

(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2017-521445

(P2017-521445A)

(43) 公表日 平成29年8月3日(2017.8.3)

(51) Int.Cl.

A61K 45/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

F 1

A 61 K 45/00
A 61 P 37/02
A 61 P 43/00
A 61 K 39/395
A 61 K 37/06

テーマコード(参考)

4 C 08 4
4 C 08 51 1 1
D
N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2017-502240 (P2017-502240) | (71) 出願人 | 504200892 ザ・カウンシル・オブ・ザ・クイーンズラ ンド・インスティテュート・オブ・メディ カル・リサーチ オーストラリア国 4006 クイーンズ ランド州 ハーストン ハーストン ロー ^ド 300 |
| (86) (22) 出願日 | 平成27年7月14日 (2015.7.14) | (74) 代理人 | 100105957 弁理士 恩田 誠 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成29年1月31日 (2017.1.31) | (74) 代理人 | 100068755 弁理士 恩田 博宣 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/AU2015/050393 | (74) 代理人 | 100142907 弁理士 本田 淳 |
| (87) 國際公開番号 | W02016/008005 | (74) 代理人 | 100152489 弁理士 中村 美樹 |
| (87) 國際公開日 | 平成28年1月21日 (2016.1.21) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 2014902709 | | |
| (32) 優先日 | 平成26年7月14日 (2014.7.14) | | |
| (33) 優先権主張国 | オーストラリア(AU) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 2014904466 | | |
| (32) 優先日 | 平成26年11月6日 (2014.11.6) | | |
| (33) 優先権主張国 | オーストラリア(AU) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ガレクチン免疫療法

(57) 【要約】

哺乳動物における免疫性を調節する方法が、その哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を調節することによって得られる。免疫の増進または増強は、その哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を活性化または刺激することによって、例えばガレクチン - 9 アゴニストをその哺乳動物に投与することによって行うことができる。このアゴニストは、ガレクチン - 9 に結合する多量体の可溶性 P D - L 2 またはアゴニスト抗体であることができる。免疫の抑制または妨害は、その哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を阻害または遮断することによって、例えばガレクチン - 9 に結合するか、または P D - L 2 の多量体化および / もしくはガレクチン - 9 との結合を妨害もしくは阻害するアンタゴニスト抗体または抗体フラグメントを投与することによって達成することができる。上記方法は、ガレクチン - 9 活性の調節に応答する疾患、障害、または状態を予防または治療するのに適していることができる。ガレクチン - 9 活性を調節することによって免疫を調節するのに役立ち得るガレクチン - 9 アゴニスト、インヒビター、またはアンタゴニストを設計す

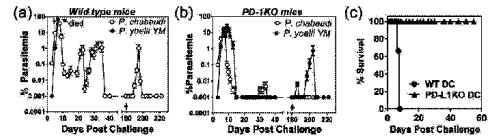


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

哺乳動物における免疫性を調節する方法であって、前記哺乳動物におけるガレクチン-9活性を調節して、それにより前記哺乳動物における免疫性を調節するステップを含む、方法。

【請求項 2】

哺乳動物における免疫性を増進または増強する方法であって、前記哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化または刺激して、それにより前記哺乳動物における免疫性を刺激または増強するステップを含む、方法。

【請求項 3】

前記哺乳動物にガレクチン-9アゴニストを投与して、それにより前記哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化または刺激するステップを含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

T h 1に仲介される免疫応答および免疫記憶の少なくとも一方を刺激し、または開始させ、あるいはその両方を行う、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

(i) 多量体の可溶性P D - L 2または1以上のその多量体で生物学的に活性なフラグメント；および、

(ii) in vivoでP D - L 2の多量体化を誘導するか、または多量体P D - L 2を模倣する作用物質、

の少なくとも一方を、前記哺乳動物に投与するステップを含み、多量体P D - L 2が二量体ではない、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

in vivoでP D - L 2の多量体化を誘導する前記作用物質が抗体である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

多量体P D - L 2を模倣する前記作用物質がアプタマーである、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

ガレクチン-9に結合するアゴニスト抗体または抗体フラグメントを前記哺乳動物に投与するステップを含む、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記哺乳動物の疾患、障害、または状態を治療または予防する、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

哺乳動物における免疫性を抑制または妨害する方法であって、前記哺乳動物におけるガレクチン-9活性を少なくとも部分的に阻害または遮断して、それにより前記哺乳動物における免疫性を抑制または妨害するステップを含む、方法。

【請求項 11】

ガレクチン-9インヒビターまたはアンタゴニストを前記哺乳動物に投与して、それにより前記哺乳動物におけるガレクチン-9活性を阻害または遮断するステップを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記ガレクチン-9インヒビターまたはアンタゴニストが、P D - L 2とガレクチン-9との間の結合相互作用に干渉する、請求項10または11に記載の方法。

【請求項 13】

前記ガレクチン-9インヒビターまたはアンタゴニストがP D - L 2に結合して、それによりガレクチン-9との結合を阻害する、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記ガレクチン - 9 インヒビターまたはアンタゴニストが P D - L 2 に結合して、 P D - L 2 の多量体化を妨害または阻害する、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。
。

【請求項 15】

前記ガレクチン - 9 インヒビターまたはアンタゴニストが、抗 P D - L 2 抗体または抗体フラグメントである、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記ガレクチン - 9 インヒビターまたはアンタゴニストが、可溶性ガレクチン - 9 もしくはその生物学的に活性なフラグメント、および、前記哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を阻害または遮断する P D - L 2 の単量体または二量体形、の少なくとも一方を含む、請求項 10 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 17】

前記ガレクチン - 9 インヒビターまたはアンタゴニストが、ガレクチン - 9 に結合して、それにより前記哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を阻害または遮断する抗体または抗体フラグメントを含む、請求項 10 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記哺乳動物の疾患、障害、または状態を治療または予防する、請求項 11 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

哺乳動物の疾患、障害、または状態を治療または予防する方法であって、前記哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を調節して、それにより前記疾患、障害、または状態を治療または予防するステップを含む、方法。 20

【請求項 20】

前記疾患、障害、または状態が、前記哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を活性化または刺激することにより免疫性を増進または増強させることに応答する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記哺乳動物にガレクチン - 9 アゴニストを投与するステップを含む、請求項 19 または 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記疾患、障害、または状態が癌であるか、または病原体によって引き起こされるか、あるいはその両方である、請求項 9 および 19 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 23】

前記疾患、障害、または状態が、前記哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を阻害または遮断することにより免疫性を抑制または妨害することに応答する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

前記哺乳動物にガレクチン - 9 アンタゴニストまたはインヒビターを投与するステップを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記疾患、障害、または状態が、自己免疫疾患および炎症性疾患の少なくとも一方である、請求項 18 、 19 、 23 、および 24 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 26】

ガレクチン - 9 アゴニスト、インヒビター、またはアンタゴニストを設計する、選別する、操作する、あるいは產生する方法であって、

(i) 候補分子が、ガレクチン - 9 活性を活性化または刺激し、かつそれにより哺乳動物における免疫性を刺激または増強することができるアゴニストであるかどうかを判断するステップ；または

(i i) 候補分子が、ガレクチン - 9 活性を遮断または阻害し、かつそれにより哺乳動物における免疫性を少なくとも部分的に抑制または妨害することができるアンタゴニストま 50

たはインヒビターであるかどうかを判断するステップを含む、方法。

【請求項 27】

ステップ(i)において前記候補分子は、PD-L2によるガレクチン-9の刺激または活性化を模倣する、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

ステップ(ii)において前記候補分子は、PD-L2によるガレクチン-9の刺激または活性化を遮断または阻害する、請求項26または27に記載の方法。

【請求項 29】

ガレクチン-9が、CD4+T細胞、CD8+T細胞、B細胞、またはNK細胞によって発現する、請求項1～28のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 30】

前記哺乳動物がヒトである、請求項1～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

請求項26～30のいずれか一項に記載の方法によって產生されるガレクチン-9アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビター。

【請求項 32】

ガレクチン-9アゴニストと免疫原とを含む組成物。

【請求項 33】

ガレクチン-9アンタゴニストまたはインヒビターを含む組成物。 20

【請求項 34】

前記ガレクチン-9アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターが、請求項31に記載のガレクチン-9アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターである、請求項32または33に記載の組成物。

【請求項 35】

請求項1～25のいずれか一項に記載の方法に従って使用するための、請求項31に記載のガレクチン-9アゴニスト、アンタゴニストもしくはインヒビター、または請求項32～34のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫療法に関する。より詳細には、本発明は、ガレクチン-9を標的にして免疫応答を調節し、およびそれにより1つまたは複数の疾患、障害、または状態を予防または治療することに関する。

【背景技術】

【0002】

PD-1は、T細胞機能を下方制御することが知られている分子の拡張ファミリーのメンバーである。PD-1は、2種類の既知のリガンド、PD-L1(B7-H1)(非特許文献1；非特許文献2)およびPD-L2(B7-DC)(非特許文献3：非特許文献4)を有する。これらは両方ともB7共シグナル伝達分子のファミリーに属する。PD-1の発現は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラーT細胞、樹状細胞(DC:dendritic cell)、および活性化単核細胞上で観察され得る(非特許文献5)。PD-1は、休止T細胞上では発現しないが、活性化すると誘発される(非特許文献6)。PD-1結合反応の機能的な効果は、T細胞の活性化後、数時間以内に観察することができるが、PD-1細胞表面タンパク質の上方制御には24時間を要する(非特許文献7)。PD-1が単独で架橋するときにはシグナル伝達は起きないものの、PD-1がT細胞受容体シグナルと同時に関与する場合、それは阻害シグナルを誘発することができる(非特許文献8)。一般に、T細胞上のPD-1とそのリガンドとの間の相互作用は、末梢T細胞トレランスの誘発および維持を制御するとともに、病原体または癌に対する免疫応答の間の増殖およびT細胞によるサイトカイン産生について負の調節をする(非特許文献8)。 40

P D - L 2 は P D - 1 の別のリガンドである。これは、P D - 1 との結合に関して P D - L 1 と競合すると一般に考えられている。一般に、P D - L 2 の免疫学的機能は、P D - L 1 と重複すると思われ、および P D - L 2 自体に帰属する可能性のある特定の役割または機能は存在しないと思われている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0 0 0 3】

【非特許文献 1】ドング (D o n g) ら、1999年

【非特許文献 2】フリーマン (F r e e m a n) ら、2000年

【非特許文献 3】ラッチマン (L a t c h m a n) ら、2001年

10

【非特許文献 4】ツェング (T s e n g) ら、2001年

【非特許文献 5】カイル (K e i r) ら、2008年

【非特許文献 6】アガタ (A g a t a) ら、1996年

【非特許文献 7】チェムニッツ (C h e m n i t z) ら、2004年

【非特許文献 8】シャーペ (S h a r p e) ら、2007年

【図面の簡単な説明】

【0 0 0 4】

【図 1】P D - 1 および P D - L 1 は、プラスモディウム・シャバウディ (P . c h a b a u d i) およびプラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YMマラリアに対する保護免疫を調節する。(a) WTのコホート (n = 9) および (b) P D - 1 KOマウスを非致死性の 10^5 個のプラスモディウム・シャバウディ (P . c h a b a u d i) または致死性の 10^4 個のプラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YM p RBCに感染させ、血液塗沫標本を1~2日ごとに採取して寄生虫血症を監視した。次いで40日後、すべての生存しているマウスを140日間休養させ、同じ寄生虫で再攻撃感染させた(×目盛上の矢印)。エラーバー: ± S . E . M。対数目盛は無症状感染を強調する。すべての野生型マウスは、致死性攻撃感染から7日間以内に死亡した(†)。(c) プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YMに感染させたB6WT()マウスおよびP D - L 1 KO()マウス由来の全CD11c⁺DCをナイーブマウスに移植し、次いで致死用量のプラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YMに感染させ、それらマウス(合計n = 9)を1~3日ごとに60日間超にわたって調べた。WT DCを与えたすべてのマウスが9日目までに死亡し、一方、P D - L 1 KO DCを与えたすべてのマウスが生存した。

20

【図 2】P D - L 2 mRNAが、プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YM およびプラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) 17XNLに感染後7日目から得た全脾臓DCにおけるリアルタイムPCRによる3種類のハウスキーピング遺伝子の平均と比較された。データは、2つの独立した実験で調製されたRNAを使用して得られたmRNAレベルの平均および範囲として示される。有意性は反復実験からのプールされたデータに対するノンパラメータt - 検定を使用して解析された。

30

【図 3】非致死性感染におけるP D - L 2 の遮断は感染を悪化させる。対照 IgGによる処理(黒丸)または抗P D - L 2 抗体(白四角)の遮断の後のWTマウスの寄生虫血症の平均パーセント。データはWT(合計n = 10)マウスまたはP D - 1 KO(合計n = 10)マウスにおける2つの独立した実験のうちの1つを表す(*p = 0.0048)。

40

【図 4】可溶性合成多量体P D - L 2 は、致死性マラリアから保護し、持続性免疫を生じさせる。B6マウス(n = 12)のコホートを致死性プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YMに感染させ、3、5、および7日目にマウスに可溶性大量体P D - L 2 またはヒトIgG(対照IgG)のいずれかを与えた。感染のクリアランスおよび3ヶ月間の休養の後、生存しているマウスを再び致死性プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YMで再攻撃感染させた(矢印:追加のsPDL2なし)。

【図 5】可溶性合成多量体P D - L 2 は脳マラリアの症状から保護し、生存期間を延ばす。B6マウス(n = 9)のコホートをプラスモディウム・ベルゲイ (P . b e r g h e i

50

) マラリアに感染させた。これは 8 日目までに脳症状を生じ、3、5、および 7 日目にマウスに可溶性 P D - L 2 またはヒト I g G (対照 I g) のいずれかを与えた。マウスは、(a) 脳症状および (b) 生存に関して毎日監視された。マウスは、過剰 T N F が原因の D C 機能の欠如により最終的には死亡した (ウイクス (W y k e s) 2 0 0 7 年)。

【図 6】 C D 4⁺ および C D 8⁺ T 細胞枯渇化の研究は、重症マラリアに対する防御におけるこれらの細胞の役割を示す。 (a) 致死性プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YM に感染させ、 r I g (黒丸) による処理、または C D 4⁺ T 細胞 (白四角) もしくは C D 8⁺ T 細胞 (白丸) の枯渇した s P D - L 2 (黒四角) による処理の後の W T マウスの平均生存比率。

【図 7】 s P D - L 2 による防御は P D - L 1 の遮断を介さない。 W T および P D - L 1 ノックアウトマウスのコホートを致死性プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YM に感染させ、対照 I g G または s P D - L 2 のいずれかで処理した。マウスは寄生虫血症に関して監視された。

【図 8】 固定化 P D - L 2 によって T 細胞からガレクチン - 9 を免疫沈降させる。全マウス T 細胞集団のライゼートを固定化 I g G または P D - L 2 - F c 融合タンパク質と混合した。質量分光光度計分析のためにそのバンドを切断し、消化した。ガレクチン - 9 (2) は、 P D - L 2 による免疫沈降に特有のものであった。

【図 9】 固定化 P D - L 2 によって T 細胞から免疫沈降させたガレクチン - 9 のウェスタンプロット。全マウス T 細胞集団のライゼートを固定化 I g G または P D - L 2 - F c 融合タンパク質と混合した。そのゲル上のタンパク質が、ガレクチン - 9 について免疫標識したニトロセルロースに移された。

【図 10】 s P D - L 2 は T 細胞上でガレクチン - 9 に結合する。ナイーブマウスの脾臓から全 T 細胞集団を単離し、ビオチン化 s P D - L 2 および A P C - スプレットアビジンまたは P E - 抗ガレクチン - 9 と共にインキュベートした。 T 細胞はまた、ビオチン化 s P D - L 2 および A P C - スプレットアビジンで標識する前に、標識されていない抗ガレクチン - 9 抗体と共にインキュベートされた。すべての試料がまた、 C D 4⁺ および C D 8⁺ T 細胞を識別するために標識された。

【図 11】 可溶性 P D - L 2 は、ナイーブマウス C D 4⁺ T 細胞の分化と、ガレクチン - 9 によって仲介されるそれらの T_{B E T} レベルとを増大させる。ナイーブ C D 4⁺ T 細胞を抗 C D 3 、 I L - 2 、およびグラフ上に示した刺激物と一緒に培養した。 s P D - L 2 は、ラット I g G 処理と比較して (a) T_{B E T} を発現させる C D 4 + C D 6 2^{1°} 細胞の割合と、 (b) 細胞内の T_{B E T} のレベルとを増加させた。この効果は、ガレクチン - 9 インヒビターであることが確定している抗ガレクチン - 9 (クローン 1 0 8 A) 抗体によって遮断された。クローン R G 9 . 1 もまた、 T_{B E T} を発現させるマウス C D 4 + C D 6 2^{1°} 細胞の割合を増加させた。

【図 12】 可溶性合成 P D - L 2 および抗ガレクチン - 9 抗体は、致死性マラリアの症状から守る。 B 6 マウス (n = 3) のコホートを致死性プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YM に感染させ、3、5、および 7 日目にマウスに可溶性 P D - L 2 、抗ガレクチン - 9 、またはヒト I g G (対照 I g) のいずれかを与えた。マウスを毎日監視し、疾患の症状および生存にスコアを付けた。スコアが 4 に達したときにマウスを安楽死させた。臨床スコアに及ぼす s P D L 2 のプラス効果は、ガレクチン - 9 刺激物質 (作動性抗体 (a g o n i s i n g a n t i b o d y)) であることが確定している R G 1 によって模倣され、かつそれによって改善される。

【図 13】 マウス P D - L 2 - ガレクチン - 9 は高度に安定であり、それはガレクチン - 9 および P D - L 2 の多量体化を伴う。ガレクチン - 9 と P D - L 2 との間の結合の生化学的性質を決定するためにオクテット・レッド (O c t e t r e d) による研究が実施された。 s P D - L 2 をプローブと結合させ、その s P D - 1 および s ガレクチン - 9 との相互作用を測定した。 P D - L 2 - P D - 1 結合曲線は、0 . 0 2 秒未満 (アッセイの検出感度) で P D - L 2 が P D - 1 に結合し、かつ 0 . 0 2 秒未満で解離することを示す。この P D - L 2 - G a l - 9 曲線は、ガレクチン - 9 結合が、会合に 2 9 9 . 9 9 秒を

10

20

30

40

50

、および解離に 614.21 秒を要することを示し、これは P D - L 2 とガレクチン - 9 との間の極めて安定な相互作用を表す。ピークの高さは、P D - 1 では見られないガレクチン - 9 の大きい集合体を示し、これはガレクチン - 9 および P D L 2 が結合の間に多量体化することを表す。

【図 14】マウス s P D - L 2 または抗ガレクチン - 9 抗体で処理したマウス C D 4⁺ T 細胞から分泌されるサイトカイン。C D 4⁺ T 細胞をマウス脾臓から単離し、抗 C D 3 および刺激物と一緒に 3 日間培養し、上清を回収してサイトカイン、インターフェロン - 、I L - 2 、および T N F - を測定した。エラーバーは S E M を表し、およびデータは 2 回の実験のうちの 1 つを表す。

【図 15 A】ヒト s P D - L 2 で処理したヒト C D 4⁺ T 細胞から分泌されるサイトカイン。ヒト P B M C から C D 4⁺ T 細胞を単離し、T C R の活性化に似せるように P M A およびイオノマイシンと一緒に 3 日間培養した。次いで細胞を s P D - L 2 または対照と一緒に培養し、3 日目に上清を回収してサイトカイン、インターフェロン - (I F N -) 、I L - 2 、T N F - 、および I L - 4 を測定した。エラーバーは S E M を表し、およびデータは 2 回の実験からのプールされたデータを表す。

【図 15 B】抗マウスガレクチン - 9 で処理したヒト C D 4⁺ T 細胞から分泌される I F N - 。ヒト P B M C から C D 4⁺ T 細胞を単離し、T C R の活性化に似せるように準最適濃度の抗 C D 3 と一緒に 3 日間培養した。次いで細胞をヒト s P D - L 2 または抗マウスガレクチン - 9 と一緒に培養し、3 日目に上清を回収してサイトカインを測定した。エラーバーは S E M を表し、およびデータは 1 回の実験を表す。

【図 16】抗ガレクチン - 9 活性化抗体（しかし、抗 T i m 3 遮断抗体ではない）は致死性マラリアから防御する。感染後 3 、 5 、および 7 日目に対照ラット I g G で処理し、抗 T i m 3 抗体を遮断するまたは抗ガレクチン - 9 抗体を活性化させる W T マウスにおけるプラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) Y M マラリアの典型的な過程の寄生虫血症の平均パーセント。エラーバーは S E M を表し、およびデータは T i m 3 については 2 回の実験のうちの 1 つ、抗ガレクチン - 9 については 3 回の実験のうちの 1 つを表す。

【図 17】抗ガレクチン - 9 処理は乳腺癌の進行を軽減する。マウスのコホートに (a) P Y M T 由来の乳癌、または (b) E O 7 7 1 L M B 乳癌を異所移植し、対照 I g G または抗ガレクチン - 9 抗体のいずれかで処理した。マウスを 1 ~ 2 日ごとに監視して腫瘍の進行を監視した。Q I M R - B の倫理は、胸部に移植した腫瘍が約 525 mm² に達した場合、マウスを安楽死させることを必要とする。エラーバーは S E M を表す。

【図 18】P D - L 2 の遮断は、プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) 17 X N L に感染したマウスの脾臓中の寄生虫特異的 C D 4⁺ T 細胞の増殖を阻害する。プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) 17 X N L に感染させ、ラット I g G または抗 P D - L 2 遮断抗体で処理した W T マウスにおける様々なパラメータの分析。すべてのデータは、バーが中央値を表す散布図に示される。(a 、 b) は、(a) 7 日目 (n = 4) および (b) 14 日目 (n = 7) の脾臓当たりの T b e t 発現 C D 4⁺ C D 6 2 L^{hi} および C D 4⁺ C D 6 2 L^{lo} T 細胞の数。(c) は、ナイープ DC (n = 7) の存在下で寄生虫抗原 (M S P 1_{1,9}) に応答して E L I S P O T 培養物中でインターフェロン - (I F N -) を分泌した C D 4⁺ T 細胞の数。(d 、 e) は、プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) 17 X N L に感染マウス (n = 7) の血清中の (d) I F N - および (e) I L - 10 のレベル。(f) は、脾臓 (n = 7) 当たりの C D 2 5 および F o x P 3 を発現させる C D 4⁺ T 細胞（調節 T 細胞）の数。14 日目のデータは、2 つのプールされた独立した実験を表す。有意性は、両側検定に基づくノンパラメトリックマン - ホイットニー U 検定を使用して解析された (* P < 0.05 、 ** P < 0.005 、 *** P < 0.0005) 。F 検定は、群間の有意に異なる分散を見出した。

【図 19】P D - L 2 は、プラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) 17 X N L マラリアの期間中の T h 1 免疫を調節する。(A 、 B) は、(A) W T マウスおよび P D - L 2 K O マウス (n = 4) または (B) ラット I g G または抗 P D - L 2 遮断抗体で処理したマウス (n = 5) におけるプラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) 17 X N

10

20

30

40

50

Lマラリアの典型的な過程の間の臨床症状のスコア。(C～F)散乱図は、ラットIgGまたは抗PD-L2遮断抗体で処理したWTマウス、またはプラスモディウム・ヨエリ(*P. yoelii*)17XNLに感染させたPD-L2KOマウスにおけるCD4⁺T細胞の14日間の解析を示す。(C)は、脾臓当たりのT_{bet}発現CD4⁺CD62L^{hi}またはCD4⁺CD62L^{lo}T細胞の平均数。(D)は、ナイーブDCの存在下で寄生虫抗原(MSP1₁₉)に応答してELISPOT培養物中でIFN- γ を分泌した脾臓当たりCD4⁺T細胞の平均数。(E～F)は、ナイーブDCの存在下で寄生虫抗原(Pb1)に応答してELISPOT培養物中でIFN- γ を分泌した脾臓当たりCD8⁺T細胞の平均数。(E)PD-L2遮断ありおよびなしでプラスモディウム・ヨエリ(*P. yoelii*)17XNLに感染後14日目に採取した細胞(n=7)。(F)PD-L2KOマウスおよび対照由来のプラスモディウム・ヨエリ(*P. yoelii*)17XNLに感染後14日目に採取した細胞。データは、一度行われたPD-L2KOマウス以外は2つの独立した実験からプールされる。エラーバーはSEMを表す(*P<0.05)。有意性は、ノンパラメトリックマン-ホイットニーU検定を使用して解析された。

【図20】sPD-L2は、CD4⁺T細胞を介して保護および生存を仲介する。(a)は生存曲線、(b～d)は、プラスモディウム・ヨエリ(*P. yoelii*)YMに感染後3、5、および7日目に対照のヒトIgG(hIg)またはsPD-L2で処理したWTマウスにおける寄生虫血症の平均パーセント。次いでマウスは、感染後1日目に始まり、感染後14～18日目まで、3～4日ごとの(b)ラットIgG、(c)枯渇化抗CD4抗体、または(d)枯渇化抗CD8抗体(n=4)で同時処理された。データは、2回の独立した実験(類似した結果が得られた)のうちの1つを表す。sPD-L2⁺ラットIgG処理群と対照群(ラットおよびヒトIgGを与えた)との間の、またはsPD-L2⁺ラットIgG処理群とCD4⁺T細胞が枯渇したsPD-L2処理群との間の生存の有意性を、プールされた実験からのデータに基づくログ-ランク(マンテル-コックス)検定を使用して解析した。

【図21】sPD-L2は、Th1 CD4⁺およびCD8⁺T細胞機能を促進させることによって致死性マラリアからマウスを保護する。プラスモディウム・ヨエリ(*P. yoelii*)YMに感染させ、感染後3、5、および7日目に対照ヒトIgGまたはsPD-L2で処理したWTマウス(n=8)における様々なパラメータの分析(感染後7日目)。すべてのデータは散布図中に示され、バーは中央値を表す。(a)ナイーブDCの存在下で寄生虫抗原MSP1₁₉に応答してELISPOT培養物中でIFN- γ を分泌したCD4⁺T細胞の数。(b)EdUを取り込むことによって測定される、ナイーブDCの存在下で寄生虫抗原MSP1₁₉に応答して培養物中で増殖したCD4⁺T細胞の数。(c)脾臓当たりのCD25およびFoxP3を発現させるCD4⁺T細胞の数。(d)脾臓当たりの寄生虫特異的Pb1-四量体⁺CD8⁺T細胞の数。(e)ナイーブDCの存在下で寄生虫ペプチドPb1に応答して培養物中でIFN- γ を分泌したCD8⁺T細胞の数(ELISPOTによって求められる)。(f)CD11a(最新の活性化のマーカ)およびグランザイムBを発現させたCD8⁺T細胞の数。データは、それまでに始められた四量体およびグランザイムBの標識化以外は2つのプールされた独立した実験を表す。有意性は、両側検定に基づくノンパラメトリックマン-ホイットニーU検定を使用して解析された(*P<0.05、**P<0.005)。F検定は、群間の有意に異なる分散を見出した。

【発明を実施するための形態】

【0005】

本発明は、少なくとも部分的には、ガレクチン-9がPD-L2の受容体であるという予期しない発見から生じた。したがって、PD-L2の免疫学的效果の少なくとも幾つかは、PD-1によってというよりもむしろ、ガレクチン-9との多量体PD-L2の結合によって仲介され得る。したがって、本発明は、広義には、ガレクチン-9を標的にして、それにより免疫システムを調節することに向けられる。1つの広範な実施形態では、本発明は、ガレクチン-9を活性化または刺激することによって哺乳動物における免疫性を

10

20

30

40

50

増進または増強することに向けられる。別の広範な実施形態では、本発明は、ガレクチン-9を阻害または遮断（blocking）することによって哺乳動物における免疫性を抑制または妨害することに向けられる。

【0006】

本発明の態様は、哺乳動物における免疫性を調節する方法であって、哺乳動物におけるガレクチン-9活性を調節して、それにより哺乳動物における免疫性を調節するステップを含む、方法を提供する。

【0007】

本発明の特定の態様は、哺乳動物における免疫性を増進または増強する方法であって、哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化または刺激して、それにより哺乳動物における免疫性を刺激または増強するステップを含む、方法を提供する。10

【0008】

好適には、この方法は、哺乳動物にガレクチン-9アゴニストを投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化または刺激するステップを含む。

一実施形態では、この方法は、可溶性PD-L2またはその生物学的に活性なフラグメントを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化または刺激するステップを含む。

【0009】

好適には、可溶性PD-L2は、n個のモノマー（ここで、n=3である）を含む多量体である。20

一実施形態では、この方法は、ガレクチン-9に結合するアゴニスト抗体または抗体フラグメントを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化または刺激するステップを含む。

【0010】

好適には、これは、Th1に仲介される免疫応答および/または免疫記憶を刺激かつ/または開始させる。

本発明の別の特定の態様は、哺乳動物における免疫性を少なくとも部分的に抑制または妨害する方法であって、哺乳動物におけるガレクチン-9活性を少なくとも部分的に阻害または遮断して、それにより哺乳動物における免疫性を抑制または妨害するステップを含む、方法を提供する。30

【0011】

好適には、この方法は、ガレクチン-9インヒビターまたはアンタゴニストを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン-9活性を阻害または妨害するステップを含む。好ましくは、インヒビターまたはアンタゴニストは、PD-L2とガレクチン-9との間の結合相互作用を少なくとも部分的に妨害するか、またはそれに干渉する。

【0012】

一実施形態では、この方法は、可溶性ガレクチン-9またはその生物学的に活性なフラグメントを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン-9活性を阻害または遮断するステップを含む。

【0013】

一実施形態ではこの方法は、ガレクチン-9に結合するアンタゴニスト抗体または抗体フラグメントを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン-9活性を阻害または遮断するステップを含む。40

【0014】

本発明の関連する態様は、哺乳動物の疾患、障害、または状態を治療または予防する方法であって、哺乳動物におけるガレクチン-9活性を調節して、それにより疾患または状態を予防または治療するステップを含む、方法を提供する。

【0015】

一実施形態では、その疾患、障害、または状態は、哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化または刺激することによる免疫の増進または増強に応答する。好ましくは、こ50

の方法は、ガレクチン - 9 に結合するアゴニスト抗体または抗体フラグメントを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を活性化または刺激するステップを含む。

【 0 0 1 6 】

別の実施形態では、その疾患、障害、または状態は、哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を阻害または遮断することによる免疫の抑制または妨害に応答する。1つの特定の実施形態では、この方法は、可溶性ガレクチン - 9 またはその生物学的に活性なフラグメントを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を阻害または遮断するステップを含む。別の特定の実施形態では、この方法は、ガレクチン - 9 に結合するアンタゴニスト抗体または抗体フラグメントを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を阻害または遮断するステップを含む。10

【 0 0 1 7 】

本発明のさらに別の態様は、ガレクチン - 9 アゴニストと免疫原とを含む組成物を提供する。好適には、組成物は、免疫原に対する免疫応答を誘発する免疫原性組成物またはワクチンである。その免疫原は、病原体（例えば、不活化ウィルスもしくは弱毒細菌）またはその病原体の分子成分であることができる。好適には、組成物は、適切な担体、增量剤、または賦形剤を含む。

【 0 0 1 8 】

本発明の更なる態様は、ガレクチン - 9 アゴニスト、インヒビター、またはアンタゴニストを設計する、選別する、操作する、あるいは產生する方法を提供し、前記方法は、(i) 候補分子が、ガレクチン - 9 活性を活性化または刺激し、かつそれにより哺乳動物における免疫性を刺激または増強することができるアゴニストであるかどうかを判断するステップ、または(ii) 候補分子が、ガレクチン - 9 活性を遮断または阻害し、かつそれにより哺乳動物における免疫性を少なくとも部分的に抑制または妨害することができるアンタゴニストまたはインヒビターであるかどうかを判断するステップを含む。20

【 0 0 1 9 】

一実施形態では、ステップ(i)において候補分子は、P D - L 2 によるガレクチン - 9 の刺激または活性化を模倣する。

一実施形態では、ステップ(ii)において候補分子は、P D - L 2 によるガレクチン - 9 の刺激または活性化を遮断または阻害する。30

【 0 0 2 0 】

本発明の更なる態様は、先の態様の方法に従って產生されるガレクチン - 9 アゴニスト、インヒビター、またはアンタゴニストを提供する。

本発明の更なる態様は、先の態様のガレクチン - 9 アゴニスト、インヒビター、またはアンタゴニストを含む組成物を提供する。好適には、組成物は、適切な担体、增量剤、または賦形剤を含む。

【 0 0 2 1 】

本明細書の全体を通じて、別段の指示がない限り「含む(c o m p r i s e)」、「含む(c o m p r i s e s)」、および「含んでいる(c o m p r i s i n g)」は、排他的ではなく包含的に使用され、したがって述べられる整数または整数群は、1つまたは複数の他の述べられていない整数または整数群を含むことができる。40

【 0 0 2 2 】

本明細書中で使用される「1つの(a)」および「1つの(a n)」などの不定冠詞は、单一要素または単数形要素を指すかまたは指定するのではなく、1つまたは複数の要素を指すかまたは指定する。

【 0 0 2 3 】

(詳細な説明)

P D - L 2 は、プログラム死の受容体 - 1 (P D 1) および R G M b のリガンドであり、ガレクチン - 9 (G a l - 9) が、これまで知られていない P D - L 2 の受容体であることを本明細書中で提言する。可溶性 P D - L 2 で処理したマウスは、致死性マラリア株50

で攻撃感染された場合に死亡しない。P D - L 2 に仲介される防御は C D 4⁺ T 細胞が枯渇すると失われるため、P D - L 2 が C D 4⁺ T 細胞を介して防御を仲介することを提言する。したがって、可溶性 P D - L 2 (s P D L 2) または作動性 (a g o n i s i n g) 抗ガレクチン - 9 抗体の投与は、免疫刺激物質としての役割を果たすことができ、かつ / または T h 1 に仲介される免疫応答および免疫記憶の少なくとも一方を開始させることができる。これは、免疫記憶の発生および維持を含む癌、感染因子、および寄生虫、特に癌に対する免疫応答の刺激に有効である可能性がある。また、ガレクチン - 9 に対するブロッキングまたはアンタゴニスト抗体の投与が、P D - L 2 で見られる効果を妨害または阻害する可能性があることを提言する。P D - L 2 と結合し、そのガレクチン - 9 との相互作用を遮断する抗体は、ガレクチン - 9 アンタゴニスト抗体と同様の効果を有することができる。これは免疫の抑制を補助することができ、例えば自己免疫疾患、炎症、および / またはアレルギーの治療または予防に役立ち得る。

10

【 0 0 2 4 】

本発明の目的では「単離された」とは、その自然の状態から取り出された、または人間の操作を受けた物質を意味する。単離された物質は、その自然の状態で通常それに随伴する成分を実質的にまたは本質的に含まなくてもよく、または人工的状態において、その自然の状態で通常それに随伴する成分と一緒にになるように操作することもできる。単離された物質は、天然の、化学合成の、または組換え型の形態であることができる。

20

【 0 0 2 5 】

「タンパク質」とは、アミノ酸ポリマーを意味する。アミノ酸は、当技術分野でよく理解されている天然または非天然アミノ酸、D - またはL - アミノ酸であることができる。

「ペプチド」は、50個以下のアミノ酸を有するタンパク質である。

20

【 0 0 2 6 】

「ポリペプチド」は、50個を超えるアミノ酸を有するタンパク質である。

30

本明細書中で使用される「ガレクチン - 9 」または「G a l - 9 」は、- ガラクトシド糖、例えばN - アセチルラクトサミン (G a l 1 - 3 G l c N A c または G a l 1 - 4 G l c N A c) に対するそれらの結合特異性によって定義されるガレクチンファミリーのタンパク質のうちのタンパク質を指す。これらのタンパク質はまた、それらが安定性および糖結合性についてジスルフィド結合に依存しているためにS型レクチンとも呼ばれる。L G A L S 遺伝子によってコードされる15種類のガレクチンが哺乳動物中で発見されており、そのうちのガレクチン - 1 、 - 2 、 - 3 、 - 4 、 - 7 、 - 8 、 - 9 、 - 10 、 - 12 、および - 13 は、ヒトにおいて同定されている。ヒトガレクチン - 9 は、一般には355個のアミノ酸配列（基準配列または「ロングフォーム (l o n g f o r m) 」配列と呼ばれる）を含むが、149 ~ 180番の残基を欠く「ショートフォーム (s h o r t f o r m) 」変異型が存在する。好適には、本発明に関連して、ガレクチン - 9 は、リンパ球またはNK細胞によって発現される。リンパ球は、C D 4⁺ T 細胞、C D 8⁺ T 細胞、またはB細胞であることができる。ヒトガレクチン - 9 のアミノ酸配列の非限定的な例は、ユニプロット・KB (U n i p r o t K B) 受託番号O 0 0 1 8 2 で見出すことができ、マウスガレクチン - 9 のアミノ酸配列の非限定的な例は、ユニプロット・KB (U n i p r o t K B) 受託番号O 0 8 5 7 3 で見出すことができる。

30

【 0 0 2 7 】

本明細書中で使用される「抗体」は、免疫グロブリンであるか、免疫グロブリンを含む。用語「免疫グロブリン」には、哺乳類の免疫グロブリン遺伝子複合体の任意の抗原結合タンパク質産物が挙げられ、免疫グロブリンアイソタイプIgA、IgD、IgM、IgG、およびIgEと、その抗原結合フラグメントとを含む。用語「免疫グロブリン」には、キメラのまたはヒト化された免疫グロブリンが含まれ、または別の方法では天然に産出されようと、ヒトの介入（例えば組換えDNA技術による）によって産生されようと、改変されまたは変異型のアミノ酸の残基、配列、および / または糖鎖付加を含む。

40

【 0 0 2 8 】

抗体フラグメントには、F a b および F a b ' 2 フラグメント、ダイアボディ、トリア

50

ボディ、および一本鎖抗体のフラグメント（例えば s c V s ）が挙げられるが、これらに限定されない。一般に抗体は、それぞれが C D R 1、2、および 3 アミノ酸配列を含む個別の軽鎖および重鎖可変領域を含む。好ましい抗体フラグメントは、少なくとも 1 個の軽鎖可変領域 C D R および / または少なくとも 1 個の重鎖可変領域 C D R を含む。

【 0 0 2 9 】

抗体および抗体フラグメントはポリクローナル、または好ましくはモノクローナルであることができる。モノクローナル抗体は、ガレクチン - 9 またはそのフラグメントを接種された産生種から得られる脾臓または他の抗体産生細胞を固定化することによる、例えばケラーおよびミルステイン（Koe h l e r & M i l s t e i n）による論文、1975 年、ネーチャー（N a t u r e）、第 256 号、p. 495 ~ 497 に記載されているような標準的な方法を使用して、または例えばコリガン（C o l i g a n）らの著「免疫学における最近のプロトコル（C U R R E N T P R O T O C O L S I N I M M U N O L O G Y ）」の第 2 章に記載されているようなその最近の修正法によって產生させることができる。これらの抗体は、その抗体または抗体フラグメントをコードする核酸を適切な宿主細胞中で発現させることによって組換え合成抗体または抗体フラグメントとして產生し得ることも理解されるはずである。組換え合成抗体または抗体フラグメントの重鎖または軽鎖は、同じ宿主細胞中で様々な発現ベクターから共発現させることも、または宿主細胞中で一本鎖抗体として発現させることもできる。組換え抗体の発現および選択技術の非限定的な例は、コリガン（C o l i g a n）ら著「免疫学における最近のプロトコル（C U R R E N T P R O T O C O L S I N I M M U N O L O G Y ）」の第 17 章、およびツベルブラー（Z u b e r b u h l e r）らの論文、2009 年、プロテイン・エンジニアリング・デザイン・アンド・セレクション（P r o t e i n E n g i n e e r i n g , D e s i g n & S e l e c t i o n ）、第 22 卷、p. 169 中で得られる。

10

20

30

40

【 0 0 3 0 】

これらの抗体および抗体フラグメントは、別の種の中で產生させまたは別の種が起源であって、「異質の」抗体に対して有害な免疫応答を顕在化させることなく、ある種に投与可能であるように修飾することができる。ヒトに関連して、これは、別の種の中で產生させた抗体、または別の種が起源の抗体の「ヒト化」である。このような方法は当技術分野でよく知られており、一般には非ヒト抗体相補性決定領域（C D R : c o m p l e m e n t a r i t y d e t e r m i n i n g r e g i o n ）のヒト抗体の骨格またはバックボーン上への組換え「移植」を伴う。

【 0 0 3 1 】

幾つかの実施形態では、抗体または抗体フラグメントは標識される。

標識は、色素原、触媒、ビオチン、ジゴキシゲニン、酵素、蛍光団、化学発光分子、放射性同位元素、薬剤または他の化学療法剤、磁気ビーズ、および / または直接可視標識を含む群から選択することができる。

【 0 0 3 2 】

本発明の態様は、哺乳動物における免疫性を調節する方法であって、哺乳動物におけるガレクチン - 9 活性を調節して、それにより哺乳動物における免疫性を調節するステップを含む、方法を提供する。

【 0 0 3 3 】

一実施形態では「免疫性を調節する」とは、哺乳動物における免疫性を増進または増強することを意味する。これに関連して、ガレクチン - 9 活性は、例えばアゴニストによって刺激または増大される。

【 0 0 3 4 】

別の実施形態では「免疫性を調節する」とは、哺乳動物における免疫性を少なくとも部分的に抑制、阻害、または妨害することを意味する。これに関連して、ガレクチン - 9 活性は、例えばガレクチン - 9 アンタゴニストまたはインヒビターによって少なくとも部分的に遮断または阻害される。

【 0 0 3 5 】

50

したがって本発明の1つの特定の態様は、哺乳動物における免疫性の増進または増強する方法であって、哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化、増加、または刺激して、それにより哺乳動物における免疫性を刺激または増強するステップを含む、方法を提供する。

【0036】

好適には、この方法は、哺乳動物にガレクチン-9アゴニストを投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化または刺激するステップを含む。

これに関連して、「アゴニスト」とは、ガレクチン-9活性を少なくとも部分的に活性化、増加、または刺激する分子を意味する。アゴニストは、PD-L2などのガレクチン-9の天然のリガンドであってもよく、またはPD-L2などの天然のリガンドの作用を模倣していてもよい。1つの特定の実施形態では、この方法は、哺乳動物に可溶性PD-L2またはその生物学的に活性なフラグメントを投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化または刺激するステップを含む。好適には、PD-L2は多量体であり、好ましくはn個のモノマー（ここで、n=3である）を含む。好ましくは、多量体PD-L2は、3個、4個、5個、6個、7個、または8個のPD-L2モノマーを含む。1つの特定の実施形態では、PD-L2は、8個のモノマーを含む（すなわち、n=8、すなわち八量体である）。これに関連して、多量体PD-L2は、各モノマーの共有結合を容易にするためのリンカーアミノ酸またはペプチドの使用を含む例えばモノマーの化学的架橋によって、共有結合により誘導または形成することができる。他の実施形態では、多量体PD-L2の効果は、ペプチドもしくは核酸（例えばオリゴヌクレオチド）アプタマーなどの作用物質によって、またはPD-L2とガレクチン-9との両方に結合する二重特異性抗体によって模倣することもでき、またはペプチドもしくは核酸（例えばオリゴヌクレオチド）のアプタマーなどの作用物質によって模倣することもできる。アゴニストは、ガレクチン-9と結合して、それによりガレクチン-9活性を活性化または刺激することができる任意の他の分子、例えばアゴニスト抗体または抗体フラグメントであることができる。1つの特定の実施形態では、この方法は、ガレクチン-9に結合するアゴニスト抗体または抗体フラグメントを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン-9活性を活性化または刺激するステップを含む。

【0037】

幾つかの実施形態では、アゴニストは、哺乳動物に投与されると免疫応答を刺激または増強することができる。免疫応答には、癌または病原体、例えば感染症および/または寄生虫性疾患を引き起こすもの（特にその病原体が免疫記憶を無効にし、消去し、または回避することによって免疫システムを回避する場合）に対する免疫記憶の誘発を挙げることができる。非限定的な例は、免疫記憶を消去してそれにより後に再感染を可能にするマラリアである。

【0038】

癌に関連して、アゴニストの癌患者への投与は、免疫記憶を創出、誘発、かつ/または維持することができ、その結果、そうでなければ非自己シグナルが低いかまたは不足しているが、腫瘍細胞が異物として認識されるようになる。

【0039】

別の実施形態では、ガレクチン-9アゴニストは、ワクチンまたは他の免疫原性組成物中で免疫原と組み合わせてアジュvantとして投与することができる。これは、ワクチンまたは免疫原性組成物の効力を高めることができ、かつまたブースタワクチン接種の必要性を取り除くか、できるだけ少なくすることができます。この実施形態の特定の形態では、アゴニストの投与は、免疫原または病原体の免疫記憶を十分に刺激しない不成功または準最適なワクチンまたはワクチン接種を救出または回復させることができる。免疫原は、病原体の成分分子（例えば、細胞表面タンパク質、免疫原性ペプチドまたは「サブユニットワクチン」の場合などのその他の成分、複数のB-および/またはT-エピトープ、VLP、カプシド、またはキャプソメア）、不活化病原体（例えば、不活化ウィルス、弱毒化した寄生虫感染RBC、または弱毒化細菌）、または病原体に対する免疫応答を誘発する

10

20

30

40

50

ことができる任意の他の分子または構造体であることができる。例えば、マラリア免疫感作の向上におけるP D - L 2 および抗ガレクチン - 9 抗体アゴニスト投与の有効性を実証する実施例を参照されたい。

【0040】

哺乳動物へのアゴニストの投与は、ナイーブT - 細胞を刺激してT h 1 の系統の選択および / または関与を行わせることができる。当業者は理解するはずであるように、T h 1 の系統には、これらに限定されないがインターフェロン - (I F N -) 、 I L - 2 、および T N F - を含む多くの因子のうちの 1 つを産生、分泌する C D 4 + T 細胞が挙げられる。T h 1 細胞は I L - 1 2 および I L - 2 によって誘発され、続いて免疫エフェクター細胞、例えばマクロファージ、顆粒球、C D 8 + T 細胞、I g G を発現するB 細胞、樹状細胞、および他の C D 4 + T 紡を刺激する。

10

【0041】

前述から、例えば本明細書中で開示されるアゴニストによるガレクチン - 9 の活性化または刺激は、哺乳動物の疾患、障害、または状態を治療または予防することができる。

本明細書中で使用される「治療すること」、「治療する」、または「治療」とは、少なくとも症状が現れ始めた後、その疾患、障害、または状態の症状を少なくとも改善する治療的介入、一連の行動、またはプロトコルを指す。本明細書中で使用される「予防すること」、「予防する」、または「予防」とは、疾患、異常、もしくは状態、または症状の発症または進行を予防、阻害、または遅延するようにその疾患、障害、または状態の症状の発現前に開始される治療的介入、一連の行動、またはプロトコルを指す。このような予防的治療は、「感染予防 (p r o p h y l a x i s) 」または「感染予防的 (p r o p h y l a c t i c) 」処置と呼ぶことができる。特定の実施形態では、免疫接種または予防接種は、予防的または感染予防的免疫療法である。

20

【0042】

広範な実施形態において、疾患、障害、または状態は、病原体によって引き起こされる。その病原体は、ウィルス、細菌、または寄生虫であることができる。寄生虫の非限定的な例には、これらに限定されないが、熱帯熱マラリア原虫 (P . f a l c i p a r u m) 、卵形マラリア原虫 (P . o v a l e) 、サルマラリア原虫 (P . k n o w l e s i i) 、四日熱マラリア原虫 (P . m a l a r i a e) 、および三日熱マラリア原虫 (P . v i v a x) などのプラモジウム種 (P l a s m o d i u m s p p) を含むマラリア寄生虫などの原虫が挙げられる。他の寄生虫には、これらに限定されないが、バベリア種 (B a b e s i a s p p) 、赤痢アメーバ種 (E n t a m o e b a s p p) 、ジアルジア種 (G i a r d i a s p p) と、リーシュマニア種 (L e i s h m a n i a s p p) を含むトリパノソーマ (T r y p a n o s o m e s) とが挙げられる。

30

【0043】

ウィルス性病原菌の非限定的な例には、これらに限定されないが、ヒト免疫不全ウィルス (H I V : h u m a n i m m u n o d e f i c i e n c y v i r u s) 、エボラウィルス、インフルエンザウィルス、ヘルペスウィルス、乳頭腫ウィルス、麻疹ウィルス、流行性耳下腺炎ウィルス、B 型肝炎ウィルス、風疹ウィルス、ライノウィルス、フラビウィルス (例えば C 型肝炎ウィルス (H C V : h e p a t i t i s C v i r u s)) 、西ナイルウィルス、日本脳炎ウィルスおよびデングウィルス、サイトメガロウィルス (C M V : c y t o m e g a l o v i r u s) 、およびエプスタインバーウィルス (E B V : E p s t e i n B a r r V i r u s) が挙げられる。

40

【0044】

細菌病原体の非限定的な例は、ナイセリア (N e i s s e r i a) 、ボリデテラ (B o r d a t e l l a) 、シュードモナス (P s e u d o m o n a s) 、コリネバクテリウム (C o r y n e b a c t e r i u m) 、サルモネラ (S a l m o n e l l a) 、レンサ球菌 (S t r e p t o c o c c u s) 、赤痢菌 (S h i g e l l a) 、マイコバクテリウム (M y c o b a c t e r i u m) 、マイコプラズマ (M y c o p l a s m a) 、クロスト

50

リジウム (*Clostridium*)、ヘリコバクター (*Helicobacter*)、ボレリア (*Borrelia*)、エルシニア (*Yersinia*)、レジオネラ (*Legionella*)、ヘモフィルス (*Hemophilus*)、リケッチャ (*Rickettsia*)、リストリア (*Listeria*)、ブルセラ (*Brucella*)、ビブリオ (*Vibrio*)、およびトレポネーマ (*Treponema*)などの属のものであることができ、これらには黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、偽結核菌 (*Corynebacterium pseudotuberculosis*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、ミュータンス菌 (*Streptococcus mutans*)、口腔レンサ球菌 (*Streptococcus oralis*)、ストレプトコッカス・パラサンギニス (*Streptococcus parasanguis*)、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、緑色レンサ球菌 (*Streptococcus viridans*)、リストリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、インフルエンザ菌 (*Hemophilus influenzae*)、パスツレラ・マルチシダ (*Pasteurella multicipida*)、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*)、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、らい菌 (*Mycobacterium leprae*)、マイコバクテリウム・アシアティカム (*Mycobacterium asiaticum*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーエ (*Mycobacterium intracellulare*)、肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、リケッチャ・リケッチャ (*Rickettsia rickettsii*)、ウシ流産菌 (*Brucella abortus*)、イヌ流産菌 (*Brucella canis*)、ブタ流産菌 (*Brucella suis*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、トレポネーマ・パリズム (*Treponema pallidum*)、トレポネーマ・ペルテニエ (*Treponema pertenue*)、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、ピンタトレポネーマ (*Treponema carateum*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、腸チフス菌 (*Salmonella typhi*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、およびベスト菌 (*Yersinia pestis*)などの種が挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

別の広範な実施形態では、その疾患、障害、または症状は癌である。本明細書中で一般に使用される用語「癌」、「腫瘍」、「悪性」、および「悪性腫瘍」とは、腫瘍形成、腫瘍マーカの発現、腫瘍サプレッサーの発現または活性の喪失、および／または非正常または異常な細胞表面マーカの発現と関係のある1つまたは複数の遺伝子突然変異または他の遺伝的变化を含む、非正常または異常な分子の表現型を伴うことが多い非正常または異常な細胞の増殖、分化、および／または移動によって特徴付けられる疾患または状態、あるいはその疾患または状態と関係のある細胞または組織を指す。癌および腫瘍の非限定的な例には、肉腫、癌腫、腺腫、白血病およびリンパ腫、肺癌、大腸癌、肝臓癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、神経芽腫および神経膠芽腫および他の神経癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、子

10

20

30

40

50

宮癌、頭部および頸部癌、腎臓癌、前立腺癌、および黒色腫が挙げられる。好適には、その癌は、例えば本明細書中で開示されたアゴニストによるガレクチン-9の活性化または刺激に応答する。幾つかの実施形態では、その癌は、ガレクチン-9の活性化または刺激の結果として生じる免疫記憶の誘発または増強に応答する。

【0046】

本発明の別の特定の態様は、哺乳動物における免疫性を少なくとも部分的に抑制または妨害する方法であって、哺乳動物におけるガレクチン-9活性を少なくとも部分的に阻害または遮断して、それにより哺乳動物における免疫性を抑制または妨害するステップを含む、方法を提供する。

【0047】

好適には、この方法は、ガレクチン-9インヒビターまたはアンタゴニストを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるガレクチン-9活性を阻害または遮断するステップを含む。好ましくはそのインヒビターまたはアンタゴニストは、PD-L2とガレクチン-9との間の結合相互作用を少なくとも部分的に妨害するか、またはそれに干渉する。これに加えてまたはこれに代わって、ガレクチン-9インヒビターまたはアンタゴニストは、通常はPD-L2結合に応答して生じることになるガレクチン-9のシグナル伝達を少なくとも部分的に妨害するか、またはそれに干渉する。幾つかの実施形態では、ガレクチン-9インヒビターまたはアンタゴニストは、ガレクチン-9（例えば、抗ガレクチン-9抗体または抗体フラグメント）に直接結合する作用物質であってもよく、またはPD-L2（例えば、抗PD-L2抗体フラグメント）に直接結合してPD-Lの多量体化および/またはガレクチン-9との結合を阻害または遮断してもよい。特定の実施形態では、そのガレクチン-9インヒビターまたはアンタゴニストには、(i)可溶性ガレクチン-9またはその阻害性フラグメント、(ii)ガレクチン-9に結合して、それによりPD-L2とガレクチン-9との結合、および/またはガレクチン-9のシグナル伝達を阻害または遮断するアンタゴニスト抗体または抗体フラグメント、あるいは他の作用物質、(iii)PD-L2とガレクチン-9との結合、および/またはガレクチン-9のシグナル伝達を阻害または遮断する単量体または二量体PD-L2、(iv)PD-L2と結合して、それによりPD-L2がガレクチン-9と結合するのを妨げる抗体または抗体フラグメント、あるいは他の作用物質、および/または(v)PD-L2と結合してPD-L2の多量体化を妨害または阻害する抗体または抗体フラグメント、あるいは他の作用物質を挙げることができる。

【0048】

したがって、一実施形態では、この方法は、可溶性ガレクチン-9またはその阻害性フラグメントを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物のPD-L2とガレクチン-9との結合を阻害または妨害するステップを含む。一実施形態では、この方法は、ガレクチン-9に結合するアンタゴニスト抗体または抗体フラグメントを哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるPD-L2とガレクチン-9との結合、および/またはガレクチン-9のシグナル伝達を阻害または妨害するステップを含む。別の実施形態では、この方法は、単量体または二量体PD-L2を哺乳動物に投与して、それにより哺乳動物におけるPD-L2とガレクチン-9との結合、および/またはガレクチン-9のシグナル伝達を阻害または遮断するステップを含む。更なる実施形態では、この方法は、PD-L2と結合する抗体または抗体フラグメントを哺乳動物に投与して、それによりPD-L2がガレクチン-9と結合するのを妨害するステップを含む。更なる実施形態では、この方法は、PD-L2と結合する抗体または抗体フラグメント、あるいは他の作用物質を哺乳動物に投与して、哺乳動物中のPD-L2の多量体化を妨害または阻害するステップを含む。

【0049】

幾つかの実施形態では、哺乳動物における免疫性の抑制または妨害は、疾患、障害、または状態の予防または治療を容易にするか、または補助することができる。特定の実施形態では、その疾患、障害、または状態は、アレルギー性の疾患、障害、または状態を含む、自己免疫性の疾患、障害、または状態、および炎症性の疾患、障害、または状態である

10

20

30

40

50

ことができる。

【0050】

自己免疫性および／または炎症性の疾患、障害、および状態を引き起こす根本的な免疫的機序の共通性のために、自己免疫性疾患、障害、または状態と、炎症性のそれとの間には重複が存在し得ることが理解されるはずである。しかしながら、単に一例として自己免疫性の疾患、障害、または状態には、シェーグレン症候群、I型糖尿病、強直性脊髄炎、橋本病、クローン病、筋萎縮性側索硬化症、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、多発性硬化症、グレーブス病、アジソン病、ベーチェット症候群、フォークト小柳・原田(V K H : Vogt Koyanagi - Harada)病、関節リウマチ、および乾癬性関節炎が挙げられるが、これらに限定されない。炎症性の疾患、障害、または状態の非限定的な例には、炎症性大腸炎、アテローム性動脈硬化症、骨盤内炎症性疾患、セリアック病、喘息、慢性閉塞性肺疾患、およびアレルギーが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0051】

1つの特定の実施形態では、その疾患、障害、または状態は、T - bet の、または T - bet を含むシグナル伝達経路の遮断または阻害に対応する。

いかなる特定の理論にも拘束されることを望むものではないが、T - box 転写因子である T - bet は、樹状細胞およびナチュラルキラー細胞だけでなく、T および B リンパ球中でエフェクター細胞の運命の確立および／または維持において重要な役割を果たす 1 型様免疫の主要な調節因子である。T - bet は、これに限定されないが、CD4 T 細胞および T 細胞中の INF - 產生を含む Th1 エフェクターの機能および分化の維持において重要な役割を果たすことができる。例えば、T - bet の欠乏は、自己免疫性および／または炎症性の疾患から防御し、一方、T - bet の過剰発現は、自己免疫性および／または炎症性の疾患を促進させる。実施例中でより詳細に述べるように、PD - L2 / ガレクチン - 9 経路の遮断は T - bet を遮断し、したがって、これは自己免疫性および／または炎症性の疾患の治療の新しい方法を提供する可能性を有する。

20

【0052】

先に述べたように、ガレクチン - 9 アゴニスト、アンタゴニスト、およびインヒビターの投与は、ガレクチン - 9 アゴニスト、アンタゴニスト、およびインヒビターを適切な担体、增量剤、または賦形剤と共に含む医薬組成物を投与することによって行うことができる。

30

【0053】

一般論として、担体、增量剤、または賦形剤は、全身的投与に安全に使用することができる固体または液体の充填剤、增量剤、緩衝剤、結合剤、またはカプセル充填用物質であることができる。投与の特定の経路に応じて当技術分野でよく知られている様々な担体、增量剤、および賦形剤を使用することができる。これらは、糖、デンプン、セルロースおよびその誘導体、麦芽、ゼラチン、タルク、硫酸塩、植物油、合成油、多価アルコール、アルギン酸、リン酸緩衝液、乳化剤、等張食塩水および塩類(例えば、塩酸塩、臭化物、および硫酸塩を含む鉱酸塩)、糖、糖アルコール、有機酸(例えば、酢酸、プロピオン酸、およびマロン酸)、および発熱性物質を含まない水を含む群から選択することができる。薬学的に許容できる担体、增量剤、および賦形剤について記述した有用な参考文献は、「レミントンの医薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)」(マック出版社(Mack Publishing Co.)米国ニュージャージ州、1991年)である。

40

【0054】

幾つかの実施形態では、その組成物は、アジュバントおよび免疫刺激核酸を含む 1 つまたは複数の免疫調節剤をさらに含むことができる。それらには、これらに限定されないが TLR アゴニスト、リポ多糖およびその誘導体(例えば、MPL)、完全または不完全フロイントアジュバント、ヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、オクタデシルアミノ酸エステル、リソレシチン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド、N , N - ジクオクタデシル - N ' , N ' ビス(2 - ヒドロキシエチル - プロパンジアミン)、メトキ

50

シヘキサデシルグリセロールおよびフルロニックポリオール、ポリアミン（例えばピラン）、硫酸デキストラン、ポリICカードポール、ペプチド（例えばムラミルジペプチドおよび誘導体）、ジメチルグリシン、タフトシン、オイルエマルジョン、ミネラルジェル（例えばリン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、またはミョウバン）、リンホカイン、イミキモド（Imiquimod）、ガーディキモド（Guardiquimod）、Quail A、および免疫刺激複合体（ISCOMS：immune stimulation complex）が挙げられる。

【0055】

ガレクチン-9アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターを含む組成物を対象に与えるには、任意の安全な投与経路を使用することができる。例えば、経口、直腸、腸管外、舌下、口内、静脈内、関節内、筋内、皮内、皮下、吸入、眼内、腹膜内、側脳室内、経皮などを使用することができる。

10

【0056】

哺乳動物に投与されるガレクチン-9アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターの濃度または量は、当業者が容易に決めることができ、治療される疾患、障害、または状態の性質、ならびに／あるいはその哺乳動物の体重、年齢、性別、および／または総合的な健康および生活状態などの要因が考慮される。

【0057】

一実施形態では、医薬組成物は、ワクチンまたは他の免疫原性組成物であることができる。好適には、ワクチンまたは免疫原性組成物は、ガレクチン-9アゴニストと、適切な抗体、增量剤、または賦形剤と、哺乳動物における免疫性応答を誘発することができる免疫原とを含む。好ましくは、その免疫応答は、免疫記憶の誘発を含む防御免疫応答である。免疫原は、病原体の成分分子（例えば、細胞表面タンパク質、「サブユニットワクチン」における場合などの免疫原性ペプチドまたはその他の成分、複数のB-および／またはT-エピトープを含むポリトープ、VLP、カプシド、あるいはキャプソメア）、不活化病原体（例えば、不活化ワクチン、弱毒化した寄生虫感染RBC、または弱毒化細菌）、または病原体に対する免疫応答を誘発することができる任意の他の分子であることができる。例えば、マラリア免疫感作の改善におけるPD-L2および抗ガレクチン-9抗体アゴニストの投与の有効性を実証する実施例を参照されたい。

20

【0058】

本発明の更なる態様は、ガレクチン-9アゴニスト、インヒビター、および／またはアンタゴニストを設計する、選別する、操作する、あるいは產生する方法を提供し、前記方法は、(i)候補分子が、ガレクチン-9活性を活性化または刺激し、かつそれにより哺乳動物における免疫性を刺激または増強することができるアゴニストであるかどうかを判断するステップ、または(ii)候補分子が、ガレクチン-9活性を遮断または阻害し、かつそれにより哺乳動物における免疫性を少なくとも部分的に抑制または妨害することができるアンタゴニストまたはインヒビターであるかどうかを判断するステップを含む。

30

【0059】

広くは、この方法に従って設計される、選別される、操作される、あるいは產生されるガレクチン-9アゴニスト、インヒビター、および／またはアンタゴニストは、本明細書中で先に述べたように、哺乳動物における免疫性を少なくとも部分的に刺激または増強することができるか、または哺乳動物における免疫性を少なくとも部分的に抑制または妨害することができる。

40

【0060】

1つの特定の実施形態では、ステップ(i)において候補分子は、PD-L2によるガレクチン-9の刺激または活性化を模倣する。

1つの特定の実施形態では、ステップ(ii)において候補分子は、PD-L2によるガレクチン-9の刺激または活性化を少なくとも部分的に遮断または阻害する。

【0061】

候補分子は、これらに限定されないが、本明細書中で以前に述べたような抗体または抗

50

体フラグメントなどのペプチドまたはポリペプチドを含むタンパク質、小有機分子、モノ-、ジ-、トリ-、またはポリ-サッカリドなどの炭水化物、脂質、核酸、アプタマー、またはこれらのうちの1つまたは複数を含む任意の分子であることができる。

【0062】

候補モジュレータの設計および/または選別に適用できる技術の非限定的な例は、当技術分野でよく知られているX線結晶学、NMR分光法、コンピュータによる構造データベースの選別、コンピュータによるモデリング、あるいは分子の結合相互作用を検出する生化学的または生物物理学的手法を採用することができる。

【0063】

分子の相互作用を同定する生物物理学的および生化学的手法には、例えばコリガン(Co1igan)ら編「タンパク質の科学における最近のプロトコル(CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE)」(ジョン・ウィリー・アンド・サンズ(John Wiley & Sons)、1997~2013年)の第20章中で得られる、競合放射線リガンド結合アッセイ、共免疫沈降法、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET: fluorescence resonance energy transfer)結合アッセイを含む蛍光ベースのアッセイ、電気生理学、超遠心分析法、ラベルトランスマーカー、化学的架橋、質量分光学、微量熱量測定法、表面プラズモン共鳴および光バイオセンサを用いる方法、および量子ドットバイオセンサが挙げられる。ツーハイブリッドおよびファージディスプレイ選別法は、コリガン(Co1igan)ら編「タンパク質の科学における最近のプロトコル(CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE)」(ジョン・ウィリー・アンド・サンズ(John Wiley & Sons)1997~2013年)の第19章中で得られる。

10
20

【0064】

したがって、この方法の最初のステップは、広範な構造的および/または機能的属性、例えば、ガレクチン-9に結合する能力および/または、そうでない場合はPD-L2のガレクチン-9との結合と競合する能力、あるいはPD-L2の多量体化を妨害または阻害する能力、に従って選択される複数の候補分子の同定を含むことができる。

【0065】

この方法は、その候補分子に応じたガレクチン-9と関係のある1つまたは複数の生物学的活性の変化を測定または検出する更なるステップを含むことができる。それらには、これらに限定されないがガレクチン-9細胞内シグナル伝達と、サイトカイン産生と、腫瘍の攻撃からの防御と、病原体または病原体由来の分子(例えばワクチン)による免疫感作の増強と、自己免疫、炎症、またはアレルギー反応の抑制と、in vitroまたはin vivoでのT細胞記憶の誘発との活性化または阻害が挙げられ得る。ガレクチン-9と関係のある1つまたは複数の生物学的活性のこのような変化を測定または検出するための方法およびプロトコルは、当業者によく知られており、それらの少なくとも幾つかを下記の実施例中で詳細に示す。

30

【0066】

本明細書中で以前に述べた方法によればガレクチン-9アゴニスト、アンタゴニスト、および/またはインヒビターが有用であることが分かるはずである。

40

本明細書中で開示される本発明は、ガレクチン-9またはその機能的ホモログを発現させる任意の哺乳動物において実施することができる。好ましくは、その哺乳動物はヒトである。

【0067】

本発明の特定の実施形態が容易に理解および実施され得るように、下記の非限定的実施例が参照される。

(実施例)

PD-L2およびガレクチン-9

sPD-L2は有益な効果を有することができるが、それはPD-1に関するリガンドの競合によるものであるというのが科学的コンセンサスであった。PD-L1がPD-1

50

に結合すると、それは免疫応答を中断し、一方、PDL2は、PD1の結合に関してPD-L1と競合することによって拮抗作用を有することができる。PD-L2自体のプラスの刺激効果についてはほとんど報告がないように思われる。ガレクチン-9に関して、これはTim3のリガンドであると考えられているが、Tim3はガレクチン-9の結合によって誘導または仲介されるT細胞の枯渇の一因となる免疫モジュレータである。T細胞の枯渇を回避するために、多くの開発作業は、ガレクチン-9/Tim3相互作用を抗体で遮断して、それにより免疫応答を高めることに注力している。それは、ガレクチン-9を作動させて免疫応答の向上を達成することを追求する本発明とはやや反対の方向に進んでいる。しかしながら、最近の研究論文は、ガレクチン-9とTim3とが相互に作用しない（少なくともヒトでは）ことを認識しており（ライトナー（Leitner）ら、2013年）、したがって、このコンセンサスは変わりつつある可能性がある。ガブリエル（Gabriel）ら、2009年による概説では、ガレクチン-9のマウス、ウサギ、およびラットへの投与は、本明細書中で述べたものと逆の効果を有する（少なくとも活性化T細胞において）ことが示唆され、ナイーブT細胞においても逆の効果を有することが予想されている。さらにガブリエル（Gabriel）らは、胸腺微小環境ではガレクチン-1、ガレクチン-3、ガレクチン-8、およびガレクチン-9が、ダブルネガティブ（CD4⁻CD8⁻）またはダブルポジティブ（CD4⁺CD8⁺）の胸腺細胞のアポトーシスを誘発すると結論を下し、これは中枢性トレランスの調節においてこれらのガレクチンが果たし得る役割を示唆している。ここでもまた、この概説は本発明と著しく異なっている。

10

20

【0068】

マラリア

マラリア、HIV、およびTBなどの幾つかの疾患は、世界中で毎年数百万人の個体の病的状態および死亡を引き起こしている。これらの病原体は免疫性を回避する幾つかのメカニズムを進化させているため、ワクチンの開発が大きい課題となっていることが分かっている。HIVおよびプラモジウム種（plasmodium spp）（マラリアの原因物質）が免疫性を逃れるメカニズムとして、プログラム細胞死-1（PD-1）の経路が関与しているとされてきた。したがって、本発明者らは、マラリアのマウスモデルを使用して、この経路が免疫性をどのように損ない得るかを調べた。

30

【0069】

マラリアは、毎年3～5億人の個体に感染し、数百万人を殺す。抗体に仲介される防御に基づくマラリアワクチンの40超の臨床試験が行われているが、1つのみが第I Ig相に達した。マラリアへの終生曝露でさえ保護的抗体反応を誘発しないことがあり（エガン（Egan）ら、1995年；エガン（Egan）ら、1996年）、血液期の熱帯熱マラリア原虫（plasmodium falciparum）（Pf）に感染した幼児は、事前に存在する抗マラリア抗体のレベルの急速な減退を経験する（アクポゲネタ（Akpogheneta）ら、2008年；キンヤンジュイ（Kinjyaniyu）ら、2007年）。220人の個体から採取した血漿で精査した、約23%の熱帯熱マラリア原虫（P. falciparum）タンパク質プロテオームを含有するタンパク質マイクロアレイを使用したより詳細な研究は、これらのタンパク質に対する抗体の応答性がマラリアの季節の期間には劇的に上昇するが、短命であることを確かめた（クロンプトン（Crompton）ら、2010年）。マラリア流行地の子供から採取した抗原特異的記憶B細胞（MBC：memory B cell）を測定した以前の研究は、マラリアへの多数回曝露が、循環性抗原特異的MBCの安定な集団を発生させないことを見出した（ドルフマン（Dorffman）ら、2005年）。さらに長期にわたる研究は、最近、Pf特異的MBCおよび抗体の両方の力値が急性のマラリアの後に増加した後、6ヶ月以内には感染前のレベルよりわずかに高い点にまで縮小することを示しており、これはPf特異的MBCおよび長命抗体区分の両方の非効率的な段階的な増殖を示唆しており、それは子供ではなぜ免疫が不十分であるか、また発生させるのに数年を要するかを説明し得る（ワイス（Weiss）ら、2010年）。主にアフリカに拠点を置くこれらの研究とは

40

50

対照的に、マラリアの地方的流行がはるかに低いタイでは、過去6年間に熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)および/または三日熱マラリア原虫(*P. vivax*)の文書化された臨床的発症があったことが知られている個体は、抗原特異的抗体および/または安定した頻度の抗原特異的MBCを有した(ウィパサ(*Wipasa*)ら、2010年)。

【0070】

CD^+4T 細胞は、特定の病原体に対して急激な免疫応答を形成する数種類のヘルパーサブタイプからなる。マラリアの期間中、 CD^+4T 細胞サブセットは、防御、発症機序(*pathogenesis*)、かつまた免疫応答からの逃避において複数の役割を有する。 CD^+4T 細胞は、マウスでの実験的マラリアの期間中のインターフェロン-（*IFN-*）および腫瘍壞死因子（*TNF-*）の両方（これらはこの疾患に対する防御に関与する）の主要な源であることが実証された（ムクセル(*Muxel*)ら、2011年）。プラスモディウム・シャバウディ(*P. chabaudi*)マラリアに感染したマウスでの研究は、*IFN-*と*TNF-*とが協働して脾臓中で一酸化窒素合成酵素の発現を誘発して、寄生虫負荷のピークを制御することを示した（ヤコブス(*Jacobs*)ら、1996年）。同様にヒトにおいて、*Pf*に対する早期INF-応答は、より良好な抗寄生虫免疫性と相關する（マッコール(*McCull*)ら、2010年）。INF-

は、マラリアに対する防御反応の広大なネットワークに貢献する。これは、マッコール(*McCull*)およびサワーベイン(*Sauerwein*)、2010年によって要約されている。特に注目すべきなのはMSP1特異的トランスジェニック CD^+4T 細胞に及ぼす慢性マラリアの影響を調べた研究である（スティーヴンス(*Stephens*)およびラングホーン(*Langhorne*)、2010年）。これらの寄生虫特異的T細胞を $Thy1.1$ コンジェニックマウスに播種し、次いでそれを 10^5 個のプラスモディウム・シャバウディ(*Plasmodium chabaudi*)に感染した赤血球に感染させた。これらのマウスの2分の1を30~34日目にクロロキンで処理して慢性マラリアを除去した。60日後、トランスジェニックT細胞のフローサイトメトリ解析により、未処理マウスでは、感染が除去された薬剤処理マウスと比較して記憶 $CD44^+IL-7R^+CD^+4T$ 細胞の約25%が失われたことを見出した（スティーヴンス(*Stephens*)およびラングホーン(*Langhorne*)、2010年）。この研究は、進行中の感染症が、再感染から防御する能力のある幾らかの寄生虫特異的記憶T細胞の喪失を引き起こすことを浮き彫りにする。

【0071】

プログラム死-1(*PD-1*)およびマラリア

*PD-1*はマラリアの発症機序に関与している。慢性および致命的マラリア、ならびに再感染からの長期の防御に対する免疫性における*PD-1*の役割を理解するために、*C57/B16(WT)*マウスおよび*PD-1*遺伝子が欠失した*C57/B16*マウス(*PD-1KO*)のコホートを非致死性の 10^5 個のプラスモディウム・シャバウディ(*P. chabaudi*)（慢性マラリア）または致死性のプラスモディウム・ヨエリ(*P. yoelii*)YMが寄生した赤血球(*PRBC*)に感染させ、血液を1~2日ごとに寄生虫血症について調べた。40日後、すべての生存しているマウスを140日間休養させて、一次免疫細胞を、記憶細胞のみが生存している小康状態にさせた。次いで180日目にこれらのマウスを対応する寄生虫に再感染させた（図1aおよびb中の矢印）。本発明者らは、非致死性プラスモディウム・シャバウディ(*P. chabaudi*)に感染させたすべての*WT*マウスの一次感染が約35日間で除去されたことを見出した（図1a）。これらの*WT*マウスを180日目に再感染させた場合、すべてのマウスが、最初の感染よりもはるかに低いレベルではあるが寄生虫血症を発症した（図1a）。それとは対照的に、*PD-1KO*マウスのプラスモディウム・シャバウディ(*P. chabaudi*)感染は15日間で除去され、マウスの20%のみが30日目前後に悪性度の低い再発感染を経験した（図1b）。再感染時に9/9の*PD-1KO*マウスは寄生虫血症を示さず（図1b）、血液をナイーブマウスに移植した場合、無菌免疫を有した（データは示さない）。

10

20

30

40

50

【0072】

WTマウスを致死性プラスモディウム・ヨエリ(*P. yoelii*)YMに感染させた場合、すべてのマウスが感染から7日間以内に死亡した(図1a)。それとは対照的に、10/10のPD-1KOマウスは、致死性プラスモディウム・ヨエリ(*P. yoelii*)YM感染および180日後の再感染から生存した。注目すべきことに、再攻撃されたマウスの40%のみが低レベルの寄生虫血症を経験した(図1b)。これらの研究は、PD-1経路が慢性および致死性マラリアを促進させ、再感染に対する最善の長期にわたる防御を妨害することを示す。

【0073】

マラリアの期間中のCD4⁺T細胞の枯渇

マラリアの期間中のPD-1の発現を調べた最初の研究の1つは、マウスマodelを使用して、IL-7R¹発現CD4⁺およびCD8⁺T細胞上でのPD-1の発現を示した(チャンデレ(*Chandele*)ら、2011年)。これらのPD-1を発現する細胞(特にCD8⁺T細胞)は、感染から30日間以内にほとんど完全に失われた(チャンデレ(*Chandele*)ら、2011年)。しかしながら、この研究は、T細胞の枯渇を同定するために機能的応答を測定していなかった。同様に後続の研究は、PD-1が、マリおよびケニアのPfに感染した個体の血液中のCD4⁺T細胞(バトラー(*Butler*)ら、2012年; イリングウォース(*Illingworth*)ら、2013年)およびCD8⁺T細胞(イリングウォース(*Illingworth*)ら、2013年)上でも発現したことを示したが、枯渇の機能的証明は提供されなかった。

10

20

【0074】

これらの観察結果を立証するために、赤血球期マラリアのネズミモデルを採用して、CD4⁺T細胞に及ぼすPD-1およびLAG-3の発現の増加の影響を調査した(バトラー(*Butler*)ら、2012年)。マウスのプラスモディウム・ヨエリ(*P. yoelii*)およびプラスモディウム・シャバウディ(*P. chabaudii*)マラリアの期間中における抗体によるPD-L1およびLAG-3阻害性分子の複合遮断は、寄生虫血症の除去を促進した(バトラー(*Butler*)ら、2012年)。このPD-L1およびLAG-3の二重遮断は、抗体に仲介される高い免疫性と相関関係があるCD4⁺滤胞性Tヘルパー細胞(*T_{FH}*)の数を向上させた(バトラー(*Butler*)ら、2012年)。さらに、感染後8および9日目に抗マラリア薬のクロロキンで処理した感染マウスは、より低いレベルのCD4⁺T細胞の機能不全を示した(バトラー(*Butler*)ら、2012年)。これらの研究は、リンパ球の枯渇がマラリアに対する免疫性を調節することを示した。

30

【0075】

後続の研究は、PD-1が欠失したマウス(PD-1KO)を使用し、PD-L1がB7-1(ブッテ(*Butte*)ら、2007年)およびPD-1(イワイ(*Iwai*)ら、2003年)の両方と特異的に相互に作用してT細胞活性化を阻害することができると思定して、PD-1が免疫性を調節する役割を有するかどうかに確定的に判断を下した。プラスモディウム・シャバウディ(*P. chabaudii*)マラリアが、その感染が慢性感染を生じさせていたので調べられた。マラリアの慢性期の期間中(35日目)において、増殖しあつIFN- γ およびTNF- α を分泌するという寄生虫特異的CD4⁺T細胞の能力の低下(これは、これらの細胞の枯渇を表している)を、PD-1が仲介することが示された(ホーン・デベット(*Horne-Debets*)ら、2013年)。しかしながら、PD-L1/LAG-3複合遮断の研究とは対照的に、*T_{FH}*の数の変化は観察されなかった。この明白な矛盾についての1つのあり得る説明は、PD-1KOマウスの制御性T滤胞性細胞(*T_{FR}*細胞)の比率がWTマウスと比べて著しく高かったことである(ホーン・デベット(*Horne-Debets*)ら、2013年)。*T_{FR}*細胞は、*in vitro*で抑制性であることと、*in vivo*で*T_{FH}*細胞およびGCB細胞の数を制限することとが知られている(リンターマン(*Linterman*)、2011年)。あるいは、PD-L1もB7-1と特異的に相互に作用してT細胞活性化を阻害するこ

40

50

とができる（ブッテ（Butte）ら、2007年）ため、この経路がPD-1KOマウスの T_{FH} 数を制御するのかもしれない。

【0076】

CD8⁺T細胞および枯渴

PD-1が仲介する細胞の枯渴は、CD8⁺T細胞の枯渴と最もよく関連付けられている。しかしながら、前に述べたように、脳マラリアの発症機序および脾臓構造の損傷におけるCD8⁺T細胞の役割（ビーティ（Beattie）ら、2006年）は知られているが、血液期マラリアの除去におけるそれらの役割はそれほど広く認められていない。極めて重要なことに、PD-1は、急性期のマラリアの期間中の寄生虫特異的CD8⁺T細胞数および機能的能力の95%の損失を仲介し、感染を悪化させて慢性マラリアを引き起こすことが最近示された（ホーン・デベット（Horne-Debets）ら、2013年）。この研究は、100%のマウスが慢性感染症を発症する野生型（WT：wild type）と比較して、PD-1KOマウスの慢性マラリアの進行を調べた。興味深いことに、PD-1KOマウスの30%未満が慢性感染症を発症し、これらのマウスの寄生虫血症レベルは、WTマウスの100分の1未満であった。しかしながら、PD-1KOマウスにおけるCD8⁺T細胞枯渴は、寄生虫血症のピークを2倍に増加させ、PD-1KOマウスの100%が慢性マラリアを発症した（ホーン・デベット（Horne-Debets）ら、2013年）。全体としてPD-1は、マラリアの慢性期の間の四量体⁺CD8⁺CD62L⁻T細胞の数の80%の減少、およびCD8⁺T細胞が寄生虫に応答して増殖する能力の95%の減少を仲介した（ホーン・デベット（Horne-Debets）ら、2013年）。特に注目すべきことは、たとえPD-1KOマウスがWTマウスよりも多くの機能的CD4⁺T細胞および同様の力価の寄生虫特異的抗体を有したとしても、CD8⁺T細胞が枯渴した場合、それらが依然として慢性マラリアを発症したことである。

10

20

30

40

【0077】

最後に、PD-1KOマウスは、WTマウスよりも多いグランザイムB発現CD8⁺T細胞を有しており、これは感染細胞の細胞傷害性の死滅（cytotoxic killing）が関係していることを示唆している。これらの観察結果は、慢性マラリアに対する防御におけるCD8⁺T細胞の決定的な役割を浮き彫りにする。それとは対照的に、以前の研究は、PD-L1の遮断が、病原性CD8⁺T細胞によって仲介される実験的脳マラリアを増加させることを見出しており（ハファラ（Hafala）ら、2012年）、これは、その経路が脳マラリアから防御することを表している。これらの発見の臨床的意義は、マラリアに感染した個体由来のヒトCD8⁺T細胞がPD-1を発現していることを見出したケニアでの研究によって浮き彫りにされた（イリングウォース（Ilingworth）ら、2013年）。したがって、CD8⁺T細胞の役割については、強烈なPfの伝染に数年曝露したにもかかわらず、なぜ後天的な無菌免疫の証拠が存在しなかったかを説明することができるような特定の検討材料が必要である（トラン（Tran）ら、2013年）。それは、抗体およびCD4⁺T細胞は、症候性マラリアに対する防御を与えるが、無菌免疫のためにはCD8⁺T細胞が必要であるということであり得る。したがって、PD-1に仲介されるCD8⁺T細胞の枯渴の場合、最近報告されたように無菌免疫は決して得られない（トラン（Tran）ら、2013年）。

30

【0078】

DCおよびマラリア

マラリアの期間中にCD4⁺T細胞が寄生虫血症の一次ピークを除去し、B細胞が残りの寄生虫を除去することが立証されている。T細胞活性化はDCを必要とするため、本発明者らは、マウス寄生虫の5種類の株のDC機能を比較し、再検討されているように（ワイクス（Wykes）およびグッド（Good），2008年）、寄生虫の致死性および非致死性の株と種との間に、DCの表現型および機能の二分対立（ワイクス（Wykes）ら、2007年a；ワイクス（Wykes）ら、2007年b）を見出した。これらの研究はまた、非致死性のプラスモディウム・ヨエリ（P.yoelii）17XNLおよ

40

50

びプラスモディウム・シャバウディ (*P. chabaudi*) による感染症由来の DC が完全に機能的であり、具体的には、多量の IL-12 を分泌することを発見した (ワイクス (Wykes) ら、2007年 a ; ワイクス (Wykes) ら、2007年 b)。それに反して、寄生虫の 3 種類の致死性株、プラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) YM、プラスモディウム・ビンケイ (*P. vinckei*)、およびプラスモディウム・ベルゲイ (*P. berghei*) に感染したマウス由来の DC は、それらが T 細胞を刺激したり IL-12 を分泌したりすることができないため、機能性を欠く (ワイクス (Wykes) ら、2007年 a ; ワイクス (Wykes) ら、2007年 b)。非致死性のプラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) 17XNL に感染させたマウス由来の DC をナイーブマウスに移植した場合、受容マウスは致死性感染による攻撃から生存し、この効果は IL-12 によって仲介された (ワイクス (Wykes) ら、2007年 a)。さらに他のグループもまた、マラリアの期間中に DC 機能が損なわれることを示した (グッド (Good) ら、2005年 ; オカナ - モーグナ (Ocana - Mognier) ら、2003年 ; アーバン (Urban) ら、1999年 ; アーバン (Urban) ら、2001年)。

10

【0079】

PL-L2 は主に DC によって発現し、一方、PD-L1 は DC を含む一連の細胞上で発現することが知られている。したがって、ナイーブおよび感染マウス由来の DC が、次に PD-L2 の発現について調べられた。PD-L2 の mRNA レベルが、ナイーブマウス由来の、および非致死性のプラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) 17XNL または致死性のプラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) YM に感染したマウス由来の DC 中で測定された (図 2)。致死性の感染由来の DC は、PD-L2 の mRNA の約 50 % の増加を示し、一方、非致死性の感染由来の DC は、タンパク質発現の 300 % 近い増加で応答した。この研究は、PD-L2 の発現が高いほど、より良好なマラリアからの生存と相関関係があることを示した。

20

【0080】

マラリアの期間中の PD-L2 の保護的役割

DC によって発現した PD-L2 が保護的であるかどうかに取り組むために、WT マウスを非致死性マラリアに感染させ、PD-L2 特異的遮断抗体で処理して、この分子の機能を阻害した。この実験のために WT マウスの数個のコホートをプラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) 17XNL およびプラスモディウム・シャバウディ (*P. chabaudi*) に感染させ、感染から 1 日後および感染後 14 ~ 18 日目まで、3 ~ 4 日ごとに抗 PD-L2 または対照ラット IgG (対照 Ig) のいずれかで処理した。

30

【0081】

対照 Ig を受けたすべての WT マウス (図 3a および b) は、30 ~ 37 日間で特許 (patent) 感染が除去された。しかしながら、プラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) 17XNL と PD-L2 遮断抗体とを与えられたすべてのマウスは 25 日間以内に、重い症状のために死亡するか安樂死させた (図 3a)。それとは対照的に、慢性プラスモディウム・シャバウディ (*P. chabaudi*) マラリアを有するすべてのマウスは、PD-L2 の遮断から生存したが、それらは対照マウスよりも 16 % 高い寄生虫血症の一次ピーク (対数スケールに注意されたい、* は $p = 0.0048$ を意味する)、感染の慢性期の間のより高い寄生虫血症レベルを有するとともに、感染を除去するのに 4 日間長くかかった (図 3b)。

40

【0082】

DC 上の PD-L2 の発現が不在であるか、または低いためにプラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) YM またはプラスモディウム・ベルゲイ (*P. berghei*) の感染が致死的であるかどうかを判断するために、それらのマウスに sPL-L2 を補つた (図 4 および 5)。このために、WT マウスの数個のコホートをプラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) YM またはプラスモディウム・ベルゲイ (*P. berghei*) に感染させ、感染後 3、5、および 7 日目にそれらに可溶性の組換え PD-L2 ヒト F

50

c 合成タンパク質を与えた。プラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) YM に感染させ、対照ヒト Ig G (対照 Ig) を与えられたすべての WT マウスは 11 日間以内に死亡し、多量体 sPD-L2 を与えられたマウスの 92 % は生存し、25 日間で感染は除去され、寄生虫血症のピークは有意に低かった (図 4 a および b、 $p < 0.001$)。次いで、すべての生存しているマウスを 150 日間休養させ、同じ用量の致死性プラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) YM マラリアで再度攻撃感染させた (追加の PD-L2 なし、図 4 a)。すべてのマウスが最小限の寄生虫血症 (1 % 未満) の状態で生存し、一方、すべての新しい対照マウス (対照 Ig-R) は感染のために死亡した。興味深いことに、二量体 PD-L2 はマイナスの効果を有し、一方、より高い多量体 (例えば十量体 sPD-L2) は強い有益な効果を有した。

10

【0083】

プラスモディウム・ベルゲイ (*P. berghei*) マラリアを有するマウスの分析は、すべての対照マウスが 8 日間以内に脳マラリア症状 (被毛の逆立ち、筋スパズム、昏睡を含む) を発症し (図 5 a)、10 日目までに感染のために死亡する (図 5 b) ことを見出した。それとは対照的に、sPD-L2 で処理されたすべてのプラスモディウム・ベルゲイ (*P. berghei*) 感染マウスは脳症状を発症せず、約 15 日間感染を制御下に置いたが、すべてがコントロール不能の寄生虫血症により 25 日目に死亡した。追加の用量はテストされなかった。

20

【0084】

これらの研究は、PD-L2 の発現が免疫性にとって、かつマラリアからの生存にとって必要であることを確かめた。このタンパク質を発現しているマウス中の PD-L2 の遮断は、致死を仲介するか感染を悪化させた。それとは対照的に、マウスは、それらの DC が PD-L2 を発現しないときに sPD-L2 を補った場合、致死性の感染から生存するか、脳症状がないままであった。

20

【0085】

PD-L2 は CD4 T 細胞による防御を仲介する

sPD-L2 が T 細胞を介して免疫を向上させるかどうかを判断するために、プラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) YM 感染マウスに CD4⁺ または CD8⁺ T 細胞の不在下または存在下で sPD-L2 を与えた。この実験の場合、WT マウスは、プラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) YM 感染の 1 日前および感染後 14 ~ 18 日目まで、3 ~ 4 日ごとに CD4⁺ または CD8⁺ T 細胞枯渇化抗体を与えるか、ラット Ig (Rat Ig) で処理された。次いでマウスは、感染後 3、5、および 7 日目に sPD-L2 または対照ヒト Ig を与えられた。

30

【0086】

対照 Ig を受けたすべての WT マウス (図 6 a) は 14 日目までに死亡するか、安楽死させる必要があった。それとは対照的に、sPD-L2 を与えられたプラスモディウム・ヨエリ (*P. yoelii*) YM 感染マウスの 60 % は生存し、30 日間で感染が除去された。しかしながら、感染 WT マウスは sPD-L2 を与えられたが、CD4⁺ T 細胞が枯渇した場合、すべてのマウスが重い臨床症状を発症したために、それらは死亡するか、安楽死させる必要があった (図 6 a および b)。それとは対照的に、CD8⁺ T 細胞の枯渇は、sPD-L2 処理による致死性マラリアからの生存に影響を与えたかったが、マウスはより高い寄生虫血症を経験した (図 6 c)。総合すれば、これらの観察結果は、sPD-L2 が、CD8⁺ T 細胞機能に及ぼす幾つかの影響を伴って CD4⁺ T 細胞による防御および生存を仲介することを実証した。これらの研究は、sPD-L2 処理後の生存期間中央値が成体マウスの場合よりも低い非常に若いマウスで始められた (成熟マウスを利用できないため)。

40

【0087】

sPD-L2 による防御は PD-L1 機能の遮断によって仲介されない

DC 上での PD-L2 の発現または sPD-L2 処理が防御免疫を仲介することができると想定して、本発明者らは、PD-L2 が、PD-L1 に仲介される免疫性の阻害を遮

50

断することによって防御を仲介することができるという仮説を立てた。この仮説をテストするために、P D - L 1 ノックアウトマウス (P D - L 1 K O 、 n = 4) の 2 つのコホートをプラスモディウム・ヨエリ (P . y o e l i i) YM に感染させ、P D - L 2 の 3 種類の用量または対照 I g G のいずれかで処理した。すべての対照マウスが、重い臨床症状および高い寄生虫血症レベル (約 78 %) により 7 日目までに死亡した (図 7) 。これとは対照的に、P D - L 2 で処理した感染 P D - L 1 K O マウスは寄生虫血症を制御下に置いた (24 %) が 10 日目までに死亡した。この研究は、P D - L 2 によって仲介される防御が P D - L 1 から独立していることを示した。

【 0088 】

C D 4 + T 細胞上のガレクチン - 9 は P D - L 2 の新規な受容体である

10

P D - L 2 が P D - L 1 から独立してマラリアに対して保護的であると想定して、本発明者らは、それがナイーブ T 細胞上に第二の受容体を有するという仮説を立てた。この仮説をテストするために、本発明者らは、ナイーブ C 57 B L / 6 マウス由来の単離 T 細胞のライゼートを調製し、固定化 P D - L 2 またはヒト I g G を使用して受容体を免疫沈降させた (図 8) 。 3 回の独立した実験において、重鎖および軽鎖免疫グロブリン (バンド 1 および 4) 、 s P D - L 2 (バンド 5) 、およびアクチン (バンド 3) を含む 5 本の再現可能なバンドを繰り返し免疫沈降させた。ガレクチン - 9 (バンド 2) は、 P D - L 2 によって免疫沈降されたが、それは 3 回の独立した実験ではヒト I g G によって同等のバンドを免疫沈降させなかった。対照中で N 2 ° および N 2 と呼ばれるバンドはヒストンタンパク質であった。最後に、 s P D - L 2 によって免疫沈降したバンド 2 がガレクチン - 9 であることを確かめるために実験が繰り返されたが、そのゲルをニトロセルロースに転写し、そのウェスタンプロットを抗ガレクチン - 9 抗体で標識した (図 9) 。これらの研究は、 T 細胞から免疫沈降させたバンド 2 の配列決定によって見出された 39 k D のバンドがガレクチン - 9 であり、および潜在的に P D - L 2 の新規な結合相手であることを確かめた。

20

【 0089 】

ナイーブ T 細胞上のガレクチン - 9 は P D - L 2 の受容体である

s P D - L 2 が無傷 T 細胞上でガレクチン - 9 に結合したかどうかを判断するために、ナイーブマウスの脾臓から全 T 細胞集団を単離し、それをビオチン標識した s P D - L 2 および A P C - ストレプトアビジンまたは P E - 抗ガレクチン - 9 と共にインキュベートした (図 10) 。フローサイトメトリ解析は、 s P D - L 2 がナイーブ C D 4 + T 細胞の約 12.8 % に結合したが、ガレクチン - 9 はこれらの細胞の約 1.9 % 上で発現されたに過ぎないことを見出した。過剰な標識していない抗ガレクチン - 9 抗体によるナイーブ T 細胞の前処理は、 s P D - L 2 による標識化を約 3 % 減少させ、これにより s P D - L 2 が T 細胞上でガレクチン - 9 に結合したことが確認された。以前に公表された研究は、ナイーブマウスの脾臓から採取した C D 4 + T 細胞の約 10 ~ 20 % が、 P D - L 2 に結合することができる P D - 1 を発現することを示した。最終的にこのアッセイでは、 s P D - L 2 は有意な数の C D 8 + T 細胞には結合しなかった。

30

【 0090 】

s P D - L 2 および抗ガレクチン - 9 はナイーブ C D 4 + および C D 8 + T 細胞中での生存および分化を仲介する

40

ナイーブマウスから単離した T 細胞を、抗 C D 3 (5 μ g / m L) でコーティングした 96 ウェルプレート中で培養して I L - 2 と共に抗原シグナルを得た。この培養物はまた、 (a) 対照としてのプレートに結合させたラット I g G 、 (b) プレートに結合させた s P D - L 2 、 (c) プレートに結合させた s P D - L 2 並びに抗ガレクチン - 9 (クローン 108A) 抗体の形態のガレクチン - 9 インヒビターで処理された細胞、 (d) ガレクチン - 9 アゴニスト抗体 (クローン R G 9.1) 、および (e) 抗ガレクチン - 9 (クローン R G 9.35) のいずれかで補われた。 s P D - L 2 は、ラット I g G 対照と比べて、 T B E T を発現させる C D 4 + C D 6 2 1 ° 細胞の割合 (図 11 a) および (b) 細胞内の T B E T レベル (図 11 b) を増加させた。この効果は、抗ガレクチン - 9 (クロ

50

ーン 108A) 抗体によって遮断された。クローン RG9.1 もまた、T_{BET} を発現させる CD4⁺CD62¹ 細胞の割合および細胞内の T_{BET} のレベルを増加させた(図 11a および b)。

【0091】

プレートに結合させた PD-L2 および RG.1 (RG9.1) で処理された細胞の生存率は、36 時間後では他の培養物よりも高く、したがってこれらの培養実験の幾つかは、はるかに低い CD3 レベルの刺激(1 μg / mL) による 72 時間培養で繰り返した。図 12 に見られるように、sPD-L2 および RG1 (RG9.1) 抗体は両方とも対照培養物と比較して CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞の生存率を向上させる。

【0092】

可溶性 PD-L2 および抗ガレクチン - 9 抗体は致死性マラリアに対して保護するガレクチン - 9 のシグナル伝達が可溶性 PD-L2 と同じ効果を有するかどうかを判断するために、WT マウスの 3 つのコホートをプラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) YM に感染させ、感染後 3、5、および 7 日目に 200 μg の sPD-L2、抗ガレクチン - 9、またはラット IgG を静脈内に投与した。マウスは毎日監視され、被毛の逆立ち、ハンチング、または活動減退を含む疾患の臨床症状についてスコアを与えられた。sPD-L2 または作動性抗ガレクチン - 9 (クローン RG9.1) を与えられたマウスは最小限の症状を示し、すべての対照マウスが死亡するか安樂死させられたとき、これらの群の 2 / 3 のマウスが生存した(図 12)。

【0093】

ガレクチン - 9 は sPD-L2 の結合相手である
マウスガレクチン - 9 とマウス PD-L2 との結合の生化学的性質を決定するために、オクテット・レッドによる研究が始められた。sPD-L2 がプローブと結合され、その sPD-L2 および s ガレクチン - 9 との相互作用が測定された。図 13 に示すように、その結果は、PD-L2 と PD-1 との間のほとんど瞬時の結合および解離を示す。これは対照的に、ガレクチン - 9 の結合は、PD-L2 と会合するのに約 200 秒、および解離するのに 614 秒超を要し、これは極めて安定な相互作用を示す。最も注目すべきことに、PD-L2 - PD-1 相互作用は 1 : 1 の分子比であり、ガレクチン - 9 と PD-L2 との相互作用は、結合の間のガレクチン - 9 の凝集または多量体化を伴う。これは、なぜ、sPD-L2 の多量体形がマラリアに対して保護的である一方で、単量体または二量体形が保護することができないかを説明するのに役立つ。単量体および多量体 sPD-L2 による保護を比較した本発明者らの研究は、マウスの 77 ~ 92 % を保護する多量体 sPD-L2 と比較して、単量体 sPD-L2 が致死性のプラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) YM マラリアからマウスを保護しない(n = 4)、または脳マラリアを防がない(n = 3) ことを見出した(図 4)。さらに、単量体 sPD-L2 は脳マラリアを悪化させ、これは単量体 sPD-L2 が sPD-L2 のガレクチン - 9 との相互作用を遮断することを示唆する。したがって、適用される sPD-L2 の形態は、免疫応答の性質を制御するために使用することができる(例えば、多量体形を投与してマラリアまたは癌に対して防御することができ、単量体形を投与して免疫システムを下方制御し、喘息またはクローン病などの炎症性または自己免疫性疾患を治療することができる)。この点では、in vivo で PD-L2 の多量体化を促進させる作用物質、例えばアプタマーおよび二重特異性抗体の使用も本発明において役立つ。アプタマーは、広範囲の標的分子と特異的に結合することができる小型のオリゴヌクレオチドであり、治療薬として抗体を上回る幾つかの利点を提供する。それらは多量体 PD-L2 を模倣し得る。

【0094】

抗ガレクチン - 9 抗体は培養中にマウス CD4⁺ T 細胞を活性化して Th1 サイトカインを分泌させる

DC によって発現したガレクチン - 9 はまた、T 細胞上の TIM-3 のリガンドでもある(ズー(Zhu)ら、2005 年)。可溶性ガレクチン - 9 に誘導される Th1 細胞の死は、in vitro では TIM-3 によって決まり、in vivo でのガレクチン

10

20

30

40

50

-9タンパク質の投与は、インターフェロン- α を産生するT細胞の選択的喪失を引き起こす（ズー（Zhu）ら、2005年）。T細胞によって発現されるガレクチン-9の役割はあまり明確ではない。本発明者らは、最初に3種類の抗ガレクチン-9抗体をテストし、2/3が活性化していることを見出した（データは示されない）。本発明者らは、in vitroで精製されたT細胞に及ぼす最強の刺激活性を有する同時刺激抗ガレクチン-9抗体の影響を分析した。本発明者らは、マウスの脾臓から単離し、抗CD3抗体でコーティングしたプラスチックプレート上で培養されたCD4 $^{+}$ T細胞に及ぼす対照IgG、可溶性のマウスPD-L2-Ig、または抗マウスガレクチン-9 mAbの影響を評価した。培養の3日後、上清をサイトカインについてテストした。IgGによる対照培養物と比較して固定化PD-L2および抗ガレクチン-9の両方が、IL-2（約4倍）、IFN- γ （約4倍）、およびTNF- α （60%）の分泌を有意に増加させることができた。これらの研究は、マウスPD-L2について以前に報告された（シン（Shin）ら、2003年）ように、PD-L2および抗ガレクチン-9の両方がマウスT細胞に同時刺激シグナルを与えてTh1応答を向上させていることを確かめた。
10

【0095】

ヒトCD4 $^{+}$ T細胞について実施された同様のアッセイもまた、sPD-L2がTh1サイトカインの分泌を増加させ得ることを示した（図15A）。

本発明者らは、ヒトCD4 $^{+}$ T細胞によるサイトカイン産生を刺激する抗ヒトガレクチン-9抗体を発見することができなかったため、本発明者らは抗マウスガレクチン-9抗体をテストした（図15B）。この抗マウスガレクチン-9抗体は、インターフェロン- γ （他のサイトカインではなく）の分泌をヒトsPD-L2によって誘導されるレベルまで誘導した。
20

【0096】

抗ガレクチン-9はマラリアに対して防御する

抗ガレクチン-9抗体が、可溶性PD-L2で処理することによって見られるのと同じ防御を提供し得ることを確かめる（図4）ために、WTマウスを致死性プラスモディウム・ヨエリ（P.yoelii）YMに感染させ、対照ラットIg、ブロッキング抗Tim-3、または抗マウスガレクチン-9のいずれかで処理した（図16aおよびb）。反復実験では、抗体に仲介されるTIM-3（ガレクチン-9の別の受容体）の遮断によって防御が与えられないのに対し、抗ガレクチン-9抗体の3回投与はマウスの75%の生存を仲介した。Tim-3の遮断は、対照ラットIg処理マウスと比較して顕著な防御を提供しなかった。
30

【0097】

抗ガレクチン-9は腫瘍の進行を緩和する

Th1 CD4 $^{+}$ T細胞免疫も腫瘍を除去するのに極めて重要であると想定して、次に2種類の同系マウスの乳癌モデルにおいて抗ガレクチン-9抗体の活性化をテストした。各受容マウスの第四左乳腺脂肪体中に同所性注射される抗ガレクチン-9抗体の4回投与は、触診可能なPYMT由来の乳癌の成長を遅らせることができた（図17a）。16～22日目に与えられた抗ガレクチン-9処理は、アイソタイプ対照群と比較して27日目～35日目の腫瘍の進行を遅らせた。以前の研究は、CTL-A-4またはPD-1/PD-L1の遮断と組み合わされたTreg細胞除去が、同じ同所性移植されたPYMTで引き起こされる乳癌に影響を与えるかどうかを調べた（ボス（Bos）ら、2013年）。Treg細胞除去は、原発性および転移性腫瘍の進行を有意に遅らせるが、チェックポイント阻害は癌遺伝子で引き起こされる腫瘍の成長に影響を与えないことが見出された。次いで本発明者らは、8～10日目に与えた抗ガレクチン-9の3回投与が侵攻性の転移EO771.LMB乳腺腺癌の成長を遅らせることができるかどうかをテストした（ジョンストン（Johnstone）ら、2015年）。すべての対照マウスが15日目までに安樂死させられたが、15日目の対照マウスと比較して15～16日目の処理マウスの腫瘍は35%小さかった（図17b）。全体的に見て、抗ガレクチン-9活性化処理は、同所性移植された乳癌の進行を緩和した。
40
50

【0098】

P D - L 2 の遮断は T b e t + T h 1 応答を阻害しうる

P D - L 2 が in vivo での T b e t および T h 1 免疫を制御したことを確かめるために、本発明者らは、マウスをプラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) 17XNL マラリアに感染させ、血中で寄生虫が検出可能になったときにモノクローナル抗体で P D - L 2 を遮断した。この実験の場合、WT マウスをプラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) 17XNL に感染させ、感染後 (p. i. : post-infection) 4 日間および感染後 14 ~ 18 日目まで、3 ~ 4 日ごとに抗 P D - L 2 または対照ラット IgG のいずれかを与えた。まず T b e t 、すなわちマラリアに対する防御を仲介することが知られている T h 1 CD 4⁺ T 細胞のエフェクター機能に必要とされる転写因子の発現について、CD 4⁺ T 細胞を調べた (イング (Ing) およびスティーヴンソン (Stevenson) 、2009 年; スティーヴンス (Stephens) およびラングホーン (Langhorne) 、2010 年)。T 細胞はまた、CD 62L 、すなわちナイーブ T 細胞上で見出され、かつまたセントラルメモリー (CD 62L^{hi}) T 細胞とエフェクターメモリー (CD 62L^{lo}) T 細胞を区別するマーカの発現についても評価された。感染から 7 日後の P D - L 2 の遮断により、脾臓 T b e t 発現 CD 4⁺ T 細胞の数は下がる傾向がある (図 18 a)。しかしながら、14 日目までに、対照マウスは、脾臓 1 個当たりの T b e t 発現 CD 62L^{hi} および CD 62L^{lo} T 細胞を、P D - L 2 を遮断されたマウスのそれぞれ 2.2 倍および 3 倍で有していた (図 18 b)。同様に、14 日目に E L I S P O T アッセイによって測定された対照マウスの IFN- γ を分泌する寄生虫特異的 CD 4⁺ T 細胞の数は、P D - L 2 を遮断されたマウスの 5 倍超であった (図 18 c)。複数の細胞により分泌され得る血清 IFN- γ のレベルは、P D - L 2 を遮断したマウスでは 7 日目に減少し、14 日目までにマウスの両方の群で低くなかった (図 18 d)。これとは対照的に、P D - L 2 を遮断したマウスの血清 IL-10 は、14 日目までに対照マウスの 2 倍超になった (図 18 e)。この結果は、脾臓 1 個当たりの制御性 T 細胞 (T_{REG}) の数が 2.6 倍と高いことと相関関係がある (図 18 f)。プラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) 17XNL に感染させた P D - L 2 KO マウスによる研究はまた、T b e t を発現しつつ IFN- γ を分泌する寄生虫特異的 CD 4⁺ T 細胞の脾臓 1 個当たりの数が、14 日目において感染 WT マウスと比較して有意に低いことを見出した (図 19 c, d)。最後に、P D - L 2 KO マウスまたは抗体による P D - L 2 の遮断のいずれかにより、感染から 14 日目までに IFN- γ を分泌する寄生虫特異的 CD 8⁺ T 細胞の数が下がる傾向があった (図 19 e, f)。

【0099】

総合すると、本発明者らのデータは、P D - L 2 の発現がプラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) 17XNL マラリア感染の期間中の効果的な T h 1 CD 4⁺ T 細胞応答にとって必要であることを示した。意義深いことには、P D - L 2 の遮断は、プラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) 17XNL 感染から 7 日目 ~ 14 日目におけるこれらの細胞数の増加を妨害するので、T b e t 発現 CD 4⁺ T 細胞の最適増殖のために P D - L 2 を必要とする。注目すべきことに、機能的な寄生虫特異的 IFN- γ 分泌 CD 4⁺ T 細胞は 7 日目には存在したが、P D - L 2 シグナルの不在下では 14 日目までに減少し、このことは、そうしたシグナルがこれら重要なエフェクター細胞の増殖および生存を向上させたことを示している。これらの発見に照らすと、プラスモディウム・シャバウディ (P. chabaudi) 感染マウスは、寄生虫の大部分が 10 日間以内に除去されるため、P D - L 2 遮断から生存する可能性が高いが、プラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) 17XNL 実験は、P D - L 2 のみが最初の 1 週間後の長期的な免疫を向上させることを示した。したがって、P D - L 2 は感染から最初の 1 週間後のみ、T h 1 CD 4⁺ T 細胞数を維持するのに必要である。

【0100】

T - box 転写因子 T - b e t は、樹状細胞およびナチュラルキラー細胞だけでなく、T および B リンパ球中でエフェクター細胞の運命の確立および / または維持において重要

10

20

30

40

50

な役割を果たす 1 型様免疫性の主要な調節因子として出現した。T - bet は Th 1 のエフェクター機能の維持において重要な役割を果たしていると考えられる。T - bet 欠乏マウスは、主として CD 4 および T 細胞の欠陥 IFN - の産生を含む、正常に機能しない Th 1 の分化を実証する。

【 0101 】

Th 1 応答は、長い間にわって自己免疫症候群と関連付けられてきた。一般に、Th 1 関連症候群と考えられてきたセリック病およびクローン病の両方が、高い T - bet 活性および / または発現を示す。Th 1 関連 IBD マウスモデルにおいて重症複合免疫不全 (scid : severe combined immunodeficient) 受容体中への CD 4 + CD 62 L + 細胞の養子移植は、T - bet の欠乏が疾患から防御する一方で、T - bet 過剰発現は疾患を促進させることを示した。これはまた、多発性硬化症 (ラック (Rack) ら、2014 年)、炎症性関節炎 (ワング (Wang) ら、2006 年)、糖尿病 (ジューデス (Ju edes) ら、2004 年)、ベーチェット症候群 (リー (Li) ら、2006 年)、およびフォークト小柳 - 原田 (VKH) 病 (リー (Li) ら、2005 年) にも当てはまる。したがって、PD - L 2 / ガレクチン - 9 経路の遮断は、T bet を遮断するため、自己免疫疾患の治療の新しい方法を提供することが期待できる。

10

【 0102 】

致死性マラリアからの sPD - L 2 を介した生存は CD 4 + T 細胞を必要とするプラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) YM マラリアからの多量体 sPD - L 2 に仲介される生存への T 細胞の貢献を判断するために、sPD - L 2 で処理した感染マウスの CD 4 + または CD 8 + T 細胞を枯渇させた。この実験の場合、WT マウスの複数群をプラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) YM に感染させ、sPD - L 2 またはヒト IgG (hIgG) で処理した。これらのマウスはまた、感染後 1 日目および 14 ~ 18 日目まで、3 ~ 4 日ごとに CD 4 + または CD 8 + T 細胞枯渇化抗体またはラット Ig を与えられた。以前の研究は、その使用される抗体がそれらの細胞を枯渇させることになることを確認した。hIg およびラット Ig を受けた感染 WT マウスのすべてが 14 日目までに死亡するか、安樂死させる必要があった (図 20 a および b)。これとは対照的に、sPD - L 2 および対照ラット Ig を与えられたプラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) YM 感染マウスの 75 % は、30 日間以内に寄生虫血症が除去され、モニタリングが終了したときに 50 日間超にわたって生存した (図 6 a および b)。しかしながら、CD 4 + T 細胞が枯渇した場合、sPD - L 2 によって保護されず、臨床症状の重症度のために安樂死させる必要があった (図 20 a, c)。これとは対照的に、CD 8 + T 細胞の枯渇は、sPD - L 2 によって与えられる保護効果に有意な影響を与えたかったが、これらのマウスの 11 ~ 21 日目前後の寄生虫血症は対照マウスよりも一貫して高かった (図 20 a, d)。総合すると、これらの発見は、sPD - L 2 は、CD 4 + T 細胞によりプラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) YM 感染からの防御、生存、および寄生虫防除を推進することができ、CD 8 + T 細胞からの可能な貢献は比較的重要でないことを実証する。

20

30

【 0103 】

sPD - L 2 は CD 4 + および CD 8 + T 細胞機能の向上により防御および生存を仲介する

40

sPD - L 2 がその治療効果を発揮するメカニズムを確定するために、プラスモディウム・ヨエリ (P. yoelii) YM 感染マウスを 3 日目および 5 日目に対照 Ig または sPD - L 2 で処理し、対照マウスにおいて重い臨床症状が始まる前の 7 日目に脾臓を回収した。脾臓から T 細胞を単離し、それをナイーブマウス由来の脾臓 DC と、寄生虫特異的抗原 (MSP 1, 9) またはペプチド (Pb 1, SQLLNKYL) と共に、または追加の抗原なしで培養した。sPD - L 2 による処理は、培養中に MSP 1, 9 に応答することができる寄生虫特異的 CD 4 + T 細胞の数を増加させ、IFN - 分泌 CD 4 + T 細胞の数 (ELISPOT アッセイによって測定される) は対照 Ig で処理したマウスの

50

約2.7倍であった(図21a)。同様に、*in vitro EdU*取込みアッセイは、sPD-L2処理マウスの寄生虫抗原に応答して増殖する寄生虫特異的T細胞の数がより多いことを確かめた(図21b)。しかしながら、コホート間のT_{REG}の数には差がなかった(図21c)。さらに、sPD-L2処理マウスの寄生虫特異的CD8⁺T細胞の数(すなわち、寄生虫特異的ペプチドF4を表すMHC四量体(D^b)に結合したもの(ラウ(Lau)ら、2011年))がまた、対照群の6倍であることを示した(図21d)。しかしながら、7日間以内のこれらの細胞によるINF- 分泌(図21e)またはグランザイムB発現(図21f)の有意な増加はなかった。総合すると、これらの結果は、IFN- 分泌CD4⁺T細胞の発達(これは、マラリアに対する防御に欠かせないことが知られているTh1エフェクター機能の向上を表す)を促進させることにより、sPD-L2が致死性マラリアからマウスを守ることを示す(クマー(Kumar)およびミラー(Miller)、1990年;スティーヴンス(Stephens)およびラングホーン(Langhorne)、2010年;スー(Su)およびスティーヴンソン(Stevenson)、2002年)。同様に、CD8⁺T細胞の増加は、sPD-L2で処理したマウスで11~21日目前後に見られる防御の若干の向上を説明した(図18d)。

10

20

【0104】

本明細書の全体を通してその目的は、本発明の好ましい実施形態をいずれか1つの実施形態または特定の特徴の集合に本発明を限定することなく記述することであった。本発明の広範な趣旨および範囲から逸脱することなく、本明細書中で記述または例示した実施形態に対する様々な変更形態および修正形態をなし得る。

【0105】

本明細書中で参照したすべてのコンピュータプログラム、アルゴリズム、特許、および科学文献は、それらの全体が参照により本明細書に援用される。

参考文献

【0106】

【表1】

- Agata, Y., A. Kawasaki, H. Nishimura, Y. Ishida, T. Tsubata, H. Yagita, and T. Honjo. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8:765-772.
- Akpogheneta, O.J., N.O. Duah, K.K. Tetteh, S. Dunyo, D.E. Lanar, M. Pinder, and D.J. Conway. 2008. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage Plasmodium falciparum is age dependent and antigen specific. *Infect Immun* 76:1748-1755. 10
- Beattie, L., C.R. Engwerda, M. Wykes, and M.F. Good. 2006. CD8+ T lymphocyte-mediated loss of marginal metallophilic macrophages following infection with Plasmodium chabaudi chabaudi AS. *J Immunol* 177:2518-2526.
- Bos, P.D., Plitas, G., Rudra, D., Lee, S.Y., and Rudensky, A.Y. (2013). Transient regulatory T cell ablation deters oncogene-driven breast cancer and enhances radiotherapy. *J Exp Med* 210, 2435-2466. 20
- Butler, N.S., J. Moebius, L.L. Pewe, B. Traore, O.K. Doumbo, L.T. Tygrett, T.J. Waldschmidt, P.D. Crompton, and J.T. Harty. 2012. Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nat Immunol* 13:188-195.
- Butte, M.J., M.E. Keir, T.B. Phamduy, A.H. Sharpe, and G.J. Freeman. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27:111-122. 30
- Chandele, A., P. Mukerjee, G. Das, R. Ahmed, and V.S. Chauhan. 2011. Phenotypic and functional profiling of malaria-induced CD8 and CD4 T cells during blood-stage infection with Plasmodium yoelii. *Immunology* 132:273-286.
- Chemnitz, J.M., R.V. Parry, K.E. Nichols, C.H. June, and J.L. Riley. 2004. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 173:945-954. 40
- Crompton, P.D., M.A. Kayala, B. Traore, K. Kayentao, A. Ongoiba, G.E. Weiss, D.M. Molina, C.R. Burk, M. Waisberg, A. Jasinskas, X. Tan, S. Doumbo, D. Doumtabe, Y. Kone, D.L. Narum, X. Liang, O.K. Doumbo, L.H. Miller, D.L. Doolan, P. Baldi, P.L. Felgner, and S.K. Pierce. 2010. A prospective analysis of

- the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6958-6963.
- Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5:1365-1369.
- Dorfman, J.R., P. Bejon, F.M. Ndungu, J. Langhorne, M.M. Kortok, B.S. Lowe, T.W. Mwangi, T.N. Williams, and K. Marsh. 2005. B Cell Memory to 3 Plasmodium falciparum Blood-Stage Antigens in a Malaria-Endemic Area. *J Infect Dis* 191:1623-1630.
- Egan, A.F., J.A. Chappel, P.A. Burghaus, J.S. Morris, J.S. McBride, A.A. Holder, D.C. Kaslow, and E.M. Riley. 1995. Serum antibodies from malaria-exposed people recognize conserved epitopes formed by the two epidermal growth factor motifs of MSP1(19), the carboxy-terminal fragment of the major merozoite surface protein of Plasmodium falciparum. *Infect Immun* 63:456-466.
- Egan, A.F., J. Morris, G. Barnish, S. Allen, B.M. Greenwood, D.C. Kaslow, A.A. Holder, E.M. Riley, J.A. Chappel, P.A. Burghaus, J.S. Morris, and J.S. McBride. 1996. Clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1. *J Infect Dis* 173:765-769.
- Freeman, G.J., A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L.J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M.C. Byrne, H.F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M.R. Bowman, B.M. Carreno, M. Collins, C.R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-1034.
- Good, M.F., H. Xu, M. Wykes, and C.R. Engwerda. 2005. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol* 23:69-99.
- Hafalla, J.C., C. Claser, K.N. Couper, G.E. Grau, L. Renia, J.B. de Souza, and E.M. Riley. 2012. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 Inhibitory Pathways Independently Regulate Host Resistance to Plasmodium-induced Acute Immune Pathology. *PLoS Pathog* 8:e1002504.

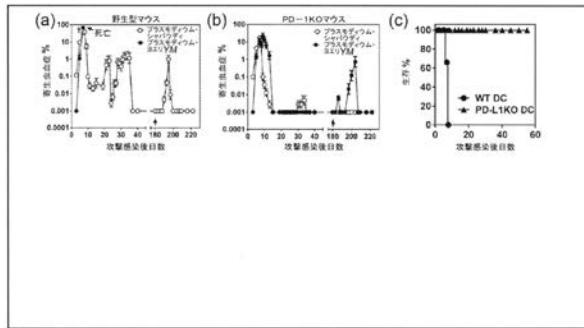
- Horne-Debets, J.M., R. Faleiro, D.S. Karunaratne, X.Q. Liu, K.E. Lineburg, C.M. Poh, G.M. Grotenbreg, G.R. Hill, K.P. Macdonald, M.F. Good, L. Renia, R. Ahmed, A.H. Sharpe, and M.N. Wykes. 2013. PD-1 Dependent Exhaustion of CD8(+) T Cells Drives Chronic Malaria. *Cell Reports* 5:1204-1213.
- Illingworth, J., N.S. Butler, S. Roetynck, J. Mwacharo, S.K. Pierce, P. Bejon, P.D. Crompton, K. Marsh, and F.M. Ndungu. 2013. Chronic exposure to Plasmodium falciparum is associated with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion. *J Immunol* 190:1038-1047. 10
- Ing, R., and Stevenson, M.M. (2009). Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection in mice. *Infect Immun* 77, 770-782.
- Iwai, Y., S. Terawaki, M. Ikegawa, T. Okazaki, and T. Honjo. 2003. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 198:39-50.
- Jacobs, P., D. Radzioch, and M.M. Stevenson. 1996. A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *Infect Immun* 64:535-541. 20
- Johnstone, C.N., Smith, Y.E., Cao, Y., Burrows, A.D., Cross, R.S., Ling, X., Redvers, R.P., Doherty, J.P., Eckhardt, B.L., Natoli, A.L., et al. (2015). Functional and molecular characterisation of EO771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. *Disease models & mechanisms* 8, 237-251. 30
- Juedes et al, 2004, T-bet Controls Autoaggressive CD8 Lymphocyte Responses in Type 1 Diabetes. *J Exp Med.* 2004 Apr 19; 199(8): 1153–1162
- Keir, M.E., M.J. Butte, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26:677-704.
- Kinyanjui, S.M., D.J. Conway, D.E. Lanar, and K. Marsh. 2007. IgG antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malar J* 6:82. 40
- Kumar, S., and Miller, L.H. (1990). Cellular mechanisms in immunity to blood stage infection. *Immunol Lett* 25, 109-114.
- Latchman, Y., C.R. Wood, T. Chernova, D. Chaudhary, M. Borde, I. Chernova, Y. Iwai, A.J. Long, J.A. Brown, R. Nunes, E.A. Greenfield, K. Bourque, V.A. Boussiotis, L.L. Carter, B.M. Carreno, N. Malenkovich, H. Nishimura, T. Okazaki, T.

- Honjo, A.H. Sharpe, and G.J. Freeman. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2:261-268.
- Lau, L.S., Fernandez Ruiz, D., Davey, G.M., de Koning-Ward, T.F., Papenfuss, A.T., Carbone, F.R., Brooks, A.G., Crabb, B.S., and Heath, W.R. (2011). Blood-stage Plasmodium berghei infection generates a potent, specific CD8+ T-cell response despite residence largely in cells lacking MHC I processing machinery. *J Infect Dis* 204, 1989-1996. 10
- Li B et al, T-bet expression is upregulated in active Behçet's disease. *Br J Ophthalmol*. 2003 Oct;87(10):1264-7
- Li B et al., Upregulation of T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells during Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Br J Ophthalmol*. 2005 Nov;89(11):1410-2.
- Linterman, M.A., W. Pierson, S.K. Lee, A. Kallies, S. Kawamoto, T.F. Rayner, M. Srivastava, D.P. Divekar, L. Beaton, J.J. Hogan, S. Fagarasan, A. Liston, K.G. Smith, and C.G. Vinuesa. 2011. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med* 17:975-982. 20
- McCall, M.B., J. Hopman, M. Daou, B. Maiga, V. Dara, I. Ploemen, K. Nganou-Makamdop, A. Niangaly, Y. Tolo, C. Arama, J.T. Bousema, J.W. van der Meer, A.J. van der Ven, M. Troye-Blomberg, A. Dolo, O.K. Doumbo, and R.W. Sauerwein. 2010. Early interferon-gamma response against Plasmodium falciparum correlates with interethnic differences in susceptibility to parasitemia between sympatric Fulani and Dogon in Mali. *J Infect Dis* 201:142-152. 30
- McCall, M.B., and R.W. Sauerwein. 2010. Interferon-gamma--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *J Leukoc Biol* 88:1131-1143.
- Muxel, S.M., A.P. Freitas do Rosario, C.A. Zago, S.I. Castillo-Mendez, L.R. Sardinha, S.M. Rodriguez-Malaga, N.O. Camara, J.M. Alvarez, and M.R. Lima. 2011. The spleen CD4+ T cell response to blood-stage Plasmodium chabaudi malaria develops in two phases characterized by different properties. *PLoS One* 6:e22434. 40
- Ocana-Morgner, C., M.M. Mota, and A. Rodriguez. 2003. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J Exp Med* 197:143-151.

- Sharpe, A.H., E.J. Wherry, R. Ahmed, and G.J. Freeman. 2007. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8:239-245.
- Shin, T., Kennedy, G., Gorski, K., Tsuchiya, H., Koseki, H., Azuma, M., Yagita, H., Chen, L., Powell, J., Pardoll, D., and Housseau, F. 2003. Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of CD4+ T cells independent of the PD-1 receptor. *J Exp Med* 198, 31-38. 10
- Stephens, R., and J. Langhorne. 2010. Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. *PLoS Pathog* 6:e1001208.
- Su, Z., and Stevenson, M.M. 2002. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage Plasmodium chabaudi AS malaria infection in mice. *J Immunol* 168, 1348-1355.
- Tran, T.M., S. Li, S. Doumbo, D. Doumtabe, C.Y. Huang, S. Dia, A. Bathily, J. Sangala, Y. Kone, A. Traore, M. Niangaly, C. Dara, K. Kayentao, A. Ongoiba, O.K. Doumbo, B. Traore, and P.D. Crompton. 2013. An Intensive Longitudinal Cohort Study of Malian Children and Adults Reveals No Evidence of Acquired Immunity to Plasmodium falciparum Infection. *Clin Infect Dis* 57:40-47. 20
- Tseng, S.Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J.E. Slansky, S.I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D.M. Pardoll, and H. Tsuchiya. 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193:839-846.
- Urban, B.C., D.J. Ferguson, A. Pain, N. Willcox, M. Plebanski, J.M. Austyn, and D.J. Roberts. 1999. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells [see comments]. *Nature* 400:73-77. 30
- Urban, B.C., N. Willcox, and D.J. Roberts. 2001. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8750-8755.
- Wang et al, 2006, Transcription factor T-bet regulates inflammatory arthritis through its function in dendritic cells, *JCI* Feb; 116(2) 414-421
- Weiss, G.E., B. Traore, K. Kayentao, A. Ongoiba, S. Doumbo, D. Doumtabe, Y. Kone, S. Dia, A. Guindo, A. Traore, C.Y. Huang, K. Miura, M. Mircetic, S. Li, A. Baughman, D.L. Narum, L.H. Miller, O.K. Doumbo, S.K. Pierce, and P.D. Crompton. 2010. The Plasmodium falciparum-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathog* 6:e1000912. 40

- Wipasa, J., C. Suphavilai, L.C. Okell, J. Cook, P.H. Corran, K. Thaikla, W. Liewsaree, E.M. Riley, and J.C. Hafalla. 2010. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathog* 6:e1000770.
- Wykes, M.N., and M.F. Good. 2008. What really happens to dendritic cells during malaria? *Nat Rev Microbiol* 6:864-867. 10
- Wykes, M.N., X.Q. Liu, L. Beattie, D.I. Stanisic, K.J. Stacey, M.J. Smyth, R. Thomas, and M.F. Good. 2007a. Plasmodium Strain Determines Dendritic Cell Function Essential for Survival from Malaria. *PLoS Pathog* 3:e96.
- Wykes, M.N., X.Q. Liu, S. Jiang, C. Hirunpetcharat, and M.F. Good. 2007b. Systemic tumor necrosis factor generated during lethal Plasmodium infections impairs dendritic cell function. *J Immunol* 179:3982-3987. 20
- Zhu, C., Anderson, A.C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khouri, S.J., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Kuchroo, V.K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6, 1245-1252.

【図1】



【図2】

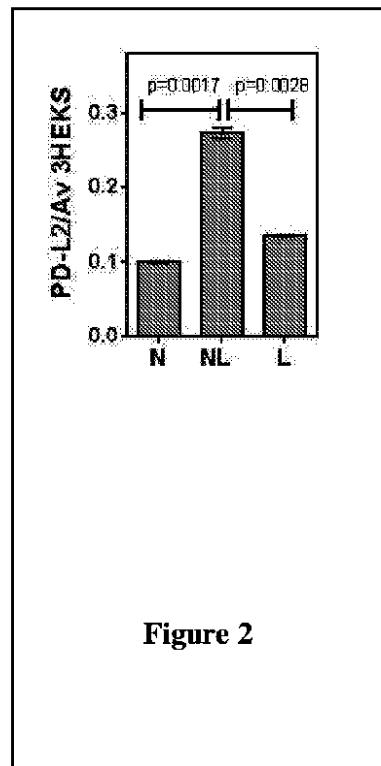
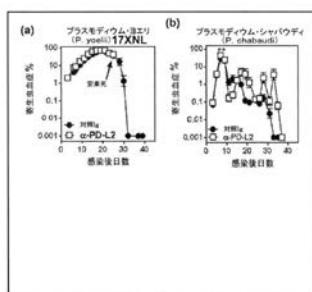
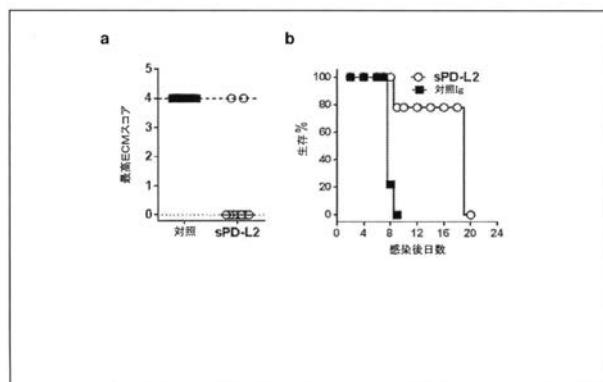


Figure 2

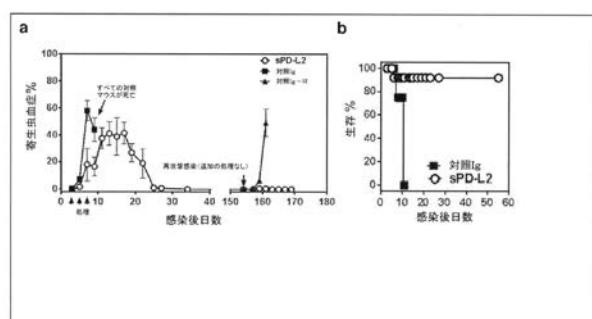
【図3】



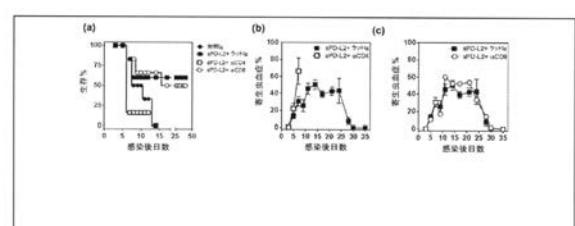
【図5】



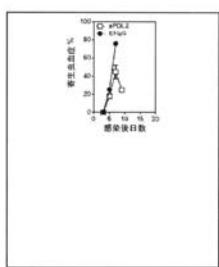
【図4】



【図6】



【図7】



【図8】

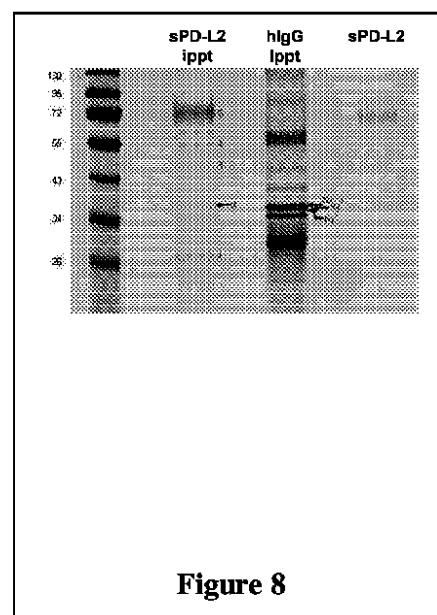
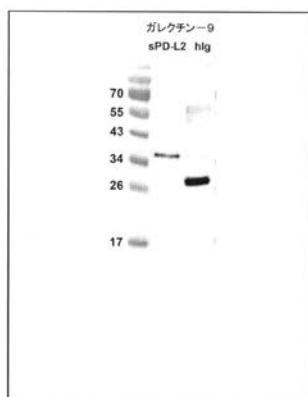
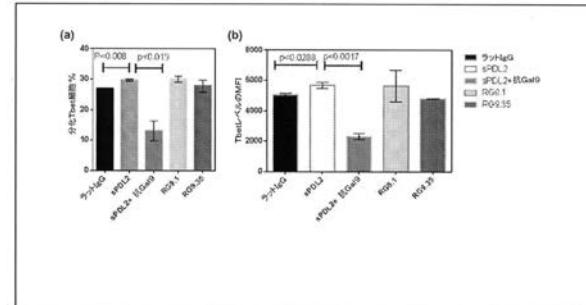


Figure 8

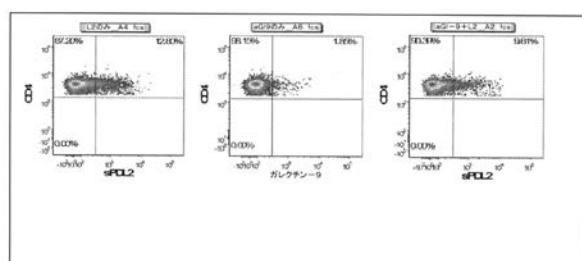
【図9】



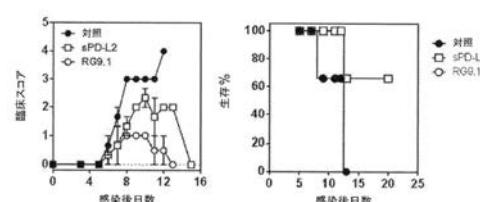
【図11】



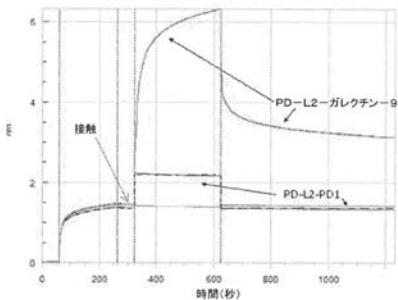
【図10】



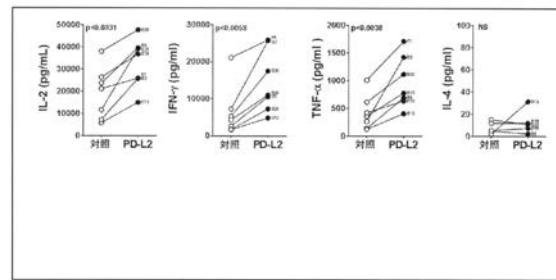
【図12】



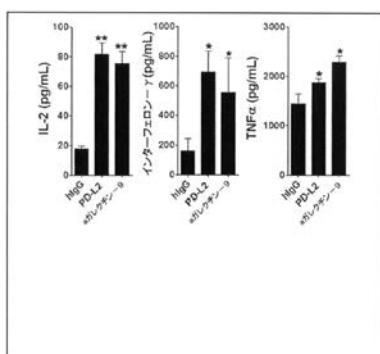
【図 1 3】



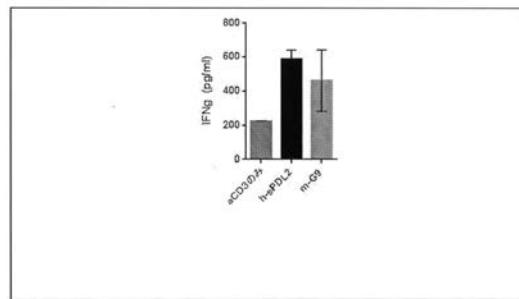
【図 1 5 A】



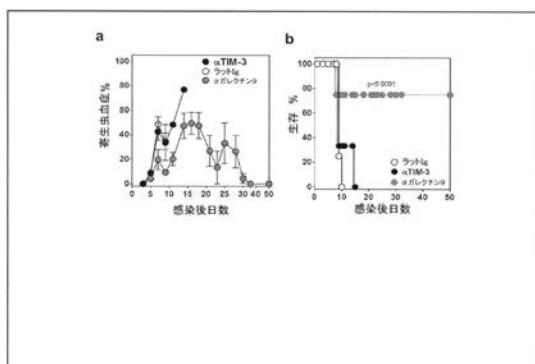
【図 1 4】



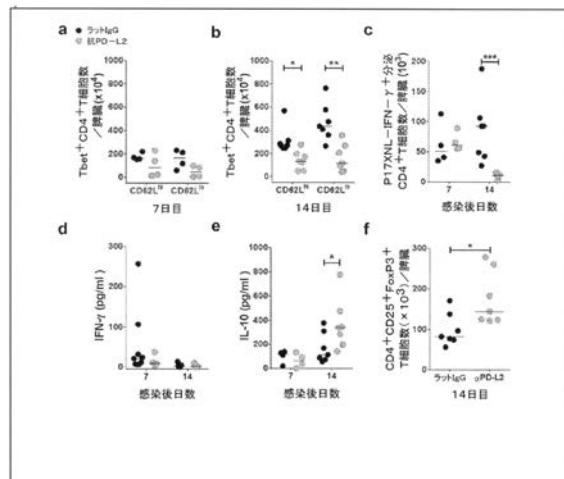
【図 1 5 B】



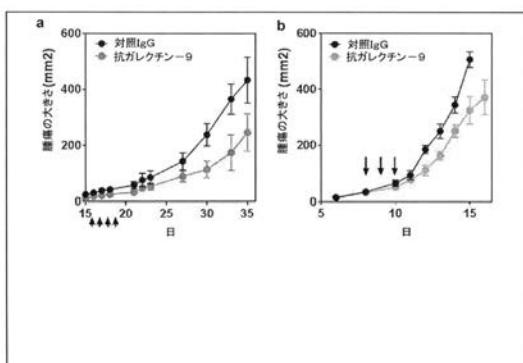
【図 1 6】



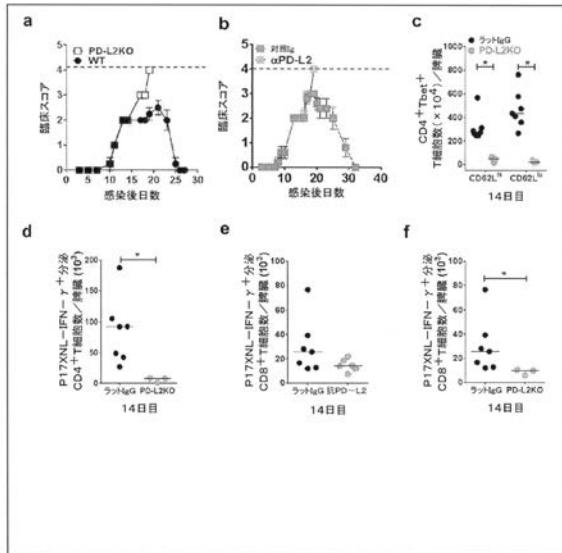
【図 1 8】



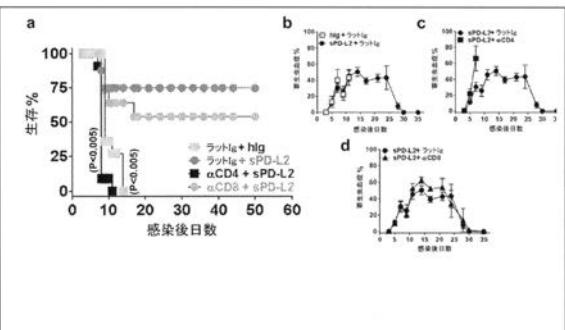
【図 1 7】



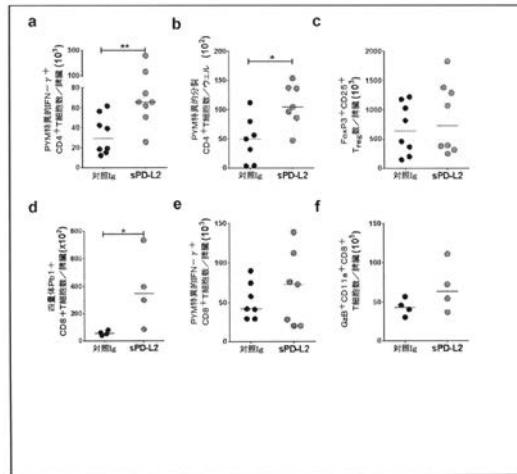
【図19】



【図20】



【図21】



【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/AU2015/050393 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|--|--|-----|---|-----|---|-----|--|-----|---|-----|--|-----|--|-----|---|-----|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 38/17 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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) Patentscope, WPIAP, EPODOC, MEDLINE and keywords: inventor and applicant search, galectin 9, ecalectin, PDL2, CD273, modulat+, activat+, inhibit+, suppress+ and like terms | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Documents are listed in the continuation of Box C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C | | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>* Special categories of cited documents:</p> <table> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>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)</td> <td>"Y"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table> | | | "A" | document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "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 | "E" | earlier application or patent but published on or after the international filing date | "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 | "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) | "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 | "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" | document member of the same patent family | "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| "A" | document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "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 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| "E" | earlier application or patent but published on or after the international filing date | "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 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| "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) | "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 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" | document member of the same patent family | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search 11 September 2015 | Date of mailing of the international search report 11 September 2015 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au | Authorised officer Nathalie Tochon-Danguy AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262833101 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | International application No. PCT/AU2015/050393 |
|---|---|---|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | EP 1586325 A1 (GALPHARMA CO. LTD.) 19 October 2005 Abstract, pages 29-34, Figures 7, 9, 12-15, Examples 1-3, Claims | 1-3, 8-11, 17-26, 29-31, 33-35 |
| X | WO 2002/000730 A3 (GENETICS INSTITUTE INC. & DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC.) 03 January 2002 Abstract, pages 48, 49, 65, 72-80, 86-87, 96, 98-108, Examples 4-5, 7-10, Claims | 1-5, 9-16, 18-23, 25, 30, 31, 35 |
| X | LEWKOWISH I.P. et al., "PD-L2 modulates asthma severity by directly decreasing dendritic cell IL-12 production", <i>Mucosal. Immunol.</i> , July 2013, vol. 6, no. 4, pages 728-739 doi:10.1038/mi.2012.111 Abstract, pages 2-5, 8 | 31, 32, 34, 35 |
| X | NISHIMORI A., et al., "Identification and characterization of bovine programmed death-ligand 2", <i>Microbiol Immunol.</i> Jul 2014, vol. 58, no. 7, pages 388-97, Epub 08 July 2014 Abstract, Results, pages 390, 393 | 31, 32, 34, 35 |
| X | KOJIMA M. et al., "Fusion protein of mutant B7-DC and Fc enhances the antitumor immune effect of GM-CSF-secreting whole-cell vaccine", <i>J. Immunother.</i> , April 2014, vol. 37, no. 3, pages 147-154 doi:10.1097/CJI.0000000000000025 Abstract, pages 5, 6 | 1-4, 8, 9, 19-22, 31, 32, 34, 35 |
| T | HSU Y.-L. et al., "Up-regulation of galectin-9 induces cell migration in human dendritic cells infected with dengue virus", <i>J. Cell. Mol. Med.</i> , May 2015, vol. 19, no. 5, pages 1065-1076, Epub 6 March 2015 Whole document | 1-35 |
| Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009) | | |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members | | International application No. PCT/AU2015/050393 | |
|---|-------------------------|---|-------------------------|
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. | | | |
| Patent Document/s Cited in Search Report | | Patent Family Member/s | |
| Publication Number | Publication Date | Publication Number | Publication Date |
| EP 1586325 A1 | 19 October 2005 | EP 1586325 A1 | 19 Oct 2005 |
| | | AU 2003262266 A1 | 13 Aug 2004 |
| | | CA 2514108 A1 | 05 Aug 2004 |
| | | CN 1744910 A | 08 Mar 2006 |
| | | JP 2004244411 A | 02 Sep 2004 |
| | | KR 20050103474 A | 31 Oct 2005 |
| | | US 2006134119 A1 | 22 Jun 2006 |
| | | WO 2004064857 A1 | 05 Aug 2004 |
| WO 2002/000730 A3 | 03 January 2002 | WO 0200730 A2 | 03 Jan 2002 |
| | | AU 7173101 A | 08 Jan 2002 |
| | | AU 7309601 A | 08 Jan 2002 |
| | | AU 2001273096 B2 | 29 Sep 2005 |
| | | AU 2005220184 A1 | 27 Oct 2005 |
| | | AU 2005220184 B2 | 11 Sep 2008 |
| | | AU 2005248958 A1 | 02 Feb 2006 |
| | | CA 2413857 A1 | 03 Jan 2002 |
| | | CA 2414331 A1 | 03 Jan 2002 |
| | | EP 1297135 A2 | 02 Apr 2003 |
| | | EP 1297135 B1 | 09 Jan 2013 |
| | | EP 1320599 A2 | 25 Jun 2003 |
| | | JP 2004501624 A | 22 Jan 2004 |
| | | JP 2004501631 A | 22 Jan 2004 |
| | | NZ 522844 A | 25 Feb 2005 |
| | | NZ 543512 A | 24 Dec 2008 |
| | | US 2002110836 A1 | 15 Aug 2002 |
| | | US 7432059 B2 | 07 Oct 2008 |
| | | US 2008118511 A1 | 22 May 2008 |
| | | US 7709214 B2 | 04 May 2010 |
| | | US 2002164600 A1 | 07 Nov 2002 |
| | | WO 0200692 A2 | 03 Jan 2002 |

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/AU2015/050393 | |
|---|------------------|---|------------------|
| Information on patent family members | | | |
| Patent Document/s Cited in Search Report | | Patent Family Member/s | |
| Publication Number | Publication Date | Publication Number | Publication Date |
| End of Annex | | | |

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|---------------|-----------|--------------------------------|
| A 6 1 P 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P 37/06 |
| A 6 1 P 31/00 | (2006.01) | A 6 1 P 35/00 |
| A 6 1 P 29/00 | (2006.01) | A 6 1 P 31/00 |
| A 6 1 K 38/17 | (2006.01) | A 6 1 P 29/00 A 6 1 K 38/17 |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,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,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,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,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ウェイカス、ミッセル

オーストラリア国 4 0 0 6 クイーンズランド州 ハーストン ハーストン ロード 3 0 0

F ターム(参考) 4C084 AA01 AA17 DA01 NA14 ZB071 ZB111 ZB261 ZB321 ZC021

4C085 AA13 AA14 BB17 CC03 EE01

【要約の続き】

る、選別する、操作する、または他に產生する方法がまた提供される。