTLR9リガンド（CpG）を用いて刺激した4-1BBL欠損マクロファージによるTNF産生について試験した。TNF産生の減少が観察された（図6B）。これらのデータは、様々なTLRによって媒介されたTNF産生に4-1BBLが関係していることを示している。エンドソームもしくは例えばTLR9などの小胞体（ER）中に局在するTLRは血漿膜中に局在する4-1BBLとはおそらく相互作用し難いと思われるので、TLR9誘導性の4-1BBLのシグナリングは、細胞表面上での4-1BBLと他のTLRとの相互作用に依存する場合がある。これに一致しているのは、低用量のCpG（1μg/mL）を使用した場合のTLR4欠損マクロファージ中のTLR9誘導性TNF産生における小規模ではあるが統計学的に有意な減少の検出である（図6C～D）。しかし、4-1BBLと細胞表面TLRとの相互作用以外の機序が4-1BBLシグナリングに関係している場合もあるが、それは細胞が高用量のCpGを用いて刺激した場合にTLR4欠損によるこの減少が有意ではなかったためである。

10

【実施例8】

【0132】

[2つの連続するTLR4複合体]

4-1BBL誘導はTLR/MyD88/TRIF経路に左右され、そして4-1BBL媒介性シグナリングはMyD88およびTRIFには非依存性であるが、それとTLRとの相互作用には関連しているので、以下のようにLPS処置マクロファージ中に連続TLR4シグナリング複合体が存在するのかどうかを試験した。マクロファージをLPSで0.5、1、2、4、8および12時間かけて処置した。全細胞溶解物は、（1）抗4-1BBL、抗TLR4、および抗MyD88を用いて免疫ブロットした、（2）抗TLR4抗体を用いて免疫沈降させて、次に抗TLR4、抗4-1BBL、および抗MyD88を用いて免疫ブロットした、（3）抗MyD88抗体を用いて免疫沈降させ、次に抗MyD88、抗TLR4、および抗4-1BBLを用いて免疫ブロットした、または（4）抗4-1BBLを用いて免疫沈降させ、次に抗4-1BBL、抗TLR4、および抗MyD88を用いて免疫ブロットした。全免疫沈降法のために陰性対照としてアイソタイプ抗体を使用した。4-1BBLもしくはMyD88に対する免疫ブロット法における陽性対照は、指定の箱の中に示した。結果は、2～8時間の曝露時間にLPSが4-1BBL発現を誘導したが、TLR4もしくはMyD88のタンパク質レベルには影響を及ぼさなかったことを示している（図10A、細胞溶解物）。TLR4は、0.5～1時間のLPS曝露時間中にMyD88と会合して、その後解離したが、他方TLR4-4-1BBL複合体は2～12時間のLPS曝露時間中に出現した（図10A、IP：TLR4）。TLR4-MyD88複合体は、MyD88の免疫沈降によって確認された（図10A、IP：MyD88）。MyD88は4-1BBLを沈降させることはできなかったが、これはMyD88および4-1BBLが同一TLR4複合体には存在しないことを示している。4-1BBLの免疫沈降は2～12時間かけてLPS処置した細胞中でTLR4を沈降させたが、MyD88を沈降させることはできなかったことから、MyD88および4-1BBLが同一複合体中には存在しないことが確認された（図10A、IP：4-1BBL）。このため、LPS処置マクロファージ中には2つのTLR4複合体が存在し、1つは初期細胞応答の原因であるMyD88複合体であり、そして第2は持続的TNF産生に関係している4-1BBL-TLR4複合体である。

20

30

40

【0133】

MyD88は4-1BBLと相互作用できないことを確認するために、AU1タグ付MyD88を以下のようにFlag-4-1BBLもしくはFlag-TLR4を用いて過剰発現させた。293T細胞は、Flag-4-1BBLもしくはFlag-TLR4発現ベクターと一緒にMyD88-AU1発現ベクターを用いてトランスフェクトした。細胞はトランスフェクションの24時間後に溶解させ、細胞溶解物はAU1抗体を用いた免疫沈降供し、その後抗Flagおよび抗AU1抗体を用いた免疫ブロットに供した。結果は、Flag-TLR4はMyD88によって沈降したがFlag-4-1BBLは沈

50

降しなかったことを示している（図10B）。

【0134】

4-1BBLと相互作用するタンパク質を探索するために、4-1BBLとTRAF2およびTRAF6との相互作用について以下のように試験した。293T細胞は、TRAF2-mycもしくはTRAF6-myc発現ベクターと一緒にHA-4-1BBL発現ベクターを用いてトランスフェクトした。細胞溶解物は、抗HA抗体を用いて免疫沈降させ、抗mycおよび抗HA抗体を用いて免疫ブロットした。結果は、4-1BBLがTRAF6とは相互作用するが、TRAF2とは相互作用しないことを示している（図10C）。

【0135】

4-1BBLおよびTRAF6は相互作用するために、4-1BBL媒介性TNF産生のためにTRAF6が必要とされるかどうかを試験した。SiRNAを使用して、以下のようにRAW264.7マクロファージ中でTRAF6をノックダウンさせた。マクロファージをTRAF6-siRNA#1もしくは#2、または対照siRNA(C)を用いてトランスフェクトし、TRAF6タンパク質レベルをTRAF6に対して免疫ブロットすることによって分析した。対照siRNA、TRAF6-siRNA#1もしくはTRAF6-siRNA#2トランスフェクト細胞中のTNF産生レベルを、抗Fc、4-1BB-Fc、4-1BB-Fcおよび抗Fcと一緒に、LPS、ポリI:C(25μg/mL)、IL-1β(10ng/mL)、または未処置培養培地を用いてインキュベートした24時間後に測定した。IL-6レベルは、細胞を培地、LPS、もしくはTNF(10ng/mL)で処置した場合に測定した。SiRNAはいずれもRAW264.7細胞中のTRAF6タンパク質レベルを効果的に減少させた(図10D)。TRAF6ノックダウン細胞および対照細胞は、4-1BB-Fc、抗Fc抗体、または4-1BB-Fcおよび抗Fc抗体の両方で処置し、そして培地中のTNFレベルを測定した。TRAF6のノックダウンは、4-1BBL架橋結合媒介性TNF産生を遮断した(図10D)。予想されるように、TRAF6のノックダウンは、LPS、ポリI:C、およびIL-1β誘導性サイトカイン産生を低下させたが、TNF誘導性IL-6産生には影響を及ぼさない(図10D)。

【0136】

4-1BBLによって誘発される下流事象を解明するために、転写因子活性化について試験した。4-1BBLの発現はCREBおよびC/EBPを活性化させたがNF-κBは活性化させなかった(図10E)。これは4-1BBL欠損がLPS誘導性NF-κB活性化には何の影響も及ぼさないが、CREBおよびC/EBP活性化を低下させた(図3F)という観察所見と一致している。同様に、IκBαの分解は、4-1BBLを過剰発現する細胞中で観察されなかった(図10F)。4-1BBLの発現はp38、JnkおよびErkのある程度のリン酸化を誘発し(図10F)、そしてp38、JnkおよびErkの阻害は4-1BBL媒介性TNF産生を減少させた(しかしNF-κBは減少させなかった)(図10G)ことは、4-1BBL媒介性TNF産生にはMAPキナーゼ経路が関係していることを示唆している。4-1BBLシグナリング経路は、4-1BBLの欠損が後期におけるLPS誘導性TNF mRNA転写の減少(図3E)を生じさせ、4-1BBL過剰発現はTnf mRNA量を増加させた(図10H)ので、Tnf mRNAに影響を及ぼすと思われる。4-1BBLを過剰発現する細胞中およびLPS細胞で処置した細胞中のTnf mRNAの半減期を比較した。Tnf転写産物は類似の半減期を示した(図10H)。LPSはTnf mRNAを安定化させ、4-1BBLの欠損はLPS誘導性Tnf mRNAの安定性を低下させる(図3F)ことは公知であるので、4-1BBLはLPS誘導性Tnf mRNA安定化の媒介因子であると思われる。集約すると、本明細書に記載したデータは、マクロファージ中でのTNF発現の初期活性化およびTNFの持続的産生が早期および後期シグナリング経路によって調節されることを示している(図10I)。

【0137】

前炎症性サイトカインの発現は、遺伝子の活性化および不活性化機序によって厳密に制御される。本明細書に記載した試験は、マクロファージ中でのTNF発現の初期活性化およびTNFの持続的産生が早期および後期シグナリング経路によって調節されることを示している（図10I）。周知のシグナル経路であるTLR4/MyD88/TRIFは、炎症性遺伝子の開始および早期発現の責任を担っている。4-1BBLは、早期誘導性タンパク質の1つであり、細胞活性化の早期においてのみ誘導される。新規に合成した4-1BBLは細胞表面上に転位して持続的TNF産生のための新規のシグナリング期を生成する。4-1BBLおよびTLRの相互作用は第2期シグナリングの生成に関係していると思われ、連続シグナリング複合体においてTLRが果たす役割は、4-1BBLのオリゴマー化を支援する可能性が最も高い。4-1BBL複合体のシグナリング機序は初期TLR4シグナリングの機序とは異なるが、それは後者がMyD88およびTRIFには依存していないためである。しかし、いずれのシグナリング期もTRAF6を必要とする。

10

【0138】

炎症性サイトカインの産生は、通常は炎症性誘発因子の分解が存在すると終了する初期およびその後の持続期を特徴とする炎症プロセスの一部である（Triantafilou and Triantafilou, Trends Immunol. 23:301-304 (2002)を参照されたい）。しばしば、持続的炎症性応答の終了時には炎症調節の崩壊が発生し、TNF産生の長期間の持続には多数の炎症性疾患の病態が関連することが多い（Vassalli, P., Annu. Rev. Immunol. 10:411-452 (1992)を参照されたい）。このために、持続的TNF産生における重要な調節因子としての4-1BBLの同定は、炎症性疾患における新規な介入術を開発するための新規な治療標的を提供する。

20

【実施例9】

【0139】

[4-1BBLはIL-6誘導において役割を果たす]

IL-6は、炎症に関係するサイトカインである。IL-6発現の増加は、関節リウマチ(RA)、全身発症性若年性慢性関節炎(JCA)、骨粗鬆症、および乾癬等の数種の疾患プロセスの病態に関係している。IL-6誘導における4-1BBLの関与を示すために、以下の実験を実施した。第1に、4-1BBL-/-および野生型マウスに0.5mgのLPSを腹腔内注射した。次に血清を0、2および6時間後に採取し、IL-6レベルを測定した。結果は、4-1BBL-/-マウスがLPSに応答して野生型マウスより有意に少ないIL-6を産生することを示した（図11A）。4-1BBL-/-および野生型マウス由来の腹腔マクロファージをLPS(100ng/mL)で処置し、培養培地中のIL-6のレベルを3、9および18時間後に試験した。結果から、野生型マウス由来のマクロファージが4-1BBL-/-マウス由来のマクロファージより有意に多いIL-6を生成することを確認した（図11B）。これらの結果は、野生型および4-1BBL-/-マクロファージをPam3(1μg/mL)、ポリI:C(25μg/mL)、LPS(100ng/mL)、R848(100nM)、CpG(5μg/mL)、IL-1β(10ng/mL)、または未処置培養培地(なし)を用いて処置した24時間後のIL-6産生レベルと比較した。Pam3、ポリI:C、LPS、R848、およびCpGで処置した野生型マクロファージは、4-1BBL-/-マクロファージより有意に多いIL-6を生成した（図11C）。これとは対照的に、野生型および4-1BBL-/-マクロファージによるIL-6産生レベルは匹敵していた。

30

40

【0140】

マクロファージをLPS、4-1BBL-Fcを含むLPS、0、2、もしくは5μg/mLの抗4-1BBL抗体を含むLPS、または未処置培養培地とともに24時間かけてインキュベートし、次に培地中のIL-6レベルを測定すると、結果は、LPSおよび4-1BBL-Fcを用いてインキュベートしたマクロファージがLPS単独とインキュベートしたマクロファージより有意に少ないIL-6を生成することを示した（図11D）。LPSおよび濃度を上昇させながら抗4-1BBL抗体を用いてインキュベートしたマク

50

ロファージもまた、レベルが減少する I L - 6 産生を示した (図 1 1 D)。

【0141】

I L - 6 産生において 4 - 1 B B L が果たす役割を確認するために、R A W 2 6 4 . 7 細胞は、対照 s i R N A、または 4 - 1 B B L - s i R N A # 1 もしくは # 2 を含有する p S u p p r e s s o r を用いて安定性にトランスフェクトした。L P S を用いて 3、9 および 24 時間かけて処置した 4 - 1 B B L ノックダウン細胞中での I L - 6 産生を測定し、対照細胞の I L - 6 産生と比較した。結果は、4 - 1 B B L 発現がノックダウンされている R A W 2 6 4 . 7 細胞が対照 s i R N A を用いてトランスフェクトした R A W 2 6 4 . 7 細胞より有意に少ない I L - 6 を生成することを示した (図 1 1 E)。これらの結果は、対照、およびペプチドグリカン (P G、10 μ g / m L)、ポリ I : C (25 μ g / m L)、L P S (100 n g / m L)、C p G (5 μ g / m L)、または未処置培養培地中で 24 時間かけて処置した 4 - 1 B B L ノックダウン細胞についての所見と一致していた (図 1 1 F)。

【0142】

[参考文献]

【表 1 A】

Galanos, C., Freudenberg, M. A. & Reutter, W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5939-5943 (1979).

Beutler, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* **430**, 257-263 (2004).

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* **420**, 885-891 (2002).
4.

10

Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216 (2002).

Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499-511 (2004).

Goodwin, R. G. *et al.* Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2631-2641 (1993).

20

Alderson, M. R. *et al.* Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand. *Eur. J. Immunol.* **24**, 2219-2227 (1994).

Beutler, B. *et al.* Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**, 552-554 (1985).

Watts, T. H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 23-68 (2005).

Xu, Y. *et al.* Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111-115 (2000).

30

Futagawa, T. *et al.* Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int. Immunol.* **14**, 275-286 (2002).

Klausner, R. D., Donaldson, J. G. & Lippincott-Schwartz, J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* **116**, 1071-1080 (1992).

Bukczynski, J., Wen, T., Ellefsen, K., Gauldie, J. & Watts, T. H. Costimulatory ligand 4-1BBL (CD137L) as an efficient adjuvant for human antiviral cytotoxic T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 1291-1296 (2004).

40

Rabu, C. *et al.* Production of recombinant human trimeric CD137L (4-1BBL). Crosslinking is essential to its T cell co-stimulation activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 41472-41481 (2005).

【表 1 B】

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).

Triantafilou, M. & Triantafilou, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* **23**, 301-304 (2002).

Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 411-452 (1992).

10

DeBenedette, M. A. *et al.* Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J. Immunol.* **163**, 4833-4841 (1999).

Hoebe, K. *et al.* Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**, 743-748 (2003).

Kim, S. O., Ono, K., Tobias, P. S. & Han, J. Orphan nuclear receptor Nur77 is involved in caspase-independent macrophage cell death. *J. Exp. Med.* **197**, 1441-1452 (2003).

20

Han, J., Jiang, Y., Li, Z., Kravchenko, V. V. & Ulevitch, R. T. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* **386**, 296-299 (1997).

Ge, B. *et al.* TAB1beta (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1-binding protein 1beta), a novel splicing variant of TAB1 that interacts with p38alpha but not TAK1. *J. Biol. Chem.* **278**, 2286-2293 (2003).

【0 1 4 3】

30

〔他の実施形態〕

本明細書で参照もしくは言及したすべての特許および刊行物は、本発明が関与する分野の当業者の技術レベルの指標であり、そのように参照した特許もしくは刊行物各々は、それが全体として個別に参照することにより本明細書の一部をなすものとし、または本明細書に全体として記載される場合と同程度に参照することにより本明細書の一部をなすものとする。本出願人は、本明細書にそのような言及した任意の特許もしくは刊行物からの任意またはすべての材料および情報を物理的に組み入れる権利を保有する。

【0 1 4 4】

本明細書に記載した特定の方法および組成物は、好ましい実施形態を表し、例示的なものであり、本発明の範囲を限定することは意図していない。他の目的、態様、および実施形態は、本明細書を考察すれば当業者であれば考え付くであろうし、特許請求の範囲に規定された本発明の精神の中に含まれている。当業者には、本明細書に開示した本発明には、本発明の範囲および精神から逸脱せずに、様々な置き換えおよび変更を加えられることは容易に明白になろう。本明細書に例示的に記載した本発明は、本明細書において必須であると特別に開示されていない任意の要素、または制限の非存在下で適切に実施することができる。本明細書に例示的に記載した方法およびプロセスは、異なる工程順序で適切に実施することができ、そしてそれらは本明細書または特許請求項に指定の工程の順序に必ずしも限定されない。本明細書および添付の特許請求項において使用するように、単数形の「1つの」および「その」には、その状況が明白に他のことを指すものでない限り、複数の言及を含む。したがって、例えば、「(1つの)抗体」は複数(例えば、抗体の溶

40

50

液または一連の抗体調製物)のそのような抗体などを含む。いかなる状況下においても、本特許は、本明細書に詳細開示した特定の実施例もしくは実施形態もしくは方法に限定されると解釈されてはならない。いかなる状況下においても、特許用語は、そのような記述が詳細であり、かつ出願人らによる応答文書において明示的に認められた認定もしくは留保を伴わない限り、特許商標局の任意の審査官もしくは任意の他の役員もしくは職員によって作成された任意の記述によって制限されないと解釈できる。

【0145】

使用してきた用語および表現は説明のためであって限定するために使用されたものではなく、本明細書に図示かつ記載した特徴もしくはその部分の任意の同等物を排除するためにそのような用語および表現を使用することは意図したものではなく、様々な変更が請求されている本発明の範囲内において可能であると認識されている。したがって、本発明を好ましい実施形態および任意の特徴によって詳細に開示してきたが、本明細書に開示した概念の変更および変形は当業者であれば使用できること、そしてそのような変更および変形は添付の特許請求項によって規定された本発明の範囲内に含まれると見なされることは理解される。

【0146】

本明細書では、本発明を広汎かつ遺伝学的に記載してきた。一般的開示内に含まれるより狭い種および垂属のグループの各々もまた本発明の一部を形成している。これには除かれた材料が本明細書で詳細に言及されたか否かとは無関係に、属からの任意の対象を取り出すという前提または消極的な限定を伴って、本発明の一般的記述を含む。

【0147】

他の実施形態は、以下の特許請求項に含まれる。さらに、本発明の特徴もしくは態様がマーカッシュグループによって記載される場合は、当業者であれば、本発明がマーカッシュグループの任意の個別メンバーもしくはメンバーのサブグループによって記載されることもまた理解される。

【図1】

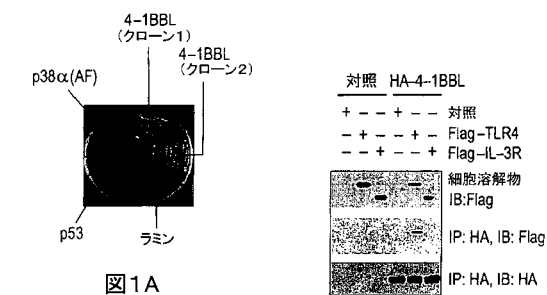


図1A

図1B

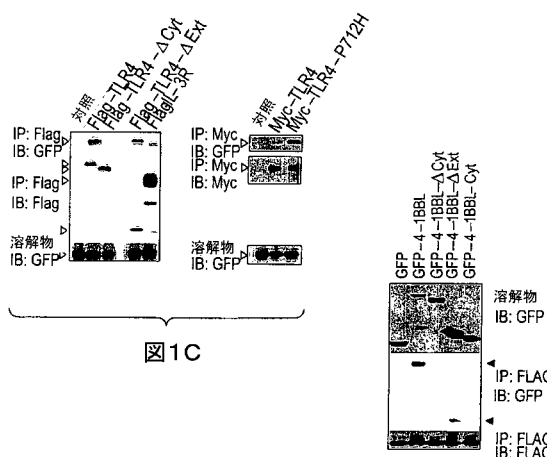


図1C

図1D

【図2】

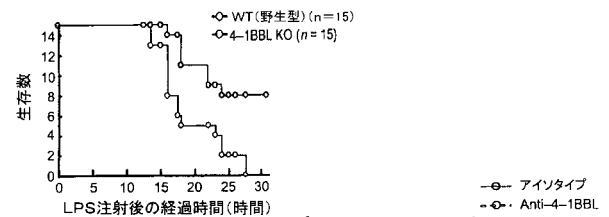


図2A

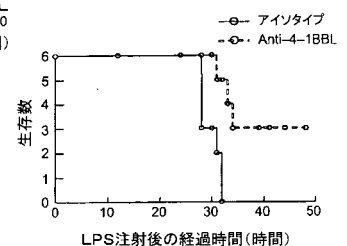


図2B

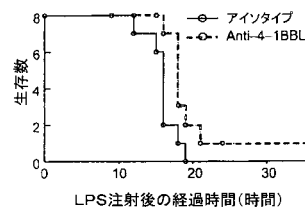


図2C

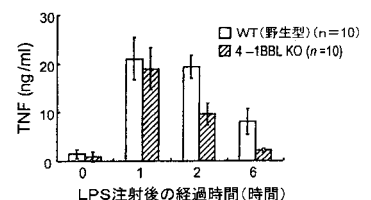
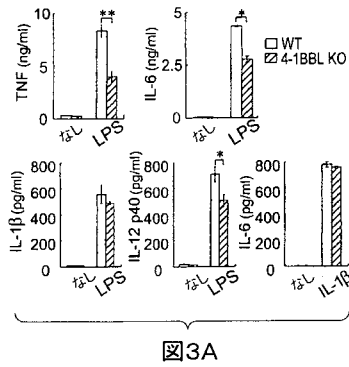
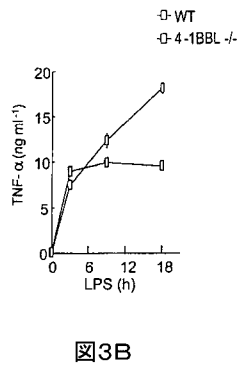


図2D

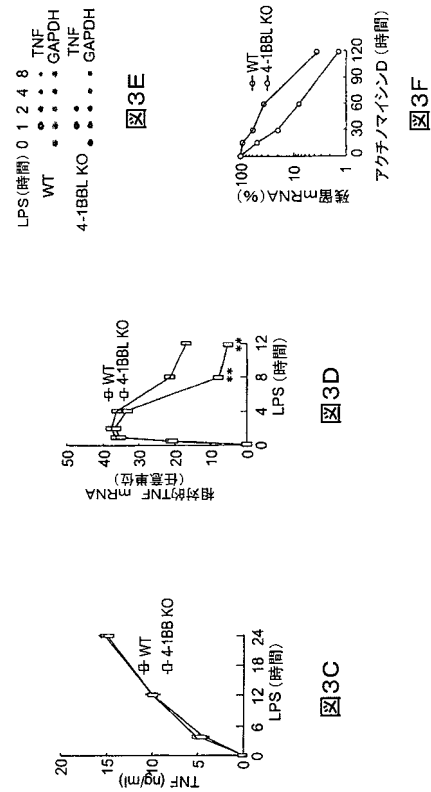
【図 3 A】



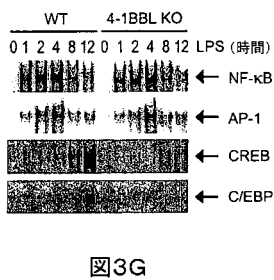
【図 3 B】



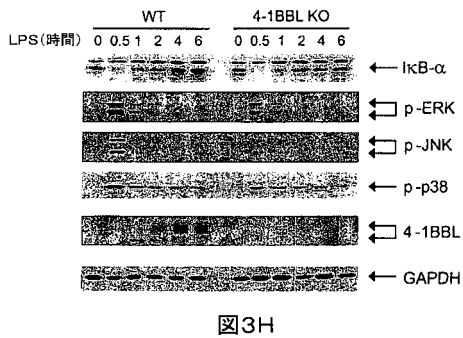
【図 3 C - 3 F】



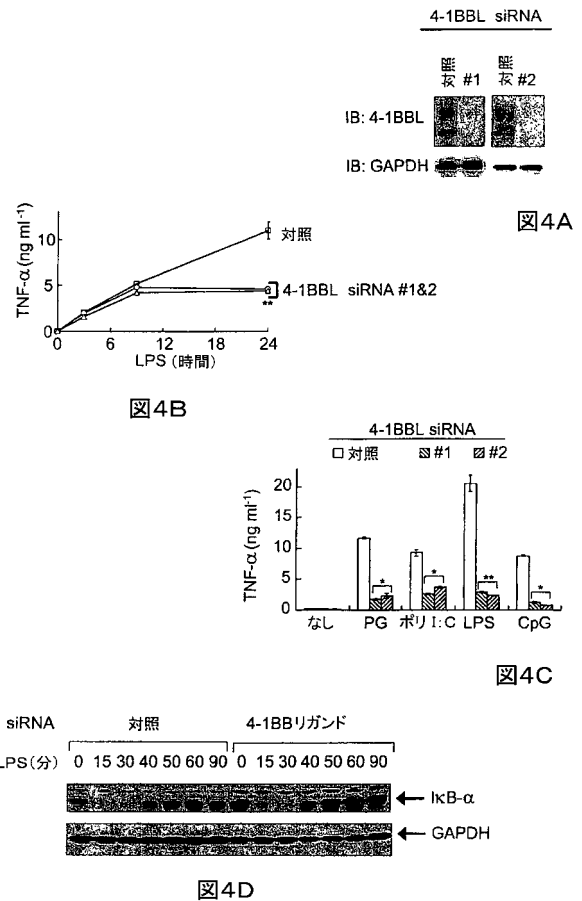
【図 3 G】



【図 3 H】



【図 4】



【図 5】

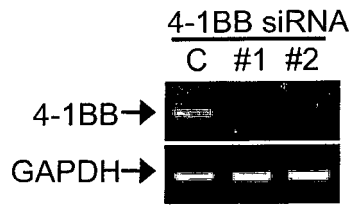


図5A

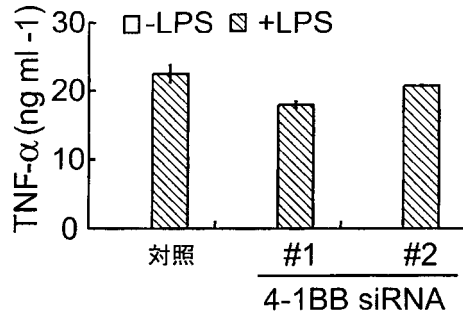


図5B

【図 6 A】

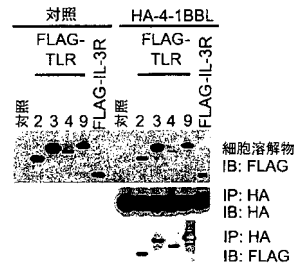


図6A

【図 6 B】

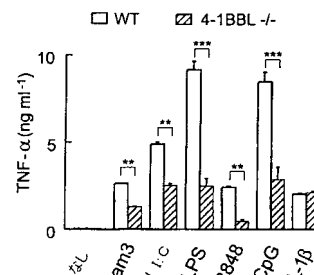


図6B

【図 6 C】

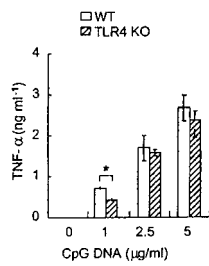


図6C

【図 6 D】

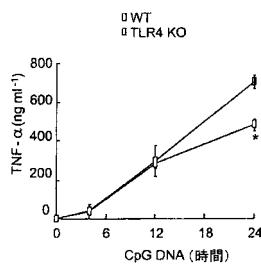


図6D

【図 7 A】

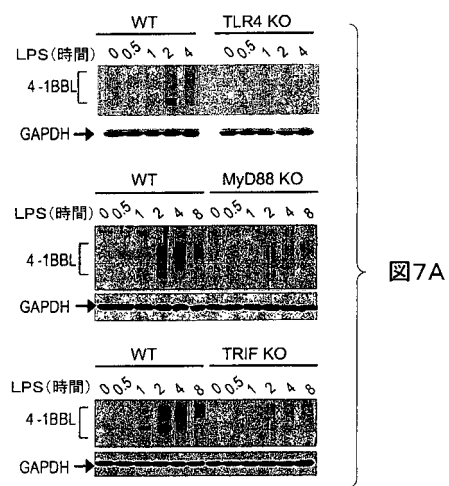


図7A

【図 7 B】

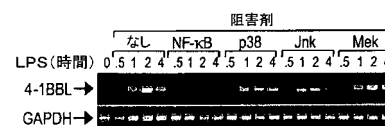


図7B

【図 7 C】

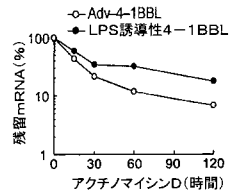


図7C

【図 7 D】

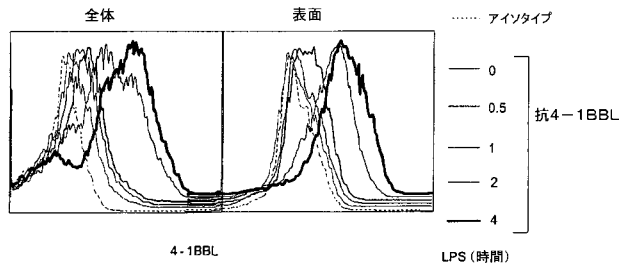


図7D

【図 7 E】

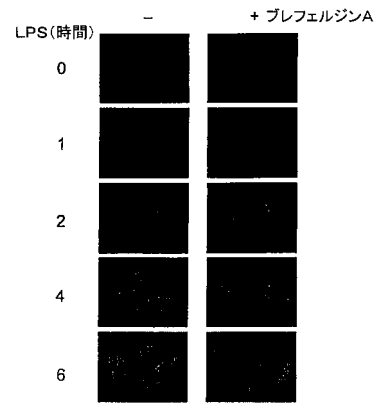


図7E

【図 7 F】

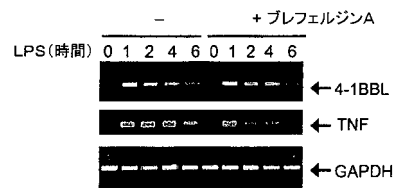


図7F

【図 8】

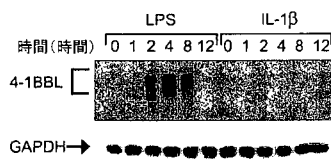


図8A

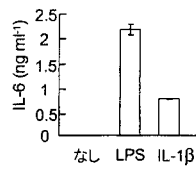


図8B

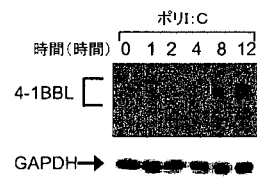


図8C

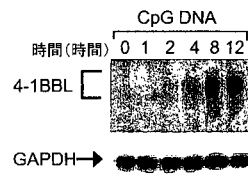


図8D

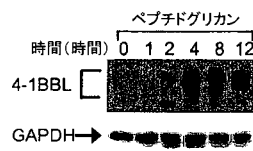


図8E

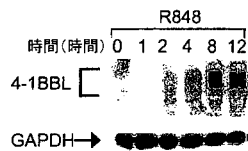


図8F

【図 9 A - 9 C】

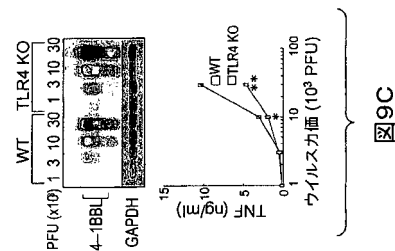


図9A

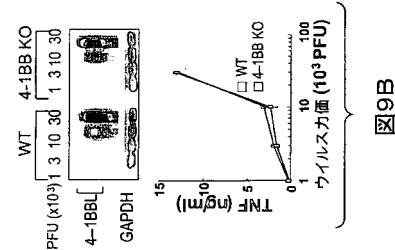


図9B

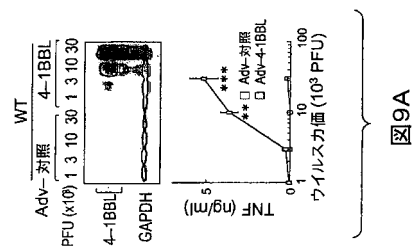
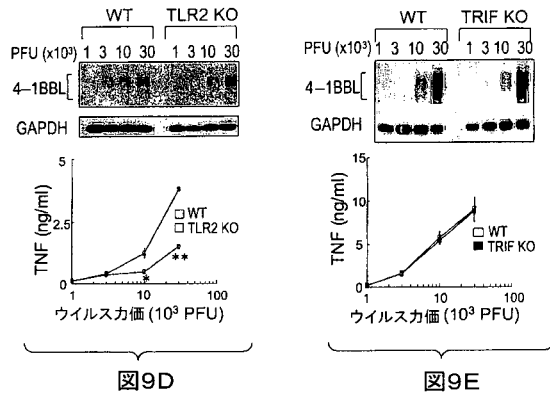
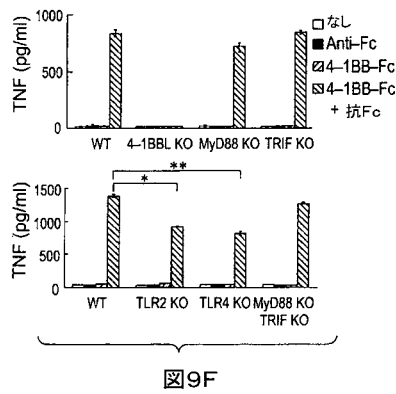
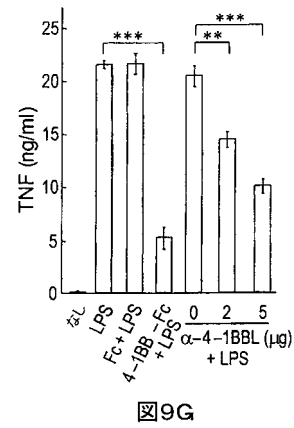


図9C

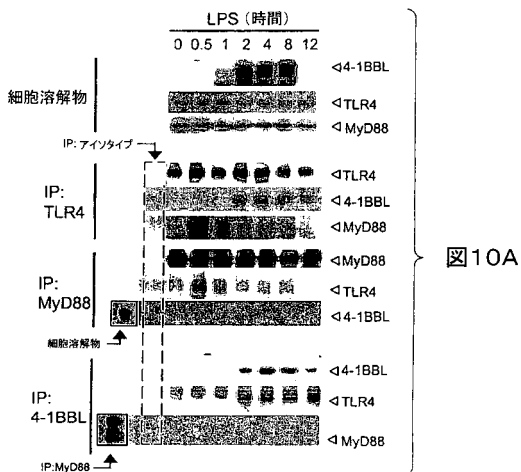
【図 9 D - 9 F】



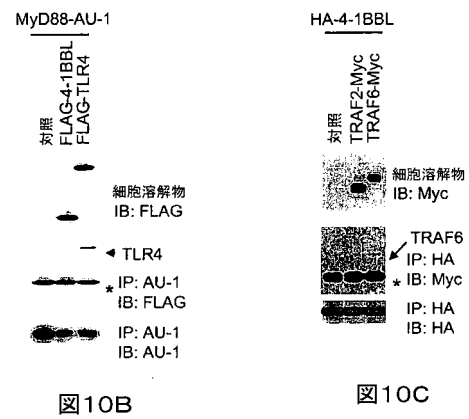
【図 9 G】



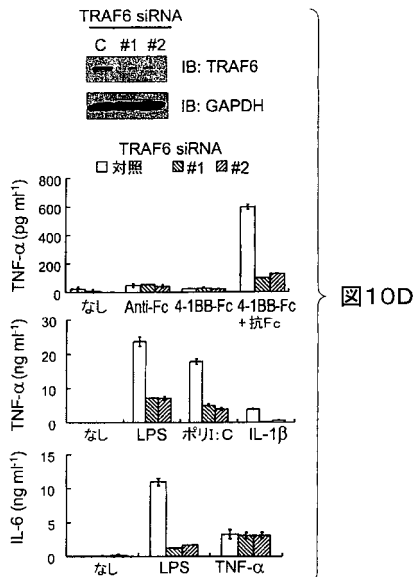
【図 10 A】



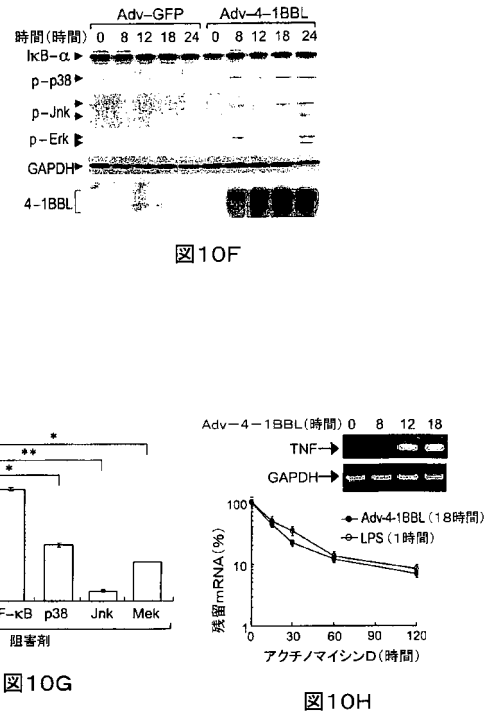
【図 10 B, 10 C】



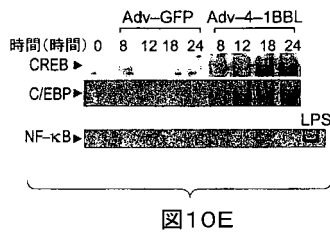
【図10D】



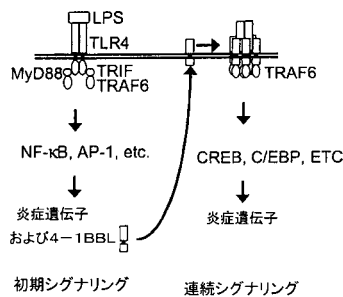
【図10F-10H】



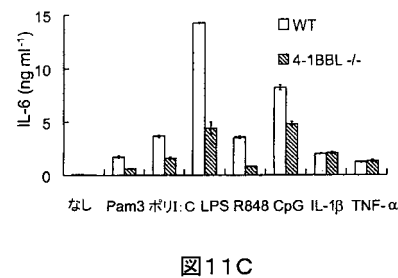
【図10E】



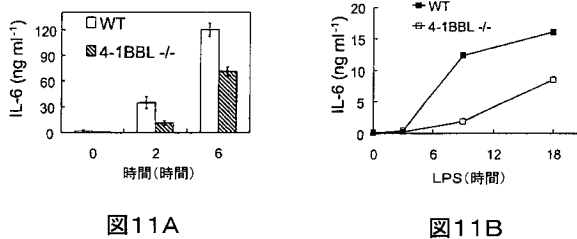
【図10I】



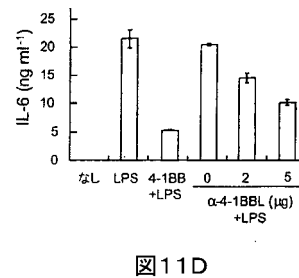
【図11C】



【図11A, 11B】



【図11D】



【図 1 1 E】

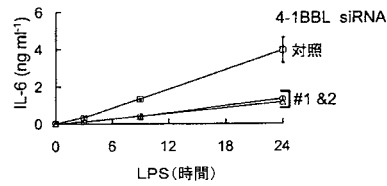


図11E

【図 1 1 F】

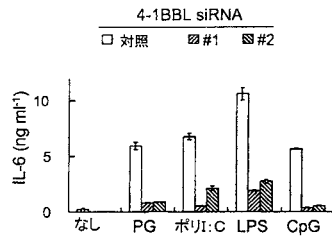


図11F

【図 1 2】

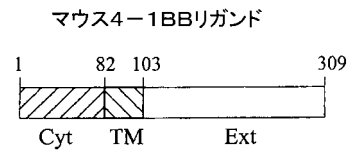


図12A

ヒト4-1BBリガンド

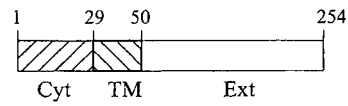


図12B

【図 1 3】

マウス4-1BB

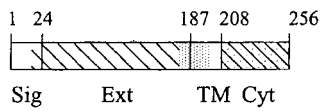


図13A

ヒト4-1BB

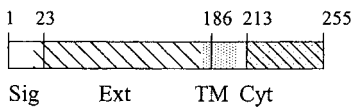


図13B

マウス4-1BB/Fc

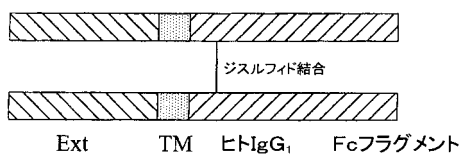


図13C

【配列表】

2010506921000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2007/022103						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K31/713 C12N15/11 C07K14/705 A61K39/395 A61P29/00 G01N33/68								
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) C07K A61K C12N G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td> AKIBA H ET AL: "Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 191, no. 2, 17 January 2000 (2000-01-17), pages 375-380, XP002254084 ISSN: 0022-1007 cf Materials and Methods, Animals and antibodies and Results "Effect of anti-CD70, CD30L, -4-4BBL, and OX40L mAbs on murine leishmaniasis ----- -/-- </td> <td>1,3</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	AKIBA H ET AL: "Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 191, no. 2, 17 January 2000 (2000-01-17), pages 375-380, XP002254084 ISSN: 0022-1007 cf Materials and Methods, Animals and antibodies and Results "Effect of anti-CD70, CD30L, -4-4BBL, and OX40L mAbs on murine leishmaniasis ----- -/--	1,3
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	AKIBA H ET AL: "Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 191, no. 2, 17 January 2000 (2000-01-17), pages 375-380, XP002254084 ISSN: 0022-1007 cf Materials and Methods, Animals and antibodies and Results "Effect of anti-CD70, CD30L, -4-4BBL, and OX40L mAbs on murine leishmaniasis ----- -/--	1,3						
☒ 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. "&" document member of the same patent family								
Date of the actual completion of the international search 8 July 2008		Date of mailing of the international search report 24/09/2008						
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 Vadot, Pierre						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2007/022103

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T. FUTAGAWA ET AL: "Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells" INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, vol. 14, no. 3, 2002, pages 275-286; XP002486148 cited in the application "activation of splenic DC by 4-1BBLfigure 7a -----	1,3,19, 21,24, 28,29,32

International Application No. PCT/US2007/022103

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 23,31,40,49 (totally) 19-22,24,28-30,32,36-39 (partially) 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.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 4-6,11-13,16-18,25-27,33-35,41-43,50-62 (total)
1,3,7,8,10,19-22,24,28-30,32,36-39,44-48 (part)

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/022103

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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

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 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.:

see annex

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 Application No. PCT/US2007/022103

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2,9,14,15,23,31,40,49 (totally)
1,3,7,8,10,19-22,24,28-30,32,36-39,44-48
(partially)

A pharmaceutical composition comprising an antagonistic antibody specific to 4-1BBL; a method of reducing production of an inflammatory cytokine by a mammalian cell or a mammal using the antagonistic antibody specific to 4-1BBL; an article of manufacture thereof.

2. claims: 4,11,16,25,33,41,50 (totally)
1,3,7,8,10,19-22,24,28-30,32,36-39,44-48
(partially)

A pharmaceutical composition comprising an oligonucleotide effective to reduce expression from a 4-1BBL nucleic acid in a cell; a method of reducing production of an inflammatory cytokine by a mammalian cell or a mammal using the oligonucleotide effective to reduce expression from a 4-1BBL nucleic acid in a cell; an article of manufacture thereof.

3. claims: 5,6,12,13,17,18,26,27,34,35,42,43,51,52 (totally)
1,3,7,8,10,19-22,24,28-30,32,36-39,44-48
(partially)

A pharmaceutical composition comprising a soluble 4-1BB which is capable of blocking 4-1BBL; a method of reducing production of an inflammatory cytokine by a mammalian cell or a mammal using the soluble 4-1BB which is capable of blocking 4-1BBL; an article of manufacture thereof.

4. claims: 53-62 (totally)

A method of screening for a 4-1BBL blocking agent using a cell expressing 4-1BBL or a mammal.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
C 0 7 K 14/715 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	C 0 7 K 14/715	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 15/00	A

(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,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

(74)代理人 100118407
弁理士 吉田 尚美

(74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100125036
弁理士 深川 英里

(74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二

(72)発明者 カン, ヨン・ジュン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 3 0, サン・ディエゴ, プレザント・リッジ 1 1 4 2 6

(72)発明者 ハン, ジアファイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 2 9, サン・ディエゴ, ピピロ・ストリート 9 2 1 3

F ターム (参考) 2G045 AA24 BB20 CB01 DA36 FB03
4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA10
DA02 DA03 EA02 EA04 FA02 FA10 GA11 GA18 HA03 HA08
HA14
4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ79 QR33 QR48 QR59 QR66 QR69 QR77
QS12 QS24 QS28 QS33 QS36 QX02
4C084 AA02 AA13 AA19 BA01 BA02 BA22 BA23 CA23 CA53 MA02
NA05 NA14 ZA681 ZA682 ZA891 ZA892 ZA961 ZA962 ZA971 ZA972
ZB111 ZB112 ZB151 ZB152
4C085 AA14 CC23 DD62
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA51 DA76 EA20 EA22
FA72 FA74 GA26