

(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2004-537500

(P2004-537500A)

(43) 公表日 平成16年12月16日(2004.12.16)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C O 7 6
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00 H	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/395 E	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 T	4 H O 4 5
A 6 1 K 47/34	A 6 1 K 39/395 V	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 66 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-555834 (P2002-555834)	(71) 出願人	501418214
(86) (22) 出願日	平成13年10月22日 (2001.10.22)		ジェネティクス インスティテュート、エ
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月18日 (2003.4.18)		ルエルシー
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/051339		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02002/055100		1 4 O, ケンブリッジ, ケンブリッジ
(87) 国際公開日	平成14年7月18日 (2002.7.18)		パーク ドライブ 8 7
(31) 優先権主張番号	09/693, 600		
(32) 優先日	平成12年10月20日 (2000.10.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/318, 185		
(32) 優先日	平成13年9月7日 (2001.9.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍の増殖の阻害および免疫応答の増強のための方法および組成物

## (57) 【要約】

被験体に I L - 1 3 のインヒビターまたは N K - T 細胞のインヒビターを投与することによって、被験体における免疫応答を増強する方法および組成物が提供される。この方法は、被験体において、腫瘍の増殖を予防する（例えば、腫瘍の再発または転移を阻害する）ために使用され得る。この方法はまた、被験体において、ワクチンに対する応答を増強するために使用され得る。本発明は、I L - 1 3 のインヒビターの被験体への投与、または被験体における N K - T 細胞の機能の崩壊が、腫瘍の再発を阻害するという発見に一部基づいている。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被験体において、腫瘍の増殖を阻害する方法であって、該方法は I L - 1 3 インヒビターを該被験体に投与する工程を包含し、ここで、該インヒビターが I L - 1 3 リガンドを含む、方法。

## 【請求項 2】

前記インヒビターが、前記被験体において、腫瘍の増殖を阻害するのに十分な量で投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記インヒビターが、前記被験体において原発性腫瘍の検出前に投与される、請求項 1 に記載の方法。 10

## 【請求項 4】

前記インヒビターが、前記被験体において原発性腫瘍の検出後に投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記被験体が前記腫瘍を発症する高い危険を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記被験体が、該被験体において、前記腫瘍を発症する危険性を高める遺伝子の対立遺伝子を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記遺伝子が、網膜芽腫遺伝子、p 5 3 遺伝子、B R C A 遺伝子、A P C および D C C 遺伝子からなる群から選択される癌抑制遺伝子である、請求項 6 に記載の方法。 20

## 【請求項 8】

前記インヒビターが、前記被験体において腫瘍の処置前に投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記インヒビターが、前記被験体において腫瘍の外科的切除前、2 週間以内に該被験体に投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記インヒビターが、前記被験体において腫瘍の外科的切除後、2 週間以内に該被験体に投与される、請求項 9 に記載の方法。 30

## 【請求項 11】

前記インヒビターが、前記被験体において腫瘍の処置と同時に投与される、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記インヒビターが、前記被験体において腫瘍の処置後に投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記インヒビターが、I L - 1 3 レセプターの I L - 1 3 結合領域を含む、請求項 1 に記載の方法。 40

## 【請求項 14】

前記インヒビターが、免疫グロブリンポリペプチドをさらに含む、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

請求項 1 に記載の方法であって、ここで、前記インヒビターが、マウス I L - 1 3 2 ポリペプチドおよび I g G<sub>1</sub> ポリペプチドの F c 領域を含む融合タンパク質またはヒト I L - 1 3 2 ポリペプチドおよび I g G<sub>1</sub> ポリペプチドの F c 領域を含む融合タンパク質である、方法。

## 【請求項 16】

前記インヒビターが、I L - 1 3 に結合する抗体である、請求項 1 に記載の方法。 50

## 【請求項 17】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 19】

前記インヒビターが IL - 13 アンタゴニストである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記被験体がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記腫瘍が、癌腫、肉腫または血球の癌である、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 22】

前記腫瘍が再発性腫瘍である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 23】

請求項 1 に記載の方法であって、前記腫瘍が、乳癌、肝臓癌、黒色腫、子宮癌、結腸直腸癌、肺癌、前立腺癌、腎細胞癌、頸部の癌、腎細胞癌腫、膵臓癌、卵巣癌、甲状腺癌、鼻咽頭癌、白血病およびリンパ腫からなる群より選択される、方法。

## 【請求項 24】

請求項 1 に記載の方法であって、前記腫瘍が、腎細胞癌腫、黒色腫、精巣癌、白血病およびリンパ腫からなる群より選択される、方法。

## 【請求項 25】

20

前記被験体に、腫瘍増殖を阻害する第 2 の薬剤を投与する工程をさらに包含する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記第 2 の薬剤が、前記被験体においてインターフェロン レベルを増大させる、請求項 25 に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記インヒビターが、前記被験体に全身投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記インヒビターが、前記被験体に局所投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 29】

30

前記インヒビターが、静脈内送達、皮下送達および筋内送達から選択される経路により投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記インヒビターが、皮下送達によって投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記インヒビターが、遅延放出組成物で投与される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 32】

前記遅延放出組成物が微粒子を含む、請求項 31 に記載の方法。

## 【請求項 33】

前記微粒子がポリ乳酸 - c o - グリコール酸 ( P L G A ) である、請求項 32 に記載の方法。

40

## 【請求項 34】

被験体において、腫瘍の増殖を阻害する方法であって、該方法は IL - 13 の非細胞毒性インヒビターを投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 35】

前記インヒビターが、前記被験体において、IL - 13 遺伝子の発現を阻害する、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 36】

前記インヒビターが、アンチセンス IL - 13 核酸または IL - 13 リボザイムである、請求項 34 に記載の方法。

50

## 【請求項 37】

前記インヒビターが、前記被験体において、IL-13 活性を阻害する、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 38】

前記インヒビターが IL-13 レセプターアンタゴニストである、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 39】

前記アンタゴニストが、IL-13 レセプターに結合する抗体である、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 40】

前記インヒビターが IL-13 レセプターの IL-13 結合領域を含む、請求項 34 に記載の方法。

10

## 【請求項 41】

前記インヒビターが免疫グロブリンポリペプチドをさらに含む、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記インヒビターが IL-13 に結合する抗体である、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 43】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 42 に記載の方法。

## 【請求項 44】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 42 に記載の方法。

20

## 【請求項 45】

被験体において、腫瘍の増殖を阻害する方法であって、該方法は、該被験体において、腫瘍の増殖を阻害するのに十分な量で、NK-T 細胞インヒビターを該被験体に投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 46】

前記細胞が、CD1 ポリペプチドを発現する抗原提示細胞に結合する、請求項 45 に記載の方法。

## 【請求項 47】

前記インヒビターが CD1 分子に結合する、請求項 46 に記載の方法。

30

## 【請求項 48】

前記インヒビターが、V<sub>H</sub> 24 に対するリガンドポリペプチドを含む、請求項 45 に記載の方法。

## 【請求項 49】

被験体において、ウイルスの増殖を阻害する方法であって、該方法が、該被験体に IL-13 インヒビターを投与する工程を包含し、ここで該インヒビターが、IL-13 リガンドを含む、方法。

## 【請求項 50】

前記インヒビターが、前記ウイルスに対する前記被験体の第一の曝露の前またはその間に投与される、請求項 49 に記載の方法。

40

## 【請求項 51】

請求項 49 に記載の方法であって、前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、B 型肝炎ウイルス (HBV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、ヒトパピローマウイルス (HPV)、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV)、サイトメガロウイルス (CMV) およびエプスタイン - バーウイルス (EBV) からなる群より選択される、方法。

## 【請求項 52】

ウイルスによる哺乳動物の慢性感染を阻害する方法であって、該方法は、該哺乳動物に IL-13 インヒビターを投与する工程を包含し、該インヒビターは、IL-13 リガンドを含み、ここで、該インヒビターは、該ウイルスによる急性感染を患っていると診断される哺乳動物に投与される、方法。

50

## 【請求項 5 3】

請求項 5 2 に記載の方法であって、前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、B 型肝炎ウイルス（HBV）、C 型肝炎ウイルス（HCV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV）、サイトメガロウイルス（CMV）およびエプスタイン - バーウイルス（EBV）からなる群より選択される、方法。

## 【請求項 5 4】

被験体において、ウイルスの増殖を阻害する方法であって、該方法は、NK - T 細胞の活性を阻害する薬剤を、該被験体に投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 5 5】

前記細胞が CD - 1 制限細胞である、請求項 5 4 に記載の方法。

10

## 【請求項 5 6】

前記インヒビターが CD 1 に結合する、請求項 5 5 に記載の方法。

## 【請求項 5 7】

前記インヒビターが V 2 4 ポリペプチドに対するリガンドを含む、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 5 8】

請求項 5 4 に記載の方法であって、前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、B 型肝炎ウイルス（HBV）、C 型肝炎ウイルス（HCV）、ヒトパピローマウイルス（HPV）、ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV）、サイトメガロウイルス（CMV）およびエプスタイン - バーウイルス（EBV）からなる群より選択される、方法。

20

## 【請求項 5 9】

被験体において、免疫応答を増強させる方法であって、該方法は、該被験体に IL - 1 3 インヒビターを投与する工程を包含し、該インヒビターは、IL - 1 3 ポリペプチドに対するリガンドを含む、方法。

## 【請求項 6 0】

前記被験体にワクチンを導入する工程をさらに包含する、請求項 5 9 に記載の方法。

## 【請求項 6 1】

前記インヒビターが、前記被験体にワクチンを導入する前、30 日以内に投与される、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 2】

前記インヒビターが、前記被験体にワクチンを導入した後、30 日以内に投与される、請求項 6 0 に記載の方法。

30

## 【請求項 6 3】

前記ワクチンが腫瘍に指向される、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 4】

前記ワクチンが病原に指向される、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 5】

前記病原が、ウイルス、細菌および真核生物細胞からなる群より選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

## 【請求項 6 6】

前記ワクチンが、前記被験体に予防的に投与される、請求項 6 0 に記載の方法。

40

## 【請求項 6 7】

前記ワクチンが、前記被験体に治療的に投与される、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 8】

前記ウイルスが、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）である、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 9】

前記ワクチンが、前記宿主において細胞傷害性 T 細胞（CTL）応答を誘発する、請求項 6 8 に記載の方法。

## 【請求項 7 0】

前記ワクチンが P C L U S 6 . 1 - 1 8 I I I B ペプチドである、請求項 6 0 に記載の方

50

法。

【請求項 7 1】

前記ワクチンが P C L U S 6 . 1 - 1 8 I I I B ペプチドである、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記被験体に、免疫応答を増強する第 2 の薬剤を投与する工程をさらに包含する、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記薬剤が I L - 1 2 を含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記被験体において、免疫応答を増強する方法であって、該方法は、該被験体に N K - T 細胞のインヒビターを投与する工程を包含する、方法。

【請求項 7 5】

前記被験体にワクチンを導入する工程をさらに包含する、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記インヒビターが、前記被験体にワクチンを導入する前、30 日以内に投与される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記インヒビターが、前記被験体にワクチンを導入した後、30 日以内に投与される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記ワクチンが腫瘍に指向される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記ワクチンが病原に指向される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記病原が、ウイルス、細菌および真核生物細胞からなる群より選択される、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記ワクチンが予防的である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記ワクチンが治療的である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記被験体に、免疫応答を増強する第 2 の薬剤を投与する工程をさらに包含する、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記薬剤が I L - 1 2 を含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

被験体において、腫瘍の増殖を阻害する方法であって、該方法が、I L - 1 3 リガンドをコードする核酸を、該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般に、免疫応答を増強するための方法および組成物に関し、そしてより具体的には、I L - 1 3 の発現もしくは活性および / または N K - T 細胞活性を阻害することによって、免疫応答を阻害するための方法および組成物に関する。

【0002】

(発明の背景)

サイトカイン I L - 1 3 は、数種の生物学的活性に関係している。これらの活性としては、例えば、I g G<sub>4</sub> および I g E スwitching の誘導、生殖細胞系 I g E 重鎖 転写の誘導、正常なヒト B 細胞における C D 2 3 の発現、ならびに C D 4 0 L または抗 C D 4 0 m

10

20

30

40

50

A b の存在下における B 細胞増殖の誘導が挙げられる。

【0003】

IL - 13 は、サイトカイン IL - 4 と、いくつかの機能的な特性を共有する。IL - 13 の多くの報告された活性は、IL - 4 の活性と類似しているが、IL - 13 は、活性化された T 細胞または T 細胞クローンに対して、増殖を促進する効果を有さない。

【0004】

IL - 13 は、標的細胞の表面上で、IL - 13 レセプター（「IL - 13 R」）と相互作用することによって、特定の生物学的活性を示す。IL - 13 R および IL - 4 レセプター（「IL - 4 R」）は、共通の成分を共有し、この成分は、レセプターの活性化に必要とされる。しかし、IL - 13 は、IL - 4 を用いてトランスフェクトされた細胞に結合しない。

10

【0005】

（発明の要旨）

本発明は、IL - 13 のインヒビターの被験体への投与、または被験体における NK - T 細胞の機能の崩壊が、腫瘍の再発を阻害するという発見に一部基づいている。従って、本発明は、IL - 13 インヒビターまたは NK - T 細胞インヒビターを被験体に投与することによって、被験体の腫瘍の増殖を阻害する方法を含む。

【0006】

IL - 13 インヒビターは、好ましくは、無毒のインヒビターである。例えば、このインヒビターは、Pseudomonas 体外毒素、リシン、アブリンおよびジフテリア毒素のような細胞傷害部分を欠失する。

20

【0007】

いくつかの実施形態において、インヒビターは、IL - 13 ポリペプチドに対するリガンドである。適切な IL - 13 リガンドの 1 例は、IL - 13 レセプターの IL - 13 結合領域を含むポリペプチドである。

【0008】

好ましくは、このポリペプチドはまた、免疫グロブリンポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、インヒビターは、可溶性哺乳動物（例えば、マウスまたはヒト）IL - 13 レセプター部分およびヒト Ig G<sub>1</sub> ポリペプチドの領域を含む、融合タンパク質である。好ましい IL - 13 リガンドは、sIL - 13 R<sub>2</sub> Fc であり、これは、Donaldson ら、J. Immunol. 161: 2317 - 24, 1998 に記載されている。

30

【0009】

別の適切なインヒビターは、IL - 13 アンタゴニスト（例えば、IL - 13 ポリペプチドに結合するアンタゴニスト抗体）である。この抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかであり得る。IL - 13 に対する抗体は、当該分野で公知の技術を使用して作製され得る。例えば、IL - 13 ポリペプチドを、動物を免疫するために使用して、IL - 13 タンパク質と特異的に反応し、そして IL - 13、またはそのフラグメントがそのレセプターに結合するのを阻害し得る、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を得ることができる。このような抗体は、免疫原として IL - 13 全体を使用し、または IL - 13 のフラグメント（例えば、可溶性成熟 IL - 13）を使用することによって得られ得る。IL - 13 のより小さなフラグメントをまた使用して、動物を免疫化し得る。このペプチドの免疫原はさらに、カルボキシル末端にシステイン残基を含み得、そしてハプテン（例えば、キーホールカサガイヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin）（KLH））に結合体化される。さらなるペプチド免疫原は、チロシン残基を硫酸化したチロシン残基と置換することによって生成され得る。このようなペプチドを合成する方法は、当該分野において公知である（例えば、Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 - 2154, 1963 に記載される）。

40

【0010】

50

腫瘍の増殖または発生はまた、CD1制限NK-T細胞の活性をブロックすることによって阻害される。好ましくは、インヒビターは、CD-1分子に結合する。CD-1結合インヒビターの例としては、抗CD-1抗体または他の可溶性抗CD1リガンドが挙げられる。抗CD1抗体は、当該分野で公知であり、例えば、Roarkら、J. Imm. 160: 3121-27, 1998に記載されている。

#### 【0011】

別の実施形態において、インヒビターは、NK-T細胞特異的マーカーに結合する。NK-T細胞特異的マーカーの例は、V24ポリペプチドである。このインヒビターの例は、V24ポリペプチドに対する抗体である。この抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかであり、そして上記の方法を使用して生成され得る。V24ポリペプチドを認識する抗体は、例えば、Prussinら、J. Immunol. 159, 5862-70, 1997に記載されている。

10

#### 【0012】

このインヒビターは、一次腫瘍、転移性腫瘍、またはその両方のいずれかの増殖を阻害するために、投与され得る。従って、いくつかの実施形態において、このインヒビターは、被験体において一次腫瘍を検出する前に、例えば、一次腫瘍の増殖を阻害するために、投与される。他の実施形態において、インヒビターは、被験体において一次腫瘍を検出した後に、例えば、一次腫瘍の再発を阻害するため、または転移を阻害するために、投与される。

#### 【0013】

好ましい実施形態において、このインヒビターは、被験体において腫瘍の増殖を阻害するのに十分な量で投与される。例えば、このインヒビターは、治療有効量で投与され得る。「治療有効量」とは、患者の意義ある利益（例えば、腫瘍の症状の緩和、腫瘍の治癒、または腫瘍のサイズもしくは他の特性の減少）を示すのに十分である、薬学的組成物または方法の各活性成分の総量を意味する。

20

#### 【0014】

被験体は、例えば、動物（例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、またはげっ歯類）（例えば、マウスもしくはラット）であり得る。

#### 【0015】

被験体は、腫瘍の発達について増加したリスクが存在し得る。「増加したリスク」は、被験体が、1以上の遺伝因子もしくは環境因子、またはその両方が異なる、年齢が一致するコントロールよりも、腫瘍をより発達しそうであることを意味する。例えば、被験体は、被験体に腫瘍の増加したリスクに対する素因を与える遺伝子の対立遺伝子を有し得る。この被験体は、対立遺伝子を遺伝し得、すなわち、被験体は、腫瘍の発達について増加したリスクの家族性の病歴を有し得る。この対立遺伝子は、被験体のプロトオンコジーンまたは腫瘍サプレッサ遺伝子において見出され得る。プロトオンコジーンの例としては、例えば、ras遺伝子およびmyc遺伝子が挙げられる。腫瘍サプレッサ遺伝子の例としては、例えば、網膜芽細胞腫遺伝子、p53遺伝子、BRCA遺伝子、APC、およびDCC遺伝子が挙げられる。環境状態は、公知の発癌物質または疑わしい発癌物質に被験体を曝す状態を含み得る。

30

40

#### 【0016】

一般的に、任意のタイプの腫瘍は、インヒビターで処置され得る。好ましくは、この腫瘍は、再発する腫瘍（すなわち、免疫学的監視に供される腫瘍）である。適切な腫瘍の型の例としては、癌腫、肉腫、または血液細胞の癌が挙げられる。従って、腫瘍は、肝臓癌、黒色腫、子宮癌、精巣癌、乳癌、直腸結腸癌、肺癌、前立腺癌、腎細胞癌、頸部癌、膵臓癌、卵巣癌、甲状腺癌、鼻咽頭腫瘍、白血病、およびリンパ腫（例えば、バーキットリンパ腫）であり得る。

#### 【0017】

所望の場合、このインヒビターは、腫瘍の増殖を阻害することが意図される更なる処置レジメンに沿って投与され得る。例えば、さらなる処置レジメンは、腫瘍の増殖を阻害する

50



第 2 の因子の投与を含み得る。適切な第 2 の因子は、被験体において、インターフェロンのレベルを増加させる因子である。この第 2 の因子は、インターフェロン 自体であり得る。

【 0 0 1 8 】

このインヒビターおよび第 2 の因子（所望の場合）は、薬学的組成物の形態で提供され得る。任意の適切な投与経路および投薬スケジュールは、インヒビター、またはこのインヒビターを含む薬学的組成物を送達するために使用され得る。このインヒビターが経口投与される場合、インヒビターは、錠剤、カプセル、粉末、溶液、またはエリキシルの形態であり得る。錠剤形態で投与した場合、本発明の薬学的組成物は、固体キャリア（例えば、ゼラチンまたはアジュバント）をさらに含み得る。錠剤、カプセル、および粉末は、5 ~ 95 % のインヒビター、そして好ましくは、約 25 ~ 90 % のインヒビターを含む。液体形状で投与される場合、液体キャリア（例えば、水、石油、動物または植物由来の油（例えば、ピーナッツ油、鉱油、もしくは大豆油、ゴマ油、または合成油））が添加され得る。薬学的組成物の液体形態は、生理学的生理食塩水溶液、デキストロースもしくは他のサッカリド溶液、またはグリコール（例えば、エチレングリコール、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）をさらに含み得る。液体形態で投与された場合、薬学的組成物は、約 0.5 ~ 90 重量 % のインヒビター、そして好ましくは約 1 ~ 50 重量 % のインヒビターを含む。

10

【 0 0 1 9 】

治療学的に有効量のインヒビターが、静脈内、皮膚、または皮下に注射することによって投与される場合、このインヒビターは、発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態である。このような非経口的に受容可能なタンパク質溶液（pH、等張性、安定性などに関するデュー（due）を有する）は、当該分野の技術範囲内である。静脈内、皮膚、または皮下への注射のために、好ましい薬学的組成物は、インヒビターに加えて、等張性ビヒクル（例えば、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、乳酸リンガー注射液、または他の当該分野で公知のビヒクル）を含む。本発明の薬学的組成物は、安定剤、保存剤、緩衝剤、抗酸化剤、または当業者に公知の添加剤を含み得る。

20

【 0 0 2 0 】

本発明の薬学的組成物中のインヒビターの量は、処置されるべき状態の性質および重篤度、および患者が受けた前処置の性質に依存する。

30

【 0 0 2 1 】

本発明の薬学的組成物を使用する静脈内治療の期間は、処置されるべき疾患の重篤度状態、および各個々の患者の潜在的な特有の応答に依存して変化する。

【 0 0 2 2 】

究極的に、担当医は、本発明の薬学的組成物を使用した、静脈治療の適切な期間を決定する。いくつかの実施形態において、インヒビターが、徐放組成物中に提供される。時限放出（time-release）組成物は、マイクロ粒子中に含まれる。

【 0 0 2 3 】

マイクロ粒子は、当該分野で公知であり、そして米国特許第 6,013,258 号において記載されるマイクロ粒子を含む。マイクロ粒子中に含むために適切な材料としては、ポリ-乳酸-co-グリコール酸（PLGA）のようなポリマー材料が挙げられる。

40

【 0 0 2 4 】

IL-13 インヒビターまたは NK-T 細胞インヒビターを被験体に投与することによって、被験体中でのウイルスの増殖を阻害する方法がまた、本発明の範囲内である。IL-13 インヒビターまたは NK-T 細胞インヒビターは、本明細書中に記載される、IL-13 インヒビターまたは NK-T 細胞インヒビターのうちのいずれかであり得る。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態において、このインヒビターは、ウイルスによって、哺乳動物の慢性的な感染を阻害するのに使用される。このインヒビターは、ウイルスによる急性感染を受

50

けていると診断された哺乳動物被験体に投与される。

【0026】

好ましくは、このインヒビターは、被験体のウイルスへの最初の曝露の前または曝露の間に、投与される。いくつかの実施形態において、ウイルスは、被験体において慢性的な感染を引き起こすか、または引き起こし得る。これらのウイルスとしては、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタイン-バーウイルス（EBV）、ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV）、およびヒト乳頭腫ウイルス（HPV）（例えば、HPV株16）が挙げられ得る。

【0027】

本発明はまた、IL-13またはNK-T細胞を被験体に投与することによって、被験体における免疫応答を増強する方法を含む。このインヒビターは、IL-13ポリペプチドに対するリガンドを含み得る。いくつかの実施形態において、このインヒビターは、ワクチンに対する応答を増強するように添加される。このインヒビターは、ワクチン接種の前、ワクチン接種と同時に、またはワクチン接種の後に、投与され得る。例えば、このインヒビターは、ワクチンを被験体に導入する前約30日以内と導入後約30日以内との間に投与され得る。

【0028】

このワクチンが、例えば、腫瘍（例えば、本明細書中に列举される腫瘍型）または病原体に指向され得る。いくつかの実施形態において、この病原体は、ウイルス、細菌、または真核生物細胞である。

【0029】

ウイルスは、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）であり得る。本明細書中に記載される方法において使用されるHIVウイルスは、米国特許第5,932,318号；Ahlersら、J. Immunol. 150:5647-65, 1993（構築物PCLUS6-18IIIBを記載する）；およびAhlersら、AIDS Res. Hum. Retroviruses 12:259-272, 1996に記載されるワクチンを含み得る。このペプチドワクチンは、好ましくは、複数の免疫決定因子を提示するHIV-1エンベロープタンパク質のペプチドを含む。このペプチドワクチンは、好ましくは、種々のMHC型を有するマウスにおける、体液性免疫応答と細胞媒介免疫応答との両方を惹起する。このようなペプチドの例は、PCLUS6.1-18IIIB（例えば、米国特許第6,214,347号に記載されている）である。

【0030】

このインヒビターは、予防的または治療的に投与され得、そしてワクチンの予防的送達または治療的送達と組み合わせて投与され得る。

【0031】

所望の場合、このインヒビターは、免疫応答を増強する第2の因子またはさらなる因子と組み合わせて投与され得る。さらなる因子としては、例えば、アジュバント、サイトカイン（例えば、IL-12）、およびGM-CSFが挙げられる。

【0032】

このインヒビターは、さらに、IL-13インヒビターをコードする核酸であり得る。IL-13インヒビターをコードする核酸は、標準的な方法（例えば、Felgnerら、米国特許第5,580,859号に記載される方法）を使用して投与され得る。約1~200μgのDNAの投薬量が、体重1kgあたりに投与されることが予想される。患者がヒト成人である場合、ワクチン接種のレジメンは、例えば、マイクロ粒子内で送達される場合、10~100μgの核酸、または100~1000μgの裸のDNAを、数回（例えば、3~6回）繰り返して筋肉内投与または皮下投与することを含み得る。

【0033】

他の標準的な送達方法（例えば、微粒子銃による移入、またはエキソビボ処置）がまた使用され得る。エキソビボ処置において、例えば、抗原提示細胞（APC）、樹状細胞、末

10

20

30

40

50

梢血単核細胞、または骨髄細胞は、患者または適切なドナーから得られ得、そして免疫原組成物を用いてエキソピボで活性化され得、次いで患者に戻される。

#### 【 0 0 3 4 】

他に規定されない場合、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じの意味を有する。本明細書に記載されるのと類似または等しい方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得、適切な方法および材料が、以下に記載されている。全ての刊行物、特許出願、特許、および本明細書中に記載される他の参考文献は、その全体が本明細書中で参考として援用されている。競合する場合、本発明の明細書（定義を含む）が、制御する。さらに、材料、方法および例は、例示のためのみであり、限定することを意図するものではない。

10

#### 【 0 0 3 5 】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細の説明および特許請求の範囲から明らかである。

#### 【 0 0 3 6 】

（発明の詳細な説明）

本発明は、被験体における腫瘍増殖を阻害するための組成物および方法を提供する。ウイルス感染を処置するための方法および組成物、ならびに被験体において免疫応答を増強するための方法および組成物もまた提供する。

#### 【 0 0 3 7 】

IL - 13 レセプターの可溶性形態の投与は、マウスモデル系における腫瘍再発を阻害することが見出された。NK - T細胞活性の阻害は、同様に、モデル系における腫瘍再発を阻害することが見出された。これらの結果は、IL - 13 ポリペプチドおよびNK - T細胞に対するリガンドが免疫応答（腫瘍監視に関係するもの）を阻害するように作用することを示唆する。免疫応答は、IL - 13 機能および/またはNK - T細胞機能を阻害することによって増強された。

20

#### 【 0 0 3 8 】

この方法および組成物は、被験体において、原発腫瘍増殖または2次腫瘍増殖（転移）のいずれかを阻害するために使用され得る。例えば、この方法および組成物は、原発腫瘍のさらなる増殖を阻害するために、原発腫瘍を診断された被験体での使用に適切である。あるいは、またはさらに、本明細書中で開示される方法および組成物はまた、原発腫瘍の転移の発達を阻害するために使用され得る。

30

#### 【 0 0 3 9 】

本発明は、以下の実施例にさらに説明され、これらの実施例は、添付の特許請求の範囲を制限しない。

#### 【 0 0 4 0 】

（実施例1．腫瘍再発のIL - 13 インヒビター媒介阻害の同定）

この実施例は、腫瘍免疫監視の重要なインヒビターとしてIL - 13 を同定する研究を説明する。CD4 分子に対する抗体を用いたマウスの処置が、腫瘍細胞の注射の10日以内に投与された場合、細胞傷害性T細胞（CTL）媒介腫瘍監視を阻害することを示す研究を最初に提示する。次に、その腫瘍再発が、IL - 4 KOマウスにおいて生じるが、IL - 4 R KOマウスでもシグナルトランスデュサーおよび転写のアクチベーター（STAT）6 KOマウスにおいても生じないことを示す研究が提示される。これらの結果は、IL - 13 が免疫再発に関係することを示唆する。これらの結果は、CD - 4 欠損マウスがより低いレベルのIL - 13 を産生したことを示すこと、ならびに（sIL - 13 R2 . Fc）、IL - 13 インヒビターの投与が腫瘍再発を阻害することを示すデータによって実証される。

40

#### 【 0 0 4 1 】

本明細書中に記載される研究について、雌性BALB / cマウスを、Charles River Breeding Laboratories（Frederick, MD）

50

から購入した。BALB/cバックグラウンドにおける、IL-4ノックアウト(KO)マウス(Noben-Trauthら、Transgenic Res 5:487~91、1996)を、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)から得た。C57BL/6NK1.1遺伝子座に類遺伝子性のBALB/cマウス系統は、Drs. Anthony Scalzo and Wayne Yokoyama (Scalzoら、Immunogenetics 41:148~51, 1995)によって提供された。C57BL/6マウス、IL-4R KO (Noben-Trauthら、Proc. Natl Acad. Sci. USA 94:10838~43, 1997)、シグナルトランスデュサーおよび転写のアクチベーター(STAT)6 KOマウス(Kaplanら、Immunity 4:313~9, 1996)およびBALB/cバックグラウンドを有するCD1 KO (Smileyら、Science 275:977~9, 1997)マウスを、病原体を含まない条件下で飼育した。全てのマウスを病原体を含まない動物設備で維持し、そして6~10週齢で使用した。動物実験は、全て、National Cancer Institute (NCI) Animal Care and Use Committeeによって承認された。

10

20

30

40

50

#### 【0042】

15-12RM腫瘍細胞を、BALB/c 3T3線維芽細胞に最初にHIV-1 IIIB gp160をトランスフェクトし、次いで、変異rasおよびmyc遺伝子をトランスフェクトして、これを腫瘍形成性にすることによって作製した(Matsuiら、J. Immunol. 163:184~193, 1999)。この細胞およびNeoのみ(18Neo)をトランスフェクトしたコントロールBALB/c 3T3細胞(Takahashiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3105~09, 1988)を、10%FCS、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび $5 \times 10^{-5}$  M 2-メルカプトエタノール(ジエネティシン(200 µg/ml)(Sigma, St. Louis, MO)を含む)を有するRPMI 1640からなる完全T細胞培地(CTM)中で維持した。

#### 【0043】

精製ラット抗マウスCD4 mAb (GK1.5 (Wildeら、J. Immunol. 131:2178~2183, 1983))を、Frederick Cancer Research and Development Center、NCI (Frederick, MD)から得た。IL-13インヒビター、マウスIL-13R<sub>2</sub>およびヒトIgG1の融合タンパク質(sIL-13R<sub>2</sub>.Fc)を、以前に記載(Donaldsonら、J. Immunol. 161:2317~24, 1998)のように作製し、そしてResearch Support Team at Genetics Institute、Cambridge、MAから得た。抗CD3 (2C11 (Leoら、Proc. Natl Acad. Sci. USA 84:1374~78, 1987))、抗CD28 (37.51)、FITC結合抗CD4 (GK1.5)およびPE結合抗NK1.1 (PK136)を、Pharmingen (San Diego, CA)から得た。抗Ia磁性ビーズ、抗CD11b磁性ビーズ、抗CD11c磁性ビーズ、抗DX5磁性ビーズ、抗CD4磁性ビーズおよび抗CD8磁性ビーズを、Miltenyi Biotec Inc (Auburn, CA)から購入した。組換えマウスIL-2を、Pharmingenから得た。Trizol、SuperScript cDNA合成キット、およびPCR SuperMixtureを、Life Technologies (Rockville, MD)から購入した。

#### 【0044】

200 µlのPBS中の100万個の15-12RM細胞を、マウスの右側腹部に皮下で注射した。インビボでCD4<sup>+</sup>細胞を欠失させるために、マウスを、示されるように、0.5 mgの抗CD4またはコントロールのラットIgG (Sigma, St. Louis, MO)を含む0.2 mlのPBSを腹腔内に接種した。いくつかの実験において、マウスを、0.1 ml PBSの腹腔内注射によって、0.2 mgのIL-13インヒビター

(sIL-13R 2.Fc)を用いて、8日間、1日おきに処置した。

#### 【0045】

T細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD4<sup>+</sup>NK-T細胞のインビトロ活性化について、96ウェルプレートを、4で一晩、抗CD3(10 $\mu$ l/ml)でコーティングした。プレートを、使用の前にPBSで3回洗浄した。15-12RM注射されたマウス由来の脾細胞の単細胞懸濁物を、注射後に、異なる時点で調製した。T細胞を、Ia、CD11b、CD11cおよびDX5に対する抗体でコーティングされた磁性ビーズを使用することによって、脾細胞からネガティブに選択された。CD4<sup>+</sup>T細胞を、抗CD8磁性ビーズを使用することによって、T細胞からCD8<sup>+</sup>細胞を欠失させることによって得た。細胞を、200 $\mu$ l CTM中の96ウェルプレートの1 $\times$ 10<sup>5</sup>/ウェルの密度で培養した。10刺激の2日後、100 $\mu$ lの培養培地を各ウェルから獲得し、そしてサイトカイン測定まで、-70で保存した。いくつかの実施形態において、CD4<sup>+</sup>T細胞(1 $\times$ 10<sup>6</sup>/ウェル)を、CD1トランスフェクトL細胞(Chenら、J Immunol 159: 2240~9、1997)、またはL細胞(2 $\times$ 10<sup>4</sup>/ウェル)を、抗CD28(10 $\mu$ g/ml)およびIL-2(20単位/ml)を用いて刺激した。1週間後、細胞培養物を収穫し、そしてサイトカイン測定まで、-70で保存した。

#### 【0046】

C57BL/6マウスまたはNK1.1遺伝子座について類遺伝子性のBALB/cマウスの脾細胞を、CD4濃縮カラム(Cedar Lane, Westbury, NY)を通過させ、次いで、FACStar(Becton Dickinson, Mount Airy, NC)を使用することによって、CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>細胞またはCD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>T細胞について分類した。サイトカインmRNAを検出するために、細胞を、200 $\mu$ l CTM中、96ウェルプレートの、1 $\times$ 10<sup>5</sup>ウェルの密度で培養した。刺激の8時間後、細胞をそれぞれのウェルから回収し、そしてRNA抽出まで-70で保存した。サイトカイン測定について、2 $\times$ 10<sup>4</sup>個の精製した細胞を、抗CD3mAbおよび抗CD28mAbのそれぞれ10 $\mu$ g/mlでコーティングした96ウェルプレート中で、刺激した。上清を48時間で回収し、そしてIL-4、IL-13およびIFN- $\gamma$ についてアッセイした。

#### 【0047】

培養上清中のIL-4、IL-13(R&D, Minneapolis, MAまたはEndogen, Woburn, MA)、IFN- $\gamma$ (R&D)の濃度は、製造業者の指示に従って、ELISAキットによって決定した。全てのサンプルを、3連でアッセイした。

#### 【0048】

いくつかの標的細胞に対するCD8<sup>+</sup>T細胞の細胞傷害性活性を、4h<sup>-51</sup>Cr放出アッセイによって測定した。CD8<sup>+</sup>T細胞を、磁性ビーズ(Milteny Biotec Inc.)を使用して、B細胞、マクロファージ、DC、NK細胞およびCD4<sup>+</sup>細胞の枯渇によって、脾細胞から精製した。特異的<sup>51</sup>Cr放出のパーセンテージを、以下のように計算した：

100 $\times$ (実験的放出-自発的放出)/(最大放出-自発的放出)。

#### 【0049】

最大放出を、5%Triton X-100の添加によって溶解された細胞の上清から決定した。自発的放出を、添加した効果器細胞なしでインキュベートされた標的細胞から決定した。

#### 【0050】

総RNAを、Trizol試薬を用いて、分類されたCD4<sup>+</sup>NK-T細胞から抽出した。cDNAを、製造業者の指示に従って、Superscript cDNA合成キットを使用することによって合成した。PCRを、GeneAmp 9700 PCRシステム(Perkin-Elmer, Norwalk, CT)によって、0.2 $\mu$ Mプライマーを含むSupermixtureを用いて行った。PCRを、94で30秒間、55で1分間、74で1分間の28サイクルで行った。IL-4に対するプライマーを、

P r o m e g a ( M a d i s s o n、W I ) から購入した。使用されたプライマーの配列は、以下の通りであった：I L - 1 3 ( センズ ) 5 ' - G A C C C A G A G G A T A T T G C A T G - 3 ' ( 配列番号 1 ) ; I L - 1 3 ( アンチセンス ) 5 ' - C C A G C A A A G T C T G A T G T G A G - 3 ' ( 配列番号 2 ) ; H P R T ( センズ ) 5 ' - G T T G G A T A C A G G C C A G A C T T T G T T G - 3 ' ( 配列番号 3 ) ; H P R T ( アンチセンス ) 5 ' - T C G G T A T C C G G T C G G A T G G G A G - 3 ' ( 配列番号 4 ) 。

【 0 0 5 1 】

このデータを、L o g - R a n k 試験を使用して、統計的有意性について分析した。このデータは  $P < 0.05$  の有意性であるとみなされた。

【 0 0 5 2 】

10

( 腫瘍再発に影響する、抗 C D 4 処置のタイミング )

腫瘍再発に対する抗 C D 4 処置のタイミングの効果を、1 5 - 1 2 R M マウスモデルにおいて試験した。

【 0 0 5 3 】

1 5 - 1 2 R M 腫瘍細胞を、0 日目に、異なる群の B A L B / c マウスの右側腹部に、皮下で ( s . c . ) 注射した。抗 C D 4 を、移植の前または移植に続いて、この群の異なるマウスに様々な回数で投与した。抗 C D 4 の投与に続いて腫瘍を発生するマウスのパーセンテージを調べた。

【 0 0 5 4 】

結果は、図 1 A および図 1 B に提示される。図 1 A は、抗 C D 4 が投与されなかった ( コントロール ) マウスの群、- 3 日目 ~ 5 0 日目に投与されたマウスの群、- 3 日目 ~ 3 0 日目に投与されたマウスの群、または - 3 日目 ~ 1 0 日目に投与されたマウスの群における腫瘍増殖を示す。図 1 B は、抗 C D 4 が、1 日目 ~ 5 0 日目に投与されたマウス、1 0 日目 ~ 5 0 日目に投与されたマウス、および 2 0 日目 ~ 5 0 日目に投与されたマウスにおける腫瘍増殖を示す。

20

【 0 0 5 5 】

各群のマウスを、1 5 - 1 2 R M 注射後の示された期間の間に、0 . 5 m g の抗 C D 4 m A b ( G K 1 . 5 ) を用いて腹腔内に接種した。この抗体を、最初の 3 日間、毎日、次いで週に 2 回接種した。5 匹のマウスを、各群について使用した。- 3 日目 ~ 1 0 日目、2 0 日目または 1 日目 ~ 5 0 日目に、コントロールと抗 C D 4 との間に、L o g - R a n k

30

試験が  $P < 0.02$  であった。同様の結果が別の実験において得られた。

【 0 0 5 6 】

腫瘍は、5 日以内に検出可能であった ( M a t s u i ら、J . I m m u n o l . 1 6 3 : 1 8 4 ~ 1 9 3、1 9 9 9 ) ( 図 1 A、コントロール群 )。腫瘍は、1 0 ~ 1 5 日後に退行し、そして消失した。しかし、腫瘍の再発は、接種の 2 0 日 ~ 4 0 日後に観測され、そして再発の腫瘍は、退行しなかった ( 図 1 A )。コントロールマウスにおいて観測された腫瘍再発は、腫瘍退行期の間の C D 8 <sup>+</sup> C T L による腫瘍細胞の除去が不完全であるので、生じた。逆に、抗 C D 4 処置マウスにおいて、腫瘍細胞は、最初の増殖の後に完全に除去されて、再発しなかった ( 図 1 A および M a t s u i ら、J . I m m u n o l . 1 6 3 : 1 8 4 ~ 1 9 3、1 9 9 9 )。これらの結果は、C D 4 <sup>+</sup> T 細胞が C T L による腫瘍細胞

40

に対する免疫監視をネガティブに制御したことを示唆する。

【 0 0 5 7 】

C D 4 <sup>+</sup> T 細胞が腫瘍細胞に特異的な C T L を制御するときを調べるために、マウスを、1 5 - 1 2 R M 注射の後、異なる間隔で、C D 4 抗体で処置した ( 図 1 A )。1 5 - 1 2 R M 注射の 3 日前に C D 4 抗体を受容することから開始し、そして 1 0 日目または 2 0 日目に抗体を受容して停止した群のマウスは全て、- 3 日目 ~ 実験の終了まで処置されたマウスと類似の様式で腫瘍再発に対して耐性であった。抗 C D 4 処置の開始は、1 日目まで遅れることができるが、1 0 日目に開始する処置は、後の再発に対して任意の影響を有するには遅すぎた ( 図 1 B )。これは、腫瘍細胞に対する C T L の免疫監視が、初期の腫瘍増殖期において C D 4 <sup>+</sup> T 細胞によって制御されることを示唆する。最初の 1 0 日間の C

50

D 4<sup>+</sup> T細胞の枯渇は、この制御を妨げるのに必要でありそして十分であった。

【0058】

(IL-4R-STAT6によるCTL免疫監視のダウンレギュレーション)

IL-4 KOマウスおよびIL-4R KOマウスを、IL-4およびそのシグナル伝達経路が、CTLによる免疫監視のダウンレギュレーションに関係するか否かを明確にするために使用した。この結果は、図2Aおよび図2Bに示される。図2Aは、コントロールマウス、または抗CD4抗体で処置されたマウスまたはBALB/cバックグラウンドIL-4 KO、IL-4R KO、またはヘテロ接合同腹仔マウスにおいて得られた結果を示し、これらは、 $1 \times 10^6$ 個の15-12RM細胞を皮下的に注射された。抗CD4処置された群におけるマウスを、抗CD4 mAbを用いて、15-12RM注射の3  
10  
日前から注射の日まで毎日処置し、その後、週に2回処置した。7匹のマウスを使用したIL-4R+/ -群を除いて、各群について5匹のマウスを使用した。コントロール群とIL-4R-/-群との間のLog-Rank試験は、 $P < 0.05$ である。示されるこの結果は、類似の結果を有する2つの実験の代表である。

【0059】

図2Bに示される結果について、処置されていないかまたは抗CD4で処置されたかのいずれかである、BALB/c-STAT6 KOマウスまたは野生型BALB/cマウスを、 $1 \times 10^6$  15-12RM細胞で皮下的に注射した。抗CD4処置された群におけるマウスを、15-12RM注射の3日前から毎日抗CD4 mAbで処置し、その後週2  
20  
回処置した。5匹のマウスを各群について使用した。コントロール群とSTAT6 KO群との間のLog-Rank試験は、 $P < 0.02$ である。3つの実験のうちの1つの代表的な実験を示す。

【0060】

腫瘍再発は、IL-4 KOマウスにおいて生じた；実際、腫瘍増殖パターンは、コントロールマウスのパターンとは有意に異ならなかった(図2AおよびMatsuiら、J. Immunol. 163:184~193, 1999)。対照的に、IL-4R KOマウスにおいて、腫瘍は、最初の増殖および退行の後に再発しなかったが、ヘテロ接合同腹仔において、腫瘍は、野生型マウスのように再発した(図2A)。

【0061】

STAT6活性化は、IL-4Rシグナル経路を介したシグナル伝達を必要とすることが公知である(Shimodaira, Nature 380:630-3 1996; Takedaら, Nature 380:627-30, 1996; およびKaplanら, Immunity 4:313-9, 1996)。従って、IL-4R KOマウスで観察されたがIL-4 KOマウスでは観察されなかった保護が、IL-4Rシグナル経路に依存したか否かを調べるために、STAT6 KOマウスを、15-12RMで接種した(図2b)。STAT6 KOマウスは、CD4-涸渇マウスと同様に腫瘍再発に対して耐性であった。このことは、CTLによる免疫学的監視がIL-4R-STAT6シグナル伝達経路を介して制限されるが、この調節はIL-4自体を必要としないことを示唆した。従って、IL-4R-STAT6シグナル伝達経路を介してシグナルを伝達することが公知である唯一の他のサイトカインであるIL-13は、おそらくこの制限にて重要な  
30  
40  
役割をはたすようである。

【0062】

(CD4涸渇マウスにおけるサイトカイン産生)

T細胞はIL-13およびIL-4の主要な産生者なので、15-12RMを注射したマウス由来のT細胞による両方のサイトカインのインビトロ産生を、抗CD3刺激後にELISAによって測定した。結果を図3に示す。15-12RM細胞の注射の0日後、2日後、4日後、6日後、10日後に、1群あたり2匹のマウスを屠殺し、そしてそれらの脾細胞を収集した。細胞の画分を使用して、T細胞を精製した。15-12RMを注射したマウス由来の100,000個の新しく単離したT細胞を、抗CD3でコーティングしたプレート中で48時間培養した。培養上清を収集し、そして各サイトカインの濃度をEL  
50

ISAによって決定した。この図は、2匹のマウスの平均値を示す。同様の結果がさらなる実験において得られた。

#### 【0063】

コントロールマウス由来のT細胞におけるIL-13およびIL-4両方の産生は、15-12RM注射の2日後という早さで上昇する。IL-13産生およびIL-4産生は、それぞれ、2日目および4日目に最大に達し、次いで、注射の6日後までにベースラインに低下した。CD4涸渴マウス由来のT細胞において、IL-13の産生は2日目にアップレギュレートしたが、そのIL-13の絶対量は15-12RMを注射したコントロールマウス由来の細胞の絶対量よりも50~75%低かった。さらに、IL-4産生は、15-12RM注射後であってもアップレギュレートされなかった。従って、CD4涸渴マウス由来の脾臓T細胞（これは、腫瘍再発に対して耐性である）は、IL-13およびIL-4の産生が少ない。

10

#### 【0064】

IFN- $\gamma$ （これは、この系において腫瘍増殖に対して保護的な役割を果たす（Matsuiら, J. Immunol. 163:184-193, 1999））の産生を測定した。IL-13産生およびIL-4産生と対照的に、抗CD4処置したマウス由来のT細胞は、コントロールマウス由来の細胞よりも25~100%多いIFN- $\gamma$ を産生した。これらの結果は、CD4<sup>+</sup>T細胞の除去が、IL-13およびIL-4の産生を抑制するが、より多くのIFN- $\gamma$ の産生を可能にすることを示唆し、IFN- $\gamma$ は、免疫学的監視に対して必要であることが以前に示されている（Matsuiら, J. Immunol. 163:184-193, 1999）。

20

#### 【0065】

（IL-13インヒビター（sIL-13R<sup>2</sup>・Fc）は、腫瘍再発を阻害する）  
上記で得られた結果は、IL-13単独が免疫学的監視のダウンレギュレーションに必要であるか、またはIL-4もしくはIL-13のいずれかが再発を予防するのに十分であり、そして両方を排除することが再発を予防するのに必要であるという可能性のいずれかと、適合する。これらの可能性を見分けるために、野生型マウスおよびIL-4 KOマウスの両方においてIL-13インヒビター（sIL-13R<sup>2</sup>・Fc）の効果を試験した。結果を図4Aおよび4Bに示す。コントロールBALB/cマウス、抗CD4もしくはIL-13インヒビター（sIL-13R<sup>2</sup>・Fc）のいずれかをを用いて処置したマウス（図4A）、または処置しないかもしくはIL-13インヒビターで処置するかのいずれかのBALB/c-IL-4 KOマウス（図4B）を、 $1 \times 10^6$ 個の15-12RM細胞で皮下注射した。抗CD4（0.5mg）を、15-12RMの0日後、1日後、2日後、6日後、および10日後に接種した。IL-13インヒビターで処置した群のマウスを、0日目~8日目に1日おきにsIL-13R<sup>2</sup>・Fc（0.2mg）で処置した。各群について5匹のマウスを使用した。コントロール群とIL-13インヒビター群との間で、Log-Rank検定によって、 $p < 0.01$ 。IL-4 KO群とIL-4 KO+IL-13インヒビター群との間で、Log-Rank検定によって、 $p < 0.02$ 。これら2つの代表的な1つの実験を示す。

30

#### 【0066】

IL-13インヒビターを15-12RM注射の0日目後~8日目後に1日おきに接種したが、腫瘍の初期の増殖および退行を妨げなかった。しかし、IL-4 KOマウス（これは、腫瘍再発に対して抵抗性ではない）をIL-13インヒビターで処置した場合、これらは再発から完全に保護された。野生型マウスをIL-13インヒビターで処置した場合、これらもまた、CD4涸渴マウスおよびIL-13インヒビターで処置したIL-4 KOマウスと同様にふるまった。これらの結果は、この二相性の腫瘍モデルにおいて、IL-4を生成するマウスの能力にかかわらず、IL-13が腫瘍再発に必須であることを示した。

40

#### 【0067】

（実施例2．NK-T細胞機能を破壊することによる、腫瘍増殖の阻害）

50



本実施例は、IL-13がNK-T細胞によって産生されること、およびNK-T細胞を欠くCD1 KOマウスが低いレベルのIL-13を産生することを示すデータを示す。本実施例において、CD1 KOマウスにおける腫瘍増殖の阻害もまた示す。

#### 【0068】

(NK-T細胞は、IL-13を産生し得る)

IL-13インヒビターを用いた最初の8日間の処置によって、マウスは腫瘍再発から保護された(図4Aおよび4B)。CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>T細胞は、TCR活性化の際に大量のIL-4を産生するための最初期細胞の中にある(Chenら, J Immunol 159:2240-9, 1997)。

#### 【0069】

従って、CD4<sup>+</sup>NK-T細胞がIL-13を産生する能力を調べた。BALB/cマウスは利用可能なmAbによって認識されるNK1.1対立遺伝子を発現しないので、NK1.1座位について類遺伝子性であるC57BL/6マウスまたはBALB/cマウス由来のCD4<sup>+</sup>NK-T細胞を、CD4<sup>+</sup>T細胞を精製し、そしてCD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>集団およびCD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>集団について分類することによって分類し、そしてこれらを抗CD3抗体で刺激した。

#### 【0070】

IL-13 mRNAおよびIL-13タンパク質の産生を測定した。結果を図5A~5Cに示す。C57BL/6マウス由来の新しく分類した脾臓CD4<sup>+</sup>NK-T細胞を、プレートに結合した抗CD3(2C11)を用いて8時間刺激した。これらの細胞を収集し、そしてIL-13およびIL-4に対するmRNAを、RT-PCRによって検出した。図5Aは、抗CD3刺激後のCD4<sup>+</sup>NK-T細胞におけるIL-13およびIL-4のmRNA発現を示す。

#### 【0071】

図5Bは、CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>T細胞およびCD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>T細胞によるIL-13およびIL-4の産生を実証する。NK1.1座位について類遺伝子性であるBALB/cマウス由来の新しく分類した脾臓CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>T細胞およびCD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>T細胞を、プレートに結合した抗CD3(2C11)および抗CD28(37.51)を用いて48時間刺激した。上清を48時間目に収集し、そしてELISAによってIL-4およびIL-13についてアッセイした。

#### 【0072】

CD1トランスフェクトしたL細胞で刺激した、15-12RMを注射したマウス由来のCD4<sup>+</sup>T細胞による、IL-13およびIL-4の産生を、図5Cに示す。正常なBALB/cマウスおよび15-12RMを注射したBALB/cマウス(の注射3日後)の脾細胞から精製したCD4<sup>+</sup>T細胞を、CD1トランスフェクトしたL細胞またはトランスフェクトしていないL細胞を用いて1週間刺激した。抗CD28 mAb(10 μg/ml)およびIL-2(20単位/ml)もまた、培養物に添加した。培養上清を収集し、そしてIL-13およびIL-4の濃度をELISAによって決定した。アステリクスは、検出限界より下のレベル(<15.6 pg/ml)を示す。

#### 【0073】

IL-13は、抗CD3刺激によってCD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>T細胞を明瞭に誘導し、一方、CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>T細胞はわずかであった(図5Aおよび5B)。さらに、15-12RMを注射したBALB/cマウス由来のCD4<sup>+</sup>T細胞をCD1トランスフェクトしたL細胞で刺激した場合、これらは、腫瘍を保有しないマウス由来の細胞よりも、より多くのIL-13およびIL-4を産生した(図5C)が、検出可能なIFN-γは産生しなかった(データは示さず)。図5Cにおける図5Bよりも低いIL-4のレベルは、前者では7日間の培養の間の消費に起因し、一方、後者では48時間での消費に起因し得る。対照的に、精製されたCD4<sup>+</sup>T細胞はIL-13レセプターを有さないので、サイトカインは消費されないはずである。従って、CD4<sup>+</sup>NK-T細胞は、実際にIL-13を産生し得、そしてこのサイトカインの主要な供給源である。さらに、この活性は

10

20

30

40

50

、腫瘍保有動物において増強されるようである。

#### 【0074】

(IL-13産生は、CD1 KOマウスにおいて顕著に低下する)  
NK T細胞がIL-13の主要な供給源である場合、CD1 KOマウスにおけるその非存在は、IL-13産生を顕著に低下するはずである。従って、15-12RMを注射したCD1 KOマウスのCD4<sup>+</sup> T細胞におけるIL-13、IL-4およびIFN- $\gamma$ のインビトロ産生を調べた。これらのマウスは、CD1制限されたNK T細胞(CD4<sup>+</sup> NK T細胞を含む)を欠くが、従来のMHC クラスII制限されたCD4<sup>+</sup> T細胞は保持する。

#### 【0075】

結果を図6に示す。1群あたり2匹のマウスを屠殺し、そしてその脾細胞を、15-12RM細胞の注射の0日後、2日後、4日後、6日後、10日後に収集した。細胞の画分を使用してCD4<sup>+</sup> T細胞を精製した。15-12RMを注射したマウス由来の100,000個の新しく単離したT細胞を、抗CD3でコーティングしたプレート中で48時間培養した。培養上清を収集し、そして各サイトカインの濃度をELISAによって決定した。各値は、2匹のマウスの平均を示す。結果は、2つの独立した実験のものを表す。アステリスクは検出限界より下のレベル(< 7.8 pg/ml)を示す。

#### 【0076】

CD1 KOマウスの脾細胞から精製したCD4<sup>+</sup> T細胞は、15-12RM注射後にわずかな量のIL-13およびIL-4しか産生せず、一方、野生型マウス由来のCD4<sup>+</sup> T細胞は、腫瘍接種の2日後、4日後、および10日後に、これらのサイトカインの産生をアップレギュレートした。このことは、大多数のIL-13産生がNK T細胞由来であるかまたはNK T細胞に依存することを示す。逆に言えば、産生されたIFN- $\gamma$ は、野生型マウスの細胞よりもCD1 KOマウスの細胞においてかなり高かった。

#### 【0077】

(CD1 KOマウスは、低いレベルの腫瘍再発を示す)  
CD4<sup>+</sup> NK T細胞がIL-13を産生し得、そして実際に多くのIL-13産生を担い、そしてこれらの細胞が従来のCD4<sup>+</sup> T細胞に加えて抗CD4処置によって涸渇するので、NK T細胞がCTLによる腫瘍免疫学的監視のダウンレギュレーションに重要な役割を果たすと仮説を立てた。この仮説を試験するために、CD1 KOマウスを、15-12RMで接種し、そして抗CD4処置の有りまたは無しで腫瘍増殖の影響を測定した。

#### 【0078】

結果を図7に示す。未処置または抗CD4で処置のいずれかの、BALB/cバックグラウンドのCD1 KOマウスおよび野生型BALB/cマウスを、 $1 \times 10^6$ 個の15-12RM細胞を用いて皮下注射した。抗CD4処置群のマウスを、15-12RM注射の3日前から始めてその後1週間に2回、抗CD4(0.5 mg)を用いて処置した。5匹のマウスを各群について使用した。コントロール群とCD1 KO群との間で、Log-Rank検定によって、 $p < 0.02$ 。これら4つの代表的な1つの実験を示す。CD1 KOマウスにおいて、腫瘍が最初に増殖し、そして野生型マウスと同じ期間に退行した。しかし、CD1 KOマウスは、抗CD4で処置した野生型マウスと同様に腫瘍再発に対して抵抗性であった。従って、CD1制限されたNK T細胞は免疫学的監視のダウンレギュレーションに必要なようである。

#### 【0079】

抗CD4で処置したマウス(図8A)、CD1 KOマウス(図8B)およびコントロールマウス(図8C)の脾細胞から精製したCD8<sup>+</sup> T細胞の活性を、いかなるインビトロ刺激も無しで、1  $\mu$ MのP18 IIBでパルスしたか、またはパルスしていない18Neo標的に対して、15-12RM注射の12日後にCTL活性について調べた。これら3つの代表的な1つの実験を、それぞれ図8A~8Cに示す。

#### 【0080】

CD4涸渇マウスにおいて、腫瘍再発に対する保護は、コントロールマウスの場合よりも

10

20

30

40

50

、再刺激を伴わない即座のエキソピボでの、 $CD8^+$  T細胞のより高いCTL活性と関連するようであった（図8AおよびMatsuiら, J. Immunol. 163: 184-193, 1999）。同じことが $CD1$  KOマウスに対して適用されるか否かを決定するために、15-12RMを注射した $CD1$  KOマウス由来の精製された $CD8^+$  T細胞のCTL活性を、腫瘍を注射したコントロールマウスおよび抗 $CD4$ で処置したマウス由来の $CD8^+$  T細胞のCTL活性と比較した（図8B）。 $CD1$  KO由来の新しく単離した $CD8^+$  T細胞（図8B）は、インビトロ刺激無しで、P18IIIBパルスした18Neoを低いレベルで溶解し、一方、インタクトな腫瘍保有マウス由来の $CD8^+$  T細胞は、再刺激無しでP18IIIBパルスした18Neoを殺傷しなかった（図8C）。従って、NKT細胞の存在は、エキソピボにおいて即座に、CTL活性の低下を導く。

10

#### 【0081】

これらを考え合わせると、これらの結果は、腫瘍の初期増殖期（10日以内）における、 $CD1$ 制限された $CD4^+$  NKT細胞あるいはNKT細胞に依存する他の細胞のいずれかによって産生されるIL-13が、CTL免疫学的監視のネガティブな調節を誘発すること、ならびにこのネガティブな調節がIL-4R - STAT6経路を介して媒介されることを実証する。

#### 【0082】

（実施例3. IL-13インヒビターは、合成ペプチドHIVワクチンに対するCTL応答を増強する）

20

細胞傷害性T細胞リンパ球（CTL）応答の増強に対するIL-13インヒビターの能力を調べた。

#### 【0083】

BALB/cマウスを、エマルジョンアジュバント（Montanide ISA-51）中でGM-CSF（5  $\mu$ g）と混合した合成ペプチドワクチンPCUS6.1-18IIIB（20 nmole）（米国特許第5,932,218号）を用いて、0日目に皮下免疫した。0日目、1日目、2日目、4日目、および6日目の各日に、200  $\mu$ gのIL-13インヒビターIL-13Ra2-Fcを、腹腔内投与した。コントロールは、IL-13インヒビターの代わりにコントロールIgGを受けた。

#### 【0084】

30

試験マウスおよびコントロールマウスの脾臓（14日後に収集し、そして培養物中で1週間刺激した）におけるその後のCTL応答を測定し、そして図9に示されるグラフにプロットする。標的細胞を、P18IIIBペプチドでコーティングした。

#### 【0085】

有意に高いCTL媒介溶解が、IL-13インヒビターを合成ペプチドHIVワクチンと共にマウスに投与した場合に観察された。これらの結果は、IL-13インヒビター無しでのワクチンと比較した、インヒビターの存在下での細胞傷害性Tリンパ球（CTL）応答の増大を実証する。

#### 【0086】

（他の実施形態）

40

本発明は本発明の詳細な説明と共に記載してきたが、上記の説明が、例示することを意図し、そして本発明の範囲を限定せず、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲の範囲によって規定されることが、理解される。他の局面、利点、および改変が、上記の特許請求の範囲の範囲内である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

図1Aおよび図1Bは、異なる時間間隔で抗 $CD4$ を用いて処置したマウスにおける腫瘍の発生を示すグラフである。

#### 【図2】

図2Aおよび図2Bは、IL-4 KO、IL-4R、およびSTAT6 KOマウスに

50

おける腫瘍の発生を示すグラフである。

【図 3】

図 3 A ~ 3 C は、抗 C D 3 刺激を用いた、5 - 1 2 R M - 注射 B A L B / c マウス由来の T 細胞のサイトカイン産生を示すグラフである。

【図 4】

図 4 A および図 4 B は、腫瘍再発に対する、I L - 1 3 インヒビターの効果を示すグラフである。

【図 5 A】

図 5 A は、C D 4 <sup>+</sup> 細胞における I L - 1 3 および I L 4 m R N A の発現を示す電気泳動図の表示である。

10

【図 5 B】

図 5 B および図 5 C は、C D 4 <sup>+</sup> N K 1 . 1 <sup>+</sup> および C D 4 <sup>+</sup> N K 1 . 1 <sup>-</sup> T 細胞による、I L - 1 3 および I L - 4 の産生を示すヒストグラムである。

【図 5 C】

図 5 B および図 5 C は、C D 4 <sup>+</sup> N K 1 . 1 <sup>+</sup> および C D 4 <sup>+</sup> N K 1 . 1 <sup>-</sup> T 細胞による、I L - 1 3 および I L - 4 の産生を示すヒストグラムである。

【図 6】

図 6 A ~ 図 6 C は、抗 C D 3 刺激を用いた、1 5 - 1 2 R M 注射野生型 B A L B / c マウスおよび C D 1 K O マウスからの C D 4 <sup>+</sup> T 細胞のサイトカイン産生を示すヒストグラムである。

20

【図 7】

図 7 は、C D 1 K O マウスにおける腫瘍の発生を示すグラフである。

【図 8】

図 8 A ~ 8 C は、1 5 - 1 2 R M を注射された C D 1 K O マウスの C T L 活性を示すグラフである。

【図 9】

図 9 は、H I V ペプチドワクチン、G M - C S F、および I L - 1 3 インヒビターまたはコントロールペプチドのいずれかに曝露された細胞における C T L 応答を示すグラフである。

【図 1】

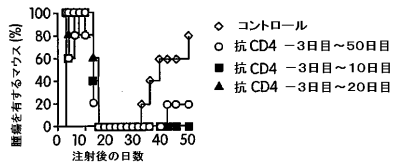


Fig. 1a

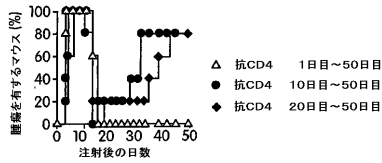


Fig. 1b

【図 3】

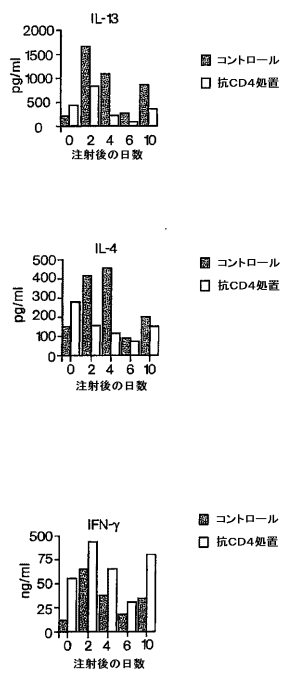


Fig. 3

【図 2】

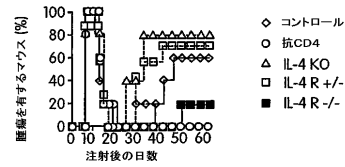


Fig. 2a

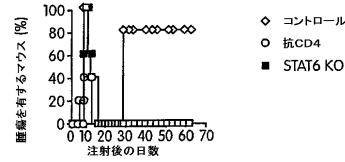


Fig. 2b

【図 4】

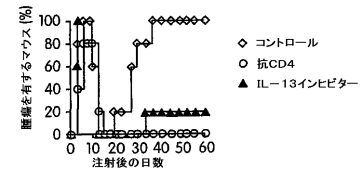


Fig. 4a

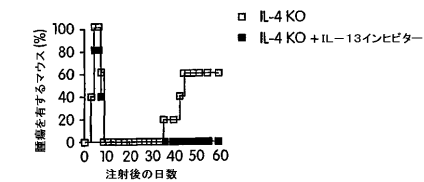


Fig. 4b

【図 5 A】

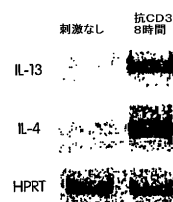


Fig. 5a

【図 5 C】

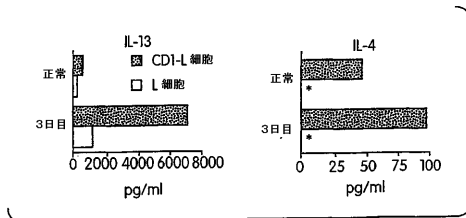


Fig. 5c

【図 6】

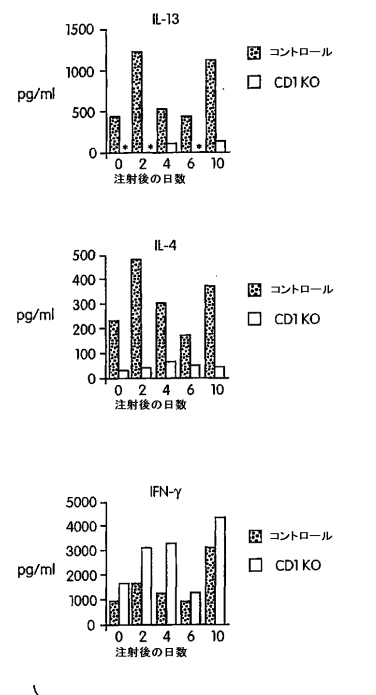


Fig. 6

【図 7】

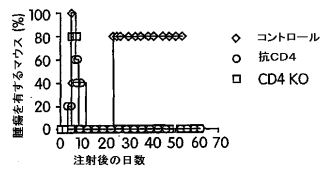


Fig. 7

【図 8】

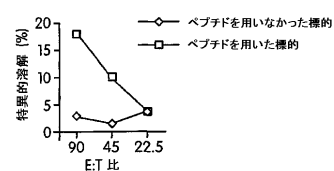


Fig. 8a

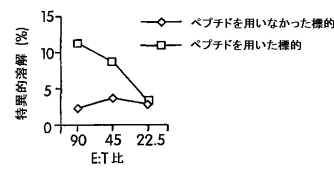


Fig. 8b

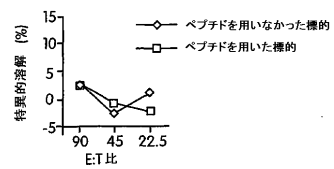


Fig. 8c

【 図 9 】

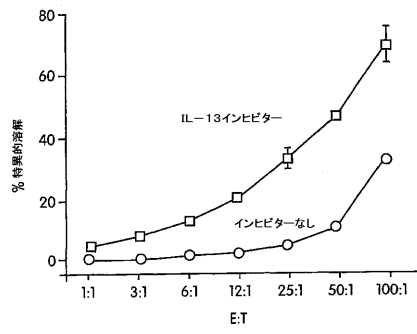


Fig. 9

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
18 July 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/055100 A2**(51) International Patent Classification: **A61K 38/00**

(21) International Application Number: PCT/US01/51339

(22) International Filing Date: 22 October 2001 (22.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
09/693,600 20 October 2000 (20.10.2000) US  
60/318,185 7 September 2001 (07.09.2001) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:  
US 09/693,600 (CIP)  
Filed on 20 October 2000 (20.10.2000)(71) Applicants (for all designated States except US):  
**GENETICS INSTITUTE, LLC** [US/US]; 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140 (US); **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES** [US/US]; National Institutes of Health, 6011 Executive Blvd., Rockville, MD 20852 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BERZOFSKY, Jay, A.** [US/US]; 5908 Bradley Boulevard, Bethesda, MD 20814 (US); **TERABE, Masaki** [US/US]; 4949 Battery Lane #502, Bethesda, MD 20814 (US); **DONALDSON, Debra, D.** [US/US]; 108 Blakely Road, Medford, MA02155 (US); **MATSUI, So** [JP/JP]; Lion's Mansion Tsukuba-gakuentoshi 1107, Tsukuba, Ibaraki 300-0051 (JP); **NOBEN-TRAUTH, Nancy** [US/US]; 15933 Indian Hills Terrace, Rockville, MD 20855 (US); **PAUL, William, E.** [US/US]; 10706 Great Arbor Drive, Potomac, MD 20851 (US).(74) Agent: **ELRIFI, Ivor, R.**; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glevsky & Popeo PC, One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/055100 A2

(54) Title: METHOD AND COMPOSITION FOR ENHANCING AN IMMUNE RESPONSE

(57) Abstract: Provided is a method and composition for enhancing an immune response in a subject by administering to the subject an inhibitor of IL-13 or an inhibitor of an NK-T cell to the subject. The method can be used to prevent growth of a tumor in the subject, e.g., to inhibit tumor recurrence or metastasis. The method can also be used to enhance a response to a vaccine in a subject.



WO 02/055100

PCT/US01/51339

## METHOD AND COMPOSITION FOR ENHANCING AN IMMUNE RESPONSE

### Field of the Invention

5       The invention relates generally to methods and compositions for enhancing immune responses and more specifically to methods and compositions for inhibiting immune responses by inhibiting IL-13 expression or activity and/or NK-T cell activity.

### Background of the Invention

10       The cytokine IL-13 has been implicated in several biological activities. These activities include, *e.g.*, induction of IgG<sub>4</sub> and IgE switching, induction of germ line IgE heavy chain  $\epsilon$  transcription, CD23 expression in normal human B cells, and induction of B cell proliferation in the presence of CD40L or anti-CD40 mAb.

15       IL-13 shares some functional properties with the cytokine IL-4. While many reported activities of IL-13 are similar to those of IL-4, IL-13 does not have growth promoting effects on activated T cells or T cell clones.

20       IL-13 exhibits certain biological activities by interacting with an IL-13 receptor ("IL-13R") on the surface of target cells. IL-13R and the IL-4 receptor ("IL-4R") share a common component, which is required for receptor activation. However, IL-13 does not bind to cells transfected with the IL-4 receptor.

### Summary of the Invention

25       The invention is based in part on the discovery that administration of an inhibitor of IL-13 to a subject, or disrupting NK-T cell function in a subject, inhibits recurrence of the tumor. Accordingly, included in the invention is a method of inhibiting the growth of a tumor in a subject by administering an IL-13 inhibitor or an NK-T cell inhibitor to the subject.

30       The IL-13 inhibitor is preferably a non-toxic inhibitor. For example, the inhibitor preferably lacks a cytotoxic moiety such as a *Pseudomonas* exotoxin, ricin, abrin and Diphtheria toxin.

      In some embodiments, the inhibitor is a ligand for an IL-13 polypeptide. One example of a suitable IL-13 ligand is a polypeptide that includes an IL-13 binding region of an IL-13 receptor.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

Preferably, the polypeptide also includes an immunoglobulin polypeptide. In some embodiments, the inhibitor is a fusion protein that includes a soluble mammalian (*e.g.*, mouse or human) IL-13 receptor portion and a region of a human IgG<sub>1</sub> polypeptide. A preferred IL-13 ligand is sIL-13R $\alpha$ 2.Fc, which is described in Donaldson *et al.*, *J. Immunol.* 161:2317-24, 1998.

Another suitable inhibitor is an IL-13 antagonist, *e.g.*, an antagonistic antibody that binds to an IL-13 polypeptide. The antibody can be either a polyclonal antibody or a monoclonal antibody. Antibodies to IL-13 can be made using techniques known in the art. For example, an IL-13 polypeptide may be used to immunize animals to obtain polyclonal and monoclonal antibodies which specifically react with the IL-13 protein, and which may inhibit binding of IL-13, or fragments thereof, to the receptor. Such antibodies may be obtained using the entire IL-13 as an immunogen, or by using fragments of IL-13, such as the soluble mature IL-13. Smaller fragments of IL-13 may also be used to immunize animals. The peptide immunogens additionally may contain a cysteine residue at the carboxyl terminus, and are conjugated to a hapten such as keyhole limpet hemocyanin (KLH). Additional peptide immunogens may be generated by replacing tyrosine residues with sulfated tyrosine residues. Methods for synthesizing such peptides are known in the art, for example, as described in Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963.

Tumor growth or occurrence is also inhibited by blocking the activity of a CD1-restricted NK-T cell. Preferably, the inhibitor binds to a CD1 molecule. Examples of CD1 binding inhibitors include anti CD-1 antibodies or other soluble anti-CD1 ligands. Anti-CD1 antibodies are known in art and are described in, *e.g.*, Roark *et al.*, *J. Imm.* 160:3121-27, 1998.

In other embodiments, the inhibitor binds to an NK-T cell specific marker. An example of an NK-T cell specific marker is a V $\alpha$ 24 polypeptide. An example of this inhibitor is an antibody to a V $\alpha$ 24 polypeptide. The antibody can be either a monoclonal antibody or a polyclonal antibody and can be made using the methods described above. Antibodies that recognize V $\alpha$ 24 polypeptide are described in, *e.g.*, Prussin *et al.*, *J. Immunol.* 159, 5862-70, 1997.

The inhibitor can be administered to inhibit the growth of either a primary tumor, a metastatic tumor, or both. Thus, in some embodiments, the inhibitor is administered prior to detection of a primary tumor in the subject, *e.g.*, to inhibit the growth of a primary tumor. In

WO 02/055100

PCT/US01/51339

other embodiments, the inhibitor is administered after detection of a primary tumor in the subject, *e.g.*, to inhibit the recurrence of a primary tumor or to inhibit metastasis.

In preferred embodiments, the inhibitor is administered in an amount sufficient to inhibit the growth of a tumor in the subject. For example, the inhibitor can be administered in a therapeutically effective amount. By "therapeutically effective amount" is meant the total amount of each active component of the pharmaceutical composition or method that is sufficient to show a meaningful patient benefit, *e.g.*, amelioration of symptoms of, healing of, or a decrease in size or other property of a tumor.

The subject can be, *e.g.*, a mammal such as a human, dog, cat, horse, cow, pig, or rodent (*e.g.*, mouse or rat).

The subject may be at an increased risk for developing a tumor. By "increased risk" is meant the subject is more likely to develop tumor than an age-matched control differing in one or more genetic factors or environmental factors, or both. For example, the subject may have an allele of a gene that predisposes the subject to increased risk of a tumor. The subject may have inherited the allele, *i.e.*, the subject may have a familial history of increased risk for developing a tumor. The alleles may be found in protooncogenes or tumor suppressor genes of the subject. Examples of protooncogenes include, *e.g.*, *ras* genes and *myc* genes. Examples of tumor suppressor genes include, *e.g.*, a retinoblastoma gene, a *p53* gene, a *BRCA* gene, an *APC*, and a *DCC* gene. Environmental conditions can include those that expose the subject to known or suspected carcinogens.

In general, any type of tumor can be treated with the inhibitor. Preferably, the tumor is a recurring tumor, *i.e.*, a tumor that is subject to immunosurveillance. Examples of suitable tumor types include carcinomas, sarcomas, or cancers of the blood cells. Thus, the tumor can be a liver, melanoma, uterine, testicular, breast, colorectal, lung, prostate, renal cell, cervical, pancreatic, ovarian, thyroid, nasopharyngeal tumor, a leukemia, and a lymphoma (such as Burkitt's lymphoma).

If desired, the inhibitor can be administered along with an additional treatment regimen or regimens that are intended to inhibit tumor growth. For example, the additional treatment regimen can include administration of a second agent that inhibits tumor growth. A suitable second agent is one that increases levels of interferon gamma in the subject. The second agent can be interferon gamma itself.

The inhibitor and second agent (if desired) can be provided in the form of a pharmaceutical composition. Any suitable administration route and dosage schedule can be

WO 02/055100

PCT/US01/51339

used to deliver the inhibitor, or a pharmaceutical composition that includes the inhibitor.

When the inhibitor is administered orally, the inhibitor can be in the form of a tablet, capsule, powder, solution or elixir. When administered in tablet form, the pharmaceutical composition of the invention may additionally contain a solid carrier such as a gelatin or an adjuvant. The tablet, capsule, and powder contain from about 5 to 95% inhibitor, and preferably from about 25 to 90% inhibitor. When administered in liquid form, a liquid carrier such as water, petroleum, oils of animal or plant origin such as peanut oil, mineral oil, soybean oil, or sesame oil, or synthetic oils may be added. The liquid form of the pharmaceutical composition may further contain physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution, or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol. When administered in liquid form, the pharmaceutical composition contains from about 0.5 to 90% by weight of inhibitor, and preferably from about 1 to 50% inhibitor.

When a therapeutically effective amount of inhibitor is administered by intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, the inhibitor will be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The preparation of such parenterally acceptable protein solutions, having due regard to pH, isotonicity, stability, and the like, is within the skill in the art. A preferred pharmaceutical composition for intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection should contain, in addition inhibitor, an isotonic vehicle such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Dextrose Injection, Dextrose and Sodium Chloride Injection, Lactated Ringer's Injection, or other vehicle as known in the art. The pharmaceutical composition of the present invention may also contain stabilizers, preservatives, buffers, antioxidants, or other additives known to those of skill in the art.

The amount of the inhibitor in the pharmaceutical composition of the present invention will depend upon the nature and severity of the condition being treated, and on the nature of prior treatments which the patient has undergone. Ultimately, the attending

WO 02/055100

PCT/US01/51339

The duration of intravenous therapy using the pharmaceutical composition of the present invention will vary, depending on the severity of the disease being treated and the condition and potential idiosyncratic response of each individual patient.

Ultimately the attending physician will decide on the appropriate duration of  
5 intravenous therapy using the pharmaceutical composition of the present invention. In some embodiments, the inhibitor is provided in a delayed-release composition. The timed-release composition can include a microparticle.

Microparticles are known in the art and include those described in, *e.g.*, US Patent No.6,013,258. Suitable material to include in microparticles includes polymeric material  
10 such as poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA).

Also within the invention is a method of inhibiting the growth of a virus in subject by administering an IL-13 inhibitor or NK-T cell inhibitor to the subject. The IL-13 inhibitor or NK-T cell inhibitor can be any of the IL-13 inhibitors or NK-T cell inhibitors described herein.

15 In some embodiments, the inhibitor is used inhibiting a chronic infection of a mammal by a virus. The inhibitor is administered to a mammalian subject diagnosed as suffering from an acute infection by the virus.

Preferably, the inhibitor is administered before or during a primary exposure of the subject to the virus. In some embodiments, the virus causes, or is capable of causing, a  
20 chronic infection in the subject. These viruses can include, *e.g.*, human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr Virus (EBV), human T-cell leukemia virus (HTLV), and human papilloma virus (HPV) (such as HPV strain 16).

Also included in the invention is a method of enhancing an immune response in a  
25 subject by administering an inhibitor of IL-13 or a NK-T cell to the subject. The inhibitor can include a ligand for an IL-13 polypeptide. In some embodiments, the inhibitor is added to enhance the response to a vaccine. The inhibitor can be administered prior to, concurrently with, or after, the vaccine. For example, the inhibitor can be administered between within about 30 days prior to and within about 30 days after introducing a vaccine  
30 into said subject.

The vaccine can be directed to, *e.g.*, a tumor (such as the tumor types listed herein) or a pathogen. In some embodiments the pathogen is virus, a bacterium, or a eukaryotic cell.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

The virus can be, e.g., human immunodeficiency virus (HIV). HIV vaccines used in the methods described herein can include vaccines described in, e.g., US Patent No. 5,932,318; Ahlers et al., *J. Immunol.* 150: 5647-65, 1993 (describing the construct PCLUS6-18IIIB); and Ahlers et al., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12: 259-272, 1996. The peptide vaccine preferably includes peptides of the HIV-1 envelope protein presenting multiple immune determinants. The peptide vaccine preferably elicits both humoral and cell-mediated immune responses in mice having a variety of MHC types. An example of such a peptide is PCLUS6.1-18IIIB (described in, e.g., US Patent No. 6,214,347).

10 The inhibitor may administered prophylactically or therapeutically and can be administered in conjunction with prophylactic or therapeutic delivery of the vaccine.

If desired the inhibitor can be administered along with a second or additional agents that enhance an immune response. Additional agents include, e.g., adjuvants, cytokines (such as IL-12), and GM-CSF.

15 The inhibitor can additionally be a nucleic acid encoding an IL-13 inhibitor. Nucleic acids encoding an IL-13 inhibitor can be administered using standard methods, e.g., those described in Felgner et al., US Patent No., 5,580,859.

It is expected that a dosage of approximately 1 to 200 µg of DNA, would be administered per kg of body weight. Where the patient is an adult human, vaccination regimens can include, e.g., intramuscular or subcutaneous administrations of 10-100 µg of nucleic acid when delivered in a microparticle, or of about 100-1000 µg of naked DNA, repeated several times (e.g., 3-6 times).

20 Other standard delivery methods, e.g., biolistic transfer, or *ex vivo* treatment, can also be used. In *ex vivo* treatment, e.g., antigen presenting cells (APCs), dendritic cells, peripheral blood mononuclear cells, or bone marrow cells, can be obtained from a patient or an appropriate donor and activated *ex vivo* with the immunogenic compositions, and then returned to the patient.

25 Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the

WO 02/055100

PCT/US01/51339

present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

5

#### Brief Description of the Drawings

FIGS. 1A and 1B are graphs showing the development of tumors in mice treated with anti-CD4 at different time periods.

FIGS. 2A and 2B are graphs showing the development of tumors in IL-4 KO, IL-4R,  
10 and STAT6 KO mice.

FIGS. 3A-3C are graphs showing cytokine production of T cells from 5-12RM-injected BALB/c mice with anti-CD3 stimulation.

FIGS. 4A and 4B are graphs showing the effect of IL-13 inhibitor on tumor recurrence.

FIG. 5A is a representation of an electrophoretogram showing expression of IL-13  
15 and IL-4 mRNA in CD4<sup>+</sup> cells.

FIGS. 5B and 5C are histograms showing production of IL-13 and IL-4 by CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> T cells.

FIGS. 6A-6C are histograms showing cytokine production of CD4<sup>+</sup> T cells from 15-  
20 12RM-injected wild-type BALB/c mice and CD1 KO mice with anti-CD3 stimulation.

FIG. 7 is a graph showing the development of tumors in CD1 KO mice.

FIGS. 8A-8C are graphs showing CTL activity of CD1 KO mice injected with 15-  
12RM.

FIG. 9 is a graph showing CTL response in cells exposed to an HIV peptide vaccine,  
25 GM-CSF, and either an IL-13 inhibitor or a control peptide.

#### Detailed Description of the Invention

The invention provides compositions and methods for inhibiting tumor growth in a  
subject. Also provided are methods and composition for treating viral infections, as well as  
30 methods and compositions for enhancing immune responses in a subject.

Administration of a soluble form of an IL-13 receptor was found to inhibit tumor recurrence in a murine model system. Inhibition of NK-T cell activity has similarly been found to inhibit tumor recurrence in the model system. These results suggest that ligands for

WO 02/055100

PCT/US01/51339

IL-13 polypeptide and NK-T cells act to inhibit immune responses, such as those involved in tumor surveillance. Immune responses were enhanced by inhibiting IL-13 function and/or NK-T cell function.

5 The methods and compositions can be used to inhibit either primary tumor growth or secondary tumor growth (metastasis) in the subject. For example, the methods and compositions are suitable for use with a subject that has been diagnosed with a primary tumor in order to prevent additional growth of the primary tumor. Alternatively, or in addition, the methods and compositions disclosed herein can also be used to inhibit the development of metastases of the primary tumor.

10 The invention will be further illustrated in the following examples, which do not limit the scope of the appended claims.

**Example 1. Identification of IL-13 inhibitor-mediated inhibition of tumor recurrence**

15 This example describes studies identifying IL-13 as an important inhibitor of tumor immunosurveillance. Studies are first presented showing that treatment of mice with antibodies to CD4 molecules inhibits cytotoxic T-cell (CTL) mediated tumor surveillance if administered within 10 days of injection of tumor cells. Next are presented studies demonstrating that tumor recurrence did occur in IL-4 KO mice, but not in IL-4R KO mice or signal transducer and activator of transcription (STAT)6 KO mice. These results suggest IL-13 is involved in tumor recurrence. These results are substantiated by showing 20 that CD-4 depleted mice produced lower levels of IL-13, as well as data showing that administration of (sIL-13R $\alpha$ 2.Fc), an IL-13 inhibitor, inhibits tumor recurrence.

For the studies described herein, female BALB/c mice were purchased from Charles River Breeding Laboratories (Frederick, MD). IL-4 knockout (KO) mice (Noben-Trauth *et al.*, Transgenic Res 5: 487-91, 1996) on a BALB/c background were obtained from the 25 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The BALB/c mouse strain congenic for the C57BL/6 NK1.1 locus was provided by Drs. Anthony Scalzo and Wayne Yokoyama (Scalzo, *et al.*, Immunogenetics 41: 148-51, 1995). C57BL/6 mice, IL-4R KO (Noben-Trauth *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. U S A 94: 10838-43, 1997), signal transducer and activator of transcription (STAT)6 KO (Kaplan *et al.*, Immunity 4: 313-9, 1996) and CD1 KO (Smiley *et al.*, Science 30 275: 977-9, 1997) mice having the BALB/c background were bred under pathogen-free conditions. All the mice were maintained in a pathogen-free animal facility and were used at



WO 02/055100

PCT/US01/51339

6-10 weeks of age. Animal experiments were all approved by the National Cancer Institute (NCI) Animal Care and Use Committee.

15-12RM tumor cells were made by transfecting BALB/c 3T3 fibroblasts first with HIV-1 IIB gp160 and then with mutant ras and myc genes to make them tumorigenic (Matsui *et al.*, J. Immunol. 163: 184-193, 1999). This and control BALB/c 3T3 cells transfected with Neo only (18Neo) (Takahashi *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3105-09, 1988) were maintained in complete T cell medium (CTM) which consisted of RPMI1640 with 10% FCS, L-glutamine, sodium pyruvate, nonessential amino acids, penicillin, streptomycin and  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoethanol, containing geneticin (200 µg/ml) (Sigma, St. Louis, MO).

Purified rat anti-mouse CD4 mAb (GK1.5 (Wilde *et al.*, J. Immunol. 131: 2178-2183, 1983)) was obtained from the Frederick Cancer Research and Development Center, NCI (Frederick, MD). IL-13 inhibitor, a fusion protein of murine IL-13Rα2 and human IgG1 (sIL-13Rα2.Fc), was made as described previously (Donaldson *et al.*, J. Immunol. 161: 2317-24, 1998) and provided from the Research Support Team at Genetics Institute, Cambridge, MA. Anti-CD3 (2C11 (Leo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1374-78, 1987)), anti-CD28 (37.51), FITC-conjugated anti-CD4 (GK1.5) and PE-conjugated anti-NK1.1 (PK136) were obtained from Pharmingen (San Diego, CA). Anti-Ia, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-DX5, anti-CD4 and anti-CD8 magnetic beads were purchased from Miltenyi Biotec Inc (Auburn, CA). Recombinant mouse IL-2 was obtained from Pharmingen. Trizol, SuperScript cDNA synthesis kit, and PCR SuperMixture were purchased from Life Technologies (Rockville, MD).

One million 15-12RM cells in 200 µl of PBS were injected subcutaneously on the right flank of the mouse. To deplete CD4<sup>+</sup> cells *in vivo*, mice were inoculated intraperitoneally with 0.2 ml of PBS containing 0.5 mg of anti-CD4 or control rat IgG (Sigma, St. Louis, MO) as indicated. In some experiments, mice were treated every other day for 8 days with 0.2 mg of IL-13 inhibitor (sIL-13Rα2.Fc) by intraperitoneal injection in 0.1 ml PBS.

For *in vitro* activation of T cells, CD4<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> NK-T cells, 96 well plates were coated with anti-CD3 (10 µg/ml) over night at 4 °C. The plates were washed three times with PBS before use. Single-cell suspensions of splenocytes from 15-12RM-injected mice were prepared at different time points after the injection. T cells were negatively selected from splenocytes by using magnetic beads coated with antibodies for Ia, CD11b,

WO 02/055100

PCT/US01/51339

CD11c and DX5. CD4<sup>+</sup> T cells were obtained by depleting CD8<sup>+</sup> cells from T cells by using anti-CD8 magnetic beads. The cells were cultured at a density of  $1 \times 10^5$ /well of a 96 well plate in 200  $\mu$ l CTM. Two days after the stimulation 100  $\mu$ l of culture medium was harvested from each well and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until cytokine measurement. In some experiments, CD4<sup>+</sup> T cells ( $1 \times 10^6$ /well) were stimulated with CD1-transfected L cells (Chen *et al.*, J Immunol 159: 2240-9, 1997) or L cells ( $2 \times 10^4$ /well) with anti-CD28 (10  $\mu$ g/ml) and IL-2 (20 units/ml). After one week, culture medium was harvested and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until cytokine measurement.

Spleen cells of C57BL/6 mice or BALB/c mice congenic for the NK1.1 locus were isolated by passing through a CD4-enrichment column (Cedar Lane, Westbury, NY) and then sorted for CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>-</sup> T cells by using FACStar (Becton Dickinson, Mountain View, CA). To detect cytokine mRNA, the cells were cultured at a density of  $1 \times 10^5$ /well of a 96 well plate in 200  $\mu$ l CTM. Eight hours after the stimulation cells were harvested from each well and stored at  $-70^\circ\text{C}$  until RNA extraction. For cytokine measurement,  $2 \times 10^4$  purified cells were stimulated in 96 well plates coated with 10  $\mu$ g/ml each of anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. Supernatants were collected at 48 hours and assayed for IL-4, IL-13 and IFN- $\gamma$ .

The concentration of IL-4, IL-13 (R&D, Minneapolis, MA or Endogen, Woburn, MA), IFN- $\gamma$  (R&D) in the culture supernatant were determined by ELISA kit according to the manufacturer's instructions. All samples were assayed in triplicate.

Cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> T cells against several target cells was measured by a 4 h-<sup>51</sup>Cr release assay. CD8<sup>+</sup> T cells were purified from splenocytes by depletion of B cells, macrophages, DC, NK cells and CD4<sup>+</sup> cells using magnetic beads (Milteny Biotec Inc.). The percentage of specific <sup>51</sup>Cr release was calculated as follows:

$100 \times (\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximum release} - \text{spontaneous release})$ .

Maximum release was determined from supernatants of cells that were lysed by addition of 5 % Triton X-100. Spontaneous release was determined from target cells incubated without added effector cells.

Total RNA was extracted from sorted CD4<sup>+</sup> NK-T cells with Trizol reagent. cDNAs were synthesized by using the Superscript cDNA synthesis kit according to manufacturer's instructions. PCR was done with Supermixture containing 0.2  $\mu$ M primers by the GeneAmp

WO 02/055100

PCT/US01/51339

9700 PCR system (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The PCR was run for 28 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 1 min, 74°C for 1 min. The primers for IL-4 were purchased from Promega (Madison, WI). The sequence of the primers used were follows: IL-13 (sense) 5'-GACCCAGAGGATATTGCATG-3' (SEQ ID NO:1); IL-13 (antisense) 5'-CCAGCAAAGTCTGATGTGAG-3' (SEQ ID NO:2); HPRT (sense) 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' (SEQ ID NO:3); HPRT (antisense) 5'-TCGGTATCCGGTCGGATGGGAG-3' (SEQ ID NO:4).

The data were analyzed for statistical significance using a Log-Rank test. The data were considered significant at  $P < 0.05$ .

10

#### *Timing of anti-CD4 treatment to affect tumor recurrence*

The effect of the timing of anti-CD4 treatment relative to tumor recurrence was examined in the 15-12RM mouse model.

15-12RM tumor cells were injected subcutaneously (s.c.) in the right flank of different groups of BALB/c mice at day 0. Anti-CD4 was administered to the different mice in the groups for various times prior to or following implantation. The percentage of mice developing tumors following administration of anti-CD4 was examined.

The results are presented in FIGS. 1A and 1B. FIG. 1A shows tumor growth in groups of mice in which anti-CD4 was not administered (control), administered at day -3 to 50, day -3 to 30, or day -3 to 10. FIG. 1B shows tumor growth in mice for which anti-CD4 was administered at day 1 to day 50, day 10 to day 50, and day 20 to day 50.

The mice of each group were intraperitoneally inoculated with 0.5mg of anti-CD4 mAb (GK1.5) during the indicated periods after 15-12RM injection. The antibody was inoculated every day for the first 3 days and then twice a week. Five mice were used for each group.  $P < 0.02$  by Log-Rank test between control and anti-CD4 day -3 to 10, 20 or day 1 to 50. Similar results were obtained in another experiment.

Tumors were detectable within 5 days (Matsui *et al.*, J. Immunol. 163: 184-193, 1999) (FIG. 1A, control group). The tumors regressed and disappeared after 10-15 days. However, recurrence of the tumors was observed between 20 and 40 days after inoculation and recurrent tumors did not regress (FIG. 1A). Tumor recurrence observed in control mice occurred because of incomplete elimination of tumor cells by CD8<sup>+</sup> CTL during the tumor regression phase. Conversely, in anti-CD4-treated mice, tumor cells were completely eliminated after the initial growth and did not recur (FIG. 1A and Matsui *et al.*, J. Immunol.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

163: 184-193, 1999). These results suggested that CD4<sup>+</sup> T cells negatively regulated immunosurveillance against tumor cells by CTL.

To examine when CD4<sup>+</sup> T cells regulate CTL specific for tumor cells, mice were treated with CD4 antibody over different intervals after 15-12RM injection (Fig. 1A). All mice in the groups which started to receive CD4 antibody 3 days before 15-12RM injection and stopped receiving antibody at day 10 or day 20 were resistant to tumor recurrence in a similar fashion to the mice treated from day -3 to the end of the experiment. Although initiation of anti-CD4 treatment could be delayed until day 1, starting treatment on day 10 was too late to have any impact on the late recurrence (FIG. 1B). This suggests that immunosurveillance of CTL against tumor cells is regulated by CD4<sup>+</sup> T cells at an early tumor growth phase. Depletion of CD4<sup>+</sup> T cells during the first 10 days was both necessary and sufficient to prevent this regulation.

#### *Down-regulation of CTL immunosurveillance through IL-4R-STAT6*

15 IL-4 KO and IL-4R KO mice were used to clarify whether IL-4 and its signaling pathway are involved in down-regulation of immunosurveillance by CTL. The results are shown in FIGS. 2A and 2B. FIG. 2A shows the results obtained in control mice or mice treated with anti-CD4 antibody or BALB/c background IL-4 KO, IL-4R KO, or heterozygote littermate mice were injected subcutaneously with  $1 \times 10^6$  15-12RM cells. The mice in the anti-CD4-treated group were treated with anti-CD4 mAb every day from 3 days before 15-12RM injection until the day of the injection and twice a week thereafter. Five mice were used for each group except for the IL-4R +/- group in which 7 mice were used.  $P < 0.05$  by Log-Rank test between the control group and the IL-4R-/- group. The result shown is a representative of two experiments with similar results.

25 For the results shown in FIG. 2B, BALB/c-STAT6 KO mice or wild-type BALB/c mice either untreated or treated with anti-CD4 were injected subcutaneously with  $1 \times 10^6$  15-12RM cells. The mice in anti-CD4-treated group were treated with anti-CD4 mAb every day from 3 days before 15-12RM injection and twice a week thereafter. Five mice were used for each group.  $P < 0.02$  by Log-Rank test between the control group and the STAT6 KO group. One representative experiment of three is shown.

30 Tumor recurrence occurred in IL-4 KO mice; indeed, the tumor growth pattern was not significantly different from that of control mice (FIG. 2A and Matsui *et al.*, J. Immunol. 163: 184-193, 1999). In contrast, in IL-4R KO mice, tumors did not recur after the initial

WO 02/055100

PCT/US01/51339

growth and regression, although in heterozygous littermates they recurred as in wild-type mice (FIG. 2A).

STAT6 activation is known to be necessary for signaling through the IL-4R signal pathway (Shimoda *et al.*, Nature 380: 630-3 1996; Takeda *et al.*, Nature 380: 627-30, 1996; and Kaplan *et al.*, Immunity 4: 313-9, 1996). Accordingly, to investigate whether the protection observed in IL-4R KO mice but not in IL-4 KO mice was dependent on the IL-4R signal pathway, STAT6 KO mice were inoculated with 15-12RM (FIG. 2b). The STAT6 KO mice were as resistant to tumor recurrence as CD4-depleted mice. This suggested that immunosurveillance by CTL was limited through the IL-4R-STAT6 signaling pathway, but this regulation did not require IL-4 itself. Therefore, IL-13, the only other cytokine known to signal through the IL-4R-STAT6 signaling pathway, is likely to play a significant role in this limitation.

#### *Production of cytokines in CD4-depleted mice*

Because T cells are major producers of IL-13 and IL-4, *in vitro* production of both cytokines by T cells from 15-12RM-injected mice was measured by ELISA after anti-CD3 stimulation. The results are shown in FIG. 3. On days 0, 2, 4, 6, 10 after injection of 15-12RM cells, two mice per group were sacrificed and their spleen cells were harvested. A fraction of the cells was used to purify T cells. One hundred thousand freshly isolated T cells from 15-12RM-injected mice were cultured in an anti-CD3 coated plate for 48 h. The culture supernatant was collected and concentration of each cytokine was determined by ELISA. The figure shows the average value of two mice. Similar results were obtained in an additional experiment.

Both IL-13 and IL-4 production in T cells from control mice are elevated as early as 2 days after 15-12RM injection. The IL-13 and IL-4 production reached a maximum on days 2 and 4, respectively, and then dropped to baseline by day 6 after injection. In the T cells from CD4-depleted mice, the absolute amount of IL-13 was 50-75 % less than that of the cells from 15-12RM injected control mice, even though production of IL-13 was up-regulated on day 2. Additionally, IL-4 production was not up-regulated even after 15-12RM injection. Thus, splenic T cells from CD4-depleted mice, which are resistant to tumor recurrence, produced less IL-13 and IL-4.

Production of IFN- $\gamma$ , which plays a protective role against tumor growth in this system (Matsui *et al.*, J. Immunol. 163: 184-193, 1999), was measured. In contrast to IL-13

WO 02/055100

PCT/US01/51339

and IL-4 production, T cells from anti-CD4-treated mice produced 25-100 % more IFN- $\gamma$  than the cells from control mice. These results suggested that removing CD4<sup>+</sup> T cells suppresses production of IL-13 and IL-4 but allows more IFN- $\gamma$  production, which was shown previously (Matsui *et al.*, J. Immunol. 163: 184-193, 1999) to be necessary for the  
5 immunosurveillance.

*An IL-13 inhibitor (sIL-13Pc2.Fc) inhibits tumor recurrence*

The results obtained above were compatible with either IL-13 alone being necessary for down-regulation of immunosurveillance or the possibility that either IL-4 or IL-13 was  
10 sufficient and eliminating both would be necessary to prevent recurrence. To distinguish these possibilities, the effect of IL-13 inhibitor (sIL-13R $\alpha$ 2.Fc) in both wild-type and IL-4 KO mice was tested. The results are shown in FIGS. 4A and 4B. Control BALB/c mice, mice treated with either anti-CD4 or IL-13 inhibitor (sIL-13R $\alpha$ 2.Fc) (FIG. 4A) or BALB/c-IL-4 KO mice either untreated or treated with IL-13 inhibitor (FIG. 4B) were injected  
15 subcutaneously with  $1 \times 10^6$  15-12RM cells. The anti-CD4 (0.5 mg) was inoculated on day 0, 1, 2, 6 and 10 after 15-12RM. The mice in IL-13 inhibitor-treated groups were treated with sIL-13R $\alpha$ 2.Fc (0.2 mg) every other day from day 0 to day 8. Five mice were used for each group.  $P < 0.01$  by Log-Rank test between the control group and the IL-13 inhibitor group.  $P < 0.02$  by Log-Rank test between the IL-4 KO group and the IL-4KO + IL-13 inhibitor  
20 group. One representative experiment of two is shown.

The IL-13 inhibitor was inoculated every other day from day 0 to day 8 after 15-12RM injection, but did not prevent the initial growth and regression of the tumor. However, when IL-4 KO mice, which are not resistant to tumor recurrence, were treated with IL-13 inhibitor, they were completely protected from the recurrence. When wild-type mice were  
25 treated with the IL-13 inhibitor, they also behaved like CD4-depleted mice and IL-13 inhibitor-treated IL-4 KO mice. These results showed that in this biphasic tumor model, IL-13 is necessary for the tumor recurrence, regardless of the capacity of the mice to make IL-4.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

**Example 2. Inhibition of tumor growth by disrupting NK-T cell function**

This example presents data showing that IL-13 is produced by NK-T cells, and that CD1 KO mice, which lack NK-T cells, produce low levels of IL-13. Also illustrated in this example is inhibition of tumor growth in CD1 KO mice.

5

*NKT cells can produce IL-13*

Treatment during the first 8 days with IL-13 inhibitor protected mice from tumor recurrence (FIGS. 4A and 4B). CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> T cells are among the earliest cells to produce a large amount of IL-4 upon TCR activation (Chen *et al.*, J Immunol 159: 2240-9, 1997).

10

Accordingly, the ability of CD4<sup>+</sup> NKT cells to produce IL-13 was examined. Since BALB/c mice do not express the NK1.1 allele recognized by available mAbs, CD4<sup>+</sup> NKT cells from C57BL/6 mice or BALB/c mice congenic for the NK1.1 locus were sorted by purifying CD4<sup>+</sup> T cells and sorting for CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> populations, and stimulated these with anti-CD3 antibody.

15

Production of IL-13 mRNA and protein was measured. The results are shown in FIGS. 5A-5C. Freshly sorted splenic CD4<sup>+</sup> NK-T cells from C57BL/6 mice were stimulated with plate-bound anti-CD3 (2C11) for 8 h. The cells were harvested and mRNA for IL-13 and IL-4 was detected by RT-PCR. FIG. 5A shows expression of mRNA of IL-13 and IL-4 in CD4<sup>+</sup> NK-T cells after anti-CD3 stimulation.

20

FIG. 5B demonstrates production of IL-13 and IL-4 by CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> T cells. Freshly sorted splenic CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> T cells from BALB/c mice congenic for the NK1.1 locus were stimulated with plate-bound anti-CD3 (2C11) and anti-CD28 (37.51) for 48 h. Supernatants were collected at 48 h and assayed for IL-4 and IL-13 by ELISA.

25

Production of IL-13 and IL-4 by CD4<sup>+</sup> T cells from 15-12RM-injected mice stimulated with CD1-transfected L cells is shown in FIG. 5C. CD4<sup>+</sup> T cells purified from spleen cells from normal and 15-12RM-injected (on day 3 after injection) BALB/c mice were stimulated with CD1-transfected L cells or non-transfected L cells for a week. Anti-CD28 mAb (10 µg/ml) and IL-2 (20 units/ml) were also added in the culture. The culture supernatant was collected and concentration of IL-13 and IL-4 were determined by ELISA. Asterisks indicate a level under the detection limit (<15.6 pg/ml).

30

IL-13 was clearly induced in CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> T cells by anti-CD3 stimulation, whereas CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup> T cells made little (FIGS. 5A and 5B). Furthermore, when CD4<sup>+</sup> T cells from

WO 02/055100

PCT/US01/51339

15-12RM-injected BALB/c mice were stimulated with CD1-transfected L cells, they produced more IL-13 and IL-4 than the cells from non-tumor-bearing mice (FIG. 5C) but did not produce detectable IFN- $\gamma$  (data not shown). The lower level of IL-4 in FIG. 5C than in Fig. 5B may be due to consumption during the 7-day culture in the former, *versus* 48 h in the latter. In contrast, because the purified CD4<sup>+</sup> T cells do not have IL-13 receptors, that cytokine should not have been consumed. Thus, CD4<sup>+</sup> NKT cells can indeed make IL-13, and are a primary source of this cytokine. Moreover, this activity appears to be enhanced in tumor-bearing animals.

#### 10 *IL-13 production is markedly decreased in CD1 KO mice*

If NKT cells are a major source of IL-13, then their absence in CD1 KO mice should markedly reduce IL-13 production. Accordingly, the *in vitro* production of IL-13, IL-4 and IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> T cells of 15-12RM-injected CD1 KO mice was examined. These mice lack CD1-restricted NKT cells, including CD4<sup>+</sup> NKT cells, but retain conventional MHC class II-restricted CD4<sup>+</sup> T cells.

The results are shown in FIG 6. Two mice per group were sacrificed and their spleen cells were harvested on days 0, 2, 4, 6, 10 after injection of 15-12RM cells. A fraction of the cells was used to purify CD4<sup>+</sup> T cells. One hundred thousand freshly isolated T cells from 15-12RM-injected mice were cultured in an anti-CD3 coated plate for 48 h. The culture supernatant was collected and concentration of each cytokines was determined by ELISA. The each value shows the average of two mice. The results are representative of two independent experiments. Asterisks indicate a level under the detection limit (<7.8 pg/ml).

CD4<sup>+</sup> T cells purified from spleen cells of CD1 KO mice produced only a slight amount of IL-13 and IL-4 after 15-12RM injection, whereas CD4<sup>+</sup> T cells from wild-type mice up-regulated the production of these cytokines on days 2, 4 and 10 after tumor inoculation. This indicates that the majority of IL-13 production was from or dependent on NKT cells. Conversely, the IFN- $\gamma$  produced was even higher in the cells of CD1 KO mice than in those of wild-type mice.

#### 30 *CD1 KO mice show low levels of tumor recurrence*

Because CD4<sup>+</sup> NKT cells can produce IL-13 and indeed are responsible for much of the IL-13 production, and these cells would be depleted by anti-CD4 treatment in addition to



WO 02/055100

PCT/US01/51339

conventional CD4<sup>+</sup> T cells, it was hypothesized that NKT cells play a critical role in down-regulation of tumor immunosurveillance by CTL. To test this hypothesis, CD1 KO mice were inoculated with 15-12RM and the effect of tumor growth with or without anti-CD4 treatment was measured.

5 The results are shown in FIG. 7. BALB/c background CD1 KO mice and wild-type BALB/c mice either untreated or treated with anti-CD4 were injected subcutaneously with  $1 \times 10^6$  15-12RM cells. The mice in the anti-CD4-treated group were treated with anti-CD4 (0.5 mg) starting 3 days before 15-12RM injection and twice a week thereafter. Five mice were used for each group.  $P < 0.02$  by Log-Rank test between the control group and the CD1  
10 KO group. One representative experiment of four is shown. In the CD1 KO mice, tumors grew initially and regressed in the same time period as in wild-type mice. However, CD1 KO mice were as resistant to tumor recurrence as anti-CD4-treated wild-type mice. Thus, CD1-restricted NKT cells appeared to be necessary for the down-regulation of immunosurveillance.

15 The activity of CD8<sup>+</sup> T cells purified from splenocytes of anti-CD4-treated (FIG. 8A), CD1 KO (FIG. 8B) and control mice (FIG. 8C) examined for CTL activity at 12 days after 15-12RM injection against 18Neo targets pulsed with 1  $\mu$ M of P18IIIB or unpulsed, without any *in vitro* stimulation. One representative experiment of three is shown in FIG. 8A-8C, respectively.

20 In CD4-depleted mice, protection against tumor recurrence appeared to be associated with higher CTL activity of CD8<sup>+</sup> T cells immediately *ex vivo* without restimulation than in control mice (FIG. 8A and Matsui *et al.*, *J. Immunol.* 163: 184-193, 1999). To determine whether the same applied to CD1 KO mice, the CTL activity of purified CD8<sup>+</sup> T cells from 15-12RM-injected CD1 KO mice was compared with that of the CD8<sup>+</sup> T cells from tumor  
25 injected control and anti-CD4-treated mice (FIG. 8B). Freshly isolated CD8<sup>+</sup> T cells from CD1 KO (FIG. 8B) lysed P18IIIB-pulsed 18Neo at a low level without *in vitro* stimulation, whereas CD8<sup>+</sup> T cells from intact tumor-bearing mice did not kill P18IIIB-pulsed 18Neo without restimulation (FIG. 8C). Thus, the presence of NKT cells led to reduced CTL activity immediately *ex vivo*.

30 Taken together, these results demonstrate that IL-13 produced either by CD1-restricted CD4<sup>+</sup> NKT cells, or possibly by other cells dependent on NKT cells, at an early growth phase of the tumor (within 10 days) triggers negative regulation of CTL.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

immunosurveillance, and that this negative regulation is mediated through the IL-4R $\alpha$ -STAT6 pathway.

5 **Example 3. An IL-13 inhibitor enhances a CTL response to a synthetic peptide HIV vaccine**

The ability of an IL-13 inhibitor for enhancing a cytotoxic T cell lymphocyte (CTL) response was examined.

BALB/c mice were immunized subcutaneously with a synthetic peptide vaccine  
10 PCLUS6.1-18IIIB (20 nmoles) (US Patent No. 5,932,218) that was mixed with GM-CSF (5 ug) in an emulsion adjuvant, Montanide ISA-51 on day 0. On each of days 0, 1, 2, 4, and 6, 200 ug of the IL-13 inhibitor IL-13Ra2-Fc was administered intraperitoneally. Controls received a control IgG instead of IL-13 inhibitor.

The subsequent CTL response in the spleens of the test and control mice, harvested 14  
15 days later and stimulated for 1 week in culture, was measured and is plotted in the graph shown in FIG. 9. Targets cells were coated with P18IIIB peptide.

Significantly higher CTL-mediated lysis was observed when the IL-13 inhibitor was administered along with a synthetic peptide HIV vaccine to mice. These results demonstrate that an increased the cytotoxic T lymphocyte (CTL) response in the presence of the inhibitor  
20 as compared to the vaccine without the IL-13 inhibitor.

Other Embodiments

It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not  
25 limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

What is claimed is:

1. A method of inhibiting the growth of a tumor in a subject, the method comprising administering to said subject an IL-13 inhibitor, wherein said inhibitor comprises an IL-13 ligand.
- 5 2. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered in an amount sufficient to inhibit the growth of a tumor in said subject.
3. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered prior to detection of a primary tumor in said subject.
4. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered after detection  
10 of a primary tumor in said subject.
5. The method of claim 1, wherein said subject is at increased risk for developing said tumor.
6. The method of claim 1, wherein said subject has an allele of a gene that increases the risk of developing said tumor in said subject.
- 15 7. The method of claim 6, wherein said gene is a tumor suppressor gene selected from the group consisting of a retinoblastoma gene, a p53 gene, a BRCA gene, a APC, and a DCC gene.
8. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered prior to treatment of a tumor in said subject.
- 20 9. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered to said subject within two weeks prior to surgical resection of a tumor in said subject.
10. The method of claim 9, wherein said inhibitor is administered to said subject within two weeks after surgical resection of a tumor in said subject.
11. The method of claim 10, wherein said inhibitor is administered concurrently  
25 with treatment of a tumor in said subject.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

12. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered following treatment of a tumor in said subject.
13. The method of claim 1, wherein said inhibitor comprises an IL-13 binding region of an IL-13 receptor.
- 5 14. The method of claim 13, wherein said inhibitor further comprises an immunoglobulin polypeptide.
15. The method of claim 1, wherein said inhibitor is a fusion protein comprising a murine IL-13 $\alpha$  2 polypeptide and an Fc region of a IgG<sub>1</sub> polypeptide or a fusion protein comprising a human IL-13 $\alpha$  2 polypeptide and an Fc region of a IgG<sub>1</sub> polypeptide.
- 10 16. The method of claim 1, wherein said inhibitor is an antibody which binds to IL-13.
17. The method of claim 16, wherein said antibody is a polyclonal antibody.
18. The method of claim 16, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
19. The method of claim 1, wherein said inhibitor is an IL-13 antagonist.
- 15 20. The method of claim 1, wherein said subject is a human.
21. The method of claim 1, wherein said tumor is a carcinoma, sarcoma, or cancer of a blood cell.
22. The method of claim 1, wherein said tumor is a recurring tumor.
23. The method of claim 1, wherein said tumor is selected from the group  
20 consisting of breast cancer, liver cancer, melanoma, uterine cancer, colorectal cancer, lung cancer, prostate cancer, renal cell cancer, cervical cancer, renal cell carcinoma, pancreatic cancer, ovarian cancer, thyroid cancer, nasopharyngeal cancer, leukemia and lymphoma.
24. The method of claim 1, wherein said tumor is selected from the group  
25 consisting of renal cell carcinoma, melanoma, testicular cancer, leukemia, and lymphoma.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

25. The method of claim 1, further comprising administering to said subject a second agent that inhibits tumor growth.
26. The method of claim 25, wherein said second agent increases interferon gamma levels in said subject.
- 5 27. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered systemically to said subject.
28. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered topically to said subject.
29. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered by a route  
10 selected from intravenous, subcutaneous, and intramuscular delivery.
30. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered by subcutaneous delivery.
31. The method of claim 1, wherein said inhibitor is administered in a delayed-release composition.
- 15 32. The method of claim 31, wherein said delayed-release composition comprises a microparticle
33. The method of claim 32, wherein said microparticle is poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA).
34. A method of inhibiting the growth of a tumor in a subject, the method  
20 comprising administering a non-cytotoxic inhibitor of IL-13.
35. The method of claim 34, wherein said inhibitor inhibits IL-13 gene expression in said subject.
36. The method of claim 34, wherein said inhibitor is an anti-sense IL-13 nucleic acid or an IL-13 ribozyme.
- 25 37. The method of claim 34, wherein said inhibitor inhibits IL-13 activity in said subject.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

38. The method of claim 34, wherein said inhibitor is an IL-13 receptor antagonist.
39. The method of claim 38, wherein said antagonist is an antibody which binds to an IL-13 receptor.
- 5 40. The method of claim 34, wherein said inhibitor comprises an IL-13 binding region of an IL-13 receptor.
41. The method of claim 34, wherein said inhibitor further comprises an immunoglobulin polypeptide.
42. The method of claim 34, wherein said inhibitor is an antibody which binds to  
10 IL-13.
43. The method of claim 42, wherein said antibody is a polyclonal antibody.
44. The method of claim 42, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
45. A method of inhibiting the growth of a tumor in a subject, the method comprising administering to said subject a NK-T cell inhibitor in an amount sufficient to  
15 inhibit the growth of a tumor in said subject.
46. The method of claim 45, wherein said cell binds to an antigen-presenting cell that expresses a CD1 polypeptide.
47. The method of claim 46, wherein said inhibitor binds to a CD1 molecule.
48. The method of claim 45, wherein said inhibitor comprises a ligand for a V $\alpha$ 24  
20 polypeptide.
49. A method of inhibiting the growth of a virus in subject, the method comprising administering an IL-13 inhibitor to said subject, wherein said inhibitor comprises an IL-13 ligand.
50. The method of claim 49, wherein said inhibitor is administered before or  
25 during a primary exposure of said subject to said virus.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

51. The method of claim 49, wherein said virus is selected from the group consisting of human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human papilloma virus (HPV), human T-cell leukemia virus (HTLV), cytomegalovirus (CMV), and Epstein-Barr Virus (EBV).
52. A method of inhibiting a chronic infection of a mammal by a virus, comprising administering to said mammal an IL-13 inhibitor, said inhibitor comprising an IL-13 ligand, wherein said inhibitor is administered to a mammal is diagnosed as suffering from an acute infection by said virus.
53. The method of claim 52, wherein said virus is selected from the group consisting of human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human papilloma virus (HPV), human T-cell leukemia virus (HTLV), cytomegalovirus (CMV), and Epstein-Barr Virus (EBV).
54. A method of inhibiting the growth of a virus in subject, the method comprising administering to said subject an agent that inhibits activity of a NK-T cell.
55. The method of claim 54, wherein said cell is a CD1-restricted cell.
56. The method of claim 55, wherein said inhibitor binds to CD1.
57. The method of claim 54, wherein said inhibitor comprises a ligand for a V $\alpha$ 24 polypeptide.
58. The method of claim 54, wherein said virus is selected from the group consisting of human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), human papilloma virus (HPV), human T-cell leukemia virus (HTLV), cytomegalovirus (CMV), and Epstein-Barr Virus (EBV).
59. A method of enhancing an immune response in a subject, the method comprising administering an inhibitor of IL-13 to said subject, wherein said inhibitor comprises a ligand for an IL-13 polypeptide.
60. The method of claim 59, further comprising introducing a vaccine into said subject.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

61. The method of claim 60, wherein said inhibitor is administered within 30 days prior to introducing a vaccine into said subject.
62. The method of claim 60, wherein said inhibitor is administered within 30 days after introducing a vaccine into said subject.
- 5 63. The method of claim 60, wherein said vaccine is directed to a tumor.
64. The method of claim 60, wherein said vaccine is directed to a pathogen.
65. The method of claim 64, wherein said pathogen is selected from the group consisting of a virus, a bacterium, and a eukaryotic cell.
66. The method of claim 60, wherein said vaccine is administered prophylactically  
10 to said subject.
67. The method of claim 60, wherein said vaccine is administered therapeutically to said subject.
68. The method of claim 60, wherein said virus is human immunodeficiency virus (HIV).
- 15 69. The method of claim 68, wherein said vaccine elicits a cytotoxic T cell (CTL)-response in said host.
70. The method of claim 60, wherein said vaccine is a PCLUS6.1-18IIIB peptide.
71. The method of claim 69, wherein said vaccine is a PCLUS6.1-18IIIB peptide.
72. The method of claim 60, further comprising administering to said subject a  
20 second agent that enhances an immune response.
73. The method of claim 72, wherein said agent comprises IL-12.
74. A method of enhancing an immune response in a subject, the method comprising administering an inhibitor of an NK-T cell to said subject.
75. The method of claim 74, further comprising introducing a vaccine into said  
25 subject.



WO 02/055100

PCT/US01/51339

76. The method of claim 75, wherein said inhibitor is administered within 30 days prior to introducing a vaccine into said subject.
77. The method of claim 75, wherein said inhibitor is administered within 30 days after introducing a vaccine into said subject.
- 5 78. The method of claim 75, wherein said vaccine is directed to a tumor.
79. The method of claim 75, wherein said vaccine is directed to a pathogen.
80. The method of claim 79, wherein said pathogen is selected from the group consisting of a virus, a bacterium, and a eukaryotic cell.
81. The method of claim 75, wherein said vaccine is prophylactic.
- 10 82. The method of claim 75, wherein said vaccine is therapeutic.
83. The method of claim 75, further comprising administering to said subject a second agent that enhances an immune response.
84. The method of claim 83, wherein said agent comprises IL-12.
85. A method of inhibiting the growth of a tumor in a subject, the method
- 15 comprising administering to said subject a nucleic acid encoding an IL-13 ligand.

WO 02/055100

PCT/US01/51339

1/8

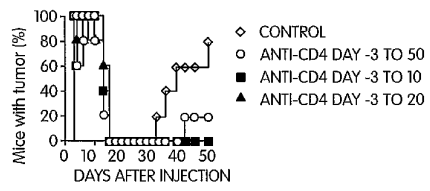


Fig. 1a

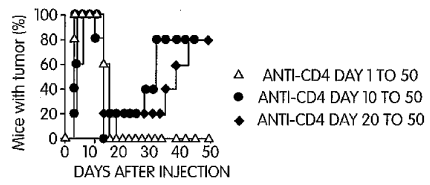


Fig. 1b

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/055100

PCT/US01/51339

2/8

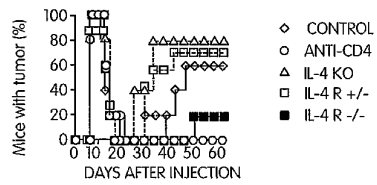


Fig. 2a

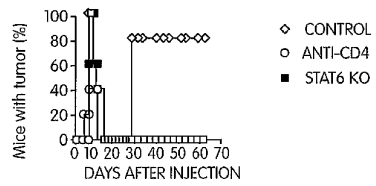


Fig. 2b

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/055100

PCT/US01/51339

3/8

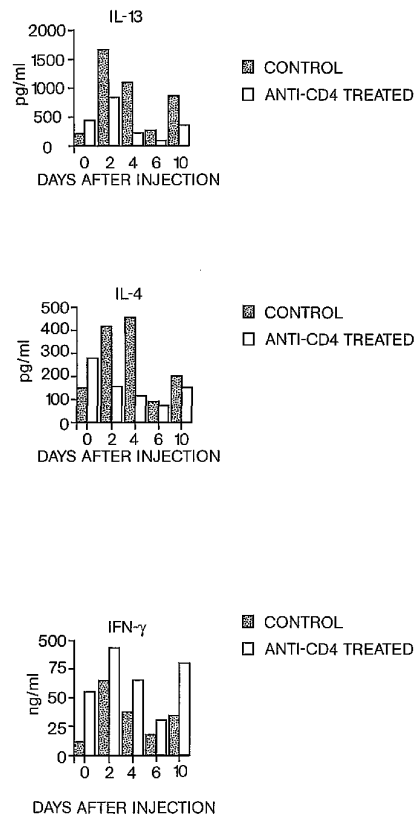


Fig. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/055100

PCT/US01/51339

4/8

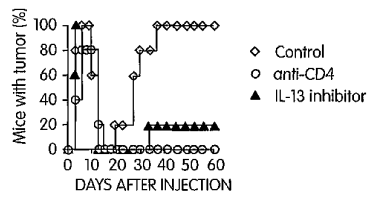


Fig. 4a

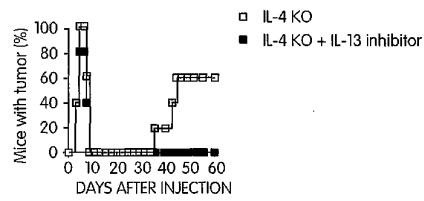


Fig. 4b

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/055100

PCT/US01/51339

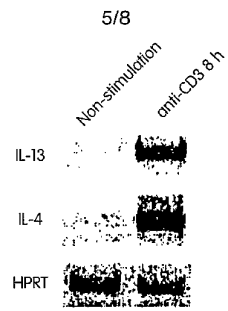


Fig. 5a

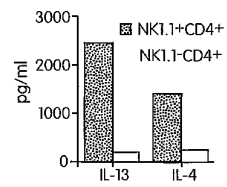


Fig. 5b

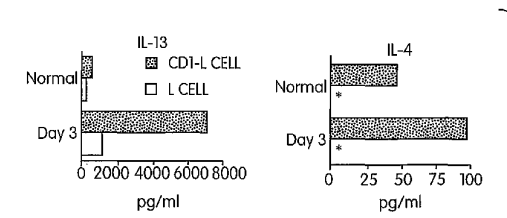


Fig. 5c

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/055100

PCT/US01/51339

6/8

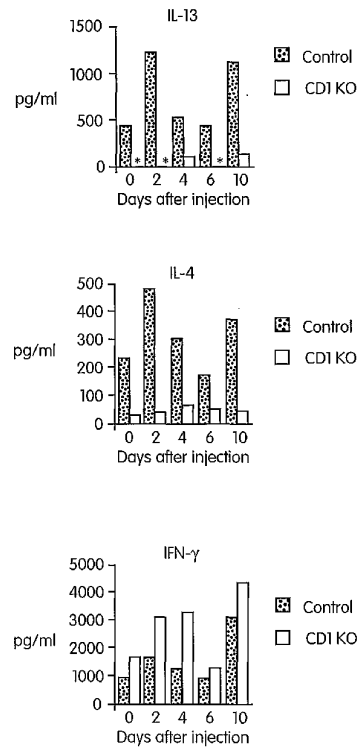


Fig. 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/055100

PCT/US01/51339

7/8

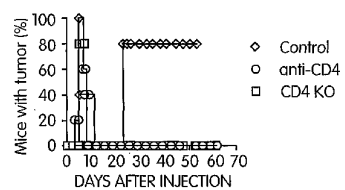


Fig. 7

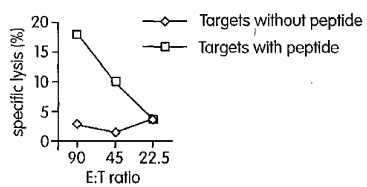


Fig. 8a

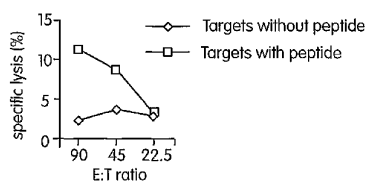


Fig. 8b

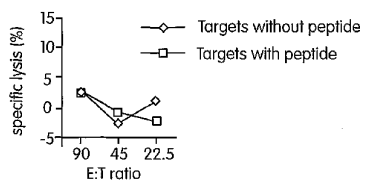


Fig. 8c

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/055100

PCT/US01/51339

8/8

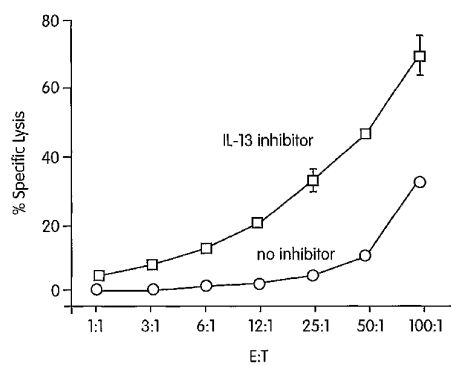


Fig. 9

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
18 July 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/055100 A3**

- (51) International Patent Classification: **A61K 38/00** Tsukuba-gakuentoshi 1107, Tsukuba, Ibaraki 300-0051 (JP). **NOBEN-TRAUTH, Nancy** [US/US]; 15933 Indian Hills Terrace, Rockville, MD 20855 (US). **PAUL, William, E.** [US/US]; 10706 Great Arbor Drive, Potomac, MD 20851 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/51339
- (22) International Filing Date: 22 October 2001 (22.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
09/693,600 20 October 2000 (20.10.2000) US  
60/318,185 7 September 2001 (07.09.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:  
US 09/693,600 (CIP)  
Filed on 20 October 2000 (20.10.2000)
- (71) Applicants (for all designated States except US): **GENETICS INSTITUTE, LLC** [US/US]; 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140 (US). **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES** [US/US]; National Institutes of Health, 6011 Executive Blvd., Rockville, MD 20852 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): **BERZOFSKY, Jay, A.** [US/US]; 5908 Bradley Boulevard, Bethesda, MD 20814 (US). **TERABE, Masaki** [US/US]; 4949 Battery Lane #502, Bethesda, MD 20814 (US). **DONALDSON, Debra, D.** [US/US]; 108 Blakely Road, Medford, MA 02155 (US). **MATSUI, So** [JP/JP]; Lion's Mansion
- (74) Agent: **ELRIFI, Ivor, R.**; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky & Popeo PC, One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 27 March 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/055100 A3

(54) Title: METHOD AND COMPOSITION FOR INHIBITION OF TUMOR GROWTH AND ENHANCING AN IMMUNE RESPONSE

(57) Abstract: Provided is a method and composition for enhancing an immune response in a subject by administering to the subject an inhibitor of IL-13 or an inhibitor of an NK-T cell to the subject. The method can be used to prevent growth of a tumor in the subject, e.g., to inhibit tumor recurrence or metastasis. The method can also be used to enhance a response to a vaccine in a subject.

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 01/51339

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 04680 A (SCHERING CORP) 3 March 1994 (1994-03-03)  claims 4,5,11 page 21, line 33 -page 22, line 2 page 22, line 21 - line 27 ---	1-4,14, 16-24, 27-32, 34, 37-44,59
E	EP 1 176 140 A (MITSUBISHI PHARMA CORP) 30 January 2002 (2002-01-30)  claim 14 page 36, line 27,53 page 37, line 6,12 --- -/--	1-4, 19-24, 27-32, 34,37, 38,49-53
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 June 2002		Date of mailing of the international search report 14 11. 2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5819 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Beranová, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 P US 01/51339

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	US 6 143 871 A (GAUCHAT JEAN-FRANCOIS ET AL) 7 November 2000 (2000-11-07)  claims 1,3,16 column 4, line 1 - line 4	1-4,13, 19-24, 27-32, 34,37, 38, 49-53,59
P,X	WO 01 77332 A (HESKA CORP ;TANG LIANG (US); MCCALL CATHERINE A (US)) 18 October 2001 (2001-10-18) claim 44 page 53, line 26 - line 28	59
X	WO 00 36103 A (GENETICS INST ;UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 22 June 2000 (2000-06-22)  claims 21,30,45,46 page 14, line 25 -page 15, line 6 page 15, line 25 -page 16, line 8	1-4, 13-30, 34-44, 49-53,59
X	WO 00 40264 A (DEBINSKI WALDEMAR ;CONNOR JAMES R (US); PENN STATE RES FOUND (US)) 13 July 2000 (2000-07-13) claims 1,4,5 page 7, line 21 - line 25	1-4, 8-24,27, 29,34-44

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 01/51339**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 1 - 44, 49 - 53, 59 - 73 and 85 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.
2. ☒ Claims Nos.: 1, 2, 19, 38, 49, 59  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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 any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-44, 49-53, 59-73

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/US 01/51339

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1 - 44, 49 - 53, 59 - 73

1.1. Claims: 1 - 44

Method of inhibiting the growth of tumor comprising administering an IL-13 inhibitor

1.2. Claims: 49 - 53

Method of inhibiting the growth of a virus comprising administering an IL-13 inhibitor

1.3. Claims: 59 - 73

Method of enhancing an immune response comprising administering an IL-13 inhibitor

2. Claims: 45 - 48, 54 - 58, 74 - 84

Invention 2:

Method of inhibiting the growth of a tumor, of inhibiting the growth of a virus or of enhancing an immune response comprising administering a NK-T cell inhibitor

3. Claim : 85

Invention 3:

Method of inhibiting the growth of a tumor comprising administering a nucleic acid encoding an IL-13 ligand

Please note that all inventions mentioned under item 1, although not necessarily linked by a common inventive concept, could be searched without effort justifying an additional fee.

International Application No. PCT/US 61/51339

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1, 2, 19, 38, 49, 59

Present claims 1, 2, 19, 38, 49, 59 and 85 relate to a method defined by reference to a desirable characteristic or property, namely "IL-13 inhibitor". The claims cover all methods having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such methods. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the method by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been limited to a key word search relating to those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely an IL-13 inhibitor comprising an IL-13 binding region of an IL-13 receptor, an IL-13 inhibitor comprising an immunoglobulin polypeptide and a fusion protein comprising an IL-13 polypeptide and an Fc region of a IgG polypeptide (claims 13 - 18).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/51339

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9404680 A	03-03-1994	US 5596072 A	21-01-1997
		AU 5010793 A	15-03-1994
		CA 2142860 A1	03-03-1994
		EP 0656947 A1	14-06-1995
		JP 7508179 T	14-09-1995
		WO 9404680 A1	03-03-1994
		CN 1085953 A	27-04-1994
		ZA 9306097 A	21-02-1994
EP 1176140 A	30-01-2002	AU 2460600 A	29-08-2000
		BR 0008173 A	22-10-2002
		EP 1176140 A1	30-01-2002
		CN 1346348 T	24-04-2002
		WO 0047558 A1	17-08-2000
		NZ 514095 A	28-09-2001
US 6143871 A	07-11-2000	NONE	
WO 0177332 A	18-10-2001	AU 5328201 A	23-10-2001
		WO 0177332 A2	18-10-2001
WO 0036103 A	22-06-2000	AU 2177509 A	03-07-2000
		BR 9916209 A	26-12-2001
		CN 1352686 T	05-06-2002
		EP 1141286 A1	10-10-2001
		WO 0036103 A1	22-06-2000
WO 0040264 A	13-07-2000	US 2001053371 A1	20-12-2001
		AU 2223800 A	24-07-2000
		EP 1140167 A1	10-10-2001
		JP 2002534395 T	15-10-2002
		WO 0040264 A1	13-07-2000
		US 2002031492 A1	14-03-2002



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 31/14	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 31/20	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04	A 6 1 P 35/02	
// C 0 7 K 14/54	A 6 1 P 37/04	
C 0 7 K 16/24	A 6 1 K 37/02	
	C 0 7 K 14/54	
	C 0 7 K 16/24	

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

(71)出願人 503145648

ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド ステイツ アズ レプリゼンテッド バイ ザ セク  
レタリー オブ ザ デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービスズ  
アメリカ合衆国 メリーランド 20852, ロックビル, エグゼキュティブ ブールバード  
6011, ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 バーゾフスキー, ジェイ エイ.

アメリカ合衆国 メリーランド 20814, ベセスダ, ブラッドレイ ブールバード 59  
08

(72)発明者 テラベ, マサキ

アメリカ合衆国 メリーランド 20814, ベセスダ, バッテリー レーン 4949 ナ  
ンバー502

(72)発明者 ドナルドソン, デブラ ディー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02155, メッドフォード, ブレイクリー ロード  
108

(72)発明者 マツイ, ソウ

茨城県筑波市筑波ライオンズマンション学園都市1107

(72)発明者 ノベン-トゥルース, ナンシー

アメリカ合衆国 メリーランド 20855, ロックビル, インディアン ヒルズ テラス  
15933

(72)発明者 ポール, ウィリアム イー.

アメリカ合衆国 メリーランド 20851, ポトマック, グレート アーバー ドライブ  
10706

F ターム(参考) 4C076 AA11 AA94 BB13 BB15 BB16 CC27 CC35 EE24 FF31  
4C084 AA02 AA13 AA17 AA20 MA02 MA17 MA66 NA12 NA13 ZB26  
ZB33  
4C085 AA03 AA13 AA14 AA33 BB17 CC21 CC22 CC23 EE01 EE03  
EE05 GG02 GG03 GG04  
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA02 DA76 EA28 EA31