

(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2016-520060

(P2016-520060A)

(43) 公表日 平成28年7月11日(2016.7.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/365 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/365	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 31/496 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/496	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 31/53 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/53	
<b>A 6 1 K 31/517 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/517	
<b>A 6 1 K 31/5025 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/5025	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-512884 (P2016-512884)	(71) 出願人	515309313 アンドリュー・ビー・ブッシュ
(86) (22) 出願日	平成25年5月6日 (2013.5.6)		アメリカ合衆国ニュージャージー州085
(85) 翻訳文提出日	平成28年1月6日 (2016.1.6)		40, プリンストン, ターナー・コート
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/039758		41
(87) 国際公開番号	W02014/182277	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(87) 国際公開日	平成26年11月13日 (2014.11.13)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100101373 弁理士 竹内 茂雄
		(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
		(74) 代理人	100122644 弁理士 寺地 拓己

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *in vivo*での抗体産生および液性免疫のFGF調節

## (57) 【要約】

本発明は、線維芽細胞増殖因子 - 2 (FGF2) の活性を、阻害または促進することにより、*in vivo*抗体産生を、それぞれ増加または減少させる方法を提供する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

内因性抗体の産生の増加を必要とし、がんの治療を必要としない哺乳動物において、内因性抗体の産生を増加させる方法であって、

内因性抗体の産生の増加を必要とし、がんの治療を必要としない哺乳動物に：バルガテフ；ドビチニブ；プリバニブ；セディラニブ；ポナチニブ；SAR106881；

4 - [ 3 - クロロ - 4 - ( 3 - シクロプロピルウレイド ) フェノキシ ] - 7 - メトキシキノリン - 6 - カルボキシアミド；

N - [ 5 - [ 2 - ( 3 , 5 - ジメトキシフェニル ) エチル ] - 2 H - ピラゾール - 3 - イル ] - 4 - ( 3 , 5 - ジメチルピペラジン - 1 - イル ) ベンズアミド；

( E ) - 3 - [ 2 , 4 - ジメチル - 5 - [ ( 2 - オキシインドリン - 3 - イリデン ) メチル ] - 1 H - ピロール - 3 - イル ] プロパン酸；

3 - ( 2 , 6 - ジクロロ - 3 , 5 - ジメトキシ - フェニル ) - 1 - { 6 - [ 4 - ( 4 - エチル - ピペラジン - 1 - イル ) - フェニルアミノ ] - ピリミジン - 4 - イル } - 1 - メチル - 尿素；

6 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イル ) - N - ( 5 - メチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル ) - 2 - [ ( E ) - 2 - フェニルビニル ] ピリミジン - 4 - アミン L - タルトレート；および

フロ ( 3 ' , 4 ' : 6 , 7 ) ナフト ( 2 , 3 - d ) - 1 , 3 - ジオキソール - 6 ( 5 a H ) - オン、5 , 8 , 8 a , 9 - テトラヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 5 - ( 3 , 4 , 5 - トリメトキシフェニル ) - 、 ( 5 R - ( 5 - , 5 a - , 8 a - , 9 - ) ) - 、 から成る群より選択される化合物またはその薬学的に許容される塩の治療有効量を投与することを含む、前記方法。

## 【請求項 2】

哺乳動物がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

哺乳動物が老齢のヒトである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

哺乳動物が免疫不全症を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

哺乳動物がヒトである、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

哺乳動物において、免疫原のワクチン接種に対する液性免疫応答を増加させる方法であって、

免疫原に対する哺乳動物のワクチン接種と併せて、哺乳動物に：バルガテフ；ドビチニブ；プリバニブ；セディラニブ；ポナチニブ；SAR106881；

4 - [ 3 - クロロ - 4 - ( 3 - シクロプロピルウレイド ) フェノキシ ] - 7 - メトキシキノリン - 6 - カルボキシアミド；

N - [ 5 - [ 2 - ( 3 , 5 - ジメトキシフェニル ) エチル ] - 2 H - ピラゾール - 3 - イル ] - 4 - ( 3 , 5 - ジメチルピペラジン - 1 - イル ) ベンズアミド；

( E ) - 3 - [ 2 , 4 - ジメチル - 5 - [ ( 2 - オキシインドリン - 3 - イリデン ) メチル ] - 1 H - ピロール - 3 - イル ] プロパン酸；

3 - ( 2 , 6 - ジクロロ - 3 , 5 - ジメトキシ - フェニル ) - 1 - { 6 - [ 4 - ( 4 - エチル - ピペラジン - 1 - イル ) - フェニルアミノ ] - ピリミジン - 4 - イル } - 1 - メチル - 尿素；

6 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イル ) - N - ( 5 - メチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル ) - 2 - [ ( E ) - 2 - フェニルビニル ] ピリミジン - 4 - アミン L - タルトレート；および

フロ ( 3 ' , 4 ' : 6 , 7 ) ナフト ( 2 , 3 - d ) - 1 , 3 - ジオキソール - 6 ( 5 a H ) - オン、5 , 8 , 8 a , 9 - テトラヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 5 - ( 3 , 4 , 5 - トリ

10

20

30

40

50

メトキシフェニル) -、(5R - (5 - , 5a - , 8a - , 9 - )) -、から成る群より選択される化合物またはその薬学的に許容される塩を投与することを含む、前記方法。

【請求項7】

哺乳動物がヒトである、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

哺乳動物ががんの治療を必要としない、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

哺乳動物がヒトである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

哺乳動物において内因性抗体の産生を増加させるための医薬の調製における：バルガテフ；ドピチニブ；プリバニブ；セディラニブ；ボナチニブ；SAR106881；

4 - [3 - クロロ - 4 - (3 - シクロプロピルウレイド)フェノキシ] - 7 - メトキシキノリン - 6 - カルボキシアミド；

N - [5 - [2 - (3, 5 - ジメトキシフェニル)エチル] - 2H - ピラゾール - 3 - イル] - 4 - (3, 5 - ジメチルピペラジン - 1 - イル)ベンズアミド；

(E) - 3 - [2, 4 - ジメチル - 5 - [(2 - オキソインドリン - 3 - イリデン)メチル] - 1H - ピロール - 3 - イル]プロパン酸；

3 - (2, 6 - ジクロロ - 3, 5 - ジメトキシ - フェニル) - 1 - {6 - [4 - (4 - エチル - ピペラジン - 1 - イル) - フェニルアミノ] - ピリミジン - 4 - イル} - 1 - メチル - 尿素；

6 - (4 - メチルピペラジン - 1 - イル) - N - (5 - メチル - 1H - ピラゾール - 3 - イル) - 2 - [(E) - 2 - フェニルビニル]ピリミジン - 4 - アミンL - タルトレート；および

フロ(3', 4' : 6, 7)ナフト(2, 3 - d) - 1, 3 - ジオキソール - 6(5aH) - オン、5, 8, 8a, 9 - テトラヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 5 - (3, 4, 5 - トリメトキシフェニル) -、(5R - (5 - , 5a - , 8a - , 9 - )) -、から成る群より選択される化合物またはその薬学的に許容される塩の使用。

【請求項11】

哺乳動物における免疫不全症の治療のための医薬の調製における：バルガテフ；ドピチニブ；プリバニブ；セディラニブ；ボナチニブ；SAR106881；

4 - [3 - クロロ - 4 - (3 - シクロプロピルウレイド)フェノキシ] - 7 - メトキシキノリン - 6 - カルボキシアミド；

N - [5 - [2 - (3, 5 - ジメトキシフェニル)エチル] - 2H - ピラゾール - 3 - イル] - 4 - (3, 5 - ジメチルピペラジン - 1 - イル)ベンズアミド；

(E) - 3 - [2, 4 - ジメチル - 5 - [(2 - オキソインドリン - 3 - イリデン)メチル] - 1H - ピロール - 3 - イル]プロパン酸；

3 - (2, 6 - ジクロロ - 3, 5 - ジメトキシ - フェニル) - 1 - {6 - [4 - (4 - エチル - ピペラジン - 1 - イル) - フェニルアミノ] - ピリミジン - 4 - イル} - 1 - メチル - 尿素；

6 - (4 - メチルピペラジン - 1 - イル) - N - (5 - メチル - 1H - ピラゾール - 3 - イル) - 2 - [(E) - 2 - フェニルビニル]ピリミジン - 4 - アミンL - タルトレート；および

フロ(3', 4' : 6, 7)ナフト(2, 3 - d) - 1, 3 - ジオキソール - 6(5aH) - オン、5, 8, 8a, 9 - テトラヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 5 - (3, 4, 5 - トリメトキシフェニル) -、(5R - (5 - , 5a - , 8a - , 9 - )) -、から成る群より選択される化合物またはその薬学的に許容される塩の使用。

【請求項12】

哺乳動物における微生物感染またはウイルス感染の治療のための医薬の調製における：バルガテフ；ドピチニブ；プリバニブ；セディラニブ；ボナチニブ；SAR106881

10

20

30

40

50

;

4 - [ 3 - クロロ - 4 - ( 3 - シクロプロピルウレイド ) フェノキシ ] - 7 - メトキシキノリン - 6 - カルボキサミド ;

N - [ 5 - [ 2 - ( 3 , 5 - ジメトキシフェニル ) エチル ] - 2 H - ピラゾール - 3 - イル ] - 4 - ( 3 , 5 - ジメチルピペラジン - 1 - イル ) ベンズアミド ;

( E ) - 3 - [ 2 , 4 - ジメチル - 5 - [ ( 2 - オキシインドリン - 3 - イリデン ) メチル ] - 1 H - ピロール - 3 - イル ] プロパン酸 ;

3 - ( 2 , 6 - ジクロロ - 3 , 5 - ジメトキシ - フェニル ) - 1 - { 6 - [ 4 - ( 4 - エチル - ピペラジン - 1 - イル ) - フェニルアミノ ] - ピリミジン - 4 - イル } - 1 - メチル - 尿素 ;

6 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イル ) - N - ( 5 - メチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル ) - 2 - [ ( E ) - 2 - フェニルビニル ] ピリミジン - 4 - アミン L - タルトレート ; および

フロ ( 3 ' , 4 ' : 6 , 7 ) ナフト ( 2 , 3 - d ) - 1 , 3 - ジオキソール - 6 ( 5 a H ) - オン、5 , 8 , 8 a , 9 - テトラヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 5 - ( 3 , 4 , 5 - トリメトキシフェニル ) - 、 ( 5 R - ( 5 - , 5 a - , 8 a - , 9 - ) ) - 、 から成る群より選択される化合物またはその薬学的に許容される塩の使用。

#### 【請求項 13】

哺乳動物において免疫原のワクチン接種に対する液性免疫応答を増強させるための医薬の調製における：バルガテフ；ドビチニブ；プリバニブ；セディラニブ；ボナチニブ；SAR106881；

4 - [ 3 - クロロ - 4 - ( 3 - シクロプロピルウレイド ) フェノキシ ] - 7 - メトキシキノリン - 6 - カルボキサミド ;

N - [ 5 - [ 2 - ( 3 , 5 - ジメトキシフェニル ) エチル ] - 2 H - ピラゾール - 3 - イル ] - 4 - ( 3 , 5 - ジメチルピペラジン - 1 - イル ) ベンズアミド ;

( E ) - 3 - [ 2 , 4 - ジメチル - 5 - [ ( 2 - オキシインドリン - 3 - イリデン ) メチル ] - 1 H - ピロール - 3 - イル ] プロパン酸 ;

3 - ( 2 , 6 - ジクロロ - 3 , 5 - ジメトキシ - フェニル ) - 1 - { 6 - [ 4 - ( 4 - エチル - ピペラジン - 1 - イル ) - フェニルアミノ ] - ピリミジン - 4 - イル } - 1 - メチル - 尿素 ;

6 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イル ) - N - ( 5 - メチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル ) - 2 - [ ( E ) - 2 - フェニルビニル ] ピリミジン - 4 - アミン L - タルトレート ; および

フロ ( 3 ' , 4 ' : 6 , 7 ) ナフト ( 2 , 3 - d ) - 1 , 3 - ジオキソール - 6 ( 5 a H ) - オン、5 , 8 , 8 a , 9 - テトラヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 5 - ( 3 , 4 , 5 - トリメトキシフェニル ) - 、 ( 5 R - ( 5 - , 5 a - , 8 a - , 9 - ) ) - 、 から成る群より選択される化合物またはその薬学的に許容される塩の使用。

#### 【発明の詳細な説明】

#### 【技術分野】

#### 【0001】

#### 発明の分野

[0002]本発明は、液性免疫の分野に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

#### 発明の背景

[0003]生命体は、免疫応答中に複数のステップで抗体産生を制御しており、この応答は、侵入している病原体に対して注意深く適合させなければならない。応答が過剰である場合は、自己免疫の異常が宿主組織を損傷する可能性があるのに対して、応答が不十分な場合は、病原体が生き残り、生存を脅かし得る。液性免疫応答を刺激する可溶性因子が同定されているが、この過程の負の調節因子についての我々の知識はかなり限られている ( R

10

20

30

40

50

avetchら、2000、Science 290:84)。実際、その機能喪失が抗体産生の増強につながる可溶性サイトカインは、ほとんど同定されていない。

【0003】

[0004]液性免疫応答中、一連の複雑なシグナル伝達事象が抗体産生を指揮する。その過程は、末梢の成熟B細胞への抗原提示から始まり、そのB細胞は増殖し、胚中心へと遊走する。抗原に対して最も親和性が高いB細胞受容体を所有する細胞は、生存に恵まれているが、低親和性のものは、より容易にアポトーシスされる。この選択を生き抜いた活性化B細胞は、記憶B細胞または抗体を分泌する形質細胞に分化する。多くのB細胞は、胚中心選択過程の他に、濾胞外応答においても抗体を分泌する(MacLennanら、2003、Immunol. Rev. 194:8)。T細胞非依存性抗原への曝露後の濾胞外応答は、重要であると考えられている(Fagarasanら、2000、Science 290:89; Martinら、2001、Immunity 14:617)。抗原が除去されると、B細胞は休止状態に戻る。オフ状態のB細胞活性化の遮断は、抗体分泌の恒常性再設定のため、および病的な自己免疫状態を防ぐために必要である。失活過程を制御する可溶性因子については、あまり知られていない。

10

【0004】

[0005]細胞外調節因子の線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーは、事実上すべての高等脊椎動物組織の生理機能および発生を制御することが示されている。23種のFGFリガンドが哺乳動物において同定されており、これらのリガンドは、5つの異なる遺伝子によってコードされる細胞表面受容体と相互作用する(Wiedemannら、2000、Genomics 69:275; Ornitzら、2001、Genome Biol. 2)。リガンド結合ドメインにおける選択的スプライシングは、FGF受容体の可変型を生成し、それによって多様性が増す。

20

【0005】

[0006]FGF2または塩基性FGFは、最初に同定されたFGFファミリーメンバーであり(Abrahamら、1986、EMBO J. 5:2523)、最も広範囲に研究されているものの1つである。ほとんどの胚組織および成体組織において発現されると、選択的開始部位における翻訳開始により、FGF2は高分子量や低分子量のアイソフォームで存在する。FGF2は、5つの受容体すべてに結合するが、受容体1~3の「c」選択的スプライシング型が優先される(Ornitzら、1996、J. Biol. Chem. 271:15292)。FGF2は、増殖、分化、アポトーシス、および遊走を含めたさまざまな作用を刺激することが示されている。その結果、FGF2シグナルは、細胞の状況に応じて異なって解釈される。

30

【0006】

[0007]米国特許第4,994,559号は、ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子について開示している。

【0007】

[0008]米国特許第5,229,501号は、ヒト線維芽細胞増殖因子受容体の発現および使用について開示している。

【0008】

[0009]米国特許第5,228,855号は、ヒト線維芽細胞増殖因子受容体の細胞外形について開示している。

40

【0009】

[0010]米国特許第5,707,632号は、線維芽細胞増殖因子の受容体について開示している。

【0010】

[0011]米国特許第5,891,655号は、FGF活性を調節する分子およびFGF受容体活性化のオリゴ糖モジュレーターを同定する方法について開示している。

【0011】

[0012]米国特許第6,071,885号は、強心配糖体およびそのアグリコン誘導體

50

の投与による、FGF介在病態の治療について開示している。

【0012】

[00013]米国特許第6,350,593号は、線維芽細胞増殖因子の受容体ならびに線維芽細胞増殖因子および線維芽細胞増殖因子受容体に対する拮抗作用のための組成物を評価する方法について開示している。

【0013】

[00014]米国特許第6,255,454号は、ヒト線維芽細胞増殖因子受容体およびその可溶性型受容体の発現および使用について開示している。

【0014】

[00015]米国特許第6,900,053号は、線維芽細胞増殖因子受容体2の発現のアンチセンス調節について開示している。

10

【0015】

[00016]複数のヒトに対する療法は、免疫応答を増強するように設計されるが、それらをヒトに使用することで、重度の副作用を併発する。例えば、外因性のIL-2は、抗腫瘍免疫応答を刺激するために、進行性黒色腫患者に投与される。しかし、T細胞を直接活性化する全身性サイトカインとしてのこの生物製剤は、危険な低血圧などのひどい副作用を伴う。必要とされることは、免疫機能、特に、液性免疫を増強する新規な方法である。

【発明の概要】

【0016】

発明の概要

20

[00017]液性免疫応答の負の調節において線維芽細胞増殖因子(FGF)シグナル伝達が果たす新規な役割が、本発明者によって発見された。1型非依存性抗原に対する抗体産生は、FGF2の非存在下で増強され、反対に、FGF2が過剰に発現すると抑制されることが見出された。したがって、FGF2は、液性免疫応答の阻害剤である。加えて、脾臓中心は、効率的な形成にFGF2を必要とすることが発見された。

【0017】

[00018]本発明の1つの実施態様は、哺乳動物または他の高等脊椎動物において、免疫原のワクチン接種、例えば、抗原または生ワクチンもしくは不活化ワクチンの接種に対する液性免疫応答を増加させる方法であって、FGF2以外の免疫原に対する哺乳動物のワクチン接種と併せて、哺乳動物において、FGF2などの線維芽細胞増殖因子の活性を阻害し、それによって抗原に対する液性免疫応答を増加させることを含む方法を提供する。1つの改変例では、免疫原は、線維芽細胞増殖因子以外および線維芽細胞増殖因子受容体以外である。

30

【0018】

[00019]本発明の他の実施態様は、ヒトなどの哺乳動物において免疫不全症を治療する方法であって、哺乳動物においてFGF2などの線維芽細胞増殖因子の活性を阻害することによって、哺乳動物において内因性抗体の産生を増加させることを含む方法を提供する。

【0019】

[00020]本発明のさらなる実施態様は、ヒトなどの哺乳動物において微生物感染を治療する方法であって、微生物感染の治療を必要とする哺乳動物において、哺乳動物において抗体産生を増加させるのに有効な程度まで、FGF2などの線維芽細胞増殖因子の活性を阻害することを含む方法を提供する。阻害ステップは、FGF2アンタゴニストなどの線維芽細胞増殖因子アンタゴニストを、哺乳動物において抗体産生を増加させるのに有効な量で、哺乳動物に投与することを含み得るかまたはそれから成り得る。その方法は、微生物感染に対して活性な抗生物質または抗ウイルス剤を、哺乳動物に投与するステップをさらに含み得る。

40

【0020】

[00021]本発明の他の実施態様は、がんを有していないヒトなどの哺乳動物において、*in vivo*での抗体産生を増加させる方法であって、哺乳動物において、FGF2な

50

どの線維芽細胞増殖因子の活性を阻害するステップを含む方法を提供する。1つの改変例では、哺乳動物は老齢のヒトである。

【0021】

[00022]本発明のさらなる実施態様は、そのような低減を必要とするヒトなどの哺乳動物において病的な抗体産生などの抗体産生を減少させる方法であって、哺乳動物に、哺乳動物において抗体産生を減少させるのに有効な量で、FGF2もしくはFGF2アゴニストなどの線維芽細胞増殖因子もしくはそのアゴニスト、またはFGF2などの線維芽細胞増殖因子を結合させるFGFR1、FGFR2、およびFGFR3などの受容体のアゴニストを投与することにより減少させる方法を提供する。

【0022】

[00023]本発明の追加の特徴、利点、および実施態様は、明記されるか、または以下の詳細な説明、図面、および特許請求の範囲の考察から明らかであり得る。その上、上記の発明の概要および下記の詳細な説明は例示的なものであり、請求された本発明の範囲を限定することなく、さらなる説明を提供することを意図するものであることが理解されるべきである。

#### 図面の簡単な説明

[00024]添付の図面は、本発明のさらなる理解を与えるために含まれており、本明細書に組み込まれ、その一部を構成するものであり、本発明の好ましい実施態様を説明し、詳細な説明とともに本発明の原理を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】[00025]図1Aは、FGF2欠失マウスが、1型胸腺非依存性抗原に対してより強く応答することを示す。

【0024】

[00026]図1Bは、免疫化後に同腹仔対照と比較した、FGF2欠失動物の抗体力価の差異を示す。

【図2】[00027]図2Aは、FGF2トランスジェニックマウスが、1型胸腺非依存性抗原に対してより弱く応答することを示す。

【0025】

[00028]図2Bは、免疫化後に同腹仔対照と比較した、FGF2トランスジェニック動物の抗体力価の定量を示す。

【図3】[00029]図3は、FGF2欠失が、胚中心に影響を及ぼすが、シンデカン発現には影響を及ぼさないことを示す。

【図4】[00030]図4は、FGF2の異所性発現が、胚中心形成を抑制しないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0026】

#### 詳細な説明

[00031]ここで、液性免疫応答は、FGF2変異マウスにおいて変化することを示す。FGF2欠失マウスは、1型非依存性抗原に対してより多くの抗体を産生するが、FGF2を過剰に発現するマウスは、同一の病原刺激に対する抗体産生の抑制を示す。加えて、胚中心形成は、FGF2の非存在下で障害される。驚いたことに、シングルコピーのFGF2を欠損しているマウスにおいて、抗体産生および胚中心形成の変化が観察され、このことは、リンパ球がFGF2遺伝子投与量に特に感受性であることを実証するものである。これらの研究は、FGFシグナル伝達が、液性免疫応答および成熟B細胞の機能に非常に重要な調節因子であるという第1の証拠を提供する。

材料および方法

#### [00032]マウス

[00033]FGF2<sup>-/-</sup>（ホモ接合体遺伝子ノックアウト）マウスは、2つの学術源から得た。これらのマウスは、創傷治癒、血圧調節、および皮質神経発生に比較的良性的異

10

20

30

40

50

常を示し、検出可能なレベルのFGF2タンパク質を発現しない(Ortegaら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5672; Zhouら、1998、Nature Medicine 4:20)。両方のセットのノックアウトは、抗体産生の増加を示した。図1および図3のデータは、シンシナティ大学から得られた動物についてのものである。ヘテロ接合体動物(129SvEv:Black Swissの混合)を交配させ、ヘテロ接合体動物およびヌル動物を同腹仔対照と比較した。雌雄両方の成体マウスを使用した。FGF2トランスジェニック動物は、骨異形成および内皮の恒常性の破壊を示す(Fulghamら、1999、Endothelium 6:185; Coffinら、1995、Mol. Biol. Cell 6:1861)。遺伝子導入のためのヘテロ接合体動物(FVBN)を野生型と交配させ、雌雄両方の成体動物を同腹仔対照と比較した。動物を、施設基準に従って、無菌施設で維持した。プロトコールは、IACUCガイドラインに忠実に従った。

10

20

30

40

50

#### 【0027】

##### [00034]液性免疫応答

[00035]PBS中の完全フロイントアジュバントを用いて乳化したTNP-LPS(トリ-ニトロフェノールリポ多糖)50 $\mu$ g(最終容量200 $\mu$ l)を用い、マウスを腹腔内免疫した。血清を後眼窩眼出血により採取した。血液を凝固後に遠心分離し、アジ化ナトリウム(0.01%)を加えた。TNP特異的抗血清のELISAを、TNP-BSA(Biosearch)でコーティングされたプレート上で行い、1次抗血清を4で一晚結合させた。アルカリホスファターゼに結合したヤギ抗マウスIgG(すべてのIgアイソタイプ)を、2次抗血清(Jackson)として使用した。血清の遺伝子型は、実験者には未知であった。吸光度(405nm)をMolecular Devicesの分光光度計で、三連で測定した。値を平均化し、ダイナミックレンジの中央にある吸光度から測定値を取得した。抗体力価の差異の定量について、連続希釈法を行い、すべての動物の血清から平均値をプロットした(最小n=5、 $\pm$ s.e.m.)。1次または2次抗血清を取り除くことによって、シグナルがバックグラウンドレベルに低下した。

#### 【0028】

##### [00036]免疫組織化学

[00037]ホルマリンで固定してパラフィン包埋した脾臓から作製した5 $\mu$ mの組織切片について、免疫組織化学を行った。切片を、10%正常ウサギ血清を含有するPBST(0.1%Tween-20を含むPBS)中でブロックし、レクチンビーナッツ凝集素で染色し、次いでビオチン化抗ビーナッツ凝集素(Vector Laboratories、Burlingame、CA)を加えるか、またはラット抗CD138(シンデカン-1)(Becton Dickinson)を加えた後、ビオチン化ヤギ抗ラットIgG2次抗体(Jackson Immunoresearch)を加えた。1次抗体を、4で一晚または室温で1時間インキュベートした。1次または2次抗血清を除去することによって、特異的シグナルが消失した。

#### 【0029】

[00038]切片の出所を知らない実験者らが胚中心数に評点をつけた。それぞれの脾臓について、少なくとも3つの連続切片に評点をつけた。結果は、1遺伝子型当たり2匹以上の動物に由来する、3つの独立した実験に基づいている。最大数の動物を使用した最終実験からのデータを提示する。

#### 【0030】

##### [00039]B細胞のin vitro増殖

[00040]成体野生型マウス(C57Bl6)を屠殺し、脾臓を迅速に取り出した。脾細胞は、解離させて単細胞の懸濁液にし、NH<sub>4</sub>Clで赤血球を溶解させた後、フィコール勾配遠心分離によって単離した。続いて、Bリンパ球を、2つの方法、補体を介在した溶解またはCD43の負の選択のうちの一つによって精製した。補体溶解に関して、細胞を、抗Thy1抗体(J1J)、抗L3T4(GK1.5)、抗Ly2(TIB105、ATCC)、およびウサギ補体(Sigma)とともに、37で2時間インキュベートし

た。CD43の負の選択は、製造業者の使用説明書に従って、抗CD43 (Serotec) およびMiltenyiマイクロビーズを使用して行った。細胞を、RPMI1640、10%ウシ胎仔血清中、抗CD40 (mAb 1C10、ワイルコーネル大学医学部Hsiou-Chi Liou氏より寄贈) および抗IgM Fab'2断片 (Jackson Immunoresearch) の存在下で3日間培養した。FGF1 (100 ng/ml) およびヘパリン (10 µg/ml) を加え、コールターカウンター (Coulter) またはトリパンブルー色素排除法を使用して、細胞数を三連で測定し、ヘパリン単独と比較したところ、同一の結果が得られた。

結果

[00041] FGF2は液性免疫応答を調節する

10

[00042] 研究の過程で、多発性骨髄腫におけるFGFシグナル伝達の役割を評価するために、B細胞の機能がFGF変異マウスにおいて変化し得るかどうかを検討することにした。FGFシグナル伝達が成熟B細胞の活性に影響を及ぼすのであれば、液性免疫応答は、FGFファミリーメンバーの1つにおける機能喪失型の突然変異によって影響を受けることが予測される。この問題に対処するために、最も広範に発現するFGFの1つであるFGF2を欠失したマウスにおいて液性免疫応答を調べた。

【0031】

[00043] 1型非依存性抗原であるTNP-LPSによる免疫化は、典型的には、ポリクローナルB細胞の活性化および増殖を刺激する。この抗原は、T細胞枯渇動物において抗体産生を惹起することができ、このことは、その応答がT細胞の援助とは概ね無関係であり得ることを示唆している。TNP-LPSに対する液性応答は、FGF2の非存在下で増強された (図1A)。ピーク応答の規模およびベースラインへの減衰は、FGF2欠失によって強化される。免疫化後3週目では、抗TNP抗体力価は、同腹仔対照に比べておよそ3倍高い (図1B)。この強化作用の大きさは、抑制性FC受容体であるB細胞固有の遺伝子FCRIIBで見られるものより大きい (Takaiら、1996、Nature 379:346)。驚いたことに、シングルコピーのFGF2を欠損しているマウスは、より多くの抗TNP抗体を産生する (図1A、13日目および22日目時点)。これらの結果は、FGF2が、1次液性免疫応答を負に調節し、抗体分泌の正常な不活性化に必要とされることを実証するものである。

20

【0032】

[00044] 図1 FGF2欠失マウスは、1型胸腺非依存性抗原に対してより強く応答する。マウスをTNP-LPS 50 µgで免疫し、抗TNP特異的抗体をELISAによって測定した。図1Aにおいて、データポイントは、少なくとも5匹の動物の血清由来の平均吸光度を表す。アスタリスクは、統計的差異が $p < .05$ であることを示す (スチューデントt検定)。図1Bは、免疫化後19日目に同腹仔対照と比較した、FGF2欠失動物の抗体力価の差異の定量を示す。データポイントは、それぞれの遺伝子型について、示された希釈度における平均吸光度 $\pm s.e.m.$ を表す。対応する縦線を有する曲線間の破線は、同一の吸光度における抗体力価の差異を描いたものである。

30

【0033】

[00045] FGF2が抗体産生を調節するのに十分であるかどうかを決定するために、FGF2トランスジェニックマウスにおける液性免疫応答について調べた。これらの動物は、遍在的に活性な促進剤であるホスホグリセリン酸キナーゼによって駆動するヒトFGF2遺伝子を発現させる (Coffinら、1995、Mol. Biol. Cell 6:1861)。FGF2タンパク質の異なる形態は、いくつかの高分子量および低分子量のアイソフォームを含めたFGF2遺伝子から産生される。FGF2トランスジェニック動物では、脾臓を含めた選択された組織において、18kD型FGF2の発現に顕著な増加が見られる (Coffinら、1995、Mol. Biol. Cell 6:1861)。

40

【0034】

[00046] 図2 FGF2トランスジェニックマウスは、1型胸腺非依存性抗原に対して

50

より弱く応答する。マウスをTNP-LPS 50  $\mu$ gで免疫し、抗TNP特異的抗体をELISAによって、TNP-BSAでコーティングされたプレートを使用して測定した。アスタリスクは、統計的差異が $p < 0.05$ であることを示す(スチューデントt検定)。図2Bは、免疫化後21日目に同腹仔対照と比較した、FGF2トランスジェニック動物の抗体力価の定量を示す。データポイントは、示された希釈度における平均吸光度 $\pm$  s.e.m.を表す。対応する縦線を有する曲線間の破線は、同一の吸光度における抗体力価の差異を描いたものである。

【0035】

[00047]図2Aに示すように、TNP-LPSに応答した抗体産生は、FGF2トランスジェニック動物において、著しく減少することが見出された。抗体産生の抑制は、1次応答のあいだ、比較的后期に始まり、免疫原の投与後21日目まで、統計的有意差は観察することができなかった。抗体力価の低下は、FGF2の非存在下で見られた増強に比べて、わずかに大きい(4倍)。したがって、FGF2は、液性免疫応答を制御するのに必要かつ十分である。総合すると、これらの観察結果は、FGF2を、抗体産生の可溶性調節因子として同定するものである。

10

【0036】

[00048]抗原によって活性化されると、B細胞は胚中心に遊走し、その場所で高親和性の、体細胞突然変異した抗体が生成される。胚中心がFGF2によって影響を受けるかどうかを決定するために、FGF2ヌルマウスにおいて形成される脾胚中心の数を調べた。レクチン染色によると、TNP-LPSで免疫化後およそ2週目に、胚中心の数が実質的に低下し、ヌル動物において形成される胚中心は6分の1少ないことが明らかである(図3、パネルA~C;表2)。より少ない胚中心は、免疫化後2日目にも観察される(表1)。予想外に、胚中心は、ヘテロ接合体動物においても低下する。

20

【0037】

【表 1】

マウス	+/+	+/-	-/-
1	4	2	1
2	3	0	0
3	0	0	0
4	8	0	0
5	3	2	-
6	1	2	-
7	0	1	-
8	0	4	-
9	1	0	-
10	4	0	-
11	4	3	-
12	3	3	-
13	-	4	-
平均	2.6	1.6	0.25
s. e. m.	0.7	0.4	0.25
N	12	13	4

10

20

【0038】

【表 2】

マウス	+/+	+/-	-/-
1	5	3	11
2	13	0	3
3	11	0	3
4	9	0	0
5	14	0	0
6	8	0.5	0
7	-	-	4
平均	10	0.6	1.7
s. e. m.	1.4	0.5	0.76
N	6	6	7

30

40

【0039】

【0049】表 1 および 2 胚中心形成は、FGF2 遺伝子投与量に依存する。FGF2 + / +、+ / -、- / - マウスを、TNP-LPS 50  $\mu$ g で腹腔内免疫した。免疫化後 2 日目（表 1）およびおよそ 2 週目に（表 2）、胚中心の発現のために脾臓をピーナツ凝

50

集素で染色した。免疫化後16日目に、FGF2ヘテロ接合体マウス ( $p < 0.01$ ) およびヌルマウス ( $p < 0.01$ ) において、形成された胚中心は有意により少なかった (スチューデント *t* 検定)。免疫化後2日目に、FGF2ヌルマウスにおいて、形成された胚中心は有意により少なかった ( $p < 0.05$ )。

## 【0040】

[00050] 脾臓の肉眼的形態学的特徴は、3つの遺伝子型において類似している。形質細胞の発生がFGF2欠失動物に影響されるかどうかを決定するために、形質細胞上に発現される細胞表面ヘパリン硫酸プロテオグリカンであるシンデカン-1の発現を調べた。シンデカン陽性形質細胞の数は、著しく異なっているわけではなく、このことから、FGF2は、脾臓の形質細胞の運命の採択に影響を及ぼさないことが示唆される (図3、パネルD~F)。これらの結果は、脾胚中心形成が、FGF2遺伝子投与量に依存することを実証するものである。

## 【0041】

[00051] 図3 FGF2欠失は、胚中心に影響を及ぼすが、シンデカン発現には影響を及ぼさない。FGF2+/+、+/-、-/-マウスを、TNP-LPS 50  $\mu$ gで腹腔内免疫した (A~C)。免疫化後2週目に、胚中心の発現のために脾臓をピーナッツ凝集素で染色した (D~F)。シンデカン-1の発現は、モノクローナル抗体である抗CD138 (BD) によって測定した。

## 【0042】

## 【表3】

マウス	トランスジェニック	野生型
1	3.5	6
2	2	6
3	0	2
4	0.5	0
5	2	2
6	3	4
7	0	1
8	2	2
9	4	8.5
10	2	—
平均	1.9	3.5
<i>s. e. m.</i>	0.4	0.9
<i>n</i>	10	9

## 【0043】

[00052] 表3 胚中心形成は、FGF2の異所性発現によって影響を受けない。FGF2トランスジェニックマウスおよび同腹仔対照を、TNP-LPS 50  $\mu$ gで腹腔内免疫した。免疫化後14日目に、胚中心の発現のために脾臓をピーナッツ凝集素で染色した。

## 【0044】

[00053] 胚中心がFGF2の過剰発現によって影響を受けるかどうかを決定するために、FGF2トランスジェニック動物において同一の実験を行った。FGF2が過剰に発現すると、胚中心がより少なくなる傾向があるが、その差異は統計的に有意ではないことを

見出した(表3)。これらのデータは、FGF2の過剰発現は、1型非依存性抗原での免疫化後2週目の胚中心形成を調節するのに十分ではないことを示している。

【0045】

[00054]図4 FGF2の異所性発現は、胚中心形成を抑制しない。FGF2トランスジェニックおよび同腹仔対照を、TNP-LPS50μgで腹腔内免疫した(A、B)。免疫化後2週目に、胚中心の発現のために脾臓をピーナッツ凝集素で染色した。

【0046】

[00055]FGF2は、リガンドのFGFファミリーの中でより広範に発現するメンバーの1つであり、複数の組織において強い発現が見られる。FGF2が脾臓で発現されるかどうかを決定するために、FGF2レベルをELISA(R&D Systems)によって評価した。FGF2は302±17pg/ml(平均±s.d., n=4)で見出されることを発見し、これは、他のFGF2応答組織に見出されるものに匹敵するレベルであることを実証している。加えて、機能的な研究により、FGF1およびFGF2が、肝細胞増殖を刺激できる形態で脾臓に存在することが実証されている(Suzukiら、1992、Biochem. Biophys. Res. Commun. 186:1192)。

10

【0047】

[00056]FGFがB細胞の活性化を直接制御することができるかどうかを決定するために、外因性FGFの追加がin vitroでB細胞増殖に影響を及ぼすかどうかを探求した。B細胞を脾臓から精製し、刺激抗体を使用して、CD40およびBCRシグナル伝達を同時に活性化した。これらの系を誘導することにより、強力な成長シグナルおよび生存シグナルを伝達し、急速な増殖をもたらす。FGFシグナル伝達がこの応答に影響を及ぼし得るかどうかを検討するために、細胞をFGF1の存在下でインキュベートした。FGF2の代わりにFGF1を使用したのは、それが最も広範なFGF受容体(8)を刺激するためである。これらの条件下で、B細胞数はFGF刺激によって阻害され(表3)、このことは、FGF1が抗原に刺激されたB細胞を直接阻害できることを示唆している。

20

【0048】

【表4】

実験	減少%
1	27
2	25
3	10
4	15
5	16
6	25
X	19.7±2.8

30

【0049】

[00057]表4 FGFシグナル伝達は、脾臓のB細胞増殖を阻害する。成体野生型マウス由来の脾臓を解剖し、B細胞の非常に濃縮された集団を精製した。細胞を、血清含有培地中、CD40活性化モノクローナル抗体(1C10)および抗マウスIgM Fab'2断片(Jackson)の存在下で3日間培養した。値は、100ng/mlのFGF1を加えて観察し、ヘパリン(10μg/ml)単独と比較した、全細胞数の減少%(3連で測定した)を表している。X=平均±s.e.m., 1サンプルのt検定、p<0.01。

40

考察

50

[00058]機能獲得型および機能喪失型のマウスモデルを使用して、FGF2が液性免疫応答を制御することを示した。これらの観察結果は、この多面発現性シグナル伝達因子の大ファミリーのうちの任意のメンバーが、液性免疫応答に影響を及ぼすという第1の指摘を構成する。

【0050】

[00059]その広範な発現および多様な細胞型に及ぼすその強力な影響に基づいて、FGF2は、複数の生物学的プロセスを制御すると仮定される。しかしながら、この遺伝子を欠損しているマウスを用いた研究は、この考えに対して異議を唱えており、他のFGFファミリーメンバーを関与させたり、またはFGFシグナル伝達は必須ではないことを示唆したりしている(Ortegaら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5672; Zhouら、1998、Nature Medicine 4:201; Donoら、1998、EMBO J. 17:4213)。これらの限定された表現型を考慮すると、シングルコピーのFGF2を欠損しているマウスが免疫機能に異常を示すことは予期されなかった。このように、他の系とは対照的に、リンパ系組織がFGF2遺伝子投与量に特に感受性であるように思われる。FGFファミリーメンバーは広範に発現されるため、これらの結果は、さらなる検討によって、リンパ球機能に及ぼすFGF依存性の影響についての追加の証拠が明らかになる可能性を高めるものである。

【0051】

[00060]2つ以上の受容体ファミリーメンバーへのFGFリガンドの結合能を考えると、FGF2欠失に対して、22種の他のFGFのうちの一つによる補償が観察されなかったのは驚くべきことである。これに関し、FGF1は、FGF2に構造的に類似しており、脾臓でも発現されるため、有望な候補者である(Suzukiら、1992、Biochem. Biophys. Res. Commun. 186:1192)。一方、FGF-1/2ダブルノックアウトマウスを用いた研究は、FGF2ヌルマウスにおける、軽度の創傷治癒および神経系の表現型が、FGF2の代わりとなるFGF1の結果ではないことを示唆している(Millerら、2000、Mol. Cell. Biol. 20:2260)。1型非依存性抗原であるリポ多糖は、グラム陰性細菌の細胞壁に存在する主要な病原物質である。この分子における繰り返しエピトープが、B細胞の表面上にある、BCR、TLR2、およびTLR4を含めた受容体の大規模な関与をもたらす(Yangら、1998、Nature 395:284; Takeuchiら、1999、Immunity 11:443)。B細胞の進化が、そのような頻繁な脅威に対する、迅速および活発な既存の防御を発展させてきており、その結果として、この刺激に応答した抗体分泌は強力である。FGF2非存在下でのより大きい応答は、FGF2が1次液性免疫応答を負に調節することを実証するものである。増強された応答の規模は、FC受容体であるFCRIIBで見られる増強より大きく、その欠失は、免疫化後3週目におけるLPSに対する応答に全く影響を及ぼさない(Takaiら、1996、Nature 379:346)。これは、遺伝子の欠失により、LPSに応答した抗体産生が増強した第1の例を表すと考えられる。

【0052】

[00061]FGF2を過剰に発現する動物は、LPSに対する液性免疫応答が抑制されており、このことは、機能獲得型の表現型が、機能喪失型の表現型の正反対であることを実証するものである。FGF2は、抗体産生を調節するのに必要かつ十分であると結論付けられる。

【0053】

[00062]理論によって限定されるものではないが、液性免疫応答のどのステップがFGF2シグナル伝達によって阻害されるのか、現在明らかではない。形質細胞の生成における差異が他のリンパ系組織で起こる可能性を除外することはできないが、脾臓におけるシンデカン陽性細胞数に実質的な差異を有することなく阻害が起こる(図3、パネルD~F)。故に、FGF2は、骨髄における抗体分泌細胞の形質芽球の遊走、完全な最終分化、または代謝機能などの、シンデカン-1発現の後のステップを調節するのかもしれない。

この後者の考えと一致して、FGF2は、骨髄における複数の細胞型によって強く発現される(Brunnerら、1993、Blood 81:631;Chouら、2003、Leuk.Res.27:499)。

#### 【0054】

[0063] FGF2は、B細胞へ直接的にシグナル伝達することによって、または形質細胞の活性を調節する細胞に間接的に影響を及ぼすことによって、抗体産生を制御し得る。直接的なモデルは、初代成熟Bリンパ球のFGFシグナル伝達に应答した増殖減少を示す、本発明者らのデータと一致する(表3)。細胞数の減少は穏やかであるが、CD40およびBCRの同時関与によって作動する強い成長シグナルおよび生存シグナルを克服できる物質はほとんどないことを念頭に置くべきである。直接的な作用機序と一致して、以前の研究は、FGF受容体が正常ヒト末梢血B細胞上に存在することを報告している(Genotら、1989、Cell Immunol.122:424)。しかしながら、観察された影響を他の細胞型が介在できる可能性を現在除外することはできない。

10

#### 【0055】

[0064] 抗体産生と胚中心数との間に負の相関が見出された。一見したところ、この観察結果が矛盾しているように思われるのは、胚中心の低減が抗体産生を減少させることを研究者は予期し得たためである。しかしながら、多数の例は、胚中心数を液性应答から切り離せることを実証している。TNF受容体ヌル動物は、胚中心を欠損しているが、水疱性口内炎ウイルスに应答して、実質的な抗体力価を生ずる(Karrerら、2000、J.Immunol.164:768)。同様に、TNF-ヌル動物は、脾臓の形態に劇的な変化を示すが、LPSに対する抗体産生は影響されない(Pasparakisら、1996、J.Exp.Med.184:1397)。

20

#### 【0056】

[0065] このように、本明細書に記載の研究は、FGF2が、液性免疫应答において、2つの明確かつ相補的な役割を果たすことを実証するものである。FGF2は、胚中心形成を促進し、それによって、病原刺激に対して防御する活性化B細胞の生成に貢献する。一方、FGF2は、形質細胞の活性を低下させ、その際に、抗体産生に制限を与える。FGF2は、B細胞应答のあいだ種々の時間に、相反する力を発揮するため、免疫系におけるその活性は、確かに複雑である。そのような複雑さが他の組織における観察結果と一致するのは、FGFシグナル伝達が、その時間的および空間的な作用地点に応じて、根本的に異なった影響を刺激できる場合である。

30

#### 【0057】

##### 【0066】哺乳動物におけるFGF2活性の阻害に関する実施態様

[0067] 複数の病状において、ワクチン接種による保護は不十分であり、低いセロコンバージョン率が観察される(Cohen D.ら、Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome.、BMJ.2010、May 14;340:c2541)。液性免疫应答を増加させるために本発明を使用し得るワクチンの非限定的な例としては、マリアワクチン(M.Esenら、Vaccine 2009、Nov 16;27(49):6862-8.Safety and immunogenicity of GMZ2-a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate); HIVワクチン(Hoxie J.A.、Annu.Rev.Med.2010;61:135-52.Toward an antibody-based HIV-1 vaccine.); インフルエンザワクチン(Nguyen MLら、Infect.Immun.2009、Nov;77(11):4714-23.The major neutralizing antibody responses to recombinant anthrax lethal and edema factors are directed to non-cross-reactive epitopes); 老齢患者におけるインフルエンザワクチン(Frasca D.、Diaz A.、Romero M.ら、Vaccine 2010、Oct 22.

40

50

Intrinsic defects in B cell response to seasonal influenza vaccination in elderly humans.); および炭疽菌ワクチン (Nguyen MLら、Infect. Immun. 2009、Nov; 77(11): 4714-23. The major neutralizing antibody responses to recombinant anthrax lethal and edema factors are directed to non-cross-reactive epitopes.) が挙げられる。

【0058】

[0068]本発明は、例えば、免疫不全症に罹患しているヒト患者などの患者における抗体産生および/または液性免疫を増加させるために使用することができ、そのような免疫不全症には、分類不能型免疫不全症 (Rezaei Nら、Clin. Vaccine Immunol. 2008、Apr; 15(4): 607-11、Serum bactericidal antibody responses to meningococcal polysaccharide vaccination as a basis for clinical classification of common variable immunodeficiency.); 原発性免疫不全障害 (PID)、Ig欠損症、IgG欠損症; およびHIV疾患 (後天性免疫不全症候群) が含まれるが、それらに限定されるものではない。

【0059】

[0069]本発明の1つの実施態様は、哺乳動物において、免疫原、例えば抗原または生ワクチンのワクチン接種に対する液性免疫応答を増加させる方法であって、FGF2以外の免疫原に対する哺乳動物のワクチン接種と併せて、哺乳動物において、FGF2の活性を阻害し、それによって抗原に対する液性免疫応答を増加させることを含む方法を提供する。1つの改変例では、免疫原は、線維芽細胞増殖因子以外および線維芽細胞増殖因子受容体以外である。哺乳動物は、老齢のヒトなどのヒトであり得る。ヒトであり得る哺乳動物は、限定されるものではないが、分類不能型免疫不全症; 原発性免疫不全障害 (PID)、IgG欠損症などの免疫グロブリン欠損症およびHIV疾患などの免疫不全症を有し得る。

【0060】

[0070]本発明の他の実施態様は、ヒトなどの哺乳動物において免疫不全症を治療する方法であって、哺乳動物においてFGF2の活性を阻害することによって、哺乳動物において内因性抗体の産生を増加させることを含む方法を提供する。1つの改変例では、哺乳動物はがんを有さない。免疫不全症は、例えば、限定されるものではないが、分類不能型免疫不全症; 原発性免疫不全障害 (PID)、IgG欠損症などの免疫グロブリン欠損症およびHIV疾患であり得る。非ヒト哺乳動物も、免疫不全症に罹患しており、本発明に従って治療することができる。例えば、本発明の方法は、飼いネコなどのネコにおけるネコ免疫不全ウイルス (FIV) に関連する免疫不全症を治療するために使用され得る。

【0061】

[0071]本発明のさらなる実施態様は、ヒトなどの哺乳動物において微生物感染を治療する方法であって、微生物感染の治療を必要とする哺乳動物に、FGF2アンタゴニストを投与することを含み、FGF2アンタゴニストは、哺乳動物において抗体産生を増加させるのに有効な量で投与される方法を提供する。その方法は、微生物感染に対して活性である抗生物質または抗ウイルス剤を、哺乳動物に投与するステップをさらに含み得る。抗生物質または抗ウイルス剤は、哺乳動物において、抗生物質または抗ウイルス剤の効果とFGF2アンタゴニストの効果とが、時間的に重なり合うように投与される。微生物感染は、例えば、細菌感染、ウイルス感染、または寄生性真核生物感染であり得る。その方法は、FGF2アンタゴニストを投与する前に、哺乳動物が微生物感染を有することを決定するステップをさらに含み得る。

【0062】

10

20

30

40

50

[00072]本発明の他の実施態様は、がんを有しないヒトなどの哺乳動物において、*in vivo*抗体産生を増加させる方法であって、哺乳動物においてFGF2の活性を阻害することを含む方法を提供する。1つの改変例では、哺乳動物は、老齢のヒト、または老齢の飼育イヌまたはネコなどの非ヒト哺乳動物である。

【0063】

[00073]関連のある実施態様は、非ヒト哺乳動物において、一般に所望の免疫原に対する抗血清またはポリクローナル抗体の産生を増強する方法であって：本明細書に記載の方法およびやり方のいずれかに従って、非ヒト哺乳動物においてFGF2の活性を阻害するステップ；ならびに非ヒト哺乳動物を、線維芽細胞増殖因子でも線維芽細胞増殖因子受容体でもない免疫原で免疫するステップを含み、それによって、哺乳動物において免疫原に対する抗体の産生を、FGF2活性を阻害しない比較し得る免疫化に対して、増強、増加、および/または加速させることを含む方法を提供する。その方法は、ポリクローナル血清を非ヒト哺乳動物から回収するステップ、および任意で単離するステップをさらに含む得る。免疫化ステップは、例えば、免疫原による2回以上の時間的に離れた免疫化を含むことができ、そして、例えば免疫化アジュバントの含めることによって補助することができる。抗血清およびポリクローナル抗体の産生方法は、当該技術分野において周知であり、長年にわたって確立されている。例えば米国特許第5,440,021号を参照されたい。

10

【0064】

[00074]哺乳動物におけるFGF2活性の阻害に応答した抗体産生の増加は、本発明の全体的な特徴であり、本発明は、FGF2活性を阻害するために哺乳動物に投与されるFGF2阻害剤の種類に限定されない。FGF2活性の阻害剤の好ましい種類には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体ならびにそれらの結合断片が含まれ、それらは、FGF2に結合して、FGF結合受容体とモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体との相互作用を遮断するもの、FGFR1、FGFR2、およびFGFR3などのFGF受容体に結合して、リガンド(FGF2)の受容体への結合を遮断するものである。例えば、FGF2を中和する単鎖モノクローナルscFv抗体を使用することができ、そのような抗体は、Taoら、*Selection and characterization of a human neutralizing antibody to human fibroblast growth factor-2*、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010、Apr 9;394(3):767-73. Epub 2010、Mar 17に記載のもの、またはその中に記載の方法によって得られるものなどである。Sunら、*Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292:964-976、2007に記載のもの、またはこの論文の方法に従って得られるものなどの、FGFR1を遮断する抗体を使用することができる。Gorbenkら、*Hybridoma*、Volume 28、Number 4、2009も、抗FGFR1抗体の産生およびそれらの製造について記載している。FGFR3に対するモノクローナル抗体およびそれらの製造は、Qingら、*J. Clin. Invest.* 119:1216-1229(2009)、およびGorbenkら、*Hybridoma*、Volume 28、Number 4、2009、295-300に

20

30

40

【0065】

[00075]抗体は、抗原と特異的に結合する1以上の抗原結合部位を含有する。抗体には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、およびヒト化抗体が含まれるが、それらに限定されるものではない。免疫学的に活性な部分には、Fv、単鎖Fv(scFv)、単鎖可変ドメイン(sVD)、Fab断片、Fab'断片、およびF(ab')<sub>2</sub>断片などの1価および2価の断片が含まれる。免疫学的に活性な部分は、2重特異性抗体、3重特異性抗体などから多価に組み込むことができる。抗体には、ファージ上に提示される抗原結合断片、および抗体コンジュゲートをさらに含まれる。

【0066】

50

[00076]「単離された抗体」は、(1)成分の混合物から、部分的に、実質的に、または完全に精製された；(2)その自然環境の成分から同定、分離、および/または回収された；(3)モノクローナルである；(4)同一種由来の他のタンパク質を含まない；(5)異なる種由来の細胞によって発現される；あるいは(6)天然に存在しない抗体である。単離された抗体は、例えば、本発明に従って、FGF2活性の阻害剤として使用され得る。単離された抗体の例には、FGF2を使用して親和性精製された抗FGF2抗体、ハイブリドーマまたは他の細胞株によって *in vitro* で作製された抗FGF2抗体、ファージライブラリーなどのライブラリーから単離されたヒト抗FGF2抗体、およびトランスジェニックマウスに由来するヒト抗FGF2抗体が含まれる。

#### 【0067】

[00077]一般に、天然に存在する抗体分子は、2本の同一の重鎖および2本の軽鎖で構成される。それぞれの軽鎖は通常、鎖間ジスルフィド結合によって重鎖に共有結合しており、2本の重鎖は、ヒンジ領域で、複数のジスルフィド結合によって、互いにさらに結合している。個々の鎖は、類似のサイズ(約110~125個のアミノ酸)および構造を有するが機能が異なるドメインにフォールディングする。軽鎖は、1つの可変ドメイン( $V_L$ )および1つの定常ドメイン( $C_L$ )を含む。重鎖は、1つの可変ドメイン( $V_H$ )および、抗体のクラスまたはアイソタイプに応じて、3つまたは4つの定常ドメイン( $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ 、および $C_{H4}$ )を含む。マウスおよびヒトでは、アイソタイプは、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMであり、IgAおよびIgGは、サブクラスまたはサブタイプにさらに細分される。 $V_L$ および $V_H$ ドメインから成る抗体の部分は、「Fv」と称され、抗原結合部位を構成する。単鎖Fv(scFv)は、1つのポリペプチド鎖に $V_L$ ドメインおよび $V_H$ ドメインを含有する、遺伝子工学的に作製されたタンパク質であり、一方のドメインのN末端と他方のドメインのC末端が、柔軟性のあるリンカーによって連結されている。「Fab」は、 $V_L$ - $C_L$ (すなわち軽鎖)および $V_H$ - $C_{H1}$ (「Fd」とも称される)から成る抗体の部分を表す。

#### 【0068】

[00078]抗体は、限定されるものではないが、単一可変ドメイン(sVD)とsVDを含む抗原結合タンパク質とを含む。sVD結合部位は、抗原特異的Fv領域( $V_H$ ドメインおよび $V_L$ ドメインを含む)から得ることができる。多くの場合、Fv領域の結合親和性および結合特異性は、主として、可変ドメインの1つによって寄与されることを示すことができる。あるいは、scFvは、直接得ることができる。sVDの直接源には、 $V_H$ ドメインのみを含有する抗体を自然に発現する哺乳動物(例えばラクダ科)が含まれる。さらに、ファージディスプレイライブラリーを構築し、単一可変ドメインのみを発現させることができる。例えば、ヒトドメイン抗体ファージディスプレイライブラリーは、Domantis(英国、ケンブリッジ)から市販されている。

#### 【0069】

[00079]抗体可変ドメインは、特に抗原結合部位の位置において、1つの抗体から次の抗体までかなりのアミノ酸配列多様性を示す。「相補性決定領域」(CDR)と呼ばれる3つの領域は、 $V_L$ および $V_H$ のそれぞれに見出される。抗体のCDRは、「超可変領域」といわれることが多い。

#### 【0070】

[00080]「Fc」は、一对の重鎖定常ドメインを含む抗体の部分の名称である。IgG<sub>1</sub>抗体では、例えば、Fcは、 $C_{H2}$ および $C_{H3}$ ドメインを含む。IgA抗体またはIgM抗体のFcは、 $C_{H4}$ ドメインをさらに含む。Fcは、Fc受容体結合、補体介在性細胞障害作用および抗体依存性細胞障害作用の活性化と関連する。複数のIgG様タンパク質の複合体であるIgAおよびIgMなどの自然抗体に関して、複合体形成は、Fc定常ドメインを必要とする。

#### 【0071】

[00081]最後に、「ヒンジ」領域は、抗体のFab部分とFc部分とを分離し、Fabの、互いに対する可動性およびFcに対する可動性を提供し、その上2本の重鎖の共有結

10

20

30

40

50

合のための複数のジスルフィド結合を含む。このように、本発明の抗体には、抗原と特異的に結合する、天然に存在する抗体、(Fab')<sub>2</sub>などの2価の断片、Fabなどの1価の断片、単鎖抗体、単鎖Fv(scFv)、単一ドメイン抗体、多価単鎖抗体、2重特異性抗体、3重特異性抗体などが含まれるが、それらに限定されるものではない。

#### 【0072】

[00082]抗体断片には、本発明の抗体の可変領域または超可変領域のアミノ酸配列に実質的に類似したアミノ酸配列を有するポリペプチドも含まれる。実質的に同一のアミノ酸配列は、本明細書において、PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448(1988)に従って、FASTA検索方法によって決定される場合、比較対象のアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%の相同性または同一性を有する配列と定義される。

10

#### 【0073】

[00083]本発明に従って阻害剤として用いられ得る抗体には、「キメラ」抗体およびその結合断片が含まれる。そのような抗体は、一般に、ある1つの抗体の可変ドメインと、異なる抗体の定常ドメインとを含む。典型的には、抗体に対する宿主の免疫応答を最小限にするために、そして抗体エフェクター機能を保持することによって、抗体標的に対する宿主の応答を増強するために、キメラ抗体の定常ドメインは、そのキメラ抗体が投与される同一種から取得される。

#### 【0074】

[00084]本発明に従って阻害剤として用いられ得る抗体には、「ヒト化」抗体も含まれる。ヒト化可変ドメインの構築は、非ヒト起源の1つ以上の相補性決定領域(CDR)を含むアミノ酸配列が、ヒトフレームワーク領域(FR)に移植されて行われる。例えば、Jones, P. T.ら、1996、Nature 321、522-25; Riechman, L.ら、1988、Nature 332、323-27; およびQueenらの米国特許第5,530,101号を参照されたい。ヒト化構築物は、例えば、非ヒト源に由来する抗原結合ドメインを、ヒトの治療に使用することが望まれる場合に、有害な免疫原性を排除するのに特に価値がある。可変ドメインは、高度の構造的相同性を有しており、CDRおよびFRに相当する可変ドメイン内のアミノ酸残基の容易な同定を可能にする。例えば、Kabata, E. A.ら、1991、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、全米バイオテクノロジー情報センター、国立衛生研究所、メリーランド州ベセスダを参照されたい。このように、抗原結合に直接関わりそうなアミノ酸が容易に同定される。加えて、移植されたCDRを含むヒト化結合ドメインの、抗原に対する親和性を保存または増強するための方法が開発されている。1つのやり方は、レシピエントの可変ドメインに、CDR領域の立体構造に影響を及ぼす外来フレームワーク残基を含めることである。2つ目のやり方は、外来可変領域に対する相同性が最も近いヒト可変ドメインに、外来CDRを移植することである。Queen, C.ら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86、10029-33。CDRは、所望のCDR配列を含む重複プライマーを使用して、個々のFR配列を最初に増幅し、得られた遺伝子断片をその後の増幅反応において加えることによって、異なるFR上に最も容易に移植される。異なる可変ドメインへのCDRの移植は、アミノ酸配列中のCDRに隣接しているアミノ酸残基の置換、またはCDRの立体構造に影響を及ぼすフォールディングされた可変ドメイン構造内のCDRに接触してパッキングされているアミノ酸残基の置換をさらに包含することができる。したがって、本発明のヒト化可変ドメインには、1つ以上の非ヒトCDRを含むヒトドメイン、および結合特性を保存または増強するために追加の置換が行われたようなドメインが含まれる。

20

30

40

#### 【0075】

[00085]表面に露出した残基を置換することによって、免疫原性をより低下させ、抗体が免疫系に対して自己として見えるようにした可変ドメインを有する抗体も、阻害剤とし

50

て使用され得る (Padlan, E. A., 1991, Mol. Immunol. 28, 489-98)。抗体は、このプロセスによって、親和性を消失することなく変更されている (Roguskaら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 969-973)。抗原結合部位の近傍のアミノ酸残基の内部パッキングは変化しないままであるため、親和性は保存される。免疫原性を低下させるために本発明に従って表面に露出した残基の置換は、CDR残基または結合特性に影響を及ぼす隣接残基の置換を意味するものではない。

#### 【0076】

[00086]抗体のレシピエントがヒトである場合は、本質的にヒトである可変ドメインを用いることが好ましい場合が多い。ヒト抗体は、ヒトV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>フレームワーク領域 (FW)ならびにヒト相補性決定領域 (CDR)を含む。好ましくは、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>可変ドメインの全体がヒトであるかまたはヒト配列に由来する。抗体は、ヒト細胞から、例えばヒトハイブリドーマを作り出すことによって、直接得ることができる。

10

#### 【0077】

[00087]あるいは、ヒト抗体は、再配列されていないヒトIg遺伝子断片が導入され、内因性マウスIg遺伝子が不活性化されたトランスジェニック動物から得ることができる (BriggemannおよびTauszig、1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8, 455-58に概説されている)。好ましいトランスジェニック動物は、サイズが1Mbを超える非常に大きな連続したIg遺伝子断片を含有する (Mendezら、1997, Nature Genet. 15, 146-56)が、中程度の親和性のヒトMabは、より小さな遺伝子座を含有するトランスジェニック動物から得ることができる (例えば、Wagnerら、1994, Eur. J. Immunol. 42, 2672-81; Greenら、1994, Nature Genet. 7, 13-21を参照されたい)。

20

#### 【0078】

[00088]ヒト抗体は、抗体V<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>ドメインのライブラリーからも得ることができる。例えば、可変ドメインライブラリーは、ヒトゲノム配列からまたは生産的に再配列された可変領域遺伝子を発現させる末梢血リンパ球から得ることができる。さらに、ヒト遺伝子ライブラリーは、合成することができる。1つの実施態様では、ランダムな配列または部分的にランダムな配列を含むように合成される1つ以上のCDRとともにヒトフレームワーク領域を含む、可変ドメインライブラリーを作り出すことができる。例えば、ヒトV<sub>H</sub>遺伝子断片およびCDR3H領域の合成配列 (すなわち、合成D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>遺伝子断片)によってメンバーがコードされる、ヒトV<sub>H</sub>可変ドメインライブラリーを作り出すことができる。同様に、ヒトV<sub>L</sub>可変ドメインは、ヒトV<sub>L</sub>遺伝子断片およびCDR3L領域の合成配列 (すなわち、合成J<sub>L</sub>遺伝子断片)によってコードされ得る。他の実施態様では、ヒトフレームワークは、それらが公知のヒト抗体配列またはヒト配列のサブグループから誘導されたコンセンサス配列を有するという点で、合成的であり得る。他の代替形態では、1つ以上のCDRは、再配列された可変ドメインを発現させるヒトリンパ球から増幅し、次いで特定のヒトフレームワーク内に組換えを行うことによって得られる。

30

40

#### 【0079】

[00089]可変ドメインのライブラリーをスクリーニングするためには、ヒト重鎖および軽鎖可変ドメインの組合せが、糸状ファージの表面上にディスプレイされるファージディスプレイライブラリーを用いるのが一般的である (例えば、McCaffertyら、1990, Nature 348, 552-54; Aujameら、1997, Human Antibodies 8, 155-68を参照されたい)。可変ドメインの組合せは、典型的には、FabまたはscFvの形で、糸状ファージ上にディスプレイされる。所望の抗原結合特性を有する可変ドメインの組合せを保有するファージについて、ライブラリーがスクリーニングされる。好ましい単ドメインと可変ドメインとの組合せは、選択された抗原に対する高親和性および他の関連抗原に対する低交差反応性を示す。抗体断片

50

の非常に大きなレパートリーをスクリーニングすることによって（例えば、Griffithsら、1994、EMBO J. 13、3245-60を参照されたい）、多様性に富んだ高親和性の結合ドメインが単離され、その多くが、所望の抗原に対してナノモル以下の親和性を有することが期待される。

#### 【0080】

[00090]生理学的免疫応答では、発現抗体遺伝子の突然変異および選択が、それらの標的抗原に対して高親和性を有する抗体の産生につながる。本発明の抗体に組み込まれるV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを、同様に*in vitro*または*in vivo*突然変異およびスクリーニング手法に供して、親和性および/または特異性を変更することができる。それ故に、本発明の結合ドメインは、直接突然変異、親和性成熟法または鎖シャッフリングによって、CDRおよび/またはFW領域を変異させることによって、結合特性が改善されたものを含む。単一ドメイン抗体の結合の1次決定基であるアミノ酸残基は、カバットによって定義されたCDRの範囲内であり得るが、他の残基も同様に含み得ることは理解される。sVDについて、抗原結合にとって重要な残基は、他にV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>ヘテロ二量体の界面に位置するアミノ酸も含む可能性がある。典型的には、ファージディスプレイを使用して、そのような突然変異体（mutant）をスクリーニングし、所望の結合特性を有するものを同定する（例えば、Yangら、J. Mol. Biol.、254:392-403（1995）を参照されたい）。突然変異は、種々のやり方で行うことができる。1つのやり方は、個々の残基または残基の組合せをランダム化して、他の同一配列の集団において、20アミノ酸のすべてまたはそのサブセットが特定の位置に見出されるようにすることである。あるいは、エラープローンPCR法（例えばHawkinsら、J. Mol. Biol.、226:889-896（1992）を参照されたい）によって、一連のCDR残基にわたって突然変異を誘導してもよい。例えば、重鎖および軽鎖の可変領域遺伝子を含むファージディスプレイベクターを、大腸菌の突然変異誘発株の中で増殖させてもよい（例えば、Lowら、J. Mol. Biol.、250:359-368（1996）を参照されたい）。これらの突然変異誘発の方法は、当業者に知られている多くの方法の一例である。

10

20

#### 【0081】

[00091]本発明に従って使用され得る阻害剤は、非免疫グロブリン骨格から遺伝子工学的に作製された抗原結合タンパク質も含む。例えば、アフィボディは、黄色ブドウ球菌プロテインAの免疫グロブリン結合ドメインから誘導されるものであり、ジスルフィド結合を全く所有せず、可逆的なフォールディングを示す。別の例はフィブロネクチンであり、これは抗体様構造を有し、CDR様ループを示す。抗体とは対照的に、フィブロネクチンドメイン構造は、ジスルフィド結合に依存しないが、高い熱力学的安定性を示す。結合部位は、例えば、コドンを特定の位置で多様化することおよび所望の抗原への結合についてスクリーニングすることによって、そのような骨格に遺伝子工学的に作製することができる。コドンは、ループ、平面、空洞またはそのような位置の組合せにおいて、ランダム化することができる。さらに、ペプチド配列を、通常はループに挿入することができる。得られたライブラリーの標的結合変異体（variant）は、当該技術分野において周知のスクリーニング技術の選択を使用して単離することができ、そのような技術には、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、細菌または酵母表面ディスプレイなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。治療を意図した抗原結合タンパク質について、潜在的な免疫原性を最小限にするために、種々の戦略が利用できる。ヒト骨格を用いることができ、例えば、ペグ化またはT細胞エピトープ工学技術（すなわち、T細胞反応性配列の最小化）によって、免疫原性を最小限にすることができる。

30

40

#### 【0082】

[00092]非免疫グロブリン骨格由来の抗原結合タンパク質は、多くの場合、免疫グロブリン型タンパク質に比べてより経済的に製造することができる。例えば、ジスルフィド結合または遊離システインが存在しないことにより細菌細胞質の還元環境における機能性分子の発現が可能になり、それによって、通常は細胞周辺の発現に比べてより高収率が得ら

50

れ、*in vitro*リフォールディングに比べてより好都合である。Binz, H. K. ら (Nat. Biotech. 23: 1257-68, 2005) は、種々のそのような抗原特異的結合タンパク質およびそれらの開発のための技術を開示する。

【0083】

[00093] FGF2 または他の FGF のそれらの受容体への結合を阻害する抗体または他の分子の同定または選択は、試験薬剤の存在下および非存在下で結合を比較する、通常のリガンド-受容体結合アッセイに従って行われ得る。これは、FGF2 およびその受容体の完全な配列が、ヒトなどの種々の哺乳動物において知られているためである。リガンド-受容体結合アッセイについては、例えば米国特許第 5,440,021 号を参照されたい。

10

【0084】

[00094] FGF2 活性の阻害剤の別の好ましいタイプは、FGFR1、FGFR2、および FGFR3 の可溶性の形などの、可溶性の FGF2 結合受容体または FGF 結合受容体の可溶性部分である。可溶性の受容体配列は、例えば、それが投与される種に適合させることができ、すなわち、ヒト受容体配列は、ヒトレシピエントなどに使用され得る。例えば、FP-1039 は、ヒト免疫グロブリン G1 (IgG1) の Fc 領域に結合されたヒト FGFR1 の細胞外ドメインからなる可溶性融合タンパク質であり、本発明に従って、FGF2 阻害剤/アンタゴニストとして使用され得る (Five Prime Therapeutics, Inc., カリフォルニア州サンフランシスコ; Keer ら, ASCO 2010, 抄録番号 TPS260)。

20

【0085】

[00095] FGF2 活性はまた、本発明に従って、対象哺乳動物に、FGF2 自体に対するあるいは FGFR1、FGFR2、および/または FGFR3 に対するワクチン接種を行うことによって阻害され得る。例えば、FGF2 のヘパリン結合部分を標的とするペプチドワクチンを使用して、Plum ら、Generation of a specific immunological response to FGF2 does not affect wound healing or reproduction, Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2004, Feb; 26(1): 29-41 の方法に従って、哺乳動物に、特異的抗 FGF2 抗体応答を生成することができる。

30

【0086】

[00096] 抗体または可溶性受容体などの可溶性ポリペプチドを使用して FGF2 活性を阻害する実施態様について、例えば、ヒトへの静脈内投与のための組成物は、0.1~20 mg、例えば 0.1~10 mg などのポリペプチドを含み得、これは日用量であり得る。より一般的には、対象 1 人当たり 0.1 mg/日から約 100 mg/日までの投与量が、1 日または複数日間使用され得る。投与可能な組成物を調製する方法は、当業者に周知であり、レミントンの薬学、第 19 版、MacK 出版社、ペンシルバニア州イーストン (1995) のような出版物に、より詳細に記載されている。対象への投与のためのポリペプチドは、例えば、凍結乾燥された形で提供され、投与前に滅菌水で再水和され得る。次いで、ポリペプチド溶液は、米国薬局方 0.9% 塩化ナトリウムを含有する輸液バッグに加え、例えば 0.5 から 15 mg/kg 体重までの投与量で投与され得る。あるいは、例えば、ポリペプチドは、ボラス注射として、例えば、0.5~30 mg/kg 体重の投与量で投与することができる。

40

【0087】

[00097] FGF2 活性阻害剤のさらに他の適したタイプは、例えば、FGF2 または FGFR1、FGFR2 および FGFR3 のうちの 1 つもしくは複数を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。その上さらなる適した阻害剤は、小分子阻害剤であり、例えば、米国特許第 6,071,885 号に記載の強心配糖体またはアグリコン誘導体および米国特許第 5,891,655 号に記載の FGF 活性を調節するオリゴ糖が挙げられる。Sarker ら、Clin. Cancer Res., 2008; 14(7) 207

50

5 - 81に記載のTKI258は(CHIR-258としても知られている)、別の適した小分子FGF受容体阻害剤である。Bhideら、Mol. Cancer Ther. ; 9(2) February 2010、369-78に記載のFGFR1キナーゼ阻害剤であるブリバニブ(Brivaniab)は、さらに別の適した小分子阻害剤である。

【0088】

[00098]哺乳動物におけるFGF2活性の増加に関する実施態様

[00099]本発明は、哺乳動物においてFGF2の活性を増加させることにより、例えば、哺乳動物において抗体産生を低下させるのに有効な量で、FGF2を哺乳動物に投与すること、あるいはFGF2のアゴニストまたはFGFR1、FGFR2、もしくはFGFR3などのFGF2受容体のアゴニストを哺乳動物に投与することにより、ヒトなどの哺乳動物において、*in vivo*抗体産生を意図的に低下させる実施態様も提供する。FGF2を哺乳動物レシピエントに投与する場合、ペプチド配列は、例えば、それが投与される種に、少なくとも実質的にまたは完全に同一に適合させることができ、すなわち、ヒト受容体配列は、ヒトレシピエントなどに使用することができる。

10

【0089】

[00100]本発明のこの態様は、実際の適用が、急性毒性状態における抗体産生の抑制であることが分かる。多くの場合、侵入している病原体に対する応答は、病的な自己免疫作用を引き起こし、リンパ球活性が急上昇して制御不能になる可能性がある。このような状況において、FGF2の投与は、制御不良の抗体分泌を軽減させる。

【0090】

20

[00101]同様に、ヒトの複数の病理は、自己免疫抗体の分泌に起因する。FGF2およびFGFリガンドの投与は、これらの抗体産生を軽減させ、ひいては自己免疫疾患を改善するのに役立つ。例えば、自己免疫抗体は、全身性エリテマトーデス(Cohen D.ら、Diagnosis and management of the antiphospholipid syndrome、BMJ. 2010、May 14; 340: c2541)、ならびに関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、および若年性特発性関節炎を含めた多様な関節炎疾患(Calero I.ら、B cell therapies for rheumatoid arthritis: beyond B cell depletion、Rheum. Dis. Clin. North Am. 2010、May; 36(2): 325-43)において観察される。加えて、哺乳動物におけるFGF2活性の増加を使用して、ヒト臓器移植患者などの臓器移植患者において、低下した抗体産生レベルを低下または維持し、患者に移植された臓器に対する負の免疫応答を減少させ、それに対する寛容性を増加させることができる。

30

【0091】

[00102]したがって、本発明の1つの実施態様は、病的な抗体産生などの抗体産生を低下させることを必要とするヒトなどの哺乳動物において、病的な抗体産生などの抗体産生を低下させる方法であって、抗体産生を低下させるのに有効な量で、FGF2もしくはFGF2アゴニスト、またはFGF2と結合するFGFR1、FGFR2、およびFGFR3などの受容体のアゴニストを哺乳動物に投与することにより低下させる方法を提供する。1つの改変例では、哺乳動物は、全身性エリテマトーデス、ならびに関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、および若年性特発性関節炎を含めた多様な関節炎疾患の治療を受けているかまたはその必要があってもよく、その方法は、これらの哺乳動物において、自己免疫抗体の産生を低下させ、それによって状態を治療するものである。他の改変例では、哺乳動物は、ヒト臓器移植患者などの臓器移植患者であり、その方法は、移植された臓器に対する抗体応答を低下させるものである。

40

【0092】

[00103]線維芽細胞増殖因子およびそれらの受容体の配列は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物において、よく特徴付けられている。例えば、以下の配列が公知であり、本開示の一部を形成する：ヒトFGF2(NCBI参照配列NM\_002006.4;配列番号1ペプチド、配列番号2ヌクレオチド)、ヒトFGFR1(GenBank寄託番号M3418

50

5 . 1 ; 配列番号3ペプチド、配列番号4ヌクレオチド)、ヒトFGFR2 (NCBI参照配列NM\_\_000141.4 ; 配列番号5ペプチド、配列番号6ヌクレオチド)、ヒトFGFR3 (NCBI参照配列NM\_\_000142.4 ; 配列番号7ペプチド、配列番号8ヌクレオチド)、ヒトFGFR4 (GenBank寄託番号AF202063.1 ; 配列番号9ペプチド、配列番号10ヌクレオチド)、ウシFGF2 (NCBI参照配列NM\_\_174056.3 ; 配列番号11ペプチド、配列番号12ヌクレオチド)、ウシFGFR1 (GenBank寄託番号NM\_\_001110207.1 ; 配列番号13ペプチド、配列番号14ヌクレオチド)、ウシFGFR2 (NCBI参照配列XM\_\_002698546.1 ; 配列番号15ペプチド、配列番号16ヌクレオチド) ; ウシFGFR3 (NCBI参照配列NM\_\_174318.3 ; 配列番号17ペプチド、配列番号18ヌクレオチド)、ウシFGFR4 (NCBI参照配列XM\_\_002689008.1 ; 配列番号19ペプチド、配列番号20ヌクレオチド)、イノシシFGF2 (NCBI参照配列XM\_\_003129213.1 ; 配列番号21ペプチド、配列番号22ヌクレオチド)、イノシシFGFR1 (NCBI参照配列XM\_\_001928678.2 ; 配列番号23ペプチド、配列番号24ヌクレオチド)、イノシシFGFR2 (NCBI参照配列NM\_\_001099924.1 ; 配列番号25ペプチド、配列番号26ヌクレオチド)、イノシシFGFR3 (GenBank寄託番号BV726808.1 ; 配列番号27 cdsヌクレオチド)、イノシシFGFR4 (NCBI参照配列XM\_\_003123682.1 ; 配列番号28ペプチド、配列番号29ヌクレオチド)、アカゲザルFGF2 (NCBI参照配列XM\_\_001099284.2 ; 配列番号30ペプチド、配列番号31ヌクレオチド)、カニクイザルFGFR1 (GenBank寄託番号AB220417.1 ; 配列番号32ペプチド、配列番号33ヌクレオチド)、アカゲザルFGFR2部分 (GenBank寄託番号AY083548.1 ; 配列番号34ペプチド、配列番号35ヌクレオチド)、アカゲザルFGFR3 (NCBI参照配列XM\_\_002802167.1 ; 配列番号36ペプチド、配列番号37ヌクレオチド)、アカゲザルFGFR4 (NCBI参照配列XM\_\_001087243.2 ; 配列番号38ペプチド、配列番号39ヌクレオチド)、ハツカネズミFGF2 (NCBI参照配列NM\_\_008006.2 ; 配列番号40ペプチド、配列番号41ヌクレオチド)、ハツカネズミFGFR1 (NCBI参照配列NM\_\_010206.2 ; 配列番号42ペプチド、配列番号43ヌクレオチド)、ハツカネズミFGFR2 (NCBI参照配列NM\_\_010207.2 ; 配列番号44ペプチド、配列番号45ヌクレオチド)、ハツカネズミFGFR3 (NCBI参照配列NM\_\_008010.4 ; 配列番号46ペプチド、配列番号47ヌクレオチド)、およびハツカネズミFGFR4 (NCBI参照配列NM\_\_008011.2 ; 配列番号48ペプチド、配列番号49ヌクレオチド)。

【0093】

[000104] 限定されるものではないが、本発明は、以下に列挙された化合物またはその薬理的に許容される塩を投与することにより、ヒトなどの哺乳動物において内因性抗体の産生を増加させる方法も提供する。

【0094】

[000105] 1 . B I B F 1 1 2 0 (バルガテフ (V a r g a t e f)) ベーリンガー・インゲルハイム

化学名：メチル(3Z)-3-[({4-[N-メチル-2-(4-メチルピペラジン-1-イル)アセトアミド]フェニル}アミノ)(フェニル)メチリデン]-2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-インドール-6-カルボキシレート

【0095】

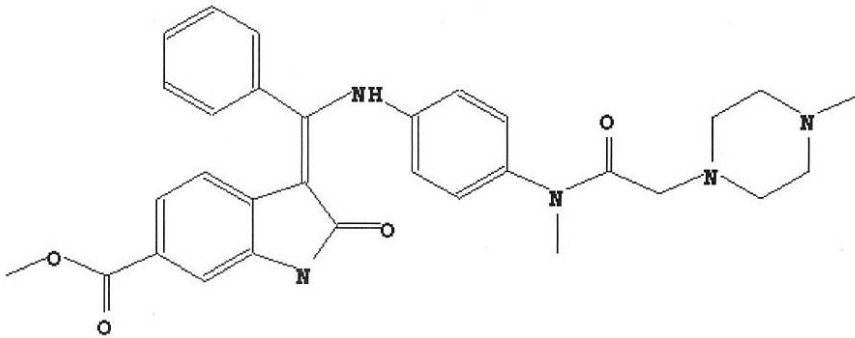
10

20

30

40

## 【化1】



10

## 【0096】

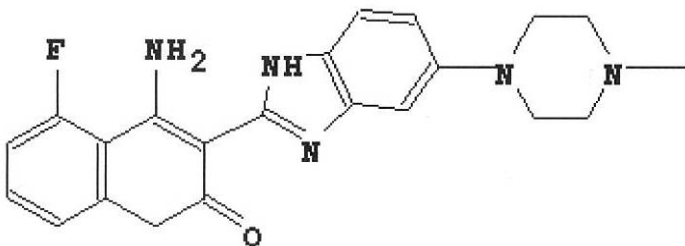
F. Hilberg *et al.*, *Cancer Res.* 2008, Jun 15; 68 (12) : 4774 - 82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6307. B1B1 1120: triple angiokinese inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy.

[000106] 2. TKI258 (ドビチニブ (Dovitinib)) ノバルティス  
 化学名: 4-アミノ-5-フルオロ-3-[5-(4-メチルピペラジン-1-イル)-1H-ベンゾ[d]イミダゾール-2-イル]-3,4-ジヒドロナフタレン-2(1H)-オン

20

## 【0097】

## 【化2】



## 【0098】

Trudel S. *et al.*, *Blood.* 2005, Apr 1; 105 (7) : 2941 - 8. Epub 2004, Dec 14. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma.

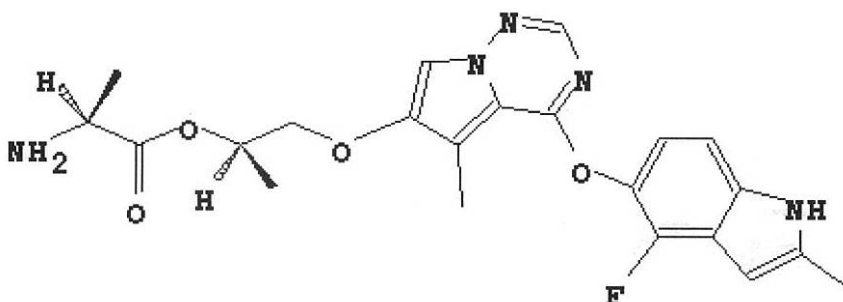
30

[000107] 3. BMS582664 (プリバニブ) プリストル・マイヤーズ スクイブ  
 化学名: (1R)-2-[[4-[(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イル)オキシ]-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イル]オキシ]-1-メチルエチル(2S)-2-アミノプロパノエート

40

## 【0099】

## 【化3】



50

## 【0100】

Bhide RS5、J. Med. Chem. 2006、Apr 6; 49(7): 2143-6. Discovery and preclinical studies of (R)-1-(4-(4-fluoro-2-methyl-1H-indol-5-yloxy)-5-methylpyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-yloxy)propan-2-ol (BMS-540215), an in vivo active potent VEGFR-2 inhibitor.

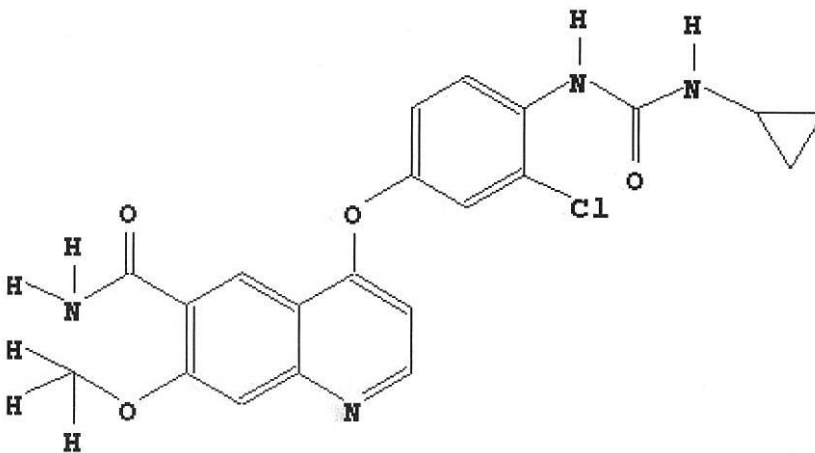
[000108] 4. E7080 エーザイ

化学名：4-[3-クロロ-4-(3-シクロプロピルウレイド)フェノキシ]-7-メトキシキノリン-6-カルボキサミド

10

## 【0101】

【化4】



20

## 【0102】

Boss DS5、Br. J. Cancer. 2012、May 8; 106(10): 1598-604. doi:10.1038/bjc.2012.154. Epub 2012. Apr 19. A phase I study of E7080, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumours.

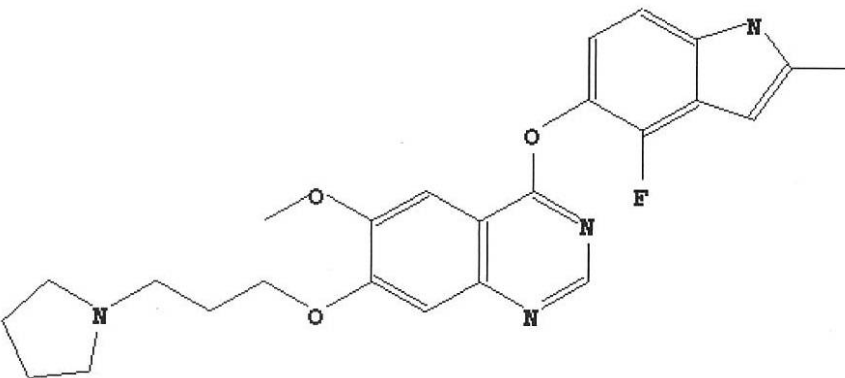
30

[000109] 5. AZ2171 (セディラニブ (Cediranib)) アストラゼネカ

化学名：4-[(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イル)オキシ]-6-メトキシ-7-(3-ピロリジン-1-イルプロポキシ)キノリン

## 【0103】

【化5】



40

## 【0104】

Wedge SR5、Cancer Res. 2005、May 15; 65(10): 4389-400. AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth

50

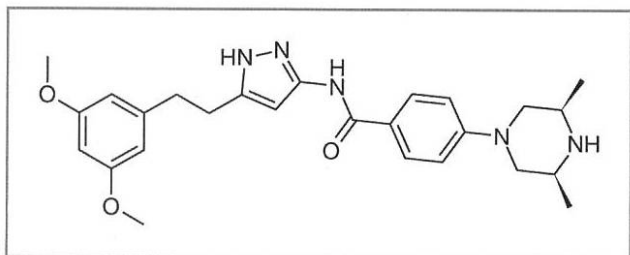
factor receptor - 2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer .

[000110] 6 . AZD4547 アストラゼネカ

化学名 : N - [ 5 - [ 2 - ( 3 , 5 - ジメトキシフェニル ) エチル ] - 2 H - ピラゾール - 3 - イル ] - 4 - ( 3 , 5 - ジメチルピペラジン - 1 - イル ) ベンズアミド

【 0 1 0 5 】

【 化 6 】



10

【 0 1 0 6 】

Gavine PR、Cancer Res . 2012、Apr 15 ; 72 ( 8 ) : 2045 - 56 . doi : 10 . 1158 / 0008 - 5472 . CAN - 11 - 3034 . Epub 2012、Feb 27 . AZD4547 : an orally bioavailable , potent , and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family .

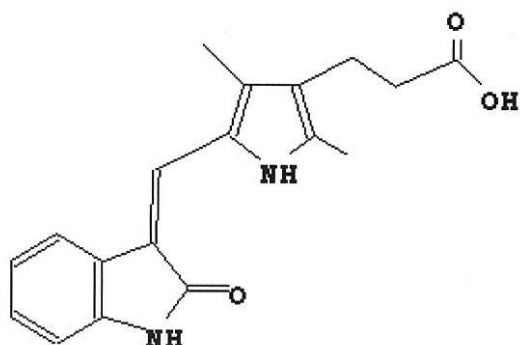
20

[000111] 7 . TSU68 ( SU6668 ) 大鵬薬品

化学名 : ( E ) - 3 - [ 2 , 4 - ジメチル - 5 - [ ( 2 - オキシインドリン - 3 - イリデン ) メチル ] - 1 H - ピロール - 3 - イル ] プロパン酸

【 0 1 0 7 】

【 化 7 】



30

SU 6668

40

【 0 1 0 8 】

Yorozuya K. 5、Oncol . Rep . 2005、Sep ; 14 ( 3 ) : 677 - 82 . TSU - 68 ( SU6668 ) inhibits local tumor growth and liver metastasis of human colon cancer xenografts via anti - angiogenesis .

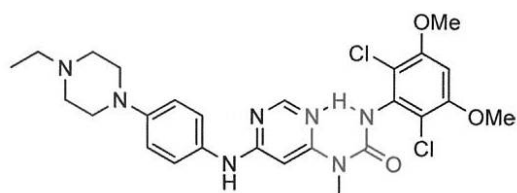
[000112] 8 . BGJ398 ノバルティス

化学名 : 3 - ( 2 , 6 - ジクロロ - 3 , 5 - ジメトキシ - フェニル ) - 1 - { 6 - [ 4 - ( 4 - エチル - ピペラジン - 1 - イル ) - フェニルアミノ ] - ピリミジン - 4 - イル } - 1 - メチル - 尿素

50

【0109】

【化8】



1h (NVP-BGJ398)

10

【0110】

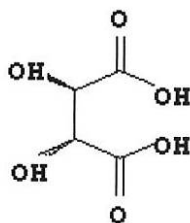
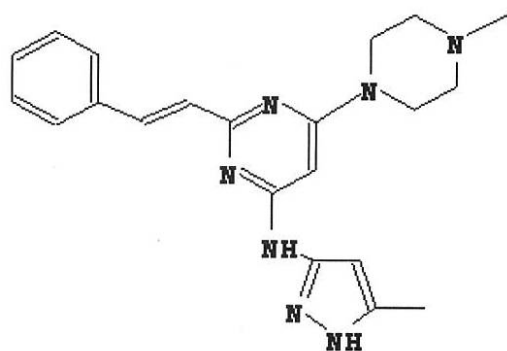
[000113] Guagnano V. 5、J. Med. Chem. 2011、Oct 27 ; 54 (20) : 7066 - 83 . doi : 10 . 1021 / jm2006222 . Epub 2011、Sep 21 . Discovery of 3 - (2 , 6 - dichloro - 3 , 5 - dimethoxy - phenyl) - 1 - {6 - [4 - (4 - ethyl - piperazin - 1 - yl) - phenylamino] - pyrimidin - 4 - yl} - 1 - methyl - urea (NVP - BGJ398) , a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase .

20

[000114] 9 . ENMD2076 Miikana Therapeutics  
 化学名 : 6 - (4 - メチルピペラジン - 1 - イル) - N - (5 - メチル - 1H - ピラゾール - 3 - イル) - 2 - [(E) - 2 - フェニルビニル]ピリミジン - 4 - アミン L - タルトレート

【0111】

【化9】



30

【0112】

Matulonis UA. 5、Eur. J. Cancer. 2013、Jan ; 49 (1) : 121 - 31 . doi : 10 . 1016 / j . ejca . 2012 . 07 . 020 . Epub 2012、Aug 21 . ENMD - 2076、an oral inhibitor of angiogenic and proliferation kinases , has activity in recurrent , platinum resistant ovarian cancer .

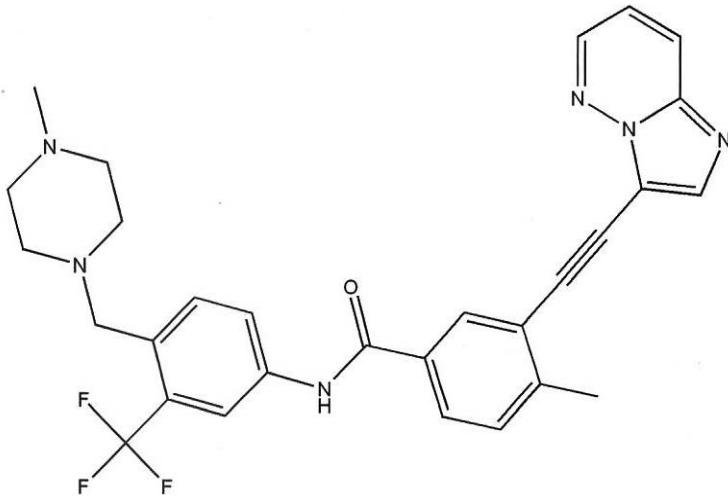
40

[000115] 10 . AP24534 (ポナチニブ (Ponatinib)) Ariad Pharmaceuticals

化学名 : ベンズアミド , 3 - (2 - イミダゾ [1 , 2 - b] ピリダジン - 3 - イルエチニル) - 4 - メチル - N - [4 - [(4 - メチル - 1 - ピペラジンイル)メチル] - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル]

【0113】

## 【化10】



10

## 【0114】

Chase A. 5, *Haematologica*. 2013, Jan; 98(1): 103-6. doi: 10.3324/haematol.2012.066407. Epub 2012, Aug 8. Ponatinib as targeted therapy for FGFR1 fusions associated with the 8p11 myeloproliferative syndrome.

20

[000116] 11. AXL1717 Axelar

化学名: フロ(3', 4': 6, 7)ナフト(2, 3-d)-1, 3-ジオキソール-6(5aH)-オン, 5, 8, 8a, 9-テトラヒドロ-9-ヒドロキシ-5-(3, 4, 5-トリメトキシフェニル)-, (5R-(5-, 5a-, 8a-, 9-))-  
Ekman S., *Acta Oncol*. 2011, Apr; 50(3): 441-7. doi: 10.3109/0284186X.2010.499370. Epub 2010, Aug 11. Clinical Phase I study with an Insulin-like Growth Factor-1 receptor inhibitor: experiences in patients with squamous non-small cell lung carcinoma.

30

[000117] 12. FP1039 (融合タンパク質) Five Prime, Human Genome Sciences, グラクソ・スミスクライン。FP1039は、ヒト IgG1のFc部分に結合したヒト線維芽細胞増殖因子受容体1c (FGFR1)の細胞外ドメインを含む。この分子は、FGFR1リガンドを捕捉し、FGF受容体への結合を妨げるように設計されている。Hardingら、Preclinical efficacy of FP-1039 (FGFR1:Fc) in endometrial carcinoma models with activating mutations in FGFR2. 第101回 米国がん学会総会: 抄録2597, 17 Apr 2010

40

[000118] 13. MFGR 1877S FGFR3 Mab ジェネンテック。Qin J. 5, *J. Clin. Invest*. 2009, May; 119(5): 1216-29. doi: 10.1172/JCI38017. Epub 2009, Apr 20. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice.

[000119] 14. Aveo GP369 FGFR2 mAb. Bai A *Cancer Res*. 2010, Oct 1; 70(19): 7630-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1489. Epub 2010, Aug 13. GP369, an FGFR2-IIIb-specific antibody

50

, exhibits potent antitumor activity against human cancers driven by activated FGFR2 signaling.

[000120] 15. FGFR1 mAbおよびFGFR3 mAb、Imclone Systems。Sun HD 氏、Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2007、Mar; 292(3): E964-76. Epub 2006、Nov 28. Monoclonal antibody antagonists of hypothalamic FGFR1 cause potent but reversible hypophagia and weight loss in rodents and monkeys; Deevi DS., Dierenzo R., Li H., Malabunga M., Prewett MC., Inhibiting FGFR3 for enhancing the cytotoxic effects of cisplatin on bladder cancer cells and possible mechanisms., 2007、AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics.: 176-177 (+ポスター)抄録B48、22 Oct 2007.

10

[000121] 16. FGF2 mAbおよびFGFR2 mAb、Galaxy Biotech。Wang L. 氏、Mol. Cancer Ther. 2012、Apr; 11(4): 864-72. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0813. Epub 2012、Feb 16. A novel monoclonal antibody to fibroblast growth factor 2 effectively inhibits growth of hepatocellular carcinoma xenografts; Zhao WM., Clin. Cancer Res. 2010、Dec 1; 16(23): 5750-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0531. Epub 2010、Jul 29. Monoclonal antibodies to fibroblast growth factor receptor 2 effectively inhibit growth of gastric tumor xenografts.

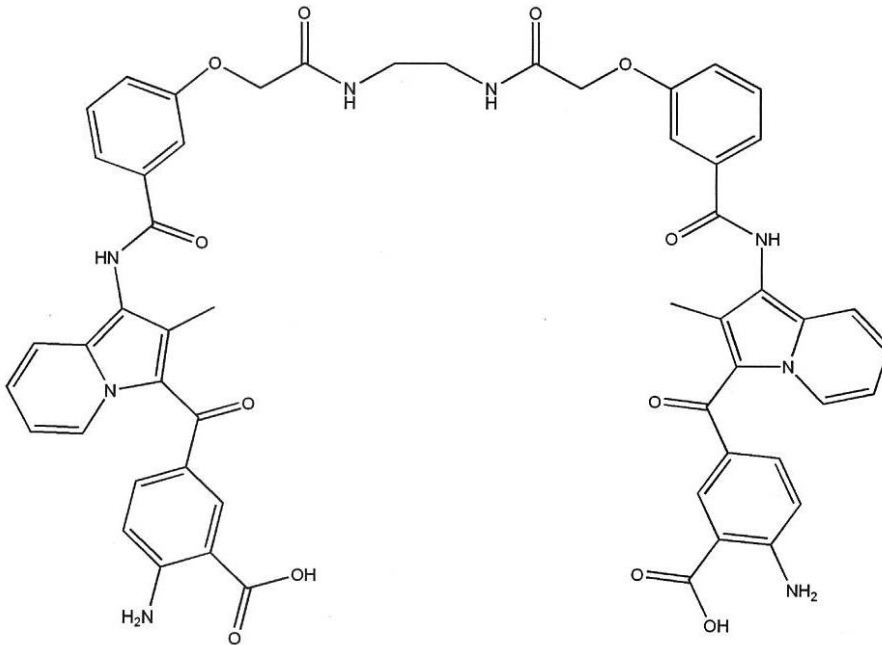
20

30

[000122] 17. SAR106881、サノフィ・アベンティス リサーチプログラム  
FGFRアゴニスト

【0115】

## 【化 1 1】



この構造について、名を付けることができなかった。

## 【0116】

Guillo, Making agonists from antagonists : SAR106881, a breakthrough in FGFRs activation and a potential treatment to improve peripheral revascularization and reduce neuropathic pain. 第240回 米国化学会全国学会 : (+口頭発表) 抄録 MED I 23, 22 Aug 2010.

[000123] 18. JNJ42756493 FGFRアンタゴニスト Astex Therapeutics / Janssen Research. Squiresら、Development of inhibitors of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) kinase using a fragment based approach. 第101回 米国がん学会総会 : 抄録 3626, 17 Apr 2010.

[000124] 化合物またはその薬理的に許容される塩は、例えば、内因性抗体の産生増加を必要とし、がんの治療を必要としないヒトなどの哺乳動物に、治療有効量で投与することができる。哺乳動物は、液性免疫不全または本明細書に記載の免疫不全症などの免疫不全症を有していてもよい。哺乳動物は、例えば老齢であり得る。化合物またはその薬学的に許容される塩は、例えば、ワクチン接種への液性免疫応答を改善するために、免疫原 (FGF2またはFGF以外) のワクチン接種と併せて、内因性抗体の産生を増加させるのに有効な量で投与することができる。化合物またはその薬学的に許容される塩は、例えば、微生物感染またはウイルス感染の治療を必要とするヒトなどの哺乳動物に、例えば、単独でまたは抗生物質もしくは抗ウイルス剤の投与に加えて (またはそれと併せて)、内因性抗体の産生を増加させるのに有効な量で投与することができる。いずれの方法においても、哺乳動物は、がんの治療を必要としないものであり得る。本発明は、本開示に記載の治療方法のそれぞれについて、対応する第1のおよび第2の医学的用途も提供する。したがって、本発明は、記載した病態を治療するための薬剤の使用を提供し、記載した病態を治療するための医薬の製造のための薬剤の使用も提供する。

## 【0117】

[000125] 本発明が使用され得る非ヒト哺乳動物には、例えば、ウシ科などの畜産動物、例えば雌ウシおよびヒツジ、ブタ、ウマなどのウマ科、伴侶動物としての飼いイヌなどの

イヌ科、伴侶動物としての飼いネコなどのネコ科、霊長類、ウサギなどのウサギ目の動物、ならびにラットおよびマウスなどの齧歯目の動物が含まれる。本発明は、家禽などの鳥、例えば、ニワトリ、シチメンチョウおよびウズラ、アヒルおよびガチョウにも適用できる。したがって、本発明は、哺乳動物について本明細書に記載しているが上述の鳥類などの鳥類に適用されるような、対応する実施態様および改変例を提供する。セキショクヤケイ F G F 2 ( N C B I 参照配列 N M \_ 2 0 5 4 3 3 . 1 ; 配列番号 5 0 ペプチド、配列番号 5 1 ヌクレオチド)、セキショクヤケイ F G F R 1 ( N C B I 参照配列 N M \_ 2 0 5 5 1 0 . 1 ; 配列番号 5 2 ペプチド、配列番号 5 3 ヌクレオチド)、セキショクヤケイ F G F R 2 ( N C B I 参照配列 N M \_ 2 0 5 3 1 9 . 1 ; 配列番号 5 4 ペプチド、配列番号 5 5 ヌクレオチド)、およびセキショクヤケイ F G F R 3 ( N C B I 参照配列 N M \_ 2 0 5 5 0 9 . 2 ; 配列番号 5 6 ペプチド、配列番号 5 7 ヌクレオチド)の配列も本開示の一部を形成する。

10

**【 0 1 1 8 】**

[000126]上記の例は、F G F 2 およびその受容体に関連するものであるが、本発明は、一般に線維芽細胞増殖因子および/または F G F 受容体に関して、ならびに限定されるものではないが F G F 1 および F G F 3 などの他の特定の線維芽細胞増殖因子に関して、本明細書に記載のそれぞれの実施態様および改変例に対応する実施態様も提供する。

**【 0 1 1 9 】**

[000127]本開示に引用された特許および他の出版物のそれぞれは、その全体が援用される。

20

**【 0 1 2 0 】**

[000128]前述の説明は、本発明の好ましい実施態様に関するものであるが、他の改変例および変更例は、当業者に明らかであり、本発明の精神または範囲から逸脱することなく実施し得ることが留意される。その上、本発明の1つの実施態様に関連して記載された特徴は、たとえ上記に明示されていなくとも、他の実施態様と併せて使用され得る。

**【 0 1 2 1 】**

[0001]本出願は、A S C I I フォーマットで E F S - W e b によって提出された配列表を含む。この配列表は、その全体が本明細書に援用される。2013年5月6日に作成された前記 A S C I I の写しは、ファイル名が A B 0 0 1 W S q . t x t であり、サイズが 2 7 5 , 3 3 0 バイトである。

30

【 図 1 】

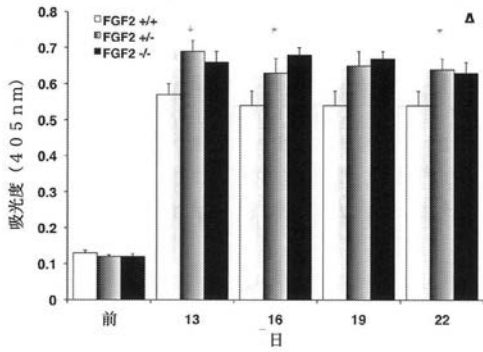


FIG. 1A

【 図 2 】

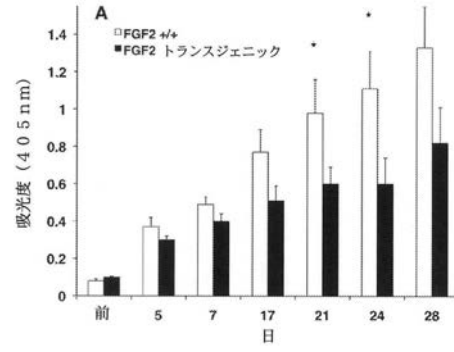


FIG. 2A

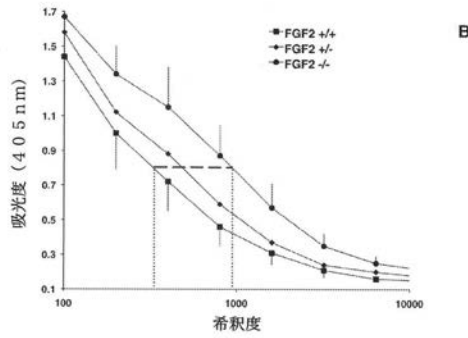


FIG. 1B

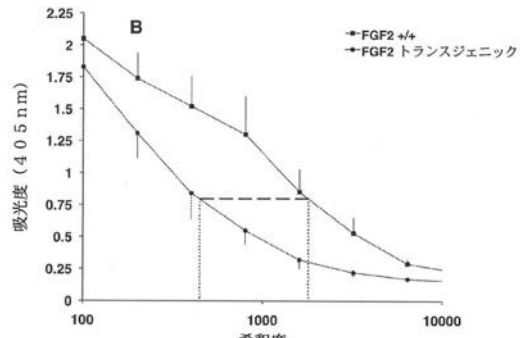


FIG. 2B

【 図 3 】

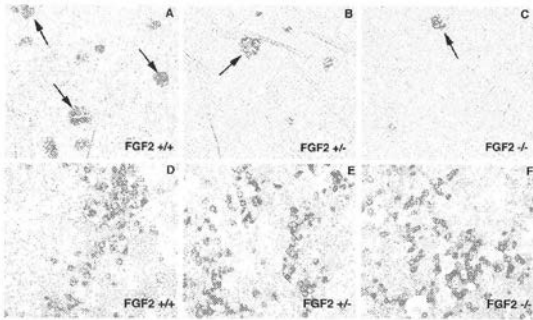


FIG. 3

【 図 4 】

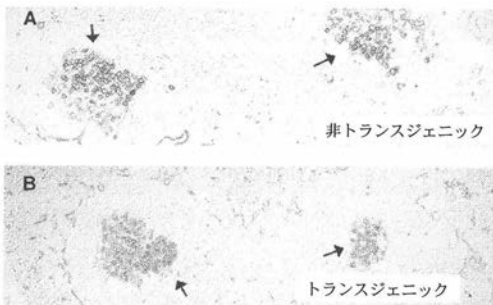


FIG. 4

## 【配列表】

2016520060000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成28年5月6日(2016.5.6)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物において内因性抗体の産生を増加させるための医薬組成物であって、FGF2に結合してその活性を阻害する抗体またはその断片を含む、前記医薬組成物。

【請求項2】

哺乳動物ががんを有していない、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

哺乳動物がヒトである、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項4】

ヒトがHIV疾患を有している、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】

ヒトが老齢のヒトである、請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項6】

哺乳動物において、FGF2以外の免疫原のワクチン接種に対する液性免疫応答を増加させるための医薬組成物であって、FGF2に結合してその活性を阻害する抗体またはその断片を含む、前記医薬組成物。

【請求項7】

哺乳動物がヒトである、請求項6に記載の医薬組成物。

【請求項8】

ヒトが老齢のヒトである、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

哺乳動物における液性免疫不全症を治療するための医薬組成物であって、FGF2に結合してその活性を阻害する抗体またはその断片を含む、前記医薬組成物。

【請求項10】

哺乳動物において微生物感染またはウイルス感染を治療するための医薬組成物であって、FGF2に結合してその活性を阻害する抗体またはその断片を含む、前記医薬組成物。

【請求項11】

哺乳動物において内因性抗体の産生を増加させるための医薬組成物であって：バルガテフ；ドピチニブ；プリバニブ；セディラニブ；ポナチニブ；SAR106881；4-[3-クロロ-4-(3-シクロプロピルウレイド)フェノキシ]-7-メトキシキノリン-6-カルボキシアミド；N-[5-[2-(3,5-ジメトキシフェニル)エチル]-2H-ピラゾール-3-イル]-4-(3,5-ジメチルピペラジン-1-イル)ベンズアミド；(E)-3-[2,4-ジメチル-5-[(2-オキシインドリン-3-イリデン)メチル]-1H-ピロール-3-イル]プロパン酸；3-(2,6-ジクロロ-3,5-ジメトキシ-フェニル)-1-{6-[4-(4-エチル-ピペラジン-1-イル)-フェニルアミノ]-ピリミジン-4-イル}-1-メチル-尿素；6-(4-メチルピペラジン-1-イル)-N-(5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-2-[(E)-2-フェニルビニル]ピリミジン-4-アミン L-タルトレート；および

フロ(3', 4' : 6, 7)ナフト(2, 3-d) - 1, 3 - ジオキソール - 6 (5 a H) - オン、5, 8, 8 a, 9 - テトラヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 5 - (3, 4, 5 - トリメトキシフェニル) -、(5 R - (5 - , 5 a - , 8 a - , 9 - )) -、  
から成る群より選択される F G F 2 活性に対する阻害化合物またはその薬学的に許容される塩を含む、前記医薬組成物。

【請求項 1 2】

哺乳動物において、F G F 2 以外の免疫原のワクチン接種に対する液性免疫応答を増加させるための医薬組成物であって：バルガテフ；ドビチニブ；プリバニブ；セディラニブ；ポナチニブ；S A R 1 0 6 8 8 1；

4 - [ 3 - クロロ - 4 - ( 3 - シクロプロピルウレイド ) フェノキシ ] - 7 - メトキシキノリン - 6 - カルボキシアミド；

N - [ 5 - [ 2 - ( 3 , 5 - ジメトキシフェニル ) エチル ] - 2 H - ピラゾール - 3 - イル ] - 4 - ( 3 , 5 - ジメチルピペラジン - 1 - イル ) ベンズアミド；

( E ) - 3 - [ 2 , 4 - ジメチル - 5 - [ ( 2 - オキソインドリン - 3 - イリデン ) メチル ] - 1 H - ピロール - 3 - イル ] プロパン酸；

3 - ( 2 , 6 - ジクロロ - 3 , 5 - ジメトキシ - フェニル ) - 1 - { 6 - [ 4 - ( 4 - エチル - ピペラジン - 1 - イル ) - フェニルアミノ ] - ピリミジン - 4 - イル } - 1 - メチル - 尿素；

6 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イル ) - N - ( 5 - メチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル ) - 2 - [ ( E ) - 2 - フェニルビニル ] ピリミジン - 4 - アミン L - タルトレート；および

フロ(3', 4' : 6, 7)ナフト(2, 3-d) - 1, 3 - ジオキソール - 6 (5 a H) - オン、5, 8, 8 a, 9 - テトラヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 5 - (3, 4, 5 - トリメトキシフェニル) -、(5 R - (5 - , 5 a - , 8 a - , 9 - )) -、  
から成る群より選択される F G F 2 活性に対する阻害化合物またはその薬学的に許容される塩を含む、前記医薬組成物。

【請求項 1 3】

哺乳動物において 液性免疫不全症を治療するための医薬組成物であって：バルガテフ；ドビチニブ；プリバニブ；セディラニブ；ポナチニブ；S A R 1 0 6 8 8 1；

4 - [ 3 - クロロ - 4 - ( 3 - シクロプロピルウレイド ) フェノキシ ] - 7 - メトキシキノリン - 6 - カルボキシアミド；

N - [ 5 - [ 2 - ( 3 , 5 - ジメトキシフェニル ) エチル ] - 2 H - ピラゾール - 3 - イル ] - 4 - ( 3 , 5 - ジメチルピペラジン - 1 - イル ) ベンズアミド；

( E ) - 3 - [ 2 , 4 - ジメチル - 5 - [ ( 2 - オキソインドリン - 3 - イリデン ) メチル ] - 1 H - ピロール - 3 - イル ] プロパン酸；

3 - ( 2 , 6 - ジクロロ - 3 , 5 - ジメトキシ - フェニル ) - 1 - { 6 - [ 4 - ( 4 - エチル - ピペラジン - 1 - イル ) - フェニルアミノ ] - ピリミジン - 4 - イル } - 1 - メチル - 尿素；

6 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イル ) - N - ( 5 - メチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル ) - 2 - [ ( E ) - 2 - フェニルビニル ] ピリミジン - 4 - アミン L - タルトレート；および

フロ(3', 4' : 6, 7)ナフト(2, 3-d) - 1, 3 - ジオキソール - 6 (5 a H) - オン、5, 8, 8 a, 9 - テトラヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 5 - (3, 4, 5 - トリメトキシフェニル) -、(5 R - (5 - , 5 a - , 8 a - , 9 - )) -、  
から成る群より選択される F G F 2 活性に対する阻害化合物またはその薬学的に許容される塩を含む、前記医薬組成物。

【請求項 1 4】

哺乳動物において 微生物感染またはウイルス感染を治療するための医薬組成物であって：バルガテフ；ドビチニブ；プリバニブ；セディラニブ；ポナチニブ；S A R 1 0 6 8 8 1；

4 - [ 3 - クロロ - 4 - ( 3 - シクロプロピルウレイド ) フェノキシ ] - 7 - メトキシキノリン - 6 - カルボキシアミド ;  
 N - [ 5 - [ 2 - ( 3 , 5 - ジメトキシフェニル ) エチル ] - 2 H - ピラゾール - 3 - イル ] - 4 - ( 3 , 5 - ジメチルピペラジン - 1 - イル ) ベンズアミド ;  
 ( E ) - 3 - [ 2 , 4 - ジメチル - 5 - [ ( 2 - オキシインドリン - 3 - イリデン ) メチル ] - 1 H - ピロール - 3 - イル ] プロパン酸 ;  
 3 - ( 2 , 6 - ジクロロ - 3 , 5 - ジメトキシ - フェニル ) - 1 - { 6 - [ 4 - ( 4 - エチル - ピペラジン - 1 - イル ) - フェニルアミノ ] - ピリミジン - 4 - イル } - 1 - メチル - 尿素 ;  
 6 - ( 4 - メチルピペラジン - 1 - イル ) - N - ( 5 - メチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル ) - 2 - [ ( E ) - 2 - フェニルビニル ] ピリミジン - 4 - アミン L - タルトレート ; および  
 フロ ( 3 ' , 4 ' : 6 , 7 ) ナフト ( 2 , 3 - d ) - 1 , 3 - ジオキソール - 6 ( 5 a H ) - オン、 5 , 8 , 8 a , 9 - テトラヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 5 - ( 3 , 4 , 5 - トリメトキシフェニル ) - 、 ( 5 R - ( 5 - , 5 a - , 8 a - , 9 - ) ) - 、  
 から成る群より選択される F G F 2 活性に対する阻害化合物 またはその薬学的に許容される塩を含む、前記医薬組成物。

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US 2013/039758		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (see extra sheet) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 31/405, 31/496, 31/506, 31/4709, 31/513, 31/519, 31/5025, 31/403, 31/365, A61P 43/00 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 practicable, search terms used) PAJ, Espacenet, Patentscope, USPTO DB, RUPTO, EAPATIS				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	CHRISTOPHER LIEU et al. Beyond VEGF: Inhibition of the Fibroblast Growth Factor Pathway and Antiangiogenesis. Clin Cancer Res, 2011, 17(19), pp. 6130-6139, especially p. 6135, table 2	1-13		
A	JOSEPH M. GOZGIT et al. Ponatinib (AP24534), a Multitargeted Pan-FGFR Inhibitor with Activity in Multiple FGFR-Amplified or Mutated Cancer Models, Mol Cancer Ther, 2012, 11(3), pp. 690-699	1-13		
A	GRAHAM C. FLETCHER et al. ENMD-2076 Is an Orally Active Kinase Inhibitor with Antiangiogenic and Antiproliferative Mechanisms of Action, Mol Cancer Ther, 2011, 10(1), pp. 126-137	1-13		
A	GUANG LIANG et al. Anticancer molecules targeting fibroblast growth factor receptors, Trends in Pharmacological Sciences, 2012, Vol. 33, No. 10, pp. 531-541, especially p. 540, table 1	1-13		
A	WO 2007/080325 A1 (SANOFI-AVENTIS et al.) 19.07.2007, pp. 1, 24	1-13		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">           "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         </td> <td style="width: 50%;">           "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            "&amp;" document member of the same patent family         </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 27 December 2013 (27.12.2013)		Date of mailing of the international search report 06 February 2014 (06.02.2014)		
Name and mailing address of the ISA/ FIPS Russia, 123995, Moscow, G-59, GSP-5, Berezhkovskaya nab., 30-1 Facsimile No. +7 (499) 243-33-37		Authorized officer T. Perova Telephone No. 8(495)531-65-15		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Classification of subject matter

International application No.

PCT/US 2013/039758

*A61K 31/405 (2006.01)*  
*A61K 31/496 (2006.01)*  
*A61K 31/506 (2006.01)*  
*A61K 31/4709 (2006.01)*  
*A61K 31/513 (2006.01)*  
*A61K 31/519 (2006.01)*  
*A61K 31/5025 (2006.01)*  
*A61K 31/403 (2006.01)*  
*A61K 31/365 (2006.01)*  
*A61P 43/00 (2006.01)*

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K	31/437	(2006.01)	A 6 1 K	31/437
A 6 1 K	31/47	(2006.01)	A 6 1 K	31/47
A 6 1 K	31/506	(2006.01)	A 6 1 K	31/506
A 6 1 K	31/404	(2006.01)	A 6 1 K	31/404
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
C 0 7 K	14/50	(2006.01)	C 0 7 K	14/50
				Z N A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 アンドリュー・ビー・ブッシュ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 4 0 , プリンストン , ターナー・コート 4 1

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC13 BC28 BC46 BC50 CA01 CB05 GA07 GA12

MA01 MA04 NA14 ZB07 ZB09 ZB33 ZB35

4H045 AA10 AA30 CA40 DA01 EA20