

(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2015-525781

(P2015-525781A)

(43) 公表日 平成27年9月7日(2015.9.7)

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

F 1

A 61 K 39/395
A 61 P 37/02
A 61 K 39/395
A 61 P 35/00
C 07 K 19/00

テーマコード(参考)

4C085
4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-525500 (P2015-525500)
(86) (22) 出願日 平成25年7月30日 (2013.7.30)
(85) 翻訳文提出日 平成27年3月18日 (2015.3.18)
(86) 國際出願番号 PCT/US2013/052612
(87) 國際公開番号 WO2014/022332
(87) 國際公開日 平成26年2月6日 (2014.2.6)
(31) 優先権主張番号 61/677,596
(32) 優先日 平成24年7月31日 (2012.7.31)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 503146324
ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホスピタル インコーポレイテッド
The Brigham and Women's Hospital, Inc.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州
2115 ボストン フランシス ストリート 75
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人 100160923
弁理士 山口 裕季

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫応答の調節

(57) 【要約】

CEACAM1/TIM3相互作用の同時増強または阻害によって上方制御または下方制御されうるT細胞寛容を調節するための組成物および方法が本明細書において記述される。本明細書において記述されるように、CEACAM1がTIM3の直接的なリガンドであり、その逆もまた同じであるという発見が、シスおよびトランスで示された。加えて、本明細書において実証されるように、CEACAM1およびTIM3はT細胞活性化の経過中に同時制御される。

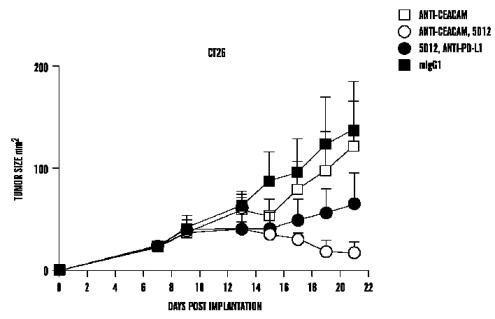
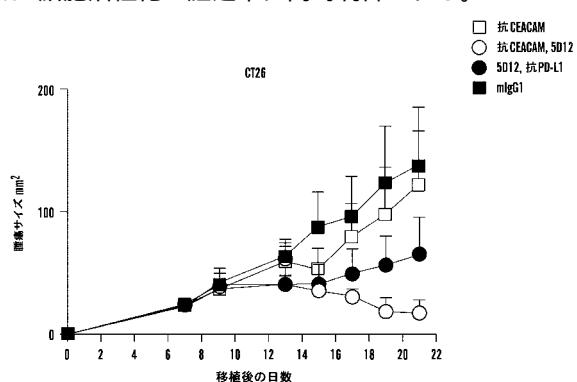


FIG. 6



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

TIM3とCEACAM1との間の相互作用を調節するための組成物であって、TIM3およびCEACAM1に特異的な結合部位を含む二重特異性薬剤を含む、組成物。

【請求項 2】

二重特異性薬剤が、TIM3およびCEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

二重特異性薬剤が、TIM3およびCEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大させる、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項 4】

二重特異性薬剤が、同じ細胞上でのTIM3とCEACAM1との間の相互作用を調節する、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

二重特異性薬剤が、第1の細胞上のTIM3と第2の細胞上のCEACAM1との間の相互作用を調節する、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

二重特異性薬剤が、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 7】

T細胞寛容を調節するための組成物であって、CEACAM1とTIM3との相互作用を調節する薬剤を含む、組成物。

【請求項 8】

薬剤が、CEACAM1とTIM3との相互作用を阻害し、T細胞寛容を阻害する、請求項7に記載の組成物。

【請求項 9】

薬剤が、CEACAM1とTIM3との相互作用を増強または模倣し、T細胞寛容を促進する、請求項7に記載の組成物。

30

【請求項 10】

薬剤が、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体を含む、請求項7～9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

タンパク質模倣体が、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化する、請求項10に記載の組成物。

【請求項 12】

タンパク質模倣体が、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、請求項10に記載の組成物。

【請求項 13】

薬剤が、CEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む、請求項7～12のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 14】

タンパク質模倣体が、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化する、請求項13に記載の組成物。

【請求項 15】

タンパク質模倣体が、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、請求項13に記載の組成物。

【請求項 16】

薬剤が、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体、およびCEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む、請求項7に記載の組成物。

50

【請求項 17】

薬剤が、TIM-3に特異的に結合するポリペプチドを含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項 18】

薬剤が、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドを含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項 19】

TIM3に特異的に結合するポリペプチドが、抗体またはその抗原結合部分を含む、請求項17に記載の組成物。

【請求項 20】

CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドが、抗体またはその抗原結合部分を含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項 21】

薬剤が、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項 22】

CEACAM1とTIM3との相互作用を調節する方法であって、CEACAM1および/またはTIM3に結合してTIM3へのCEACAM1の結合を調節する薬剤と細胞とを接触させる段階を含む、方法。

【請求項 23】

薬剤が、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大させる、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

薬剤が、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、請求項22に記載の方法。

【請求項 25】

薬剤が、CEACAM1およびTIM3の両方に特異的な結合部位を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 26】

薬剤が、TIM3およびCEACAM1に特異的な結合部位を含む二重特異性ポリペプチド剤を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 27】

二重特異性ポリペプチド剤が、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

T細胞寛容を調節する方法であって、TIM3とCEACAM1との相互作用を調節する薬剤を投与する段階を含む、方法。

【請求項 29】

薬剤が、TIM3とCEACAM1との相互作用を促進し、T細胞寛容を促進する、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

薬剤が、TIM3とCEACAM1との相互作用を阻害し、T細胞寛容を阻害する、請求項28に記載の方法。

【請求項 31】

薬剤が、CEACAM1およびTIM3の両方に特異的な結合部位を含む、請求項28に記載の方法。

【請求項 32】

薬剤が、TIM3およびCEACAM1に特異的な結合部位を含む二重特異性ポリペプチド剤を含む、請求項31に記載の方法。

【請求項 33】

二重特異性ポリペプチド剤が、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む、請求項32に記載

10

20

30

40

50

の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年7月31日付で出願された米国特許仮出願第61/677,596号の35 U.S.C.

§119(e)の下での恩典を主張するものであり、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

政府支援

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された、助成金交付番号NIKDK51362の下での政府支援によりなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は、分子免疫学および細胞生物学に関する。より具体的には、本態様は、互いにリガンドであるTIM3およびCEACAM1の相互作用を利用することによるT細胞寛容免疫応答の調節を提供する。

【背景技術】

【0004】

背景

免疫系は異物の侵入および病変細胞から身体を保護する；しかし免疫障害、特にがんなどの、T細胞寛容に関連した免疫障害は、大きな損害を与える。世界保健機関からの最新のデータによれば、世界中の1000万人が2000年にはがんと診断され、600万人ががんが原因で死亡した。さらに、統計資料から、がん発生率が世界中で上昇中であることが示されている。例えば、米国では、見積もりにより、現在生きている者の50%がその生涯のある時点である種のがんと診断されるものと示唆されている。

【0005】

T細胞寛容はまた、例えば、過剰な免疫応答が罹患個体およびまたはドナー臓器への多大な永続的損傷を引き起こしうる、自己免疫疾患および臓器移植の状況において望ましいものでありうる免疫抑制に関与している。より具体的には、自己免疫障害は、身体の自らの組織に対する免疫応答の機能異常により引き起こされ、臨床兆候、臨床経過、および臨床転帰が異なる慢性の多系統障害をもたらす。自己免疫疾患は米国および世界中で増加中である。米国だけで、およそ5000万人が影響を受けており、自己免疫疾患は、65歳未満の女性における上位10位の死因のうちの1つであり、慢性病の、2番目に多い原因であり、および女性における罹患率の最上位の原因である。

【0006】

ゆえに、T細胞寛容を介した免疫障害を処置するための組成物および手法に対する差し迫った必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【0007】

概要

CEACAM1/TIM3相互作用の同時増強または阻害によって上方制御または下方制御されうるT細胞寛容を調節するための組成物および方法が本明細書において提供される。より具体的には、CEACAM1がTIM3の直接的なリガンドであり、その逆もまた同じであるという発見が、本明細書において実証される。本明細書において記述されるように、この結合はシスで(同じ細胞上でのCEACAM1とTIM3との間の相互作用)およびトランスで(ある細胞上のCEACAM1の、別の細胞上のTIM3との結合)示された。加えて、本明細書において実証されるように、CEACAM1およびTIM3はT細胞活性化の経過中に同時制御される。具体的には、CEACAM1の非存在下では、TIM3は活性化T細胞上に発現されず、T細胞寛容は誘導されない。CEACAM1およびTIM3は両方とも、T細胞の制御に関連付けられている。このこと、すなわちCEACAM

10

20

30

40

50

1によるTIM3発現の協調的制御と、CEACAM1およびTIM3が互いのリガンドとして作用するという本明細書において記述される本発見から、CEACAM1およびTIM3が、能動免疫応答の経過中の寛容の発現または低応答性T細胞の產生に関する相互作用性のプレイヤであることが示される。

【0008】

本明細書において実証されるように、CEACAM1はTIM3に結合し、また、その発現を制御する。この結合性相互作用および発現の協調的制御は、本明細書において記述されるように、T細胞寛容の発現に関連している。このことから、TIM3に対するCEACAM1関連リガンド、および当然の結果として、CEACAM1に対するTIM3関連リガンドが、互いの調節のために開発および利用されうることが示される。これは、T細胞寛容を増大させようとする場合に、例えば、自己免疫疾患を処置しようとする場合に、または移植の状況において有用である。対照的に、TIM3とCEACAM1との間の相互作用の遮断は、寛容を抑止するための手段となり、これは、例えば、がんを処置するのに有用である。したがって、この知見は、T細胞寛容に関連した重要な一連のチェックポイントを制御するための特有の手段について可能性を提供する。本明細書において記述されるように、有用な組成物には、これらの2種の分子間の機能または相互作用を、例えば相互作用部位で、特異的に標的化する生物製剤または小分子が含まれる。

10

【0009】

したがって、T細胞寛容を調節するための標的として、本明細書において記述される組成物および方法に関するCEACAM1/TIM3相互作用に対する局面がいくつか存在する：CEACAM1は、ヘテロフィリックなトランス結合を介してTIM3と相互作用する；CEACAM1およびTIM3は同じ細胞において、シスで相互作用する；トランスでのCEACAM1のホモフィリック結合は、TIM3の上方制御につながる；CEACAM1の非存在下で、TIM3は発現されない。これらの相互作用のいずれかを阻害することで、T細胞寛容の発現を抑止することができる。

20

【0010】

したがって、いくつかの局面において、TIM3とCEACAM1との間の相互作用を調節するための組成物であって、TIM3およびCEACAM1に特異的な結合部位を含む二重特異性薬剤を含む組成物が本明細書において記述される。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性薬剤はTIM3およびCEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性薬剤はTIM3およびCEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大させる。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、組成物は同じ細胞上のTIM3とCEACAM1との間の相互作用を調節する。例えば、2つのCEACAM1分子間のホモフィリックなトランス相互作用は、CEACAM1およびTIM-3のシス相互作用またはトランス相互作用を上方制御することができる。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性薬剤は、第1の細胞上のTIM3と第2の細胞上のCEACAM1との間の相互作用を調節する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性薬剤は、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む。

30

【0011】

いくつかの局面において、T細胞寛容を調節するための組成物であって、CEACAM1とTIM3との相互作用を調節する薬剤を含む組成物が本明細書において提供される。いくつかの態様において、組成物はCEACAM1とTIM3との相互作用を阻害し、T細胞寛容を阻害する。他の態様において、組成物はCEACAM1とTIM3との相互作用を増強または模倣し、T細胞寛容を促進する。

40

【0012】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態

50

様において、薬剤は、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体を含む。いくつかの態様において、タンパク質模倣体は、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化する。いくつかの態様において、タンパク質模倣体は、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。

【0013】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、TIM3のタンパク質模倣体は、SEQ ID NO:30またはSEQ ID NO:31を含む。いくつかの態様において、タンパク質模倣体は、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化する。いくつかの態様において、タンパク質模倣体は、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。

10

【0014】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体、およびCEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む。

【0015】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、組成物は、TIM-3に特異的に結合するポリペプチドを含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、組成物は、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドを含む。いくつかの態様において、TIM3に特異的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合部分を含む。いくつかの態様において、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合部分を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、組成物は、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む。

20

【0016】

本明細書において記述される組成物の態様の各々を、TIM3とCEACAM1との間の相互作用を調節する方法において、および/またはT細胞寛容を調節する方法において用いることができる。

30

【0017】

したがって、いくつかの局面において、CEACAM1とTIM3との相互作用を調節する方法であって、CEACAM1および/またはTIM3に結合してTIM3へのCEACAM1の結合を調節する薬剤と細胞とを接触させる段階を含むそのような方法が、本明細書において記述される。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、そのような薬剤は、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大させる。いくつかの態様において、CEACAM1とTIM3との相互作用によって媒介されるシグナル伝達のそのような増大または増強は、自己免疫の処置または改善において用いることができる。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1およびTIM3の両方に特異的な結合部位を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3およびCEACAM1に特異的な結合部位を含む二重特異性ポリペプチド剤を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性ポリペプチド剤は、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む。

40

50

【0018】

いくつかの局面において、同様に本明細書において提供されるのは、T細胞寛容を調節する方法であって、TIM3とCEACAM1との相互作用を調節する薬剤を投与する段階を含む、方法である。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とCEACAM1との相互作用を促進し、T細胞寛容を促進する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とCEACAM1との相互作用を阻害し、T細胞寛容を阻害する。いくつかの態様において、そのような阻害は、腫瘍またはがんの成長および進行を阻害するために用いることができる。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1およびTIM3の両方に特異的な結合部位を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3およびCEACAM1に特異的な結合部位を含む二重特異性ポリペプチド剤を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性ポリペプチド剤は、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む。

10

【0019】

いくつかの局面において、本明細書において提供されるのは、TIM3とCEACAM1との間の相互作用を調節するための組成物であって、TIM3およびCEACAM1に特異的な結合部位を含む二重特異性薬剤を含む、組成物である。

20

【0020】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性薬剤は、TIM3およびCEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。

【0021】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性薬剤は、TIM3およびCEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大させる。

30

【0022】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性薬剤は、同じ細胞上でのTIM3とCEACAM1との間の相互作用を調節する。

【0023】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性薬剤は、第1の細胞上のTIM3と第2の細胞上のCEACAM1との間の相互作用を調節する。

40

【0024】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性薬剤は、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0025】

いくつかの局面において、本明細書において提供されるのは、T細胞寛容を調節するための組成物であって、CEACAM1とTIM3との相互作用を調節する薬剤を含む、組成物である。

【0026】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1とTIM3との相互作用を阻害し、T細胞寛容を阻害する。

【0027】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1とTIM3との相互作用を増強または模倣し、T細胞寛容を促進

50

する。

【0028】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化または模倣する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。

【0029】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、SEQ ID NO:30またはSEQ ID NO:31を結合する含む。

【0030】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体、およびCEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む。

【0031】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM-3に特異的に結合するポリペプチドを含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、TIM3に特異的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0032】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドを含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0033】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0034】

いくつかの局面において、同様に本明細書において提供されるのは、CEACAM1とTIM3との相互作用を調節する方法であって、CEACAM1および/またはTIM3に結合してTIM3へのCEACAM1の結合を調節する薬剤と細胞とを接触させる段階を含む、方法である。

【0035】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大させる。

【0036】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。

【0037】

10

20

30

40

50

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1およびTIM3の両方に特異的な結合部位を含む。

【0038】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3およびCEACAM1に特異的な結合部位を含む二重特異性ポリペプチド剤を含む。

【0039】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、二重特異性ポリペプチド剤は、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む。

10

【0040】

いくつかの局面において、同様に本明細書において提供されるのは、T細胞寛容を調節する方法であって、TIM3とCEACAM1との相互作用を調節する薬剤を投与する段階を含む、方法である。

【0041】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大させ、T細胞寛容を増大させる。

20

【0042】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。

【0043】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1およびTIM3の両方に特異的な結合部位を含む。

30

【0044】

いくつかの局面において、同様に本明細書において提供されるのは、T細胞寛容の調節を、それを必要とする対象において行う方法であって、TIM3とCEACAM1との相互作用を調節する薬剤の有効量を投与する段階を含む、方法である。

【0045】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大または模倣し、T細胞寛容を増大させる。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、対象は自己免疫障害を有する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、対象は移植レシピエントである。

40

【0046】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害し、T細胞寛容を阻害する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、対象はがんまたは腫瘍を有する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、対象は移植レシピエントである。

50

【0047】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体はTIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体はTIM3に結合し、TIM3およびCEACAM

1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。

【0048】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化または模倣する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、SEQ ID NO:30またはSEQ ID NO:31を結合する含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体、およびCEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む。

10

【0049】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM-3に特異的に結合するポリペプチドを含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドを含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、TIM3に特異的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合部分を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合部分を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1およびTIM3の両方に特異的な結合部位を含む。

20

【0050】

いくつかの局面において、本明細書において提供されるのは、対象におけるT細胞寛容の調節において用いるための、TIM3とCEACAM1との相互作用を調節する薬剤である。

30

【0051】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大または模倣し、T細胞寛容を増大させる。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、対象は自己免疫障害を有する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、対象は移植レシピエントである。

【0052】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害し、T細胞寛容を阻害する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、対象はがんまたは腫瘍を有する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、対象は移植レシピエントである。

40

【0053】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシ

50

グナル伝達を活性化する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化または模倣する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、タンパク質模倣体は、SEQ ID NO:30またはSEQ ID NO:31を結合する含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体、およびCEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む。

【0054】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM-3に特異的に結合するポリペプチドを含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドを含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、TIM3に特異的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合部分を含む。本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドは、抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0055】

本明細書において記述されるこれらの局面およびそのような全ての局面のいくつかの態様において、薬剤は、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】CEACAM1およびTIM3が互いに生化学的相互作用を示すことを実証する。293T細胞にヒトCEACAM1およびTIM3発現プラスミドをトランスフェクションした。抗HA mAb TIM3による共免疫沈降およびCEACAM1に対するウエスタンプロット(抗Flag)のためにトランスフェクションから48時間後に全細胞溶解物を調製した(図1A)。あるいは、CEACAM1に対する抗flagモノクローナル抗体による共免疫沈降およびTIM3に対するウエスタンプロット(抗H)のためにトランスフェクションから48時間後に全細胞溶解物を調製した(図1B)。

【図2A】8日間のSEB投与中のSEB反応性T細胞の割合に対する最大のCEACAM1発現を示すFACS分析のデータを提示する。マウスに100 μg/100 μlのSEB、または対照としてのPBS 100 μlを腹腔内注射した。8日後に(V8 T細胞を壊す前に)、これらの両群におけるマウス由来のV8 T細胞(SEB反応性)上の、およびV6 T細胞(SEB非反応性)上のCEACAM1の発現を分析した。

【図2B】マウスCEACAM1-Nドメイン融合タンパク質がインビトロでTIM-3を上方制御することを示す。CD4+T細胞を、8日間SEB免疫化したマウスまたはPBS対照マウスから単離した。細胞を0.5 mg/mlのCEACAM1-Nドメイン融合タンパク質または対照としてのPBSによりインビトロで再刺激した。48時間後に、ゲートをかけたCD4+T細胞に関してTIM3の発現を調べた。

【図3】CEACAM1-/-マウスにおけるTIM3の不十分な誘導を実証する。マウスに100 μg/100 μlのSEB、または対照としてのPBS 100 μlを腹腔内注射した。SEB注射の8日後に、WT (Ceacam1+/-)マウスおよびKO (Ceacam1-/-)マウス由来の腸間膜リンパ節(MLN)およびリンパ節(LN)のCD4+V8+ T細胞上でのCEACAM1およびTIM3の発現を分析した。

【図4】0、2または4日間、CD3、およびCD3/CD8で刺激された汎T細胞を示す。CEACAM1の

10

20

30

40

50

発現を定量的PCRによって分析した。休止T細胞上では低い、CEACAM1の発現は、TCR/CD3複合体を通じたT細胞のライゲーション(シグナル1)により転写的に制御されるが、CD28により提供される古典的な共刺激シグナル(シグナル2)によってTCR/CD3複合体が共会合される場合には負に制御される。

【図5A】図5A～5Bは、SEB反応性T細胞サブセットにおいてのみのホモフィリックなライゲーションによるTIM3の誘導を実証するインビトロでのデータを裏付ける。図5Aは、CD4⁺V⁸⁺ T細胞がネズミCEACAM1-Nドメイン-Fc融合タンパク質の存在下または非存在下でSEB処理により除かれることを示し、SEBによるT細胞受容体の会合が融合タンパク質によってあまり影響されないことを実証している。

【図5B】図5A～5Bは、SEB反応性T細胞サブセットにおいてのみのホモフィリックなライゲーションによるTIM3の誘導を実証するインビトロでのデータを裏付ける。図5Bは、ネズミCEACAM1-Nドメイン-Fc融合タンパク質とのCEACAM1のライゲーションがSEB反応性CD4⁺V⁸⁺ T細胞上でのTIM3発現の増大を誘導することを実証する。

【図6】抗Tim3抗体および抗Ceacam1抗体が協同して、腫瘍退縮を誘導することを実証する。インビオマウスモデルにおいて結腸直腸細胞株CT26を用いて、PD-L1およびTIM3と比べてCEACAM1およびTIM3の同時遮断について調べ、皮下の腫瘍成長に及ぼすその影響を測定した。CEACAM1およびTIM3の同時遮断は、がんおよび腫瘍のサイズおよび成長の顕著な抑制をもたらし、TIM3およびPD-L1の同時遮断で見られたものを上回った。

【図7】CEACAM1に結合すると予想されるTIM3ペプチドの例を示す。ペプチド1は、アミノ酸残基58～77 (SEQ ID NO:30)の線状ペプチドである。ペプチド2は、アミノ酸58～62、SG SGリンカーおよびTIM3のアミノ酸112～119 (SEQ ID NO:31)を含む非線状ペプチドである。

【図8】ヒトCEACAM1およびTIM3が、シスで、およびTIM3のC-C'ループ周辺で特異的に相互作用することの生化学的実証を示す。ヒト胎児由来腎臓(HEK)細胞に、FLAGタグ付CEACAM1、ならびに/または、TIM3 C-C'ループ内とその周辺およびFGループに隣接したさまざまな位置で野生型(WT)を変異させたHAタグ付TIM3をトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後に、溶解物をFLAG特異的モノクローナル抗体またはHA特異的モノクローナル抗体(mAb)のどちらかで免疫沈降(IP)し、CEACAM1 (抗FLAG mAbもしくは抗CEACAM1 5F4 mAbのどちらかで)またはTIM3 (抗HA mAb)に対して免疫プロット(IB)した。図8A: IP、その後の免疫プロットを示し、CEACAM1またはTIM3に対する免疫沈降および交互のパートナーに対する免疫プロッティングによって規定されるようなシス相互作用を示す。図8B: TIM3のIgVドメインの変異がCEACAM1とTIM3との間の結合親和性に劇的に影響を与えることを示す。R112Wは、ヒト集団において特定された天然の一塩基多型(SNP)を表す。図8C: 構造モデリングに基づいてTIM3の残基58と110との間の重要なジスルフィド結合であると予想されるものの変異を示し、これによって、これらの残基が、CEACAM1とTIM3との間の結合親和性にとって重要な特徴である、TIM3のIgVドメイン上の溝に対する構造的安定化に寄与することが示される。C58Rはヒト集団における天然のSNPである。

【図9】CEACAM1が、2つの並置された細胞間でトランスでTIM3に機能的に結合することの証拠を示す。より具体的には、CEACAM1 IgV Nドメインは初代トランスジェニックT細胞上のTIM3にトランスで結合し、その相互作用は抗TIM3モノクローナル抗体(2C12)により遮断される。TIM3がヒトCD2プロモーターにより制御される、T細胞におけるTIM3のトランスジェニック(Tg)過剰発現を有するB6 (WT)マウス、およびCeacam1^{-/-}マウス(ノックアウト)と交配されたTIM3 Tgマウス、またはCeacam1^{-/-}マウスから初代ナイーブT細胞を単離した。結合を遮断するため、さまざまな濃度のTIM3特異的モノクローナル抗体2C12の存在下または非存在下でFc融合タンパク質としてのマウスNドメインにより初代T細胞を染色した。

* , P < 0.05; ** , P < 0.01

【図10A】図10A～10Bは、Fc融合タンパク質としてのCEACAM1 Nドメインのインビオでの投与が、TIM3をトランスジェニックに過剰発現する初代T細胞上のTIM3にトランスで結合し、寛容を誘導しうることを実証する。図10Aにおいて、WTマウス、TIM3Tg/Ceacam1^{-/-}マウスまたはCeacam1^{-/-}マウスの腹腔内に、示したスケジュールによってマウスN-CEACAM

10

20

30

40

50

1-Fc (または融合タンパク質のFcはヒトのものであるので対照としてのヒトIgG Fc) 100 μ gを投与し、10日の時点でリンパ節を単離し、抗CD3またはブドウ球菌エンテロトキシン(SEB)のどちらかによりインビトロで刺激した。

【図10B-1】図10A～10Bは、Fc融合タンパク質としてのCEACAM1 Nドメインのインビトロでの投与が、TIM3をトランスジェニックに過剰発現する初代T細胞上のTIM3にトランスで結合し、寛容を誘導しうることを実証する。図10Bにおいて、インビトロでの細胞応答を増殖またはインターフェロン産生に関して示す。寛容は、トランスでTIM3およびCEACAM1が存在する場合に実証される。*, *, P < 0.01; **, P < 0.001

【図10B-2】図10A～10Bは、Fc融合タンパク質としてのCEACAM1 Nドメインのインビトロでの投与が、TIM3をトランスジェニックに過剰発現する初代T細胞上のTIM3にトランスで結合し、寛容を誘導しうることを実証する。図10Bにおいて、インビトロでの細胞応答を増殖またはインターフェロン産生に関して示す。寛容は、トランスでTIM3およびCEACAM1が存在する場合に実証される。*, *, P < 0.01; **, P < 0.001

【図11】Rag2欠損レシピエントマウスへのナイーブT細胞の移入後に、養子移入されたT細胞による大腸炎の低下およびTNF発現の低下に関連して、Ceacam1^{-/-}マウスのT細胞中のCEACAM1-4Lバリエントのトランスジェニックな再構成がインビトロで活性化T細胞上のTIM3発現を回復することを実証する。WTマウス、Ceacam1^{-/-}マウスまたはCEACAM1-4L Tg/Ceacam1^{-/-}マウス由来のナイーブCD62L⁺CD4⁺ T細胞をRag2^{-/-}マウスへ移入し、8週の時点でマウスを、養子移入されたT細胞上のTIM3およびTNFの発現ならびに大腸炎の重症度について調べた。大腸炎スコアは定量的な病理組織診断に相当する。T細胞上のCEACAM1発現の回復によって提供される防御が実証される。Rag2ノックアウトレシピエントは、トランスでCEACAM1を提供する。*, P < 0.05; **, P < 0.01

【図12】抗がん免疫応答の間に、疲弊したT細胞においてCEACAM1およびTIM3がともに跡をたどることを実証する。図12: CEACAM1およびTIM3二重陽性細胞が、CT26結腸直腸腫瘍細胞に関連した腫瘍浸潤リンパ球(TIL)中に蓄積し、細胞内インターフェロン-、IL-2およびTNFのレベルがほぼ検出不能である疲弊した表現型を呈することを示す。CT26結腸直腸がん細胞をWT Balb/cレシピエントへ皮下投与し、腫瘍成長についてモニタリングした。28日後、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を単離し、CEACAM1およびTIM3またはPD1およびTIM3についてフローサイトメトリーにより分析し、細胞内インターフェロン-、IL-2またはTNFのレベルを集団の各々において評価した。

【図13A】図13A～13Cは、CEACAM1およびTIM3が抗原特異的な寛容に必要とされることを実証する。より具体的には、CEACAM1欠損レシピエントへのCFSE標識OTII-Rag2KO (ノックアウト)初代ナイーブT細胞の養子移入が、インビトロでの移入細胞の増殖の増大によって示されるように、抗原(オボアルブミン)刺激に対する寛容の低下をもたらす。図13Aは、WTレシピエントまたはCeacam1^{-/-}レシピエントへのOTII-Rag2 ko T細胞の移入のスケジュールを示す。

【図13B】図13A～13Cは、CEACAM1およびTIM3が抗原特異的な寛容に必要とされることを実証する。より具体的には、CEACAM1欠損レシピエントへのCFSE標識OTII-Rag2KO (ノックアウト)初代ナイーブT細胞の養子移入が、インビトロでの移入細胞の増殖の増大によって示されるように、抗原(オボアルブミン)刺激に対する寛容の低下をもたらす。図13Bは、リンパ球に対するゲーティングの後、Tg T細胞についての増殖(CFSE)およびCEACAM1発現の評価を示す。抗原提示細胞にCEACAM1が存在していなかった場合に、移入T細胞について増殖およびTIM3発現の増大が観察された。

【図13C】図13A～13Cは、CEACAM1およびTIM3が抗原特異的な寛容に必要とされることを実証する。より具体的には、CEACAM1欠損レシピエントへのCFSE標識OTII-Rag2KO (ノックアウト)初代ナイーブT細胞の養子移入が、インビトロでの移入細胞の増殖の増大によって示されるように、抗原(オボアルブミン)刺激に対する寛容の低下をもたらす。図13Cは、CEACAM1がレシピエントマウスに存在していなかった場合に、調べた全ての区画におけるTg T細胞増殖の増大を実証する結果の概要を示しており、抗原提示細胞によって提供されるトランスのCEACAM1シグナルがないことが寛容の低下をもたらすことを示している。*, P

10

20

30

40

50

< 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001

【図14-1】CEACAM1が不十分または十分なマウスへのOT11-Rag2 KO初代ナイーブT細胞の養子移入がTIM3の上方制御をもたらすことを実証しており、CEACAM1はシスで必要とされるが、トランスでのCEACAM1の発現は活性化T細胞上でのTIM3の上方制御のために必要とされないことを示している。加えて、TIM3の発現はCEACAM1⁺ T細胞上において観察されるだけであり、これらの2つの細胞表面分子が協調的に発現されることを示している。OT11 Tg-Rag ko T細胞をWTマウスまたはCEACAM1欠損マウスへ養子移入し、抗原(オボアルブミン)活性化し、CEACAM1およびTIM3の発現をTg T細胞においてフローサイトメトリーにより調べた。抗原提示細胞上でのCEACAM1の発現にかかわらず、両分子が活性化T細胞上に協調的に発現された。

【図14-2】CEACAM1が不十分または十分なマウスへのOT11-Rag2 KO初代ナイーブT細胞の養子移入がTIM3の上方制御をもたらすことを実証しており、CEACAM1はシスで必要とされるが、トランスでのCEACAM1の発現は活性化T細胞上でのTIM3の上方制御のために必要とされないことを示している。加えて、TIM3の発現はCEACAM1⁺ T細胞上において観察されるだけであり、これらの2つの細胞表面分子が協調的に発現されることを示している。OT11 Tg-Rag ko T細胞をWTマウスまたはCEACAM1欠損マウスへ養子移入し、抗原(オボアルブミン)活性化し、CEACAM1およびTIM3の発現をTg T細胞においてフローサイトメトリーにより調べた。抗原提示細胞上でのCEACAM1の発現にかかわらず、両分子が活性化T細胞上に協調的に発現された。

【図15】ブドウ球菌エンテロトキシン(SEB)誘導性の寛容(欠損および非欠損の両方)がCEACAM1欠損マウス、またはT細胞上でのTIM3の強制的なトランスジェニック発現を有するCEACAM1欠損マウスのどちらにおいても、抑止されることを実証しており、TIM3が、寛容誘導性分子としてのその機能のためにはCEACAM1を要することを実証している。SEB誘導性の寛容をWTマウス、Ceacam1^{-/-}マウス、Ceacam1^{-/-}-TIM3TgマウスまたはTIM3Tg-WTマウスにおいて標準的な方法によってもたらし、T細胞受容体V₈を発現しているT細胞を欠損について分析し、またはSEBに対する応答を、TNF発現によって定義されるようにSEB処置マウス由来の脾細胞について評価した。WTマウスおよびTIM3Tg-WTマウスは欠損(減少)したV₈ T細胞および寛容の非欠損(SEBに応じたTNF分泌の低下)を呈したが、これらはCEACAM1欠損マウスには見られなかった。 **, P < 0.01 ; ***, P < 0.001

【図16】CEACAM1およびTIM3の同時遮断が抗腫瘍免疫応答を相乗的に可能とすることを実証する。TIM3およびCEACAM1の同時遮断は、図6に示されるように、CT26腫瘍の成長の低下によって規定される抗結腸直腸腫瘍応答を増強させ、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)中の増加したCD8⁺およびCD4⁺ T細胞、インターフェロン_γ 分泌CD8⁺ T細胞、ならびに減少したIL-10分泌CD4⁺ T細胞によって規定される、本明細書で示される通りの抗腫瘍免疫応答を増大させる。CT26結腸直腸腫瘍細胞をWT Balb/cマウスへ皮下接種し、MOPC (IgG1対照)、またはCEACAM1およびTIM3に特異的な抗体の組み合わせのどちらかによる処置の後に、腫瘍成長についてモニタリングした。26日後、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を単離し、フローサイトメトリーによって規定されるようにCD4⁺およびCD8⁺ T細胞の相対的割合、細胞内インターフェロン_γ を発現していたCD8⁺ T細胞の割合ならびに細胞内IL-10を発現していたCD4⁺ T細胞の割合について分析した。 *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001

【図17A】CEACAM1の遺伝子欠失が、WTマウスと比べた皮下接種後の腫瘍成長の低下によって示されるような、結腸直腸腫瘍(CT26)に対する抗腫瘍応答の増大(図17A)をもたらすことを実証する。CT26結腸直腸腫瘍細胞を、バックグラウンドがBALB/cのWT Balb/cマウスまたはCeacam1^{-/-}マウスへ皮下接種し、腫瘍成長をモニタリングした。26日後、TILを単離し、TIM3発現について調べるか、またはリンパ球を流入領域リンパ節から単離し、CD8⁺ T細胞のAH1-テトラマーでの染色について分析した。AH1テトラマーは、CT26腫瘍細胞により発現され、かつ細胞溶解CD8⁺ T細胞により認識されるMHCクラスI拘束性抗原を検出する。 **, P < 0.01; ***, P < 0.001

【図17B】CEACAM1の遺伝子欠失が、CT26腫瘍細胞に対するおよびそれに特異的である流入領域リンパ節中のCD8⁺ AH1-テトラマー⁺ T細胞の増大(図17B)をもたらすことを実証

10

20

30

40

50

する。CT26結腸直腸腫瘍細胞を、バックグラウンドがBALB/cのWT Balb/cマウスまたはCea cam1^{-/-}マウスへ皮下接種し、腫瘍成長をモニタリングした。26日後、TILを単離し、TIM3発現について調べるか、またはリンパ球を流入領域リンパ節から単離し、CD8⁺ T細胞のAH1-テトラマーでの染色について分析した。AH1テトラマーは、CT26腫瘍細胞により発現され、かつ細胞溶解CD8⁺ T細胞により認識されるMHCクラスI拘束性抗原を検出する。^{*,*}, P < 0.01; ^{*,*,*}, P < 0.001

【図17C】CEACAM1の遺伝子欠失が、TIL中のTIM3⁺CD8⁺ T細胞の減少(図17C)をもたらすことを実証する。CT26結腸直腸腫瘍細胞を、バックグラウンドがBALB/cのWT Balb/cマウスまたはCeacam1^{-/-}マウスへ皮下接種し、腫瘍成長をモニタリングした。26日後、TILを単離し、TIM3発現について調べるか、またはリンパ球を流入領域リンパ節から単離し、CD8⁺ T細胞のAH1-テトラマーでの染色について分析した。AH1テトラマーは、CT26腫瘍細胞により発現され、かつ細胞溶解CD8⁺ T細胞により認識されるMHCクラスI拘束性抗原を検出する。^{*,*}, P < 0.01; ^{*,*,*}, P < 0.001

10

【発明を実施するための形態】

【0057】

詳細な説明

T細胞寛容は、一部では、自己の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子を認識するが自己ペプチドを認識しない免疫系細胞の集団をもたらすように機能する。過去の研究から、がん胎児性抗原関連細胞接着分子1(CEACAM1)、およびTh1特異的細胞表面分子であるT細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子-3(T-cell Immunoglobulin and Mucin domain-containing molecule-3 (TIM3))の両方が、免疫制御の重要な構成要素であることが示されている。どちらの分子も、とりわけ持続的活性化後の、活性化T細胞上に発現されることが以前に観察されている。

20

【0058】

より具体的には、TIM3は寛容誘導に関与することが知られており、この分子の遮断によって、I型糖尿病の非肥満性糖尿病(NOD)モデルにおける疾患だけでなく実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)も悪化する。TIM3は、ネズミIFN 分泌Th1細胞のサブセット上に選択的に発現されるがTh2細胞上にはない受容体分子であり、インビポでTh1免疫および寛容を制御する。ヒトでは、TIM3は活性化CD4⁺細胞のサブセットにより発現され、抗CD3/28刺激はTIM3⁺ T細胞の数だけでなく発現のレベルも増加させる。TIM3は、インビトロでの極性化されたTh1細胞であるIFN 分泌Th1細胞上に高いレベルで発現され、また、樹状細胞上、末梢マクロファージ上にも構成的に発現され、Th17細胞上にはより低いレベルで発現される。加えて、ヒトCD4⁺ T細胞は、TIM3特異的なアンタゴニスト抗体の存在下で抗CD3/28で刺激された場合に、IL-10、IL-4、またはTNF ではなく、上昇したレベルのIFN 、IL-17、IL-2、およびIL-6を分泌した。これは、転写レベルでサイトカインの誘導により媒介される。TIM3はヒトT細胞の負の制御因子であり、Th1およびTh17サイトカインの分泌を制御する；モノクローナル抗体またはRNA干渉剤のどちらかによるTIM3の遮断は、活性化ヒトT細胞によるIFN の分泌を増加させる(Hastings et al., 39 Eur. J. Immunol. 2492 (2009))。TIM3はまた、主要な「イートミー(eat me)」シグナルであるホスファチジルセリンに結合することが明らかにされている。TIM3は、ガレクチン-9をヘテロフィリックなリガンドとして利用することが以前に示されている。ガレクチン-9は、TIM3 IgVドメイン上の糖質モチーフを特異的に認識するTIM3リガンドとして特定された(Zhu et al., Nat. Immunol. (2005); 米国特許出願公開第2005/0191721号)。

30

【0059】

構造的に、TIM3は、N末端IgVドメイン、その後にムチンドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質尾部を含む。(マウスおよびヒトの) TIM3 IgVドメインは、ごく近くにCC'およびFGループが配置される2つの特有のジスルフィド結合を形成する4つの非標準的システインを有する。これらのループによって形成される表面は、他の免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)メンバーには存在しない結合溝(FG-CC'溝)を形成し、突然変異誘発試験から、この表面が、広範囲の初代免疫細胞に存在する非ガレクチン-9リガンドの認識に寄与

40

50

することが実証された(Cao et al., 26 *Immunity* 311 (2007); Anderson et al., 26 *Immunity* 273 (2007))。FG-CC'溝内では、Gln62およびArg112が、ガラクチン-9非依存性のリガンド結合に不可欠である。Gln62の置換は食作用活性を変化させなかつたが、Arg112の置換はその活性を完全に抑止した。アポトーシス細胞の認識にも重要である、TIM3の金属イオン依存的なリガンド結合部位は、IgVドメインのFGループに存在するN120およびD121、ならびにより少い程度で、L118およびM119を要する。(Nakayama et al., 113 *Blood* 3821 (2009))。したがって、第2のヘテロフィリックなリガンドがTIM3結合(すなわち、FG-CC'溝への結合)に関与しているものと予測されたが、この相互作用の正体および性質は、本明細書において記述される発見まで謎のままであった。

【0060】

10

CEACAM1 (CD66または胆汁糖タンパク質としても公知)に関して、臨床的証拠から、腫瘍および腫瘍浸潤リンパ球上の高レベルのCEACAM1発現が予後不良および転移の高リスクと相關することが示されている。CEACAM1は、リンパ系細胞種および骨髄性細胞種の両方にに対する制御性共受容体として機能し、広範囲の組織および細胞種において構成的に発現される。しかしながら、ナチュラルキラー(NK)細胞およびT細胞上でのその発現は、サイトカインおよび膜活性化受容体の活性化によって主に誘導される。CEACAM1は、単一のIg可変ドメイン様アミノ末端、1個～3個のIg定常ドメイン様領域、および単一の膜貫通セグメントに続いて、短い(CEACAM1-S)または長い(CEACAM1-L)細胞質ドメインからなる(Hinoda et al., 85 *PNAS* 6959 (1988))。N末端ドメインは、細胞活性化および/または細胞周期進行に関連した広範囲の細胞過程に影響を与えるホモフィリックな細胞間結合を助長することが示されており；また、ウイルス性(ネズミ肝炎ウイルス)病原菌および細菌性(淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)および髄膜炎菌(*N. meningitidis*)、モラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)、ならびにインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*))病原菌のヘテロフィリックな接着により標的化され、インビオで、多種多様のCEACAM1発現ヒト細胞および組織にそれらが感染することを可能にする。

20

【0061】

発現される時、CEACAM1は、ヒトでは11種のアイソフォームおよびマウスでは少なくとも4種のアイソフォームをもたらす重要な選択的RNAスプライシングによって特徴付けられる。これらのアイソフォームは、細胞質尾部の長さおよび細胞外Ig様ドメインの数が異なり、それに応じて命名されている。上記のように、CEACAM1アイソフォームの大部分は長い(CEACAM1-L)CTまたは短い(CEACAM1-S)細胞質尾部を保有する(Azuz-Lieberman et al., 17 *Intl. Immunol.* 837 (2005); Gray-Owen & Blumberg, 2006; Moller et al., 65 *Int. J. Cancer* 740 (1996); Nakajima et al., 168 *J. Immunol.* 1028 (2002); Singer et al., 168 *J. Immunol.* 5139 (2002))。長い細胞質尾部(ヒトではおよそ72アミノ酸)は、免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ(immune-receptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM))を2つ含む(Chen et al., 172 *J. Immunol.* 3535 (2004))。これらのアイソフォームはT細胞応答に対して阻害性であり、この阻害には一般に、ITIMドメイン、およびSrc相同性2ドメインホスファターゼ1 (Src homology 2 domain phosphatase 1 (SHP-1))が関与する。ITIMのリン酸化および、その結果として、ITIMとSHP-1との結合には、p56 Lckキナーゼおよびホモフィリックに結合する能力が必要になる。CEACAM1はSHP-1をT細胞受容体(TCR)シグナルソームに動員し、そこでSHP-1がCD3-、ZAP-70、またはその両方の脱リン酸化を介してZAP-70活性化を遮断する。実際に、特異的なFabでホモフィリック結合部位をマスクすることで、細胞傷害性の増大およびリンパ球の脱顆粒が引き起こされる(Chen et al., 180 *J. Immunol.* 6085 (2008))。

30

【0062】

40

本明細書において記述されるように、過去の研究から、CEACAM1がそれ自身のリガンドであり(ホモフィリックなライゲーション)、ガレクチン3およびセレクチンとのヘテロフィリックなライゲーションに関与していることが明らかにされている。休止T細胞上では低い、CEACAM1の発現は、TCR/CD3複合体を通じたT細胞のライゲーション(シグナル1)により転写的に制御されるが、CD28により提供される古典的な共刺激シグナル(シグナル2)に

50

よってTCR/CD3複合体が共会合される場合には負に制御される(図4)。TCR/CD3のライゲーションのみ(共刺激の非存在下)がT細胞寛容の誘導の一般機構であるという事実を考えると、そのような刺激によるCEACAM1の強力な誘導は、理論によって束縛または制限されることを望むわけではないが、寛容プログラムの一部でありうる。

【0063】

さらに、CEACAM1の三次構造に関して、細胞質ドメインのみが異なる、2種の主要なアイソフォームであるCEACAM1-4LおよびCEACAM1-4Sは、4つのグリコシル化されたIgドメインから構成される細胞外ドメイン(外部ドメイン)を有する。CEACAM1誘導性の細胞シグナル伝達は細胞表面におけるその細胞間のホモフィリック結合により制御され、これはN末端Igドメイン(D1)により互恵的なD1-D1相互作用において媒介される。CEACAM1のIgV N末端ドメインの基本構造は、一対の積層したシートの三次元折り畳みである。9個の構成要素のストランドが存在し、ストランドA、B、E、およびDは一方のシートに位置しており、ストランドC、C'、C''、F、およびGは他方のシートにおいて逆平行で存在している。CEACAM1のN末端ドメインのGFCC'表面は、ホモフィリックな接着の媒介に不可欠であることが知られている。ホモフィリックおよびヘテロフィリックな相互作用は、他の接着受容体-リガンドのペアで観察されており、例えばCD2とCD58とのペア；ICAM-1とICAM-1、LFA-1、ライノウイルスもしくは熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)に感染した赤血球とのペア；またはカドヘリンとカドヘリンとのペア(Watt et al., 98 *Blood* 1469 (2001))。これらの相互作用から、免疫グロブリンファミリーメンバーのGFCC'表面は、理論によって束縛または制限されることを望むわけではないが、種々のタンパク質間相互作用を認識するためのばんそうこうとして進化した可能性のあることが示された(Springer et al., 6 *Ann. Rev. Cell Biol.* 359 (1990))。

【0064】

例えばナイセリア(*Neisseria*) Opaタンパク質との、CEACAMのヘテロフィリックな相互作用に関するペプチド領域は、GFCC'C''表面上にもあり、ホモフィリックな結合部位と部分的に重複する。Fedorovich et al., D62 *Acta Cryst.* 971 (2006)。比較すると、ネズミコロナウイルスへのネズミCEACAM1の結合には、ユニークに折り畳まれたCC'ループが必要とされ、ここではアミノ酸34～52が重要な役割を果たす(Tan et al., 21 *EMBO J.* 2076 (2002)；Watt et al., 2001)。さらに、GFCC'C''表面の残基27～42の間のアミノ酸(特にD27L28F29)ならびにS32、Y34、V39、Q44、Q89、およびI91は、インフルエンザ菌、ならびに淋菌および髄膜炎菌のOpaタンパク質の結合のための異なるアドヒジオトープ(adhesi optope)を形成する。これらのアドヒジオトープは、溝である可能性が高く、V39およびD40のCC'ループ残基が関与するホモフィリックなシス結合によって形成されるか、またはCEACAM1/病原菌結合より先に起こるサイトカイン(例えば、TNF⁺)の活性化によるCEACAM1のシスニ量体化の破壊後に形成される(Watt et al., 2001)。

【0065】

さらに、CEACAM1のIgC2ドメインはまた、コロナウイルスおよびインフルエンザ菌の受容体活性に関連付けられている。固定化されたCEACAM1は、この場合にはこの高度に柔軟な分子の三次構造が制限されるが、接着の低下も呈し、これは、分子の細胞質領域(例えば、細胞内二量体化)を、ホモフィリックおよびヘテロフィリックな相互作用の両方、ならびにシグナル伝達に関与させる。さらに、シスでのホモ二量体の形成が、複数のスプライスバリエント(アイソフォーム)について、IgC2ドメインを欠いているものについてさえも、特徴付けられている。

【0066】

N末端D1ドメインにおけるドメイン内ジスルフィド架橋の欠如は、CEACAM1外部ドメインを高度に柔軟にする。CEACAM1は細胞膜にマイクロクラスタの状態で存在する；ホモフィリック結合が、2つの異なる種類の二量体、ならびに三量体およびさらに高次のオリゴマーをもたらす再構築を誘発する。Igドメイン間のヒンジ領域のため、逆平行性のトランス二量体(C二量体)および平行性のシスニ量体(A二量体)が形成されうる。N末端D1ドメインは、C二量体化およびA二量体化の両方に関与するが、D2-D4ドメインはA二量体化にのみ関

10

20

30

40

50

わる。二価陽イオンは外部ドメインの柔軟性を低下させ、CEACAM1媒介性の細胞接着にさらに関与する多量体複合体の形成を増強させた。重要なことに、外部ドメインの二量体化は、膜貫通ドメインから細胞質ドメインへと伝達され、したがって、次いで、細胞内シグナル伝達を指令する。別の結合部位は、CEACAM1分子上でのグリコシル化のレベルおよび柔軟性に依存して、ABED表面全体で関与しうる(Klaile et al., 187 J. Cell Biol. 553 (2009))。

【0067】

CEACAM1の機能はまた、グリコシル化によって影響を受ける可能性が高い。糖質は、細胞表面に発現されているCEACAM1の重量の60%までを占める。この非常に大きな糖質含量の役割により、CEACAM1アイソフォームの「亜種」の構築が可能となる。例えば、CEACAM1がシリルルイスx修飾を発現する能力は、白血球ホーミングに影響を与える(Chen et al., 86 J. Leuk. Biol. 195 (2009))。

10

【0068】

ホモフィリックな接着およびヘテロフィリックな接着の両方においてシス相互作用とトランク相互作用とを区別すること、すなわち、同じ細胞に発現されているか、または相対する細胞に発現されているかどうかは、シス相互作用がトランクでの相互作用を阻害または増強することが可能なため、重要である。シスでのホモフィリックな相互作用または二量体化はしたがって、ヘテロフィリックな結合または細胞シグナル伝達のための受容体の高次構造を維持、生成、または破壊しうる。例えば、シスでのCEACAM1分子のホモフィリックな相互作用または二量体化は、受容体を、相対する細胞と相互作用できない高次構造に維持することができ、またはN末端のGFCC'C'表面を正しい方向に配置して、同じ細胞もしくは相対する細胞でのホモフィリックもしくはヘテロフィリックな対抗受容体への結合の結合力を増大させることができる(例えば、ICAM-1、カドヘリン、およびCEAの場合と同様)。同じ上皮細胞上でのCEACAM1のホモフィリックな会合は、トランクでのその相互作用を阻止することができ、上皮腫瘍形成中にCEACAM1レベルが低下している場合に失われる制御機構である、上皮細胞増殖を阻害する負のシグナルを送達することができる。あるいは、炎症中の好中球表面でのCEACAM1分子の活性化は、内皮細胞上のE-セレクチンリガンドへのsLex残基の提示を制御することができ、CD11/CD18およびL-セレクチンレベルを制御することができる。内皮細胞および上皮細胞上では、おそらくホモフィリックな相互作用または二量体化を誘導または阻害することによる、CEACAM1の活性化はまた、細胞表面上のアイソフォーム濃度を制御することができ、分子を正しい方向に向けることができ、または淋菌Opaタンパク質もしくはインフルエンザ菌に対するCEACAM1のGFCC'C'表面上の隣接残基の結合力を増加させることができる。しかしながら、本明細書において記述される発見の前には、T細胞寛容についてCEACAM1のN末端ドメイン相互作用のホモフィリック vs ヘテロフィリックな相互作用に、どの機構が関わっているかは明らかになっていなかつた。

20

【0069】

このように、CEACAM1もTIM3もともに、免疫制御を達成するのに不可欠な役割を果たすことが示されたが、これらの2つの分子間の相互作用は、本明細書において記述される発見の前には特定されておらず、または特徴付けられていない。本明細書において示されるように、これらの2つの分子に関する生化学的な共免疫沈降分析は、CEACAM1がTIM3と生化学的な相互作用を示すことを明らかにしている(図1A～1Bおよび8A～8C)。さらに、CEACAM1およびTIM3の相互作用の活性に関する機構を、TCR/CD3複合体のインビボ刺激であるブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)の投与後のT細胞寛容モデルにおいて調べた。SEBは細菌の「スーパー抗原」として公知の分子のクラスに属しており、それらはT細胞の、とりわけT細胞受容体V鎖を発現しているT細胞の強力な活性化因子であり、例えばIFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-6、IL-12などのサイトカインの産生を誘導する。本明細書において実証されるように、SEB投与により、インビボでの寛容誘導との関連でCEACAM1の上方制御が明らかになった(図2A、図15)。

30

【0070】

40

50

CEACAM1のNドメイン結合ドメインを標的化する(したがって寛容の活性化を制御する)キメラ融合タンパク質の能力についても、過敏性腸疾患、多発性硬化症、および関節リウマチにおける過剰な炎症を阻害するうえでのその重要性を考えて、調べた。SEB応答性T細胞上でのCEACAM1-Fc融合タンパク質とのCEACAM1のライゲーションに続けて、SEBによるインピトロでの再刺激を行った(図2B): ホモフィリックなトランス結合が行われる場合にのみ、これらの細胞はSEB再刺激に応じてTIM3を上方制御し(29%の平均蛍光)、これは天然の寛容機構を示している。類似の結果はインピボでも観察された(図5Aおよび5B、図10A、10B、ならびに11)。

【0071】

したがって、T細胞寛容を調節するための手段として、本明細書において記述される組成物および方法により提供される、CEACAM1/TIM3の相互作用に対するいくつかの局面が存在する: CEACAM1はヘテロフィリックなトランス結合を介してTIM3と相互作用する; CEACAM1およびTIM3は同じ細胞において、シスで相互作用する; トランスでのCEACAM1のホモフィリック結合は、TIM3の上方制御につながる; CEACAM1の非存在下で、TIM3は発現されない。いくつかの局面において、これらの相互作用のいずれかを阻害することにより、T細胞寛容の発現を制限するための手法が提供される。いくつかの局面において、これらの相互作用のいずれかを増強させることを、T細胞寛容の発現を増強させるように利用することができる。

【0072】

したがって、いくつかの局面において、本明細書において記述される組成物および方法は、TIM3およびCEACAM1の生物学的相互作用を阻害することによってT細胞寛容を調節し、したがってT細胞寛容を抑止する。免疫系の抑制を軽減させることは、例えば、免疫無防備状態の対象またはがんに苦しんでいる対象において非常に望ましく、これは、本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、TIM3/CEACAM1の相互作用を阻害することによってT細胞寛容を阻害すること; TIM3の発現が上方制御されないようにCEACAM1のホモフィリックな結合を阻害すること; 例えばTIM3のC-C'ループとCEACAM1との間の相互作用を標的化することによって、TIM3およびCEACAM1がシスで結び付いた細胞を標的化すること; ならびに/またはそれらの組み合わせを含みうる。

【0073】

いくつかの局面において、本明細書において記述される組成物および方法は、TIM3およびCEACAM1の生物学的相互作用を増強することによってT細胞寛容を調節する。そのような手法は、TIM3/CEACAM1の相互作用を刺激することを含む、T細胞寛容を増強させることにより、対象においてT細胞寛容が増大されることが望ましい自己免疫疾患または他の障害を処置する方法を提供する。

【0074】

これらの組成物および方法のいくつかの態様において、TIM3分子はCEACAM1のリガンドとして提供される。本明細書において用いられる場合、TIM3という用語は、SEQ ID NO:1または2のポリペプチド、ならびにその任意の天然の対立遺伝子スプライスバリエント、およびそのプロセッシングされた形態を指す。典型的には、TIM-3はヒトTIM-3を指す。「TIM-3」という用語はまた、TIM-3ポリペプチドの特定の切断型または断片を指す表示として用いられる。本出願において、TIM-3の任意のそのような型または断片への言及は、例えば、「TIM-3 (24 ~ 131)」によって特定されうる。TIM-3の特定の残基は、例えば、「TIM-3 (62)」ということもできる。例えば、SEQ ID NO:1のアミノ酸24 ~ 131を含むTIM3のIgV領域は、TIM3 (24 ~ 131)ということができる。ヒト集団において見出される例示的な一塩基多型には、例えば、TIM3(R112W)およびTIM3(C58R)が含まれる。

【0075】

いくつかの態様において、TIM3分子は可溶性TIM3またはそのペプチド変種である。本明細書において用いられる「可溶性TIM3」は、細胞膜から解離されている、TIM3の機能的変種を含むTIM3の任意の形態を指す。可溶性TIM3は、例えば、いくつかの態様において、完全長TIM3のC末端切断型またはTIM3の膜貫通欠失型でありうる。いくつかの態様において

10

20

30

40

50

、可溶性TIM3分子は、TIM3の細胞外領域の單一ドメイン、すなわち、IgVドメインもしくはムチンドメインまたはC-C'ループを含む。いくつかの態様において、可溶性TIM3は、完全長TIM3の選択的スプライスバリエントであり、これはIgVドメインおよび細胞内領域を含むが、ムチンドメインまたは膜貫通領域を含まない。いくつかの態様において、可溶性TIM3分子は、TIM3の細胞外領域を含む。

【0076】

TIM3それ自体に加えて、CEACAM1結合分子はTIM3の模倣体でありえ、例えば、CEACAM1へのTIM3の結合の効果を模倣するまたは再現するように働く小分子、ポリペプチド(例えば、ペプチド模倣体)、抗体もしくは抗体の一部分、ポリヌクレオチド、多糖類、脂質、薬物、またはそれらの機能的変種もしくは誘導体、あるいはこれらのいずれかの組み合わせなどでありうる。CEACAM1に結合するTIM3模倣体は、天然において見出すことができ、あるいはそれは、当業者によって知られた適当なインピトロ法および合成法を用いて誘導または合成することができる。例えば、いくつかの態様において、TIM3模倣体CEACAM1結合分子は、CEACAM1へのTIM3の結合と競合する能力について小分子ライブラリをスクリーニングすることを通じて特定される小分子でありうる。別の例として、いくつかの態様において、TIM3由来のCEACAM1結合分子は、ペプチドのファージディスプレイを用いて作製し特定されうる。異なる態様において、TIM3模倣体は、天然のCEACAM1-TIM3相互作用のアンタゴニストまたはアゴニストのいずれかとして作用するようにデザインすることができる。例えば、本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、本明細書において記述される組成物および方法で用いるための、CEACAM1に結合しうるTIM3ペプチドは、TIM-3 (58~77)、すなわち

Cys-Pro-Val-Phe-Glu-Cys-Gly-Asn-Val-Val-Leu-Arg-Thr-Asp-Glu-Arg-Asp-Val-Asn-Tyr (SEQ ID NO: 30)

を含む。例えば、本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、本明細書において記述される組成物および方法で用いるための、CEACAM1に結合しうるTIM3ペプチド模倣体は、SGSGリンカーによって連結されたTIM-3のアミノ酸58~62および112~119、すなわち

Cys-Pro-Val-Phe-Glu-Ser-Gly-Ser-Gly-Arg-Ile-Gln-Glu-Pro-Gly-Ile-Met (SEQ ID NO: 31)

を含む。

【0077】

ある局面および態様において、本明細書において提供されるのは、TIM-3ポリペプチドおよびその断片の、単離されたおよび/または精製された形態であり、これは、該タンパク質または該タンパク質を含む特定の複合体と通常結び付いている可能性がある他のタンパク質から単離されているか、あるいはさもなければ、実質的にそれを含まない。

【0078】

したがって、本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、TIM-3ポリペプチドは、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつSEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2のTIM3ポリペプチドの1つまたは複数のシグナル伝達活性を保持するポリペプチドである。本明細書において用いられる「TIM3ポリペプチド」という用語はまた、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2のポリペプチドの1つまたは複数のシグナル伝達活性を保持するそのようなTIM3ポリペプチドの一部分または断片、およびSEQ ID NO:1のポリペプチドの1つまたは複数のシグナル伝達活性を保持するTIM3ポリペプチドの保存的置換変種も包含する。最低でも、本明細書において記述されるTIM3ポリペプチドは、CEACAM1の活性化を媒介することができ、かつ/またはCEACAM1に特異的に結合するか、もしくはCEACAM1と相互作用することができる。本明細書において記述される方法および組成物のいくつかの態様において、TIM3ポリペプチドの部分はTIM3のIgVドメインを含む。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様におい

10

20

30

40

50

て、可溶性TIM3ポリペプチドは、SEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:2と比べて1つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含む。2つのポリペプチド間のアミノ酸同一性は、例えば、PAM250マトリックスに基づくものなどのアライメントアルゴリズムを用いてまたは当技術分野において周知の他の方法によって2つのポリペプチド配列を最初に整列させることによって決定することができる。

【0079】

本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、本明細書において「TIM3模倣体」、「TIM3ペプチド模倣体」または「TIM3由来のCEACAM1結合ペプチド」といわれる、TIM3のCEACAM1結合活性を模倣するCEACAM1結合活性を有するペプチド、すなわち言い換えれば、CEACAM1リガンドとして働くTIM3の機能的部分を含むペプチドが提供される。いくつかの特定の態様において、TIM3ペプチドはTIM3のFG-CC'溝を含む。したがって、本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、CEACAM1活性を増大させる薬剤は、CEACAM1受容体を活性化させるうえでTIM3に機能的に取って代わりうるペプチド模倣体または小分子である。ペプチドまたは小分子は、CEACAM1に結合するTIM3の表面と構造的に類似することができ、その結果、ペプチドまたは小分子がその結合時にCEACAM1を活性化し、CEACAM1活性の増大をもたらすことができる。例えば、本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、本明細書において記述される組成物および方法で用いるための、CEACAM1に結合しうるTIM3ペプチドは、SEQ ID NO:30またはSEQ ID NO:31を含む。

10

【0080】

20

例示的なTIM3ポリペプチドのアミノ酸配列は、以下の通り、アクセッション番号AAL65156～AAL65158の下でGenBankデータベースに寄託されている。

GenBankアクセッション番号AAL65157, ヒトTIM3, クローン1 (SEQ ID NO:1)

MFSHLPFDCV LLLLLLLTR SSEVEYRAEV GQNAYLPCFY TPAAPGNLVP VCWGKGACPV

60

FECGNVVLRT DERDVNYWTS RYWLNGDFRK GDVSLTIENV TLADSGIYCC RIQIPGIMND

120

EKFNLKLVIK PAKVTPAPTL QRDFTAAFPR MLTTRGHGPA ETQTLGSLPD INLTQISTLA

30

180

NELRDSRLAN DLRDSGATIR IGIYIGAGIC AGLALALIFG ALIFKWYSHS KEKIQNLNSLI

240

SLANLPPSGL ANAVAEGIRS EENIYTIEEN VYEVEEPNEY YCYVSSRQQP SQPLGCRCFAM

300

P

301

GenBankアクセッション番号AAL65158, ヒトTIM3, クローン2 (SEQ ID NO:2)

40

MFSHLPFDCV LLLLLLLTR SSEVEYRAEV GQNAYLPCFY TPAAPGNLVP VCWGKGACPV

60

FECGNVVLRT DERDVNYWTS RYWLNGDFRK GDVSLTIENV TLADSGIYCC RIQIPGIMND

120

EKFNLKLVIK PAKVTPAPTR QRDFTAAFPR MLTTRGHGPA ETQTLGSLPD INLTQISTLA

180

NELRDSRLAN DLRDSGATIR IGIYIGAGIC AGLALALIFG ALIFKWySHS KEKIQNLSLI

10

240

SLANLPPSGL ANAVAEGIRS EENIYTIEEN VYEVEEPNEY YCYVSSRQQP SQPLGCRFAM

300

P

301

以下のアミノ酸配列(SEQ ID NO:3)を有する切断型可溶性TIM3ペプチドの一例:

MFSGLTLNCV LLLLQLLLAR SLEDGYKVEV GKNAYLPCSY TLPTSGTLVP MCWGKGFCPW

60

SQCTNELLRT DERNVTYQKS SRYQLKGDLN KGDVSLIIKN VTLDHGTYC CRIQFPGLMN

20

120

DKKLELKLDI KAGYSCKKKK LSSLSLITLA NLPPGGLANA GAVRIRSEEN IYTIEENVYE

180

VENSNEYCY VNSQQPS

197

GenBank アクセッション番号AAL65156, ネズミTIM3 (SEQ ID NO:4)

MFSGLTLNCV LLLLQLLLAR SLEDGYKVEV GKNAYLPCSY TLPTSGTLVP MCWGKGFCPW

30

60

SQCTNELLRT DERNVTYQKS SRYQLKGDLN KGDVSLIIKN VTLDHGTYC CRIQFPGLMN

120

DKKLELKLDI KAAKVTPAQT AHGDSTTASP RLTTERNGS ETQTLVTLHN NNGTKISTWA

180

DEIKDSGETI RTAIHIGVGV SAGTLALII GVLILKWySC KKKKLSSLSL ITLANLPPGG

240

LANAGAVRIR SEENIYTIEE NVYEVEENSNE YYCYVNSQQP S

281

【0081】

本明細書において記述される組成物および方法とともに用いるためのTIM3ペプチドおよびその部分は、他に開示されている方法にしたがって作製することができる。例えば、Therapeutic Uses of TIM3 Modulatorsと題する2007年11月15日付で出願されたPCT US2007/024067; Monney et. al., 415 Nature 536 (2002); Anderson et. al., 318 Science 1141 (2007); 米国特許出願公開第2004/0005322号; 同第2005/0191721号を参照されたい。あるいは、本明細書において記述される組成物および方法とともに用いるためのTIM3ペプチドおよびその部分は、当業者に公知の分子的 methods にしたがってクローニングおよび発現さ

40

50

れてもよい。いくつかの態様において、TIM3またはその一部分をコードする遺伝子は、各タンパク質の過剰発現のための発現ベクターにクローニングすることができる。

【0082】

TIM3およびCEACAM1活性を増加させてT細胞寛容を増強させるための本明細書において記述される組成物および方法の他の態様において、TIM3活性を増加させる薬剤は、TIM3受容体を活性化させるうえでCEACAM1に機能的に取って代わりうるペプチド模倣体または小分子である。いくつかの態様において、ペプチドまたは小分子は、例えば、TIM3に結合するCEACAM1の表面と構造的に類似することができ、その結果、ペプチドまたは小分子がその結合時にTIM3を活性化し、TIM3活性の増大をもたらすことができる。いくつかの具体的な態様において、TIM3活性を増加させる薬剤は、TIM3の細胞内ドメインのチロシンリン酸化を促進する。

10

【0083】

本明細書において記述される組成物および方法で有用なTIM3の機能的変種は、そのような分子がCEACAM1に結合する能力を保持しているという条件で、完全長TIM3の変異、付加、欠失、および切断を示す分子を含む。あるいは、本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、TIM3により刺激されたCEACAM1活性および/またはCEACAM1により刺激されたTIM3活性を阻害する薬剤は、例えば、可溶性TIM3タンパク質もしくは結合体、またはタンパク質もしくは抗体、TIM3 mRNAに特異的なもしくはTIM3 mRNAへと標的化される低分子干渉RNA、およびTIM3のmRNAとハイブリダイズするアンチセンスRNAを含むことができる。

20

【0084】

本明細書において記述される場合、「薬剤」は、CEACAM1/TIM3相互作用の調節を可能にするタンパク質結合剤を指すことができる。そのような薬剤は、抗体(「抗体」は、抗体の抗原結合部分、例えばエピトープ結合ペプチドもしくは抗原結合ペプチド、パラトープ、機能的CDR；組み換え抗体；キメラ抗体；トリボディ(tribody)；ミディボディ(midibody)；またはそれらの抗原結合誘導体、類似体、変種、部分、もしくは断片を含む)、タンパク質結合剤、小分子、組み換えタンパク質、ペプチド、アプタマー、アビマー(avimer)およびそれらのタンパク質結合誘導体、部分または断片を含むが、これらに限定されることはない。

30

【0085】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特に、TIM3またはCEACAM1アンタゴニストとして、本明細書において記述される組成物および方法において有用である別のクラスの薬剤である。リボザイムおよびmiRNA分子がそうであるように、このクラスの薬剤ならびにそれらを調製し使用するための方法は全て、当技術分野において周知である。例えば、全体的な議論については、PCT US2007/024067を参照されたい。

【0086】

いくつかの態様において、TIM3/CEACAM1の相互作用または経路を調節する薬剤は、完全長TIM3またはCEACAM1をコードする核酸でありえ、生きている哺乳類細胞中の輸送およびタンパク質発現のためのベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス中で運ばれる。細胞へのトランスフェクションにより、薬剤はインビボでのTIM3またはCEACAM1の過剰発現を可能にする。完全長TIM3およびCEACAM1のクローニングおよび過剰発現は、例えば、米国特許出願公開第2004/0005322号および同第2005/0191721号に開示されているように行うことができる。

40

【0087】

CEACAM1とのTIM3の相互作用を阻害する、本明細書において記述される組成物および方法で用いるための他の薬剤には、例えば、TIM3の細胞外領域に特異的に反応するまたは特異的に結合する、TIM3に対する抗体が含まれる。非限定的な例としては、ヒトTIM-3に対するハイブリドーマ7D11、10G12、および11G8由来の抗体(全てマウスIgG1)；モノクローナル抗ヒトTIM-3、クローン番号：344823、アイソタイプラットIgG2A, R&D SYSTEMSより；GALPHARMAの抗ヒトTIM3抗体；ならびにハイブリドーマ8B.2C12および25F.1D6由来の抗体

50

, ラットIgG2a, (Nakayama et al., 113 Blood 3821 (2000)が挙げられる。

【0088】

本明細書において用いられる「抗体」という用語は、抗TIM3抗体に関してまたは抗CEAC AM1抗体に関してにかかわらず、完全長の抗体もしくは免疫グロブリン、IgG、IgM、IgA、IgDもしくはIgE分子、または一般に完全抗体の抗原結合部位を含み、したがってエピトープもしくは抗原などの標的に結合する能力を保持した、完全抗体の一部分のみを含むそれらのタンパク質部分を指す。本定義によって包含される抗体またはエピトープ結合タンパク質の部分の例としては、(i) V_L 、 C_L 、 V_H および C_H1 ドメインを有する、Fab断片；(ii) C_H1 ドメインのC末端に1つもしくは複数のシステイン残基を有するFab断片である、Fab'断片；(iii) V_H および C_H1 ドメインを有するFd断片；(iv) V_H および C_H1 ドメインならびに $CH1$ ドメインのC末端の1つもしくは複数のシステイン残基を有するFd'断片；(v) 抗体の単腕の V_L および V_H ドメインを有するFv断片；(vi) 抗原に結合する V_H ドメインもしくは V_L ドメインからなるdAb断片(Ward et al., 341 Nature 544 (1989))；(vii) 単離されたCDR領域もしくは機能的なフレームワーク中で提示されている単離されたCDR領域；(viii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab'断片を含む二価断片である $F(ab')_2$ 断片；(ix) 单鎖抗体分子(例えば、单鎖Fv; scFv) (Bird et al., 242 Science 423 (1988)；およびHuston et al., 85 PNAS 5879 (1988))；(x) 同じポリペプチド鎖中の軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む、2つの抗原結合部位を有する「ダイアボディ(diabody)」(例えば、EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger et al., 90 PNAS 6444 (1993)を参照のこと)；(xi) 相補軽鎖ポリペプチドとともに、抗原結合領域の対を形成する、タンデムなFdセグメント(V_H - C_H1 - V_H - C_H1)の対を含む「直線状抗体」(Zapata et al., 8 Protein Eng. 1057 (1995)；および米国特許第5,641,870号が挙げられる。

【0089】

「特異性」という用語は、特定の抗体またはその抗原結合断片が結合できる抗原または抗原決定基の異なる型の数を指す。抗体またはその抗原結合部分の特異性は、単独で、または二重特異性ポリペプチド剤もしくは多重特異性ポリペプチド剤に関連して、親和性および/または結合力に基づき決定されうる。(二重特異性ポリペプチド剤または多重特異性ポリペプチド剤などの)抗原結合タンパク質と抗原との解離についての平衡定数(K_D)により表される親和性は、抗原決定基と抗原結合タンパク質上の抗原結合部位との間の結合強度についての尺度であり： K_D の値が低いほど、抗原決定基と抗原結合分子との間の結合強度が強い。あるいは、 $1/K_D$ である親和性定数(K_A)として、親和性を表すこともできる。当業者には明らかであるように、親和性は、関心対象の特異抗原に依存するそれ自体公知の方法で決定されうる。したがって、二重特異性ポリペプチド剤または多重特異性ポリペプチド剤は、本明細書において定義されるように、該アミノ酸配列またはポリペプチドが、別の標的またはポリペプチドと結合する親和性よりも、少なくとも $10\times$ 、例えば、少なくとも $100\times$ 、好ましくは、少なくとも $1000\times$ 、および $10,000\times$ まで、またはそれ以上良好な(上記の通り、例えば、 K_D 値として適切に表される)親和性で第1の抗原と結合する時、別の標的または抗原と比較して、第1の標的または抗原に対して「特異的」であると言われる。例えば、二重特異性ポリペプチド剤または多重特異性ポリペプチド剤が、別の標的または抗原と比較して、ある標的または抗原に対して「特異的」である時、該ポリペプチド剤は、該標的または抗原に指向し、そのような他の標的または抗原に指向しない。

【0090】

結合力とは、(本明細書において記述される二重特異性ポリペプチド剤などの)抗原結合分子と関連抗原との間の結合の強度の尺度である。結合力は、抗原決定基と抗原結合分子上のその抗原結合部位との間の親和性、および抗原結合分子上に存在する関連結合部位の数の両方に関係している。典型的には、(本明細書において記述される二重特異性ポリペプチド剤などの)抗原結合タンパク質は、 10^{-5} ~ 10^{-12} モル/リットルもしくはそれ以下、例えば 10^{-7} ~ 10^{-12} モル/リットルもしくはそれ以下または 10^{-8} ~ 10^{-12} モル/リットルの解離定数(K_D)で(すなわち、 10^5 ~ 10^{12} リットル/モルもしくはそれ以上、および例えば 10^7 ~ 10^{12} リットル/モルまたは 10^8 ~ 10^{12} リットル/モルの会合定数(K_A)で)、同族抗原または特

10

20

30

40

50

異抗原に結合する。10⁻⁴モル/リットルより大きい任意のK_D値(または10⁴M⁻¹未満の任意のK_A値)は一般に、非特異的結合を示すと見なされる。有意(例えば、特異的)であると見なされる生物学的相互作用についてのK_Dは典型的には、10⁻¹⁰ M (0.1 nM) ~ 10⁻⁵ M (10000 nM)の範囲内にある。相互作用が強力であるほど、そのK_Dは低い。本明細書において記述される二重特異性ポリペプチド剤または多重特異性ポリペプチド剤の結合部位は、500 nM 未満、200 nM未満、または10 nM未満、例えば500 pM未満の親和性で、所望の抗原に結合しうる。抗原または抗原決定基との抗原結合タンパク質の特異的結合は、例えば、ラジオイムノアッセイ法(RIA)、酵素イムノアッセイ法(EIA)、およびサンドイッチ競合アッセイ法などのスキヤッチャード分析および/または競合結合アッセイ法、ならびに当技術分野においてそれ自体公知のそれらの種々の変法; ならびに本明細書中に言及される他の技法を含む、それ自体公知の任意の適当な方法で決定されうる。

10

【0091】

したがって、本明細書において用いられる場合、「選択的に結合する」または「特異的に結合する」とは、本明細書において記述されるポリペプチドドメインが、10⁻⁵ M (1000 0 nM)もしくはそれ以下、例えば10⁻⁶ Mもしくはそれ以下、10⁻⁷ Mもしくはそれ以下、10⁻⁸ Mもしくはそれ以下、10⁻⁹ Mもしくはそれ以下、10⁻¹⁰ Mもしくはそれ以下、10⁻¹¹ Mもしくはそれ以下、または10⁻¹² Mもしくはそれ以下のK_Dで、細胞表面に存在する分子などの標的に結合することができることを指す。例えば、本明細書において記述されるポリペプチド剤が、10⁻⁵ Mもしくはそれ以下のK_DでTIM3に結合し、別のTIM分子、例えばTIM1もしくはTIM4、または関連相同体には結合しない場合、その剤は、TIM3に特異的に結合すると言われる。特異的結合は、例えば、ポリペプチド剤の親和性および結合力ならびにポリペプチド剤の濃度により影響を受ける可能性がある。当業者は、適当な細胞結合アッセイ法におけるポリペプチド剤の滴定などの任意の適当な方法を用いて、本明細書において記述されるポリペプチド剤が標的と選択的に結合するための適切な条件を決定することができる。

20

【0092】

同様に、CEACAM1を特異的に標的化する抗体またはエピトープ結合タンパク質は、本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、TIM3へのCEACAM1の結合を阻害するために用いることができる。例えば、いくつかの態様において、ヒト化抗CEACAM1抗体もしくは複合ヒト抗CEACAM1抗体またはその部分は、本明細書において記述される組成物および方法において用いることができる。そのような抗体は、例えば、2011年12月1日付で出願されたAnti-CEACAM1 Recombinant Antibodies for Cancer Therapyと題する米国特許出願第61/565,640号に記述されており、2013年6月6日付で公開されているWO 2013/82366、およびその中で論じられている参考文献に記述されている。例えば、本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、CEACAM1に特異的に結合する特定の単離された組み換え抗体またはその抗原結合部分は、アミノ酸残基SS HGMS (SEQ ID NO:5)からなる重鎖相補性決定領域(CDR) 1、アミノ酸残基TISSGGTYTYPDSVKG (SEQ ID NO: 6)

30

からなる重鎖CDR2、アミノ酸残基HDFDYDAAWFAY (SEQ ID NO: 7)

40

からなる重鎖CDR3、アミノ酸残基SANSSVSYMY (SEQ ID NO: 8)

からなる軽鎖CDR1、アミノ酸残基LTSNLAS (SEQ ID NO:9)からなる軽鎖CDR2、およびアミノ酸残基QQWSSNPPT (SEQ ID NO:10)からなる軽鎖CDR3を含みうる。

【0093】

あるいは、本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、CEACAM1結合抗体またはエピトープ結合ペプチドは、以下より選択されるCDR領域を有する

50

ように構築されうる：アミノ酸残基

SSHGMS (SEQ ID NO:5), SFYGM (SEQ ID NO: 11), またはSDYYLY (SEQ ID NO:12)

からなる重鎖CDR1；アミノ酸残基

TISSGGTYTYPDSVK (SEQ ID NO:6), TFSGGGNYTYPDSVK (SEQ ID NO:13) または TISVGGNTSYPDSVK (SEQ ID NO: 14)

からなる重鎖CDR2；アミノ酸残基

HDFDYDAAWFAY (SEQ ID NO: 7), または HGGLPFYAMDY (SEQ ID NO: 15), または GLTTGPAWFAY (SEQ ID NO: 16)

からなる重鎖CDR3；アミノ酸残基

SANSSVSYMY (SEQ ID NO: 8), SVSSSISSNLH (SEQ ID NO: 17), KSSQSLNNSNQKNYLA (SEQ ID NO: 18), または RASQKISGYLS (SEQ ID NO: 19)

からなる軽鎖CDR1；アミノ酸残基

LTSNLAS (SEQ ID NO: 9), SVSSSISSNLH (SEQ ID NO: 20), FASTRES (SEQ ID NO: 21), または AASTLDS (SEQ ID NO: 22)

からなる軽鎖CDR2；およびアミノ酸残基

QQWSSNPPT (SEQ ID NO: 10), QQWSSHFPFT (SEQ ID NO: 23), QQHYSTPWT (SEQ ID NO: 24) または LQYASSLMLYT (SEQ ID NO: 25)

からなる軽鎖CDR3。例えば、米国特許出願公開第2004/0047858号も参照されたい。

【0094】

本明細書において記述される組成物および方法において有用な他の抗CEACAM1モノクローナル抗体には、マウスにおいてCEACAM1媒介性のEAE抑制を阻害するAgB10 (Fujita et al., 175 Am. J. Pathol. 1116 (2009)); CEACAM1抗体(Chen et al., 2004); ネズミD14H11 (Yu et al., 281 J. biol. Chem. 39179 (2006)); ネズミCEACAM1特異的CC1 (Iijima et al., 199 J. Exp. Med. 471 (2004)); マウス抗ヒトCEACAM1 MRG-1 (Ortenberg 2012); 各々がCEACAM1のN末端ドメインを認識する(Watt et al., 2001)、マウス抗ヒトCEACAM1 N-ドメイン特異的抗体5F4、34B1、および26H7 (IgG1) (Morales et al., 1999); ならびに12-140-4, 4/3/17、COL-4、YG-C28F2、D14HD11、B18.7.7、D11-AD11、HEA 81、CLB-gran-10、F34-187、T84.1、B6.2、およびB1.1が含まれる。モノクローナル抗体34B1、26H7、および5F4もまた、米国特許出願公開第2004/0047858号, Therapeutic anti-BGP(C-CAM1) antibodies and uses thereof; 米国特許第7,132,255号; WO 99/52552、およびMorales et al., 163 J. Immunol. 1363 (1999)に論じられている。特異性のさらなる評価はWatt et al., 2001に公開されており、これには、モノクローナル抗体5F4が、異なるCEACAM1分子のN-ドメイン間のホモフィリックな相互作用に関与している、CEACAM1のN-ドメイン内のドメインに結合することが記述されている。

【0095】

例えば、哺乳類発現ベクターにおいてヒトIgFcに融合されたCEACAM1の細胞外部分 (Markel et al., 110 J. Clin. Invest. 943 (2002)); pCEP4-N-CEACAM1-Fc、Gallagher, 71 J. Virol. 3129 (1997)を参照されたい); および当業者には公知のように、商業的に利用可能なCEACAM1融合タンパク質の供給元を含む、他のCEACAM1-Fc融合タンパク質が記述されている。

【0096】

したがって、本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、CEACAM1はTIM3のリガンドとして提供される。いくつかの態様において、CEACAM1は可溶性CEACAM1でありうる。本明細書において用いられる「可溶性CEACAM1」は、細胞膜から解

10

20

30

40

50

離されている、CEACAM1の機能的変種を含むCEACAM1の任意の形態を指す。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、可溶性CEACAM1は完全長CEACAM1のC末端切斷型である。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、可溶性CEACAM1はCEACAM1の膜貫通欠失型である。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、可溶性CEACAM1はCEACAM1のN末端領域である。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、可溶性CEACAM1はCEACAM1の外部ドメインである。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、可溶性CEACAM1はCEACAM1-Fc融合タンパク質である。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、TIM-3のリガンドまたはTIM3結合分子は、CEACAM1の細胞外領域の单ードメイン、例えば、IgVドメインまたはGFCC'C''表面の一部分を含む。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、可溶性CEACAM1は完全長CEACAM1の選択的スプライスバリエントであり、これはIgVドメイン、およびいくらかの細胞内領域を含む。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、TIM-3のリガンドまたはTIM3結合分子は、CEACAM1の細胞外(外部ドメイン)領域を含む。

10

【0097】

例えば、分泌型ヒトCEACAM1アイソフォーム2 (UniProtKB P13688-2)は、以下のアミノ酸を有する。

20

MGHLSAPLHRVRVPWQGLLTASLLTFWNPPTAQLTTESMMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLF
GYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKS
DLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPRLQ
LSNGNRTLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLNVTYGPDTPTISPSDTYYRPGANLSLS
CYAASNPPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCHANNSVTGCNRTTVKTIIVTELPV
VAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCSTNDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNTTLSINPVKRE
DAGTYWCEVFNPISKKNQSDPIMLNVNCK (SEQ ID NO: 26)

【0098】

分泌型ヒトCEACAM1アイソフォーム3 (UniProtKB P13688-3)は、以下のアミノ酸を有する。

30

MGHLSAPLHRVRVPWQGLLTASLLTFWNPPTAQLTTESMMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQ
QLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQV
IKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSP
RLQLSNGNRTLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLNVTYGPDTPTISPSDTYYRPGAN
LSLSCYAASNPPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCHANNSVTGCNRTTVKTIIVTG
K (SEQ ID NO: 27)

【0099】

分泌型ヒトCEACAM1アイソフォーム4 (UniProtKB P13688-4)は、以下のアミノ酸を有する。

40

MGHLSAPLHRVRVPWQGLLTASLLTFWNPPTAQLTTESMMPFNVAEGKEVLLLVHNLPQQLF
GYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSGRETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKS
DLVNEEATGQFHVYPELPKPSISSNNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPRLQ
LSNGNRTLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLNVTYGPDTPTISPSDTYYRPGANLSLS
CYAASNPPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCHANNSVTGCNRTTVKTIIVTESPVL
GEDEAVPGQHHPQHKPCQEGGCWDVLV (SEQ ID NO: 28)

【0100】

50

最も長いアイソフォームであるCEACAM1-4L (アイソフォーム1)は、526アミノ酸を有し、以下の配列を有する。

10	20	30	40	50	60	
MGHLSAPLHR	VRVPWQGLLL	TASLLTFWNP	PTTAQLTTES	MPFNVAEGKE	VLLLVHNLPQ	
70	80	90	100	110	120	
QLFGYSWYKG	ERVDGNRQIV	GYAIGTQQAT	PGPANSGRE	IYPNASLLIQ	NVTQNDTGFY	
130	140	150	160	170	180	
TLQVIKSDLV	NEEATGQFHV	YPELPKPSIS	SNNSNPVEDK	DAVAFTCEPE	TQDTTYLWWI	10
190	200	210	220	230	240	
NNQSLPVSPR	LQLSNGNRTL	TLLSVTRNDT	GPYECEIQNP	VSANRSDPVT	LNVTYGPDT	
250	260	270	280	290	300	
TISPSDTYYR	PGANLSLSCY	AASNPPAQYS	WLINGTFQQS	TQELFIPNIT	VNNSGSYTCH	
310	320	330	340	350	360	
ANNSVTGCNR	TTVKTIIVTE	LSPVVAKPQI	KASKTTVTGD	KDSVNLTCST	NDTGISIRWF	
370	380	390	400	410	420	
FKNQSLPSSE	RMKLSQGNTT	LSINPVKRED	AGTYWCEVFN	PISKNQSDPI	MLNVNLYNALP	20
430	440	450	460	470	480	
QENGLSPGAI	AGIVIGVVAL	VALIAVALAC	FLHFGKTGRA	SDQRDLTEHK	PSVSNHTQDH	
490	500	510	520			
SNDPPNKMNE	VTYSTLNFEA	QQPTQPTSAS	PSLTATEIIY	SEVKKQ	(SEQ ID NO: 29)	

【0101】

上記のアミノ酸配列は、リーダー配列(34アミノ酸)、およびQLTから始まる成熟ペプチドを含む。ヒト(ID: 634)、マウス(ID: 26365)、ラット(ID: 81613)、ウシ(ID: 404118)、ゼブラフィッシュ(ID: 114465)、イヌ(ID: 612435)、ヤギ(ID: 100384959)、およびオランウータン(ID: 100172828)を含むさまざまな種のCEACAM1アイソフォームのDNAおよびアミノ酸配列がNCBIのワールド・ワイド・ウェブにて入手可能である。

【0102】

本明細書において記述される組成物および方法で用いるためのCEACAM1またはその部分は、当業者に公知の分子的・方法によるクローニングおよび発現などの、当技術分野において公知の方法によって作製することができる。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、CEACAM1またはその一部分をコードする遺伝子は、各タンパク質の過剰発現のための発現ベクターにクローニングされる。

【0103】

本明細書において記述される組成物および方法のさまざまな態様において有用なCEACAM1の機能的変種は、そのような分子がTIM3に結合する能力を保持しているという条件で、完全長CEACAM1の変異、付加、欠失、および切断を示す分子を含む。あるいは、いくつかの態様において、CEACAM1により刺激されたTIM3活性またはTIM3により刺激されたCEACAM1活性を阻害する薬剤は、可溶性CEACAM1タンパク質もしくは結合体、またはタンパク質もしくは抗体；CEACAM1 mRNAに特異的な、もしくはCEACAM1 mRNAを標的化する低分子干渉RNA；またはCEACAM1のメッセンジャーRNAとハイブリダイズするアンチセンスRNAを含むことができる。

【0104】

CEACAM1に結合する例示的な薬剤、ならびにそのような薬剤を特定するためおよびそのような薬剤がT細胞活性を増強または抑制するかどうかを特定するための方法は、例えば

10

20

30

40

50

、米国特許第7,132,255号および同第6,852,320号、ならびにその中で引用されている参考文献の中に見出され、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0105】

さらに、CEACAM1のホモフィリックな結合はTIM3を上方制御するので、いくつかの態様において、ホモフィリックなCEACAM1結合の阻害を用いて、この上方制御を負に調節することができる。逆に、本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、CEACAM1のホモフィリック結合を増強する薬剤を用いて、TIM3発現を上方制御することができる。ゆえに、本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様は、細胞集団におけるTIM3の発現または機能を調節するための手法としてCEACAM1のホモフィリック結合の調節を提供する。トランスのホモフィリックなCEACAM1結合は、N末端免疫グロブリン様ドメインによって伝達されるアロステリック機構によりシス二量体化を誘導する。CEACAM1-Lホモ二量体形成は、CEACAM1-Sの共発現により低減され、抗体のライゲーションにより調節される。CEACAM1による膜貫通シグナル伝達は、単量体/二量体平衡の変化によって作動しうる。Muller et al., 187 J. Cell Biol. 569 (2009)。ホモフィリックなCEACAM1結合を選択的に減少または増加させる例示的な薬剤は、例えば、米国特許第7,132,255号および同第6,852,320号、ならびにその中で引用されている参考文献において記述されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

10

【0106】

いくつかの態様において、融合ポリペプチドは、TIM3またはCEACAM1ポリペプチドと、融合ポリペプチドのインビボでの安定性を増加させるための、またはその生物活性もしくは局在性を調節するための、または融合ポリペプチドの精製を容易にするための第2の異種ポリペプチドとを含む。本明細書において記述される組成物および方法で用いるためのTIM3またはCEACAM1融合ポリペプチドを生成するために使用できる例示的な異種ポリペプチドとしては、アフィニティークロマトグラフィーによる融合ポリペプチドの単離に特に有用である、ポリヒスチジン(Hisまたは6Hisタグ)、Glu-Glu、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、ポリペプチドA、ポリペプチドG、免疫グロブリン重鎖定常領域(Fc)、およびマルトース結合ポリペプチド(MBP)が挙げられるが、これらに限定されることはない。アフィニティー精製の目的では、グルタチオン結合樹脂、アミラーゼ結合樹脂、およびニッケル結合樹脂またはコバルト結合樹脂などの、アフィニティークロマトグラフィーのための関連マトリックスが用いられる。融合ドメインはまた、特異抗体が利用可能な、通常は短いペプチド配列である「エピトープタグ」を含む。特異的なモノクローナル抗体が容易に利用可能である周知のエピトープタグには、FLAG、インフルエンザウイルス・ヘマグルチニン(HA)、およびc-mycタグが含まれる。場合によっては、融合ドメインは、関連プロテアーゼが融合ポリペプチドを部分的に消化し、それによって、そこから組み換えポリペプチドが遊離するのを可能にする、例えば第Xa因子またはトロンビンに対する、プロテアーゼ切断部位を有する。遊離されたポリペプチドを次いで、その後のクロマトグラフィー分離により融合ドメインから単離することができる。当技術分野において周知の別の融合ドメインは、緑色蛍光ポリペプチド(GFP)である；そのような標識分子も誘導体といわれうる。これらの融合は当業者に周知である。例えば、PCT US2007/024067を参照されたい。

20

30

40

【0107】

本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、TIM3およびCEACAM1の両方に特異的に結合する二重特異性ポリペプチド剤が用いられる。本明細書において用いられる場合、「二重特異性ポリペプチド剤」という用語は、第1の標的に対する結合特異性を有する結合部位を有する第1のポリペプチドドメインと、第2の標的に対する結合特異性を有する結合部位を有する第2のポリペプチドドメインとを含むポリペプチドを指し、すなわち、該薬剤は2つの標的、例えば、CEACAM1およびTIM3に対する特異性を有する。第1の標的および第2の標的は、同じものではない(すなわち、異なる標的(例えば、タンパク質)である)。異なる標的は、CEACAM1およびTIM3について本明細書に論じられているように、同じ細胞上に、すなわちシスで共発現されうる。二重特異性ポリペプチド

50

剤は、単一細胞上に存在する標的に結合することができ(シスでのヘテロフィリック結合)、ならびに/またはある細胞上のある標的と別の細胞上の他の標的とに結合することができる(トランスでのヘテロフィリック結合)。したがって、本明細書において記述される二重特異性ポリペプチド剤は、第1の標的および第2の標的を発現する細胞に選択的かつ特異的に結合することができる。二重特異性ポリペプチド剤の非限定的な例は、二重特異性抗体構築物である。2種の異なる抗原、例えば、TIM3およびCEACAM1に特異的な抗体の抗原結合部分を含む二重特異性抗体構築物は、当業者によって容易に構築されうる。一般に、ある抗原上の所望のエピトープに結合することが特徴付けられかつ知られた第1の抗体の抗原結合ドメインをコードする配列は、直接的に、または当業者に公知のような種々のリンカーのうちのいずれかを通じて、第2の抗原上の所望のエピトープに結合することが特徴付けられかつ知られた第2の抗体の抗原結合ドメインをコードする配列に連結されうる。そのような配列を、適切なベクターへ挿入して細胞に導入し、当業者に公知の方法によって二重特異性抗体ポリペプチドを產生することができる。

10

【0108】

本明細書において用いられる場合、「多重特異性ポリペプチド剤」という用語は、少なくとも、第1の標的、例えばTIM3に対する結合特異性を有する結合部位を有している第1のポリペプチドドメインと、第2の標的、例えばCEACAM-1に対する結合特異性を有する結合部位を有している第2のポリペプチドドメインとを含むポリペプチドを指す。第1の標的および第2の標的は同じものではない(すなわち、異なる標的(例えば、タンパク質)である)が、両方とも1つの細胞上に存在しうる(例えば、共発現されうる)。本明細書において記述される多重特異性ポリペプチド剤は、加えて、1種または複数種のさらなる標的に結合することができ、すなわち、多重特異性ポリペプチドは、少なくとも2種の、少なくとも3種の、少なくとも4種の、少なくとも5種の、少なくとも6種の、またはそれ以上の標的に結合することができ、ここで多重特異性ポリペプチド剤は、それぞれ少なくとも2種の、少なくとも、少なくとも3種の、少なくとも4種の、少なくとも5種の、少なくとも6種の、またはそれ以上の標的結合部位を有する。多重特異性ポリペプチド剤は、該薬剤が特異的である標的の全てを発現する細胞と、1種の標的しか発現していない、または該薬剤が特異的であるよりも少ない標的を発現する細胞よりも、強固に(例えば、高い結合力で)結合する。多重特異性ポリペプチド剤の非限定的な例は、多重特異性抗体またはその抗原結合断片である。誤解を避けるために、二重特異性ポリペプチド剤は、多重特異性ポリペプチド剤の一種または一部である。

20

【0109】

さらに、いくつかの態様においては、循環血中で20時間よりも大きな半減期を典型的に有する安定な血漿ポリペプチドを用いて、TIM3またはCEACAM1との融合ポリペプチドを構築することができる。そのような血漿ポリペプチドには、免疫グロブリン、血清アルブミンまたはその部分、リポポリペプチド、アボリポポリペプチド、およびトランスフェリンが含まれるが、これらに限定されることはない。TIM3またはCEACAM1分子を特定の細胞または組織型へ標的化できる配列を、TIM3またはCEACAM1に付着させて、特異的に局在化されるTIM3またはCEACAM1融合ポリペプチドを作製することもできる。例えば、PCT US2007/024067を参照されたい。

30

【0110】

いくつかの態様において、本明細書において提供される、または本明細書において記述される方法において用いられる、TIM3またはCEACAM1ポリペプチドは、翻訳後修飾をさらに含むことができる。例示的な翻訳後ポリペプチド修飾には、リン酸化、アセチル化、メチル化、ADP-リボシル化、ユビキチン化、グリコシル化、カルボニル化、SUMO化、ビオチン化、またはポリペプチド側鎖のまたは疎水性基の付加が含まれる。結果として、修飾されたポリペプチドは、脂質、多糖類または単糖類、およびホスフェートなどの、非アミノ酸要素を含みうる。そのような分子を誘導体ということもできる。

40

【0111】

本明細書において記述される組成物および方法で用いるためのTIM3またはCEACAM1ペプ

50

チドの他の誘導体には、インビボでペプチドの半減期を増強できる、PEGなどのポリマーと結合されたまたは結び付けられたものが含まれる。PEG修飾は当技術分野において周知である。例えば、PCT US2007/024067を参照されたい。

【0112】

本明細書において用いられる場合、「標的」という用語は、結合部位を有するポリペプチドドメインが選択的に結合できる生物学的分子(例えば、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、脂質、糖質)を指す。標的は、例えば、細胞内標的(例えば、細胞内タンパク質標的)または細胞表面標的(例えば、膜タンパク質、受容体タンパク質)でありうる。

【0113】

本明細書において用いられる場合、「免疫グロブリン」は、2つのシートを含み、かつ、保存されたジスルフィド結合を通常含む、抗体分子に特徴的な免疫グロブリンの折り畳みを保持しているポリペプチドのファミリーを指す。免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーは、免疫系における広範な役割(例えば、抗体、T細胞受容体分子など)、細胞接着への関与(例えばICAM分子)および細胞内シグナル伝達(例えば、PDGF受容体などの受容体分子)を含む、インビボの細胞および非細胞の相互作用の多くの局面に関与している。

10

【0114】

標的分子上の「標的部位」または「リガンド相互作用部位」は、リガンド、受容体もしくは他の結合パートナーへの結合のための部位である標的上の部位、エピトープ、抗原決定基、部分、ドメインもしくはアミノ酸残基のストレッチ、触媒部位、切断部位、アロステリック相互作用のための部位、標的の多量体化(例えば、ホモマー化もしくはヘテロ二量体化)に関与する部位; または標的、例えば、TIM3もしくはCEACAM1の生物学的作用もしくは機構に関与する抗原もしくは標的上の他の任意の部位、エピトープ、抗原決定基、部分、ドメインもしくはアミノ酸残基のストレッチを意味する。より一般的には、「リガンド相互作用部位」は、標的(および/または標的もしくは抗原が関与する任意の経路、相互作用、シグナル伝達、生物学的機構もしくは生物学的效果)、例えば、CEACAM1とTIM3との間の相互作用が調節されるように、本明細書において記述される薬剤または二重特異性もしくは多重特異性薬剤の結合部位が結合しうる、抗原または標的上の任意の部位、エピトープ、抗原決定基、部分、ドメインまたはアミノ酸残基のストレッチができる。

20

【0115】

本明細書において用いられる場合、「遮断」抗体または抗体「アンタゴニスト」は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害または低減するものである。例えば、CEACAM1/TIM-3二重特異性アンタゴニスト抗体は、CEACAM1およびTIM-3に結合し、T細胞寛容を誘導または維持するCEACAM1およびTIM-3の能力を阻害する。ある態様において、本明細書において記述される遮断抗体もしくはアンタゴニスト抗体またはその部分は、抗原の生物学的活性を完全に阻害する。

30

【0116】

本明細書において用いられる場合、「ドメイン」は、タンパク質の残部とは独立してその三次構造を保持している、折り畳まれたタンパク質構造を指す。一般に、ドメインは、タンパク質の別々の機能的特性を担っており、多くの場合、それが付加もしくは移動されたタンパク質の残りの部分および/またはドメイン自体の機能または特性の損失なしに、他のタンパク質に付加、除去または移動されうる。抗体またはその部分に関連して、「結合ドメイン」という用語は、抗原決定基に対するそのようなドメインを指す。「単一の抗体可変ドメイン」とは、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含む、折り畳まれたポリペプチドドメインを意味する。それゆえ、それには、完全な抗体可変ドメインおよび改変された可変ドメイン、例えば、1つもしくは複数のループが抗体可変ドメインに特徴的でない配列に交換されたもの、または切断されているかもしくはN末端もしくはC末端の伸張を含む抗体可変ドメインが含まれ、完全長ドメインの結合活性および特異性を少なくとも一部保持している可変ドメインの折り畳まれた断片も含まれる。したがって、二重特異性ポリ

40

50

ペプチド剤は、少なくとも2つの異なる結合ドメインを含む。

【0117】

単純な結合アッセイ法を用いて、TIM3もしくはCEACAM1に結合する薬剤、またはTIM3ポリペプチドとCEACAM1ポリペプチドとの間の相互作用を破壊する薬剤をスクリーニングまたは検出することができる。TIM3およびCEACAM1は膜貫通タンパク質であるので、いくつかの態様において、完全長タンパク質ではなくこれらのタンパク質の可溶型を用いるアッセイ法を用いることができる。可溶型には、例えば、膜貫通ドメインを欠いているもの、および/またはIgVドメインを含むもの、もしくはその同族の結合パートナーに結合するその能力を保持しているIgVドメインの断片を含むものが含まれる。

【0118】

さらに、組み換えCEACAM1またはTIM3ペプチド模倣体を含む、本明細書において記述される組成物および方法で用いるためのCEACAM1/TIM3の相互作用を阻害または増強する薬剤は、例えば、細胞にCEACAM1およびTIM3発現ベクターをトランスフェクションすること(例えば、ヒトCEACAM1およびTIM3発現プラスミドをトランスフェクションされた293T細胞); 細胞を薬剤と接触させること; 細胞を溶解すること; ならびに薬剤と接触させていない細胞と比べてCECAM1/TIM3の相互作用を特徴付けることによって特定することができる。細胞は、例えば、共免疫沈降を用いて特徴付けることができる。

【0119】

本明細書において記述される組成物および方法で用いるための、CEACAM1/TIM3の相互作用を阻害または増強する薬剤を特定するための別のアッセイ法では、CEACAM1のホモフィリックなライゲーションによって上方制御されたTIM3の発現を分析する。例えば、マウスのT細胞を、例えばSEBの投与によって活性化し、その後、T細胞を単離し、CEACAM1(例えば、CEACAM1 Nドメイン-Fcまたは別のペプチド模倣体)有りまたは無しで、および薬剤有りまたは無しでSEBに再曝露し、例えばFACSにより、TIM3発現を比較することができる。ホモフィリックなCEACAM1のライゲーションを阻害する薬剤と細胞が接触しているサンプルにおいては、TIM3発現は、薬剤を欠いている細胞においてよりも低い。例えば、プレートにCEACAM1またはTIM3融合タンパク質が結合されているELISAアッセイ法などの、インビトロ・アッセイ法を用いることができ、これらの相互作用を調節できる因子の存在下で、それぞれ、TIM3またはCEACAM1の結合をモニタリングすることができる。TIM3もしくはCEACAM1の結合をそれぞれ模倣するかまたは結合を競い合う因子を用いて、CEACAM1またはTIM3でトランスフェクションされた細胞で類似の研究を行うことができる。あるいはまたはさらに、BIACORE(表面プラズモン共鳴)アッセイ法を、結合および競合分析のために可溶性CEACAM1またはTIM3アイソフォームを用いて行うことができる。

【0120】

そのようなアッセイ法において有用な検出方法には、抗体(すなわち、「遊離」タンパク質に対して作製された抗体)に基づく方法、(蛍光標識などの)「遊離」タンパク質へ組み込まれたレポーター部分の直接検出、および近位エネルギー移動(proximity energy transfer)方法(例えば固定化されたタンパク質または固体支持体へ組み込まれた分子の蛍光またはシンチレーションを生じる、放射活性「遊離」タンパク質)が含まれる。

【0121】

CEACAM1タンパク質へのTIM3タンパク質の結合を決定するための別の種類のアッセイ法は、親和性バイオセンサ方法の使用によるものである。そのような方法は、圧電効果、電気化学、または光学的方法、例えば、橢円偏光法、光波ガイド(optical wave guidance)、および表面プラズモン共鳴(SPR)に基づきうる。例えば、TIM3またはCEACAM1の発現に及ぼすsiRNAの効力は、各遺伝子それぞれに特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いる定量的RT-PCR、または末梢血サンプル由来のTIM3および/もしくはCEACAM1に対するELISAなどの、当技術分野において公知の方法を用いてモニタリングすることができる。あるいは、血液細胞の集団を、当技術分野において知られるまたは本明細書において開示される特定の集団および亜集団に特徴的なマーカーを用いるFACS分析によって決定することができる。

10

20

30

40

50

【0122】

TIM3の活性を決定するためのアッセイ法は、米国特許出願公開第2005/0191721号に開示されている。エクスピボ・アッセイ法の一例では、磁気ビーズ(Miltenyi Biotech)を用いて健常対象の末梢血から陰性選択によりヒト単球を単離する。単球(細胞 2×10^5 個/ウェル)を段階的用量のCEACAM1ポリペプチドで刺激し、サイトカインの産生をELISAによって48時間後に測定し、TIM3、またはCEACAM1とTIM3との組み合わせのいずれかで刺激された単球におけるサイトカインの産生と比較する。

【0123】

いくつかの局面において、本明細書において記述されるように、TIM3とのCEACAM1の相互作用を調節する薬剤の治療的有効量を対象に投与する段階を含む、インビボで免疫応答を増強または抑制するための方法が本明細書において提供される。TIM3とのCEACAM1の相互作用に影響を与える分子によるT細胞寛容の調節は、インビボで免疫応答を特異的に増強または抑制するのに有用であり、これは、自己免疫疾患、がん、および移植(例えば、骨髄および臓器)を含む免疫機能に関連した状態の処置に有用でありうる。T細胞寛容の調節はまた、がん、自己免疫疾患、および移植の実験モデルにおいて、処置がT細胞を非機能的にしたかを判定するために、例えば、特定の臓器または生理学的過程に及ぼすT細胞機能の増加または減少の効果を判定するために、およびT細胞活性を増加または減少させる薬剤を試験するために、対象のT細胞が機能的(例えば増殖および/または細胞傷害機能)であるかどうかを判定することを含めて、インビトロにおいてまたは非治療的用途において有用である。その他の使用が当業者には明らかであろう。CEACAM1/TIM3の相互作用を調節する薬剤は、一次療法として単独で用いてもよく、または併用療法として他の治療用物質との組み合わせで用いて、他の医学的処置の治療的有用性を増強してもよい。

10

20

30

40

【0124】

本明細書において用いられる場合、「調節すること」または「調節する」とは一般に、適当なインビトロ・アッセイ法、細胞アッセイ法、またはインビボ・アッセイ法を用いて測定されるような、CEACAM1またはTIM3などの標的または抗原の活性を低減することまたは阻害すること、あるいは活性を増加させることを意味する。具体的には、「調節すること」または「調節する」とは、(通常、関与する標的に依存するであろう)適当なインビトロ・アッセイ法、細胞アッセイ法またはインビボ・アッセイ法を用いて測定されるような、同じ条件下であるが薬剤の存在がない同じアッセイ法における標的の活性と比べて、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、またはそれ以上を含めて、CEACAM1またはTIM3などの標的または抗原の活性を低減することまたは阻害すること、あるいは(関連するまたは意図された)生物学的活性を増加させることを意味しうる。したがって、本明細書において用いられる場合、「調節すること」という用語は、TIM3/CEACAM1相互作用を調節する薬剤で処置されていない対象と比べたTIM3/CEACAM1相互作用の増加または減少を指すことができる。「増加する」または「減少する」は、それぞれ統計的に有意な増加または減少を指す。誤解を避けるために、増加または減少は、基準と比べて少なくとも10%であり、例えば少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%またはそれ以上、少なくとも100%までまたはそれ以上を含み、増加の場合、例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、またはそれ以上である。

30

【0125】

当業者には明らかであるように、「調節すること」は、リガンド、結合パートナー、ホモ多量体型もしくはヘテロ多量体型への会合のためのパートナー、または基質のうちの1種または複数種に対する、CEACAM1またはTIM3などの標的または抗原の親和性、結合力、特異性および/または選択性の変化(増加または減少のどちらかでありうる)をもたらすこと; ならびに/あるいは同じ条件であるが二重特異性または多重特異性ポリペプチド剤の

50

存在無しと比べて、標的または抗原が存在する媒体または環境における1つまたは複数の条件(例えば、pH、イオン強度、補因子の存在など)に対する、CEACAM1またはTIM3などの標的または抗原の感度の変化(増加または減少のどちらかでありうる)をもたらすことも含むことができる。同じく、これも、関与する標的に依存する任意の適当な方法でおよび/またはそれ自体公知のもしくは本明細書において記述される任意の適当なアッセイ法を用いて判定することができる。「調節すること」は、標的もしくは抗原が関与している1つもしくは複数の生物学的もしくは生理学的な機構、効果、応答、機能、経路もしくは活性(またはシグナル伝達経路もしくは代謝経路、およびそれらに関連した生物学的もしくは生理学的な効果などの、その基質、リガンドもしくは経路が関与しているもの)に対して変化を及ぼすこと(すなわち、CEACAM1またはTIM3などの標的または抗原、および所望の生物学的または生理学的な効果に依存する、アゴニスト、アンタゴニストまたは逆アゴニストとしてのそれぞれの活性)を意味することもできる。やはり、当業者には明らかであるように、アゴニストまたはアンタゴニストとしてのそのような作用も、関与する標的または抗原に依存する任意の適当な方法でおよび/またはそれ自体公知のもしくは本明細書において記述される任意の適当なアッセイ法(インビトロ・アッセイ法、通常は、細胞アッセイ法またはインアッセイ法)を用いて決定することができる。

10

【0126】

調節することは、例えば、CEACAM1もしくはTIM3などの標的のアロステリックな調節;ならびに/あるいは標的の基質もしくはリガンドのうちの1つへの標的の結合を低減させるかもしくは阻害すること、および/または標的への結合について天然リガンドである基質と競合させることも含むことができる。調節することは、標的、またはそれが関与している機構もしくは経路を活性化させることも含むことができる。調節することは、例えば、標的の折り畳みもしくは高次構造に関しての変化、または標的の折り畳まれる能力、(例えば、リガンドの結合により)その高次構造を変化させる能力、他の(サブ)ユニットと結び付く能力、または解離する能力に関しての変化をもたらすことも含むことができる。調節することは、例えば、標的の、シグナル伝達する、リン酸化する、脱リン酸化するなどの能力の変化をもたらすことも含むことができる。

20

【0127】

したがって、例えば、TIM3またはCEACAM1活性は、1つもしくは複数のシグナル伝達活性またはTIM3もしくはCEACAM1活性の下流の読み出しが、薬剤または刺激の存在下で、そのような調節のない場合と比べて、統計的に有意な量だけ低減される場合、例えば、少なくとも100%までを含め、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、またはそれ以上低減される場合、「減少され」ている。当業者によって理解されるように、いくつかの態様において、TIM3またはCEACAM1活性が減少される場合、下流の読み出しのなかには減少するものもあるが、増加しするもの(すなわち、TIM3またはCEACAM1活性によって通常抑制されているもの)もあり、その逆は、Tim-3/Ceacam1活性が増加される態様において起こるであろう。

30

【0128】

逆に、TIM3またはCEACAM1活性は、1つもしくは複数のシグナル伝達活性またはTIM3もしくはCEACAM1活性の下流の読み出しが、薬剤または刺激の存在下で、そのような薬剤または刺激の非存在下と比べて、統計的に有意な量だけ増加される場合、例えば、少なくとも100%またはそれ以上までを含めて、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%またはそれ以上、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、またはそれ以上増加される場合、「増加され」ている。

40

【0129】

本明細書において用いられる場合、「T細胞寛容を促進する」という用語は、所与の処

50

置または一連の条件がT細胞寛容の増大をもたらすことを意味する。当業者は、例えば、シグナル1(SEB)がCEACAM1を強力に刺激し、その後に、CEACAM1依存的であるTIM3の上方制御が行われるSEBモデルを用いて、T細胞寛容の増大が達成されるかどうかを判定することができる。CEACAM1の非存在下では(例えば、対照ノックアウトマウスにおいてなど)、またはCEACAM1の上方制御もしくは機能を遮断する因子の存在下では、SEB刺激によりTIM3を活性化することができない。そのようなモデルを、T細胞寛容を読み出しとして用いてCEACAM1およびTIM3を調節する融合タンパク質、抗体、ペプチドなどを調べるように適合させることができる。正常マウスでは、ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)の新生仔期注入により、反応性T細胞受容体(TCR) V領域を発現するT細胞において寛容が誘導される。例えば、TIM3の非存在下などにおいて、T細胞寛容が抑止または低減される場合、V8を発現しているT細胞は、寛容が低減される、すなわち、より高い活性を有するであろう。

10

【0130】

本明細書において記述される方法を用いたT細胞寛容の調節を必要としている対象は、がんを有している対象もしくはがんのリスクがある対象、自己免疫疾患と診断された対象、免疫無防備状態の個体、臓器移植レシピエント、または病原体による感染に苦しんでいる対象を含むが、これらに限定されることはない。

20

【0131】

本明細書において用いられる場合、調節される「免疫応答」は、B細胞、T細胞(CD4もしくはCD8)、制御性T細胞、抗原提示細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、NKT細胞、NK細胞、好塩基球、好酸球、または好中球などの免疫系の細胞による、刺激に対する応答を指す。いくつかの態様において、応答は、特定の抗原に特異的であり(「抗原特異的な応答」)、抗原特異的な受容体を介したCD4 T細胞、CD8 T細胞、またはB細胞による応答を指す。いくつかの態様において、免疫応答は、CD4+応答またはCD8+応答などのT細胞応答である。これらの細胞によるそのような応答は、例えば、細胞傷害、増殖、サイトカインもしくはケモカインの産生、輸送、または食作用を含むことができ、それは応答を起こしている免疫細胞の性質に依存しうる。本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、調節される免疫応答は、T細胞寛容である。

20

【0132】

本明細書において記述される方法のいくつかの態様において、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤を投与される対象は、自己免疫疾患と診断されているか、自己免疫疾患有しているか、または自己免疫疾患有している。したがって、いくつかの局面において、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の有効量を投与する段階を含む、自己免疫障害を有しているかまたは自己免疫障害と診断された対象を処置する方法が本明細書において提供される。いくつかの局面において、対象におけるT細胞寛容の増大または自己免疫障害の処置において用いるための、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節する薬剤も本明細書において提供される。

30

【0133】

「自己免疫疾患」は、対象自身の抗体が宿主組織と反応するか、または免疫エフェクタT細胞が内因性の自己ペプチドに対して自己反応性であり、組織の破壊を引き起こす疾患のクラスを指す。したがって、免疫応答は、自己抗原といわれる対象自身の抗原に対して開始される。本明細書において用いられる「自己抗原」は、正常な宿主組織の抗原を指す。正常な宿主組織は、がん細胞を含まない。

40

【0134】

したがって、いくつかの態様において、本明細書において記述される方法を用いて処置または予防される自己免疫疾患には、関節リウマチ、クローラン病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス(SLE)、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症(MG)、橋本甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、天疱瘡(例えば、尋常性天疱瘡)、グレーヴズ病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、抗コラーゲン抗体による強皮症、混合結合組織病、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アディソン病、自己免疫関連不妊症、糸球体腎炎(例え

50

ば、半月体形成性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎)、水疱性類天疱瘡、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性および自己免疫性糖尿病(1型糖尿病；インスリン依存型糖尿病)が含まれるが、これらに限定されることはない。自己免疫疾患は、アテローム性動脈硬化症およびアルツハイマー病も包含するものと認識されている。本明細書において記述される局面の1つの態様において、自己免疫疾患は、多発性硬化症、1型糖尿病、橋本甲状腺炎、クローン病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、胃炎、自己免疫性肝炎、溶血性貧血、自己免疫性血友病、自己免疫性リンパ増殖性症候群(ALPS)、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、糸球体腎炎、ギラン・バレー症候群、乾癬および重症筋無力症からなる群より選択される。

【0135】

10

本明細書において記述される方法のいくつかの態様において、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤を投与される対象は、臓器移植などの移植を有するか、または受ける予定である。したがって、いくつかの局面において、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の有効量を投与する段階を含む、臓器または組織移植レシピエントである対象を処置する方法が本明細書において提供される。いくつかの態様において、本明細書において記述される方法は、対象における移植寛容を増加させるために用いられ、対象に治療的有効量のCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤；またはT細胞集団などの、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤と接触させた細胞集団を投与する段階を含む。いくつかの局面において、対象におけるT細胞寛容の増大または移植寛容の増大において用いるための、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節する薬剤も本明細書において提供される。いくつかのそのような態様において、対象は同種移植片のレシピエントである。移植片は、心臓、腎臓、肝臓、皮膚、脾臓、骨髄、皮膚または軟骨を含むがこれらに限定されない、任意の臓器または組織移植片でありうる。本明細書において用いられる「移植寛容」は、レシピエントの免疫系によるドナー臓器の拒絶がないことを指す。

20

【0136】

本明細書において記述される方法の他の局面および態様において、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤を投与される対象は、がんまたは腫瘍を有する。したがって、いくつかの局面において、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の有効量を投与する段階を含む、がんまたは腫瘍を有する対象を処置する方法が本明細書において提供される。いくつかの局面において、対象におけるT細胞寛容の減少またはがんもしくは腫瘍の処置において用いるための、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節する薬剤も本明細書において提供される。

30

【0137】

本明細書において用いられる「がん」または「腫瘍」は、身体の臓器および系の正常な機能に干渉する、制御されない細胞の成長を指す。がんまたは腫瘍を有する対象は、対象の体内に存在する客観的に測定可能ながん細胞を有する対象である。良性および悪性のがんも、この定義に含まれ、休止状態の腫瘍または微小転移巣も含まれる。最初の位置から遊走し、生命の維持に必要な臓器に生着したがんは、最終的には、影響を受けた臓器の機能的悪化を通して対象の死をもたらすことがある。白血病などの造血系のがんは、対象における正常な造血コンパートメントより優勢となり、それにより、(貧血、血小板減少症および好中球減少症の形態で)造血不全をもたらし、最終的には死を引き起こしうる。

40

【0138】

「転移」とは、がんの原発部位から体内の他の場所へのがんの伝播を意味する。がん細胞は、原発腫瘍から離れ、リンパ管および血管に浸透し、血流中を循環し、体内の他の場所にある正常組織内の遠位病巣において成長する(転移する)ことができる。転移は、局所または遠位でありうる。転移は、腫瘍細胞の原発腫瘍からの離脱、血流中の移動、および遠位部位における停止に依存する、逐次的な過程である。新たな部位で、細胞は、血液供給を確立し、成長して、生命を脅かす腫瘍を形成することができる。腫瘍細胞内の刺激性分子経路および阻害性分子経路の両方が、この挙動を制御し、遠位部位における腫瘍細胞

50

と宿主細胞との間の相互作用も重要である。

【0139】

転移は、ほとんどの場合、特定の症状のモニタリングに加えて、磁気共鳴画像(MRI)スキャン、コンピュータ断層撮影(CT)スキャン、血球数および血小板数、肝機能研究、胸部X線ならびに骨スキャンの単独使用または組み合わせ使用を通して検出される。

【0140】

がんの例としては、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されることはない。そのようながんのより具体的な例としては、基底細胞癌、胆道がん；膀胱がん；骨がん；脳およびCNSのがん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；

10 細毛癌；結腸がんおよび直腸がん；結合組織がん；消化器系がん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん(胃腸がんを含む)；膠芽腫；肝癌；肝細胞癌；上皮内新生物；腎臓がんまたは腎がん；喉頭がん；白血病；肝がん；肺がん(例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺がん、および肺の扁平上皮癌)；ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫；黒色腫；骨髄腫；神経芽腫；口腔がん(例えば、唇、舌、口、および咽頭)；卵巣がん；肺がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；

直腸がん；呼吸器のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん；精巣がん；甲状腺がん；子宮がんまたは子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ならびに他のがん腫および肉腫；ならびにB細胞リンパ腫(低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)；小リンパ球性(SL)NHL；中悪性度/濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL；巨大腫瘤病変NHL；マントル細胞リンパ腫；エイズ関連リンパ腫；およびワルデンシュトライムマクログロブリン血症を含む)；慢性リンパ球性白血病(CLL)；急性リンパ芽球性白血病(ALL)；

20 ヘアリーセル白血病；慢性骨髄芽球性白血病；および移植後リンパ球増殖性障害(PTLD)；ならびに母斑症に関連した異常血管増殖、(脳腫瘍に関連したものなどの)浮腫、ならびにメイグス症候群が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0141】

本明細書において記述されるいくつかの態様において、本方法は、本明細書において記述されるCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤を投与される対象に、腫瘍抗原またはがん抗原を投与する段階をさらに含む。

【0142】

30 特定のがんに関連しているいくつかの腫瘍抗原が同定されている。本明細書において用いられる場合、「腫瘍抗原」および「がん抗原」という用語は、がん細胞により差次的に発現され、それによって、がん細胞を標的化するために活用されうる抗原を指すように互換的に用いられる。がん抗原は、見かけ上は腫瘍特異的な免疫応答を刺激する可能性がある抗原である。これらの抗原のいくつかは正常細胞によって、コードされているが、必ずしも発現されるわけではない。これらの抗原は、正常細胞においては通常サイレントである(すなわち、発現されない)もの、ある分化段階においてのみ発現されるもの、ならびに胚抗原および胎児抗原などの一時的に発現されるものとして特徴付けられうる。他のがん抗原は、がん遺伝子(例えば、活性化されたrasがん遺伝子)、抑制遺伝子(例えば、変異p53)、内部欠失または染色体転座に起因する融合タンパク質などの変異細胞遺伝子によりコードされる。さらに他のがん抗原は、RNA腫瘍ウイルスおよびDNA腫瘍ウイルスが保持しているものなどのウイルス遺伝子によってコードされうる。多くの腫瘍抗原が、複数の固形腫瘍に関して定義されている：免疫により定義されたMAGE 1、2、および3；MART-1/Melan-A、gp100、癌胎児性抗原(CEA)、HER-2、ムチン(すわなち、MUC-1)、前立腺特異抗原(PSA)、ならびに前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)。加えて、B型肝炎(HBV)、エピスタインバー(EBV)、およびヒトパピローマ(HPV)などのウイルスタンパク質は、それぞれ、肝細胞癌、リンパ腫、および子宮頸がんの発症において重要であることが示されている。しかしながら、がんと診断された患者の免疫抑制のため、これらの患者の免疫系は、腫瘍抗原に対して応答できないことが多い。

【0143】

10

20

30

40

50

本明細書において記述される方法のいくつかの態様において、本方法は、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤を投与される対象に化学療法剤を投与する段階をさらに含む。化学療法剤の非限定的な例としては、チオテパおよびサイトキサン(CYTOXAN) (登録商標)シクロフォスファミドなどのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド(*triethylenephosphoramide*)、トリエチレンチオホスファオラミド(*triethylenethiophosphoramide*)およびトリメチロロメラミン(*trimethylolomelamine*)を含むエチレンイミンおよびメチラメラミン；アセトゲニン(特にプラタシンおよびプラタシノン)；カンプトテシン(合成類似体トポテカンを含む)；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼルシンおよびビゼレシン合成類似体を含む)；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8)；ドラスタチン；デュオカルマイシン(合成類似体KW-2189およびCB1-TM1を含む)；エリュテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチイン；スponジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンビチン、フェンテルミン、ブレドニマスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターなどナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン(*ranimustine*)などのニトロソ尿素(*nitrosoureas*)；抗生物質、例えばエンジイン抗生物質(例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシン 11およびカリケアミシン 11(例えば、Agnew, Chem. Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)を参照のこと)；ダイネマイシンAを含むダイネマイシン；クロドロネートなどのビスホスホネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連した色素タンパク質エネジン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン(*aclacinomysins*)、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン(*chromomycinis*)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、アドリアマイシン(ADRIAMYCIN) (登録商標)ドキソルビシン(モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む)、エビルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシンCなどのマイトイマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)などの代謝拮抗物質；デノブテリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤；フロリン酸などの葉酸補給剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトレキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルホルミチン；酢酸エリブチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシンおよびアンサマイトイシンなどのメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK(登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2'''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン(特にT-2毒素、ベラクリンA、ロリジンAおよ

びアンゲイジン); ウレタン; ビンデシン; ダカルバジン; マンノムスチン; ミトプロニトール; ミトラクトール; ピポプロマン; ガシトシン; アラビノシド(「Ara-C」); シクロホスファミド; チオテパ; タキソイド、例えば、タキソール(TAXOL) (登録商標) パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、アブラキサン(ABRAXANE) (登録商標) パクリタキセルのクレモフォール(Cremophor)無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL11.)、およびタキソテール(TAXOTERE) (登録商標) ドキセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); クロランブシル; GEMZAR(登録商標) ゲムシタビン; 6-チオグアニン; メルカブトブリン; メトレキサート; シスプラチニン、オキサリプラチニンおよびカルボプラチニンなどの白金類似体; ピンプラスチニン; 白金; エトポシド(VP-16); イホスファミド; マイトキサントロン; ピンクリスチニン; ナベルビン(NAVELBINE); ビノレルビン; ノバントロン; テニポシド; エダトレキサート; ダウノマイシン; アミノブテリン; ゼローダ; イバンドロナート; イリノテカン(Camptosar、CPT-11) (イリノテカンと5-FUおよびロイコボリンとの処置レジメンを含む); トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000; ジフルオロメチルオルニチン(DMFO); レチノイン酸などのレチノイド; カペシタビン; コンブレタスタチニン; ロイコボリン(LV); オキサリプラチニン処置レジメン(FOLFOX)を含む、オキサリプラチニン; ラパチニブ(タケルブ(TYKERB)); 細胞増殖を低減するPKC-、Raf、H-Ras、EGFR (例えば、エルロチニブ(タルセバ(TARCEVA) (登録商標)))およびVEGF-Aの阻害剤ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を挙げることができる。加えて、処置の方法は放射線の使用をさらに含むことができる。

10

20

30

40

50

【0144】

本明細書において記述される方法のいくつかの態様において、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤を投与される対象は、細菌、ウイルス、真菌、または寄生虫などの病原体の感染を有する。いくつかの局面において、対象におけるT細胞寛容の減少または病原体の感染の処置において用いるための、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節する薬剤も本明細書において提供される。本明細書において記述されるこれらの局面および全てのそのような局面のいくつかの態様において、対象は慢性感染症を有する。

【0145】

感染性ウイルスの例としては、以下のものが挙げられる: レトロウイルス科(例えば、HIV); ピコルナウイルス科(例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス; エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス); (胃腸炎を引き起こす株などの)カリシウイルス科; トガウイルス科(例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス); フラビウイルス科(例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス); コロナウイルス科(例えば、コロナウイルス); ラブドウイルス科(例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス); フィロウイルス科(例えば、エボラウイルス); パラミクソウイルス科(例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルス); オルトミクソウイルス科(例えば、インフルエンザウイルス); ブニヤウイルス科(例えば、ハンタンウイルス、ブニヤウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス); アレナウイルス科(出血熱ウイルス); レオウイルス科(例えば、レオウイルス、オルビウイルス、およびロタウイルス); ビルナウイルス科; ヘパドナウイルス科(B型肝炎ウイルス); パルボウイルス科(パルボウイルス); パポーバウイルス科(パピローマウイルス、ポリオーマウイルス); アデノウイルス科(大部分のアデノウイルス); ヘルペスウイルス科(単純ヘルペスウイルス(HSV)1型およびHSV-2、水痘带状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、ヘルペスウイルス); ポックスウイルス科(痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス); ならびに(アフリカブタコレラウイルスなどの)イリドウイルス科; ならびに未分類のウイルス(例えば、海綿状脳症の病原体、(B型肝炎ウイルスの欠陥サテライトであると考えられている)D型肝炎の病原体、非A非B型肝炎(クラス1 = 経口伝播型; クラス2 = 非経口伝播型(すなわち、C型肝炎))の病原体; ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス)。本明細書において記述される組成物および方法は、これらのウイルス性病原体による感染の処置における使用のた

めに企図される。

【0146】

真菌感染症の例としては、アスペルギルス症；(カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)により引き起こされる)鶯口瘡；(クリプトコッカス(*Cryptococcus*)により引き起こされる)クリプトコッカス症；およびヒストプラズマ症が挙げられるが、これらに限定されることはない。したがって、感染性真菌の例としては、クリプトコッカス・ネオフォルマンス(*Cryptococcus neoformans*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム(*Histoplasma capsulatum*)、コクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)、ブラストミセス・デルマチチジス(*Blastomyces dermatitidis*)、クラミジア・トラコマティス(*Chlamydia trachomatis*)、カンジダ・アルビカンスが挙げられるが、これらに限定されることはない。本明細書において記述される組成物および方法は、これらの真菌性病原体による感染の処置における使用のために企図される。

10

【0147】

感染性細菌の例としては、以下のものが挙げられる：ヘリコバクター・ピロリ、ボレリア・ブルグドルフェリ(*Borelia burgdorferi*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)、マイコバクテリア(*Mycobacteria*)種(例えば、結核菌(*M. tuberculosis*)、*M. avium*)、*M. intracellulare*)、*M. kansaii*)、*M. gordonae*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋菌、髄膜炎菌、リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)、 streptococcus pyogenes)(A群ストレプトコッカス)、ストレプトコッカス・アガラクチア(*Streptococcus agalactiae*)(B群ストレプトコッカス)、ストレプトコッカス(ビリダンス群)、ストレプトコッカス・フェカリス(*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ボビス(*Streptococcus bovis*)、ストレプトコッカス(嫌気性種)、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)、病原性カンピロバクター(*Campylobacter*)種、エンテロコッカス(*Enterococcus*)種、インフルエンザ菌、バチルス・アントラシス(*Bacillus anthracis*)、コリネバクテリウム・ジフテリエ(*corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム種、ブタ丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)、破傷風菌(*Clostridium tetani*)、エンテロバクター・エロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、パストレラ・マルトシダ(*Pasturella multocida*)、バクテロイデス(*Bacteroides*)種、フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)、ストレプトバチルス・モニリフォルミス(*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*)、トレポネーマ・パーテヌエ(*Treponema pertenue*)、レプトスピラ(*Leptospira*)、およびアクチノミセス・イスラエリー(*Actinomyces israelii*)。本明細書において記述される組成物および方法は、これらの細菌性病原体による感染の処置における使用のために企図される。(原生生物などの)他の感染性生物には、熱帯熱マラリア原虫およびトキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)が含まれる。本明細書において記述される組成物および方法は、これらの病原体による感染の処置における使用のために企図される。

20

【0148】

本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、本方法は、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤とともにウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、または寄生虫抗原の有効量を投与する段階をさらに含む。適当なウイルス抗原の非限定的な例としては、とりわけ、以下のものが挙げられる：インフルエンザHA抗原、NA抗原、M抗原、NP抗原、およびNS抗原；HIV p24、pol、gp41、およびgp120；メタニューモウイルス(*Metapneumovirus*)Fタンパク質およびGタンパク質；C型肝炎ウイルス(*HCV*)E1タンパク質、E2タンパク質、およびコアタンパク質；デングウイルス(*DEN 1-4*)E1タンパク質、E2タンパク質、およびコアタンパク質；ヒトパピローマウイルスL1タンパク質；エピスタインバーウイルスgp220/350およびEBNA-3Aペプチド；サイトメガロウイルス(*CMV*)gB糖タンパク質、gH糖タンパク質、pp65、IE1(エキソン4)、およびpp150；水痘帯状疱疹ウイルス(*VZV*)IE62ペプチドおよび糖タンパク質Eエピトープ；単純ヘルペスウイルス糖タンパク

30

40

50

質Dエピトープ。抗原性ポリペプチドは、天然に存在する動物もしくはヒトのウイルス単離株のポリペプチドに相当してもよいし、または天然の(病原性もしくは非病原性の)単離株と比べて、1つもしくは複数のアミノ酸置換を組み込むために操作されてもよい。

【0149】

本明細書において用いられる場合、用語「処置する」、「処置」、「処置すること」または「改善」は、疾患または障害と関連した状態の進行または重症度を逆行させる、軽減する、改善する、阻害する、遅らせるまたは阻止することが目的である、治療的処置を指す。用語「処置すること」は、自己免疫疾患、慢性感染症またはがんなどの、状態、疾患または障害の少なくとも1つの有害作用または症状を低減することまたは軽減することを含む。処置は一般に、1つまたは複数の症状または臨床マーカーが低減されるなら、「有効」である。あるいは、疾患の進行が低減または停止されるなら、処置は「有効」である。つまり、「処置」は、症状またはマーカーの改善だけでなく、処置がない場合に予想されるであろう症状の進行または悪化の休止、少なくとも緩徐化も含む。有益なまたは所望の臨床結果には、検出可能であるか検出不能であるかにかかわらず、1つもしくは複数の症状の軽減、疾患の程度の縮減、安定化した(すなわち、悪化していない)疾患状態、疾患の進行の遅延もしくは緩徐化、疾患状態の改善もしくは緩和、および寛解(部分的であるか全体的であるかにかかわらず)が含まれるが、これらに限定されることはない。疾患の「処置」という用語はまた、疾患の症状または副次的作用からの解放の提供(待機的処置を含む)を含む。

10

【0150】

本明細書において用いられる用語「有効量」は、疾患または障害の少なくとも1つまたは複数の症状を軽減するために必要とされる、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の量を指し、所望の効果を与えるのに、すなわち、例えばT細胞寛容を促進または阻害するのに十分な薬理学的組成物の量に関する。用語「治療的有効量」はそれゆえ、典型的な対象への投与時に特定の効果をもたらすのに十分である、本明細書において開示される方法を用いてCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の量を指す。本明細書において用いられる有効量はまた、疾患の症状の発現を遅延させるのに、疾患の症状の経過を変化させるのに(例えば、限定されることはないが、疾患の症状の進行を遅らせるのに)、または疾患の症状を逆行させるのに十分な量を含む。したがって、正確な「有効量」を指定することは可能ではない。しかしながら、いかなる所与の場合でも、当業者は通常の実験法のみを用いて適切な「有効量」を決定することができる。

20

【0151】

有効量、毒性、および治療効力は、例えば、LD50(集団の50%に対して致死的な用量)およびED50(集団の50%において治療的に有効な用量)を決定するための、細胞培養物または実験動物での標準の薬学的手順によって決定することができる。投与量は、採用される剤形および利用される投与経路に依存して変化しうる。毒性と治療効果との間の用量比が治療指數であり、これはLD50/ED50比として表すことができる。大きい治療指數を示す組成物および方法が好ましい。治療的に有効な用量は、細胞培養アッセイ法から最初に推定することができる。また、細胞培養においてまたは適切な動物モデルにおいて決定されたような症状の最大半数阻害を達成する、IC50を含む循環血漿濃度範囲(すなわち、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の濃度)を達成するようにある用量を動物モデルにおいて処方することができる。血漿中のレベルは、例えば、高性能液体クロマトグラフィーによって測定することができる。任意の特定の投与量の効果は、適当なバイオアッセイ法によってモニターすることができる。投与量は、医師が決定し、必要に応じて観察された処置の効果に合わせるよう、調整することができる。

30

【0152】

抗体および他のポリペプチドを含む、本明細書において記述される組成物および方法による有用な薬剤は、単離された薬剤であり、これは、その薬剤が、実質的に純粋であって、天然またはインビオ系においてともに見出されうる他の物質を、その意図した用途に対して実用的かつ適切な程度にまで、本質的に含まないことを意味する。具体的には、薬剤

40

50

は、例えば、薬学的調製物の產生で有用であるように、十分に純粹であって、宿主細胞の他の生物学的成分を実質的に含まない。単離された薬剤は薬学的調製物中で薬学的に許容される担体と混合されうるので、薬剤は調製物の重量でわずかな割合のみを構成してもよい。

【0153】

CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための本明細書において記述される薬剤は、対象における有効な処置をもたらす任意の適切な経路により、それを必要とする対象へ投与されうる。本明細書において用いられる場合、「投与すること」および「導入すること」という用語は、互換的に用いられ、所望の効果が生じるよう、炎症部位などの所望の部位におけるポリペプチド剤の少なくとも部分的な局在化をもたらす方法または経路により、そのようなポリペプチド剤を対象へ配置することを指す。

10

【0154】

いくつかの態様において、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための本明細書において記述される薬剤は、薬剤を全身に送達するかまたは所望の表面もしくは標的へ送達する、注射、注入、点滴注入、および吸入投与を含みうるがこれらに限定されない、任意の投与方法によって対象に投与される。ポリペプチド剤が消化管における不活化から防御されうる範囲で、経口投与形態も企図される。「注射」は、非限定的に、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、脳室内、囊内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、囊下、クモ膜下、脊髄内、脳脊髄内、および胸骨内への注射および注入を含む。好ましい態様において、本明細書において記述される方法において用いるための、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤は、静脈内への注入または注射により投与される。

20

【0155】

本明細書において用いられる「非経口投与」および「非経口的に投与される」という語句は、腸内投与および局所投与以外の投与方法、通常、注射による投与方法を指す。本明細書において用いられる「全身投与」、「全身に投与される」、「末梢投与」、および「末梢に投与される」という語句は、腫瘍部位などの標的部位、標的組織、または標的臓器への直接投与以外の、薬剤が対象の循環系に入り、したがって、代謝などの過程を受けるような、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の投与を指す。

30

【0156】

本明細書において記述される方法の臨床用途のため、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の投与は、非経口投与、例えば、静脈内投与；粘膜投与、例えば、鼻腔内投与；眼投与、または他の投与方法のための薬学的組成物または薬学的製剤への製剤化を含みうる。いくつかの態様において、本明細書において記述されるCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤は、対象における有効な処置をもたらす任意の薬学的に許容される担体化合物、材料、または組成物とともに投与されうる。したがって、本明細書において記述される方法で用いるための薬学的製剤は、1種または複数種の薬学的に許容される成分との組み合わせで、本明細書において記述されるCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤を含有してもよい。

【0157】

「薬学的に許容される」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、合理的な利益/リスク比に見合う、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、ヒトおよび動物の組織と接触させて用いるのに適した、化合物、材料、組成物、および/または剤形を指す。本明細書において用いられる「薬学的に許容される担体」という語句は、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の安定性、可溶性、または活性の維持に関する、液体または固体の增量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、媒質、封入材料、製造支援物質(例えば、滑沢剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムもしくはステアリン酸亜鉛、またはステアリン酸)、または溶媒を封入する材料などの、薬学的に許容される材料、組成物または媒体を意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性があり、患者にとって有害ではない、という意味で「許容され」なけ

40

50

ればならない。薬学的に許容される担体として働きうる材料のいくつかの例としては、(1) ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖類；(2) トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；(3) セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロースおよび酢酸セルロース；(4) 粉末トラガカント；(5) 麦芽；(6) ゼラチン；(7) カカオ脂および坐剤ワックスなどの賦形剤；(8) 落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびダイズ油などの油；(9) プロピレングリコールなどのグリコール；(10) グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール(PEG)などのポリオール；(11) オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；(12) 寒天；(13) 水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；(14) アルギン酸；(15) 発熱物質を含まない水；(16) 等張食塩水；(17) リンゲル液；(18) pH緩衝化溶液；(20) ポリエステル、ポリカーボネートおよび/またはポリ無水物；(21) ポリペプチドおよびアミノ酸などの增量剤(22) 血清アルブミン、HDLおよびLDLなどの血清成分；(23) エタノールなどのC2～C12アルコール；ならびに(24) 薬学的製剤中で採用される他の無毒性の適合物質が挙げられる。放出剤、コーティング剤、保存料、および抗酸化物質も、製剤中に存在しうる。「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許容される担体」などのような用語は、本明細書において互換的に用いられる。10

【0158】

本明細書において記述されるCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤は、以下に対して適合させたものを含めて、固体、液体またはゲルの形態での対象への化合物の投与のために特別に製剤化されうる：(1) 非経口投与、例えば、滅菌溶液もしくは滅菌懸濁液、または徐放性製剤として皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射または硬膜外注射による；(2) 局所適用、例えば、皮膚に適用されるクリーム、軟膏、または放出制御性パッチもしくはスプレイとして；(3) 膀胱内もしくは直腸内に、例えば、膀胱薬、クリームもしくは気泡として；(4) 眼に；(5) 経皮に；(6) 経粘膜に；あるいは(79) 経鼻に。さらに、二重特異性または多重特異性ポリペプチド剤は、患者へ移植されても、または薬物送達系を用いて注射されてもよい。例えば、Urquhart, et al., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. 「Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals」 (Plenum Press, New York, 1981); 米国特許第3,773,919号；および米国特許第35 3,270,960号を参照されたい。20

【0159】

本明細書において記述される方法において用いることができるCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の投与の方法および製剤のさらなる態様を以下に例証する。30

【0160】

非経口剤形

CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の非経口剤形はまた、皮下、静脈内(ボーラス注射を含む)、筋肉内、および動脈内を含むが、これらに限定されない、さまざまな経路によって対象に投与することができる。非経口剤形の投与では、典型的には、汚染物質に対する患者の自然防御が回避されるので、非経口剤形は好ましくは、無菌であり、または患者への投与の前に滅菌可能である。非経口剤形の例としては、すぐに注射することができる溶液、注射用の薬学的に許容される媒体にすぐに溶解または懸濁することができる乾燥品、すぐに注射できる懸濁液、放出制御性の非経口剤形、および乳濁液が挙げられるが、これらに限定されることはない。40

【0161】

開示の非経口剤形を提供するために用いられる適当な媒体は、当業者には周知である。例としては、非限定的に、滅菌水；注射用水USP；生理食塩溶液；グルコース溶液；限定されることはないが、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、ならびに乳酸加リンゲル注射液などの、水性媒体；限定されることはないが、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、およびプロピレングリコールなどの、水混和性媒体；ならびに限定されることはないが、トウ

10

20

30

40

50

モロコシ油、綿実油、落花生油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、および安息香酸ベンジルなどの、非水性媒体が挙げられる。

【0162】

エアロゾル製剤

CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤は、加圧エアロゾル容器中に、適当な高圧ガス、例えば、プロパン、ブタン、またはイソブタンなどの炭化水素の高圧ガスと通常の補助剤とともに充填することができる。CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤は、噴霧器または霧吹きのような加圧されない形態で投与することもできる。CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤は、乾燥粉末の形態で、例えば、吸入具の使用により、気道に直接投与することもできる。

10

【0163】

適当な粉末組成物には、例証として、ラクトース、または気管支内投与に許容される他の不活性の粉末と十分に混合されたCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の粉末状調製物が含まれる。粉末組成物はエアロゾルディスペンサを介して投与されてもよく、または破壊性のカプセル中に封入し、カプセルに穴を開けて吸入に適する定常流体として粉末を噴出する装置内に対象が挿入できるようにしたものであってもよい。組成物は、高圧ガス、界面活性剤、および共溶媒を含んでもよく、適当な計量弁で封鎖した従来のエアロゾル容器へ充填されてもよい。

【0164】

気道への送達のためのエアロゾルは、当技術分野において公知である。例えば、Adjei, A. and Garren, J. Pharm. Res., 1: 565-569 (1990); Zanen, P. and Lamm, J.-W. J. Int. J. Pharm., 114: 111-115 (1995); Gonda, I. 「Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract」, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6中:273-313 (1990); Anderson et al., Am. Rev. Respir. Dis., 140: 1317-1324 (1989))、ペプチドおよびタンパク質の全身送達の可能性も有する(Patton and Platz, Advanced Drug Delivery Reviews, 8: 179-196 (1992)); Timsina et. al., Int. J. Pharm., 101: 1-13 (1995); およびTansey, I. P., Spray Technol. Market, 4:26-29 (1994); French, D. L., Edwards, D. A. and Niven, R. W., Aerosol Sci., 27: 769-783 (1996); Visser, J., Powder Technology 58: 1-10 (1989)); Rudt, S. and R. H. Muller, J. Controlled Release, 22: 263-272 (1992); Tabata, Y, and Y. Ikada, Biomed. Mater. Res., 22: 837-858 (1988); Wall, D. A., Drug Delivery, 2: 10 1-20 1995); Patton, J. and Platz, R., Adv. Drug Del. Rev., 8: 179-196 (1992); Bryon, P., Adv. Drug. Del. Rev., 5: 107-132 (1990); Patton, J. S., et al., Controlled Release, 28: 15 79-85 (1994); Damms, B. and Bains, W., Nature Biotechnology (1996); Niven, R. W., et al., Pharm. Res., 12(9): 1343-1349 (1995); およびKobayashi, S., et al., Pharm. Res., 13(1): 80-83 (1996)を参照されたく、これらの全ての内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

20

【0165】

水はいくつかの化合物の分解を助長しうるため、本明細書において記述されるCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の製剤は、開示された化合物を活性成分として含む、無水の薬学的組成物および剤形をさらに包含する。例えば、水(例えば、5%)の添加は、貯蔵寿命または経時的な製剤の安定性のような特徴を決定するための、長期保管をシミュレーションする手段として、薬学分野において広く認められている。例えば、Jens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 379-80 (2nd ed., Marcel Dekker, NY, N.Y.: 1995)を参照されたい。本開示の無水の薬学的組成物および剤形は、無水の成分または低水分含有成分、および低水分または低湿度の条件を用いて調製されうる。ラクトースおよび一級アミンまたは二級アミンを含む少なくとも1種の活性成分を含む薬学的組成物および剤形は、製造、パッケージング、および/または貯蔵の間の水分および/または湿気との実質的な接触が予想される場合、好ましくは、無水である。無水の組成物は、好ましくは、適当な処方キットに含まれうるよう、水への曝露を防止することが

30

40

50

既知の材料を用いてパッケージングされる。適當なパッケージングの例としては、密閉ホイル、プラスチック、乾燥剤を含むまたは含まない単位用量容器(例えば、バイアル)、ブリスタパック、およびストリップパックが挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0166】

放出制御性剤形および徐放性剤形

本明細書において記述される方法のいくつかの態様において、CEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤は、放出制御手段または徐放手段により対象へ投与することができる。理想的には、医学的処置における最適にデザインされた放出制御性調製物の使用は、最小限の薬物物質が、最少限の時間で、状態の治癒または制御のために利用されることを特徴とする。放出制御性製剤の利点には、以下のものが含まれる: 1) 薬物の活性の拡張; 2) 投薬頻度の低減; 3) 患者コンプライアンスの増加; 4) より少ない全薬物の使用; 5) 局所または全身の副作用の低減; 6) 薬物蓄積の最小化; 7) 血中レベル変動の低減; 8) 処置の効力の改善; 9) 薬物活性の増強または損失の低減; および10) 疾患または状態の制御速度の改善(Kim, Cherng-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000))。放出制御性製剤は、式(I)の化合物の作用の開始、作用の継続時間、治療ウインドウ内の血漿レベル、およびピーク血中レベルを制御するために用いることができる。特に、放出制御性または長期放出性の剤形または製剤は、薬物の過小投薬(すなわち、最小治療レベル未満)からも、薬物の毒性レベルを超えることからも起こる可能性のある有害効果および安全性懸念を最小化しつつ、式(I)の化合物の最大の有効性が達成されることを確実にするために用いることができる。

【0167】

種々の公知の放出制御性または長期放出性の剤形、製剤、および装置は、本明細書において記述されるCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤とともに用いるために適合されうる。例としては、各々、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第3,845,770号; 同第3,916,899号; 同第3,536,809号; 同第3,598,123号; 同第4,008,719号; 同第5674,533号; 同第5,059,595号; 同第5,591,767号; 同第5,120,548号; 同第5,073,543号; 同第5,639,476号; 同第5,354,556号; 同第5,733,566号; および同第6,365,185 B1号に記述されたものが挙げられるが、これらに限定されることはない。これらの剤形は、変動する割合で、所望の放出プロファイルを提供するため、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、他の重合体マトリックス、ゲル、透過膜、浸透圧系(例えば、OROS(登録商標) (Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA))、多層コーティング、微粒子、リポソームもしくはマイクロスフェア、またはそれらの組み合わせを用いて、1種または複数種の活性成分の徐放または放出制御を提供するために用いることができる。さらに、開示された化合物の固定化され、吸着された塩型を調製し、かくして、薬物の制御送達をもたらすために、イオン交換材料が用いられてもよい。具体的な陰イオン交換体の例としては、Duolite(登録商標) A568およびDuolite(登録商標) AP143 (Rohm&Haas, Spring House, Pa. USA)が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0168】

いくつかの態様において、本明細書において記述される方法で用いるためのCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤は、徐放によってまたはパルスで対象へ投与される。パルス治療は、経時的な同一量の組成物の不連続投与の型ではなく、低減された頻度での同一用量の組成物の投与、または低減された用量の投与を含む。障害が対象に継続的に存在する時、例えば、対象がウイルス感染の継続的または慢性的な症状を有する場合、徐放またはパルス投与が特に好ましい。各パルス用量を低減させることができるので、処置の過程を通して患者へ投与されるCEACAM1およびTIM3の相互作用を調節するための薬剤の総量が最小化される。

【0169】

パルス間の間隔は、必要な場合、当業者によって決定されうる。しばしば、パルス間の間隔は、組成物または組成物の活性成分が、次のパルスの送達前に対象においてもはや検

10

20

30

40

50

出可能でない時、組成物をもう一回投与することにより計算されうる。間隔は、組成物のインビボ半減期からも計算されうる。間隔は、インビボ半減期より長く、または組成物半減期の2倍、3倍、4倍、5倍、さらには10倍として計算されうる。注入またはその他の型の送達により組成物を患者へパルス投与するためのさまざまな方法および装置は、米国特許第4,747,825号；同第4,723,958号；同第4,948,592号；同第4,965,251号および同第5,403,590号に開示されている。

【0170】

本明細書において記述されるさまざまな局面の態様は、以下の項目によって例証されうる。

- A. TIM3とCEACAM1との間の相互作用を調節するための組成物であって、TIM3およびCEACAM1に特異的な結合部位を含む二重特異性薬剤を含む、組成物。 10
- B. 二重特異性薬剤が、TIM3およびCEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、第A項に記載の組成物。
- C. 二重特異性薬剤が、TIM3およびCEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大させる、第A項に記載の組成物。
- D. 二重特異性薬剤が、同じ細胞上でのTIM3とCEACAM1との間の相互作用を調節する、第A～C項のいずれか一項に記載の組成物。
- E. 二重特異性薬剤が、第1の細胞上のTIM3と第2の細胞上のCEACAM1との間の相互作用を調節する、第A～C項のいずれか一項に記載の組成物。 20
- F. 二重特異性薬剤が、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む、第A～E項のいずれか一項に記載の組成物。
- G. T細胞寛容を調節するための組成物であって、CEACAM1とTIM3との相互作用を調節する薬剤を含む、組成物。
- H. 薬剤が、CEACAM1とTIM3との相互作用を阻害し、T細胞寛容を阻害する、第G項に記載の組成物。
- I. 薬剤が、CEACAM1とTIM3との相互作用を増強または模倣し、T細胞寛容を促進する、第G項に記載の組成物。
- J. 薬剤が、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体を含む、第G～I項のいずれか一項に記載の組成物。 30
- K. タンパク質模倣体が、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化する、第J項に記載の組成物。
- L. タンパク質模倣体が、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、第J項に記載の組成物。
- M. 薬剤が、CEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む、第G～L項のいずれか一項に記載の組成物。
- N. タンパク質模倣体が、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化する、第M項に記載の組成物。
- O. タンパク質模倣体が、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、第M項に記載の組成物。 40
- P. タンパク質模倣体が、SEQ ID NO:30またはSEQ ID NO:31に結合する含む、第M項に記載の組成物。
- Q. 薬剤が、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体、およびCEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む、第G項に記載の組成物。
- R. 薬剤が、TIM-3に特異的に結合するポリペプチドを含む、第G項に記載の組成物。
- S. 薬剤が、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドを含む、第G項に記載の組成物。
- T. TIM3に特異的に結合するポリペプチドが、抗体またはその抗原結合部分を含む、第R項に記載の組成物。
- U. CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドが、抗体またはその抗原結合部分を含む、第S項に記載の組成物。 50

V. 薬剤が、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む、第G項に記載の組成物。

W. CEACAM1とTIM3との相互作用を調節する方法であって、CEACAM1および/またはTIM3に結合してTIM3へのCEACAM1の結合を調節する薬剤と細胞とを接触させる段階を含む、方法。

X. 薬剤が、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大させる、第W項に記載の方法。

Y. 薬剤が、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、第W項に記載の方法。

Z. 薬剤が、CEACAM1およびTIM3の両方に特異的な結合部位を含む、第W項に記載の方法。

AA. 薬剤が、TIM3およびCEACAM1に特異的な結合部位を含む二重特異性ポリペプチド剤を含む、第W項に記載の方法。

BB. 二重特異性ポリペプチド剤が、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む、第Z項に記載の方法。

CC. T細胞寛容を調節する方法であって、TIM3とCEACAM1との相互作用を調節する薬剤を投与する段階を含む、方法。

DD. 薬剤がTIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大させ、T細胞寛容を増大させる、第CC項に記載の方法。

EE. 薬剤がTIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、第CC項に記載の方法。

FF. 薬剤がCEACAM1およびTIM3の両方に特異的な結合部位を含む、第CC項に記載の方法。

GG. T細胞寛容の調節を、それを必要とする対象において行う方法であって、TIM3とCEACAM1との相互作用を調節する薬剤の有効量を投与する段階を含む、方法。

HH. 薬剤が、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大または模倣し、T細胞寛容を増大させる、第GG項に記載の方法。

II. 対象が自己免疫障害を有する、第HH項に記載の方法。

JJ. 対象が移植レシピエントである、第HH項に記載の方法。

KK. 薬剤が、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害し、T細胞対応を阻害する、第GG項に記載の方法。

LL. 対象が、がんまたは腫瘍を有する、第KK項に記載の方法。

MM. 対象が移植レシピエントである、第KK項に記載の方法。

NN. 薬剤が、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体を含む、第GG～MM項のいずれか一項に記載の方法。

OO. タンパク質模倣体がTIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化する、第NN項に記載の方法。

PP. タンパク質模倣体がTIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、第NN項に記載の方法。

QQ. 薬剤が、CEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む、第GG～OO項のいずれか一項に記載の方法。

RR. タンパク質模倣体が、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化または模倣する、第QQ項に記載の方法。

SS. タンパク質模倣体が、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、第QQ項に記載の方法。

TT. タンパク質模倣体が、SEQ ID NO:30またはSEQ ID NO:31を結合する含む、第QQ項に記載の方法。

UU. 薬剤が、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体、およびCEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む、第QQ項に記載の方法。

10

20

30

40

50

VV. 薬剤が、TIM-3に特異的に結合するポリペプチドを含む、第CC～MM項のいずれか一項に記載の方法。

WW. 薬剤が、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドを含む、第CC～MM項のいずれか一項に記載の方法。

XX. TIM3に特異的に結合するポリペプチドが、抗体またはその抗原結合部分を含む、第VV項に記載の方法。

YY. CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドが、抗体またはその抗原結合部分を含む、第WW項に記載の方法。

ZZ. 薬剤が、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む、第VV～YY項のいずれか一項に記載の方法。

AAA. 薬剤が、CEACAM1およびTIM3の両方に特異的な結合部位を含む、第VV～ZZ項のいずれか一項に記載の方法。

BBB. 対象におけるT細胞寛容の調節において用いるための、TIM3とCEACAM1との相互作用を調節する薬剤。

CCC. 薬剤が、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増大または模倣し、T細胞寛容を増大させる、第BBB項に記載の使用。

DDD. 対象が自己免疫障害を有する、第CCC項に記載の使用。

EEE. 対象が移植レシピエントである、第CCC項に記載の使用。

FFF. 薬剤が、TIM3とのCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害し、T細胞寛容を阻害する、第BBB項に記載の使用。

GGG. 対象が、がんまたは腫瘍を有する、第FFF項に記載の使用。

HHH. 対象が移植レシピエントである、第FFF項に記載の使用。

III. 薬剤が、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体を含む、第BBB～HHHH項のいずれか一項に記載の使用。

JJJ. タンパク質模倣体が、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化する、第III項に記載の使用。

KKK. タンパク質模倣体が、TIM3に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、第III項に記載の使用。

LLL. 薬剤が、CEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む、第BBB～HHHH項のいずれか一項に記載の方法。

MMM. タンパク質模倣体が、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を活性化または模倣する、第LLL項に記載の使用。

NNN. タンパク質模倣体が、CEACAM1に結合し、TIM3およびCEACAM1の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、第MMM項に記載の使用。

OOO. タンパク質模倣体が、SEQ ID NO:30またはSEQ ID NO:31を結合する含む、第MMM項に記載の使用。

PPP. 薬剤が、TIM3に結合するCEACAM1のタンパク質模倣体、およびCEACAM1に結合するTIM3のタンパク質模倣体を含む、第MMM項に記載の使用。

QQQ. 薬剤が、TIM-3に特異的に結合するポリペプチドを含む、第BBB～HHH項のいずれか一項に記載の使用。

RRR. 薬剤が、CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドを含む、第BBB～HHH項のいずれか一項に記載の使用。

SSS. TIM3に特異的に結合するポリペプチドが、抗体またはその抗原結合部分を含む、第RRR項に記載の使用。

TTT. CEACAM1に特異的に結合するポリペプチドが、抗体またはその抗原結合部分を含む、第SSS項に記載の使用。

UUU. 薬剤が、TIM3に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分、およびCEACAM1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分を含む、第QQQ～TTT項のいずれか一項に記載の使用。

10

20

30

40

50

【0171】

本発明は、本明細書において記述される特定の方法論、プロトコル、および試薬などに限定されず、したがって、変動しうることが理解されるべきである。本明細書において用いられる専門用語は、特定の態様のみを記述するためのものに過ぎず、特許請求の範囲によってのみ定義される本発明の範囲を限定するようには意図されない。

【0172】

本明細書においておよび特許請求の範囲において用いられる場合、単数形は、文脈上明らかに別の意味を示していると判断されない限り、複数の指示対象を含み、その逆もまた同様である。「または」という用語は、例えば「どちらか」によって修飾されなければ、包括的である。作業実施例を除き、または他に示された場合、本明細書において用いられる成分の量または反応条件を表す用語は全て、いかなる場合でも「約」という用語によって修飾されるものと理解されるべきである。

10

【0173】

特定された全ての特許および他の刊行物は、例えば、本発明に関して用いられるそのような刊行物に記述された方法論を記述および開示する目的のため、参照により明示的に本明細書に組み入れられる。これらの刊行物は、本願の出願日より前のそれらの開示のためにのみ提供される。この点に関して、先願発明のため、またはその他の理由のため、本発明者らがそのような開示に先行している資格を有しないことの承認として解釈されるべきものは存在しない。これらの文書の日付に関する記述または内容に関する表示は全て、出願人にとって入手可能な情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確さに関する承認を構成するものではない。

20

【0174】

本明細書において他に定義されない限り、本明細書において用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が関連する技術分野の当業者にとって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。任意の公知の方法、装置、および材料が本発明の実施または試験において使用されうるが、この関連で本方法、装置、および材料が本明細書において記述される。

20

【実施例】

【0175】

実施例1. CEACAM1およびTIM3の相互作用

30

293T細胞にヒトCEACAM1およびTIM3発現プラスミドをトランスフェクションした。TIM3に対する抗HA mAbによる共免疫沈降およびCEACAM1に対するウエスタンプロット(抗Flag) (左パネル)またはCeacam1に対する抗flagによる共免疫沈降およびTim-3に対するウエスタンプロット(抗HA) (右パネル)のために、トランスフェクションから48時間後に全細胞溶解物を調製した。図1に描かれるように、CEACAM1はTIM3と生化学的相互作用を示す。

【0176】

マウスに100 μ g/100 μ lのSEB、または対照としてのPBS 100 μ lを腹腔内注射した。8日後に(V 8 T細胞を壊す前に)、これらの両群におけるマウス由来のV 8 T細胞(SEB反応性)上の、およびV 6 T細胞(SEB非反応性)上のCEACAM1の発現を分析した。FACS分析のデータ(図2A)に示されるように、8日間のSEB投与中にSEB反応性T細胞の割合に対して最大のCEACAM1発現が実証された。CD4⁺T細胞を、8日間SEB免疫化したマウスまたはPBS対照マウスから単離した。細胞を0.5 mg/mlのSEBまたは対照としてのPBSによりインピトロで再刺激した。48時間後に、ゲートをかけたCD4⁺T細胞に関してTIM3の発現を調べた。マウスCEACAM1-Nドメイン融合タンパク質は、図2Bに示されるように、インピトロでTIM-3を上方制御する。

40

【0177】

マウスに100 μ g/100 μ lのSEB、または対照としてのPBS 100 μ lを腹腔内注射した。SEB注射の8日後に、WT (Ceacam1^{+/+})マウスおよびKO (CEACAM1^{-/-})マウス由来の腸間膜リンパ節(MLN)およびリンパ節(LN)のCD4⁺V 8⁺T細胞上でCEACAM1およびTIM3の発現を分析した。Ceacam1^{-/-}マウスにおいてTIM3の誘導が不十分であることが実証された(図3)。

50

【0178】

CEACAM1の発現を定量的PCRによって分析した。休止T細胞上では低い、CEACAM1の発現は、0、2または4日間、CD3、およびCD3/CD8で刺激された汎T細胞において、TCR/CD3複合体を通じたT細胞のライゲーション(シグナル1)により転写的に制御されるが、CD28により提供される古典的な共刺激シグナル(シグナル2)によってTCR/CD3複合体が共会合される場合には負に制御される(図4)。

【0179】

実施例2. がんにおけるT細胞上でのCEACAM1およびTIM3の相互作用

T細胞調節におけるCEACAM1およびTIM3の役割を、固体腫瘍のCT26結腸腫瘍または他の固体腫瘍を担持するマウスにおいて調べる。CEACAM1またはTIM3を発現している腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の割合を決定する。腫瘍産生のため、CT26細胞 5×10^5 個を野生型Balb/cマウスの右脇腹へ移植する。カリパスを用いて腫瘍表面を二次元で測定する。本明細書において記述されるように、図6は、抗Tim3抗体および抗Ceacam1抗体が協同して、マウスがんモデルでの腫瘍退縮を誘導することを実証する。インビボマウスモデルにおいて結腸直腸細胞株CT26を用いて、PD-1およびTIM3と比べてCEACAM1およびTIM3の同時遮断について調べ、皮下の腫瘍成長に及ぼすその影響を測定した。CEACAM1およびTIM3の同時遮断は、がんおよび腫瘍のサイズおよび成長の顕著な抑制をもたらし、TIM3およびPD1の同時遮断で見られたものを上回った。

10

【0180】

これらのマウスの脾臓、末梢血液細胞、およびリンパ系組織におけるCEACAM1およびTIM3の発現についても調べる。20分間コラゲナーゼD (25 mg/ml)の存在下で腫瘍組織を解離させた後の不連続PERCOLL勾配(GE Healthcare)での遠心分離により、腫瘍浸潤リンパ球を単離する。単離された細胞を次に、T細胞機能のさまざまなアッセイ法において用いる。具体的には、CEACAM1⁺またはTIM3⁺でもあるCD8⁺細胞の頻度について調べる。さらに、CD4⁺およびCD62L細胞などのCD8⁺ TIL亜集団においてCEACAM1およびTIM3の発現について調べる。CEACAM1およびTIM3の発現は、これらの細胞の機能状態を示す。さらに、IL-2、TNFおよびIFNなどのサイトカインの発現(すなわち、分泌)はエクスピボで、例えばフローサイトメトリーによって測定することができる。単個細胞浮遊液をCD4 (RM4-5)、CD8 (53-6.7)、CD44 (IM7)、CD62L (MEL-14) (BIOLEGEND)、TIM3 (8B.2C12) (EBIOSCIENCE)、およびCD66に対する抗体で染色する。7AADを用いて、死細胞を排除する。細胞質内サイトカイン染色のため、細胞をゴルジプラグ(BD BIOSCIENCES)の存在下で3時間PMA (50 ng/ml)およびイオノマイシン(1 μg/ml)によりインビトロで刺激する。細胞を次いで、収集し、固定化および透過処理の前にCD8、TIM3およびCEACAM1で染色する。透過処理された細胞を次に、IL-2 (JES6-5H4)、TNF (MP6-XT22) およびIFN (XMG1.2)について染色する。全てのデータをBD LSRII (BD Biosciences)にて集め、FLOWJOソフトウェア(TREE STAR)で解析する。例えば、CEACAM1⁺TIM3⁺細胞は、典型的には、IFN 産生の障害によって示されるTIL疲弊と関連している。

20

30

【0181】

さらに、寛容性T細胞において失われるエフェクタ機能のなかには、TCR刺激に応答して増殖する能力の喪失がある。エクスピボで直接増殖するTILの能力は、細胞周期に入った細胞により発現される核タンパク質Ki-67の発現を決定することによって調べられる。しかしながら、HIVに慢性的に感染している個体においては、G1で停止している細胞はKi-67を発現しうることが知られている(Combadere et al., 2000)。TO-PRO-3ヨウ化物で同時に染色することにより、DNA含量についても調べる。そうすることにより、G1で停止している細胞を、S期、G2期およびM期に進行した細胞から識別することができる。TILを単離し、Ki-67発現およびDNA含量の試験の前にエクスピボで直接刺激する。TILを収集し、48時間、抗CD3 (1 μg/ml)の存在下でインビトロで培養する。細胞を次いで、CD8、CEACAM1、またはTIM3に対する抗体で染色した後で、透過処理ならびにKi-67に対する抗体(BIOLEGEND)での染色およびTO-PRO-3ヨウ化物(INVITROGEN)での染色を行う。全てのデータをBD LSRII (BD BIOSCIENCES)にて集め、FLOWJOソフトウェア(TREE STAR)で解析する。次いで、細

40

50

胞周期のG0期、G1期およびS～M期におけるTIM3⁺またはCEACAM1⁺細胞の存在量を決定する。

【0182】

CEACAM1およびTIM3が互いのリガンドであるという本明細書において開示される発見は、これらの2つの経路の複合的な標的化がインビボで抗腫瘍免疫を回復するのに最も有効な手段であると証明しうることを示している。インビボでの処置を開始する前に、CT26腫瘍担持マウスにおけるリンパ球上でのCEACAM1およびTIM3の相互作用の発現を確認する。CT26腫瘍担持マウスを次に、インビボで遮断機能を有することが既述された抗TIM3抗体(Monney et al. 2002)、抗CEACAM1抗体(Watt et al., 2001)もしくはその両方、または対照免疫グロブリンで処置する。例えば、マウスを0、2および4日目に腹腔内により抗TIM3抗体100 μgで；もしくは0、3、6、9および12日目に腹腔内により抗CEACAM1抗体100 μgで、または同日に抗TIM3抗体および抗CEACAM1抗体の混合物で、あるいはアイソタイプ対照免疫グロブリン(ラットIgG1およびラットIgG2b)で処置する。これらの処置を次いで、比較する。抗TIM3抗体および抗CEACAM1抗体による複合処置は、被検対象において腫瘍サイズおよび効力の両方において反映される、腫瘍成長の劇的な低減をもたらしうる。

10

【0183】

B16黒色腫担持マウスにおける抗TIM3および抗CEACAM1での処置の効果も試験すると、複合処置は、対照免疫グロブリン、抗TIM3または抗CEACAM1で処置したマウスと比べて生存の増強を示しうる。

20

【0184】

抗TIM3および抗CEACAM1での処置が実際に、TIL機能を回復するかどうかに直接取り組むため、CT26腫瘍を担持するマウス由来のTILを単離し、抗TIM3抗体(例えば、クローン5D12)、抗CEACAM1抗体(例えば、5F4)、抗TIM3抗体および抗CEACAM1抗体、または対照免疫グロブリンの存在下で培養する。TILを収集し、可溶性抗CD3 (5 μg/ml)、ならびに10 μg/mlの抗TIM3免疫グロブリン、抗CEACAM1免疫グロブリン、抗TIM3免疫グロブリンおよび抗CEACAM1免疫グロブリンの両方、または対照免疫グロブリン(ラットIgG1およびラットIgG2b)の存在下で培養する(1～3×10⁵個/ウェル)。96時間後、培養上清を集め、IFN-γをサイトメトリックビーズアレイ法(CBA) (BD BIOSCIENCES)によって測定する。さらに、腫瘍担持マウス由来の末梢T細胞応答に及ぼす抗TIM3および抗CEACAM1での処置の効果についても調べる。より具体的には、例えば、処置マウスの腫瘍流入領域リンパ節由来の細胞を腫瘍抗原AH1 (30 μg/ml)とともに培養する。上清を48時間の時点で回収し、IFN-γの産生について評価する。

30

【0185】

実施例3. 実験的自己免疫性脳脊髄炎

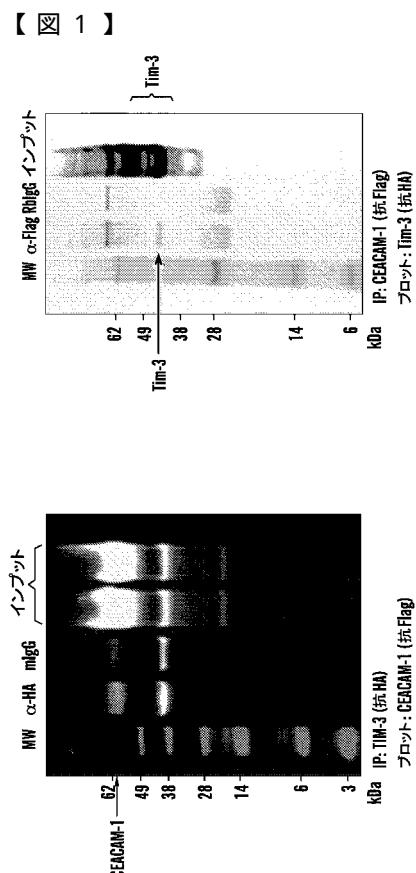
SJLマウスに、ヒト結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*) (4 mg/ml)を補充した完全フロイントアジュvant(CFA)、100 μgの抗TIM3、抗CEACAM1、抗TIM3および抗CEACAM1の両方、マウスIgG1 (EBIOSCIENCE)のいずれかを含有する不完全フロイントアジュvant(IFA)、またはIFAのみのいずれかに乳化されたPLP 139-151 100 μgを免疫化する。また、マウスに0日目および2日目に百日咳毒素(List) 100 ngを静脈内投与する。インビボで用いられる全ての抗体は、LPSを含まない。マウスを疾患の発症について毎日モニタリングし、これを以下のスケールにしたがってスコア化する：0、臨床兆候なし；1、尾部の緊張の消失；2、後肢虚弱；3、後肢麻痺；4、前肢麻痺；および5、瀕死または死。EAE症状は一般に、T細胞寛容を阻害する薬剤によって悪化する。CEACAM1がTIM3のリガンドであるという本明細書において開示される発見を考慮すると、同時投与によるまたは二重特異性ポリペプチド剤の形態での、抗TIM3阻害抗体および抗CEACAM1阻害抗体による処置は、EAE症状または疾患マーカーを相乗的に悪化させるものと考えられる。対照的に、TIM3およびCEACAM1を介したシグナル伝達を活性化する薬剤の同時投与、またはTIM3/CEACAMを介したシグナル伝達を活性化する二重特異性薬剤の同時投与は、EAE症状または疾患マーカーの低減について協同するものと考えられる。

40

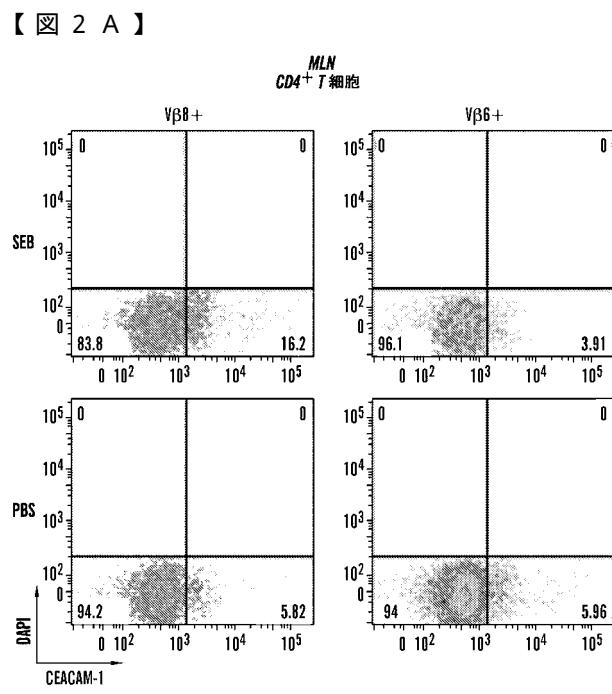
【0186】

50

EAEを有するマウス由来の細胞をCD11b、CD45、CEACAM1、TIM3、またはラットIgG1アイソタイプ対照に対するモノクローナル抗体で染色する。

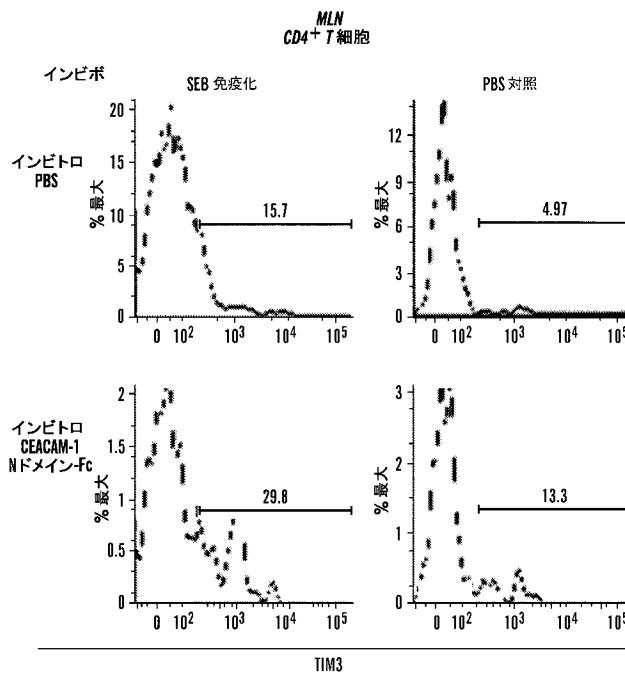


A

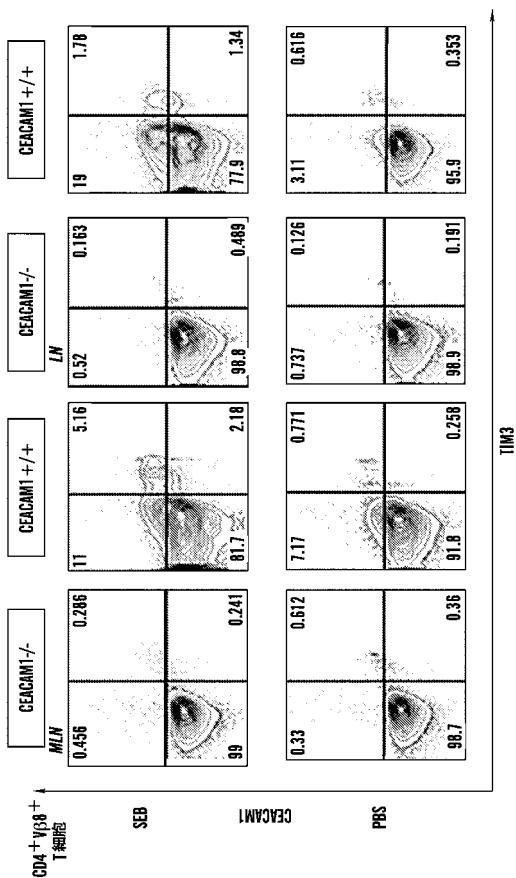


B

【図2B】

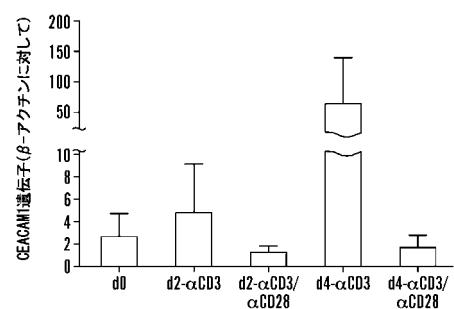


【図3】

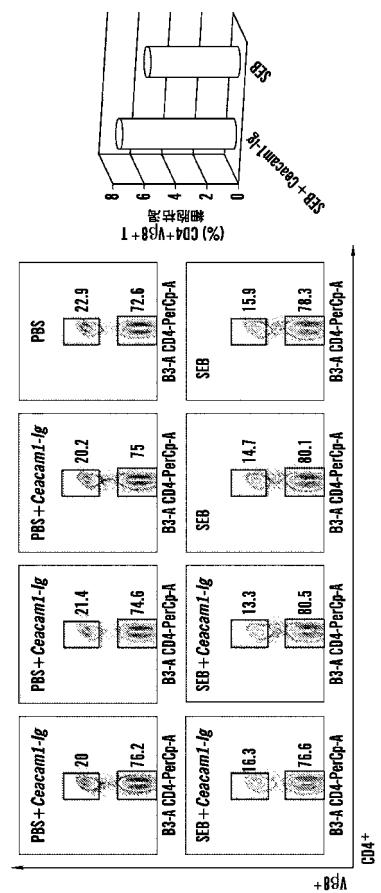


TIM3

【図4】



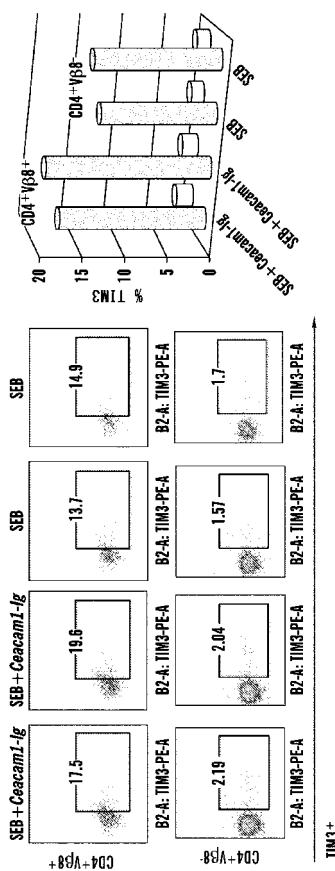
【図5A】



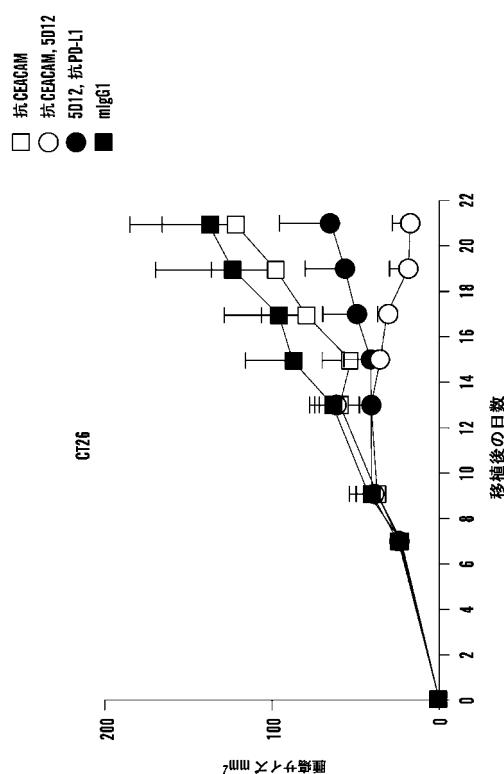
* 2~5日の融合タンパク質とのSEB投与の5日後

CD4+
+B3-A

【図5B】



【 図 6 】



【 义 7 】

ペプチド F1: 繰状
Cys-Pro-Val-Phe-Glu-Cys-Gly-Asn-Val-Leu-Arg-Thr-Asp-Glu-Arg-Asp-Val-Ash-Tyr-77
ペプチド F2: 非繰状
Cys-Pro-Val-Phe-Glu-Ser-Gly-Ser-Gly-Arg-Ile-Gln-Glu-Pro-Gly-Ile-Met-119

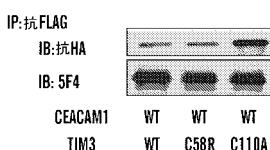
【 四 8 】



A

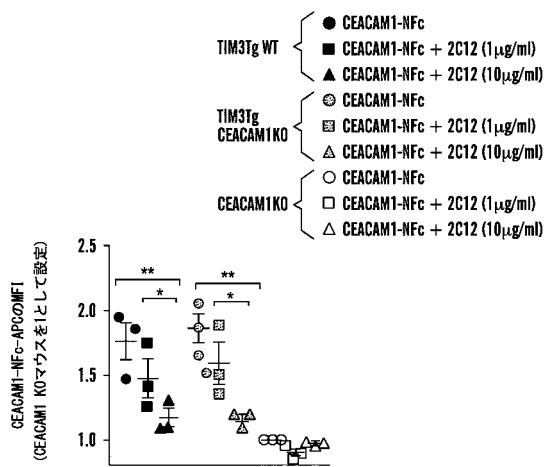
	IP: 抗FLAG						
	IB: 抗HA						
	IB: 5F4						
CEACAM1	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
TIM3	WT	P50A	E62A	R69A	R112W	D121A	

B

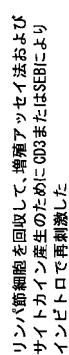


C

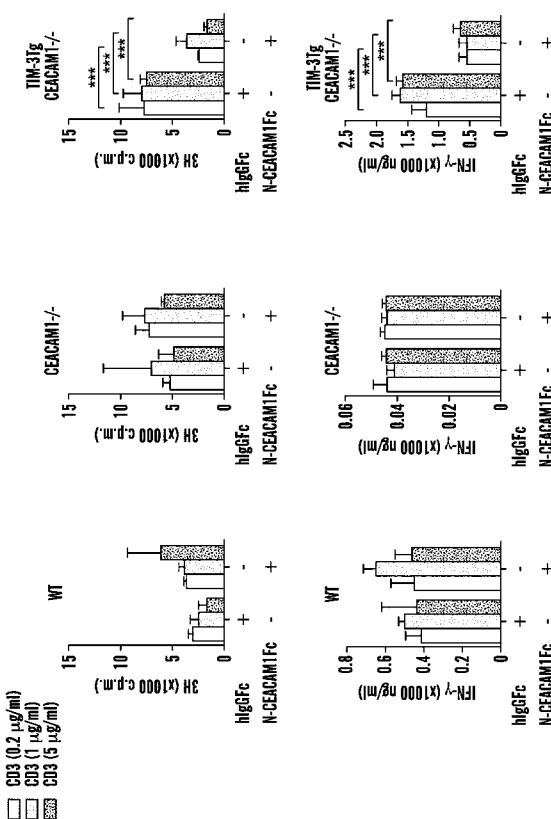
〔 図 9 〕



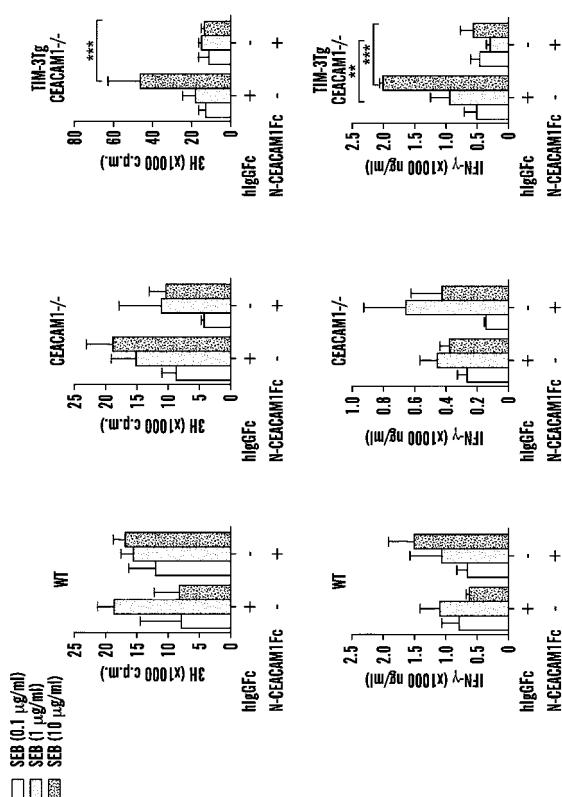
〔 図 1 0 A 〕



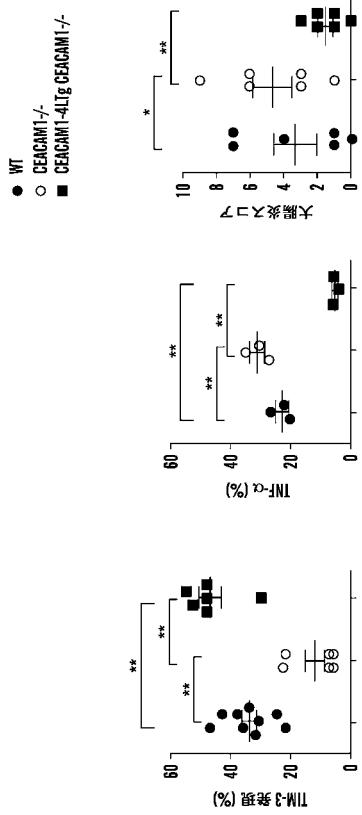
【図10B-1】



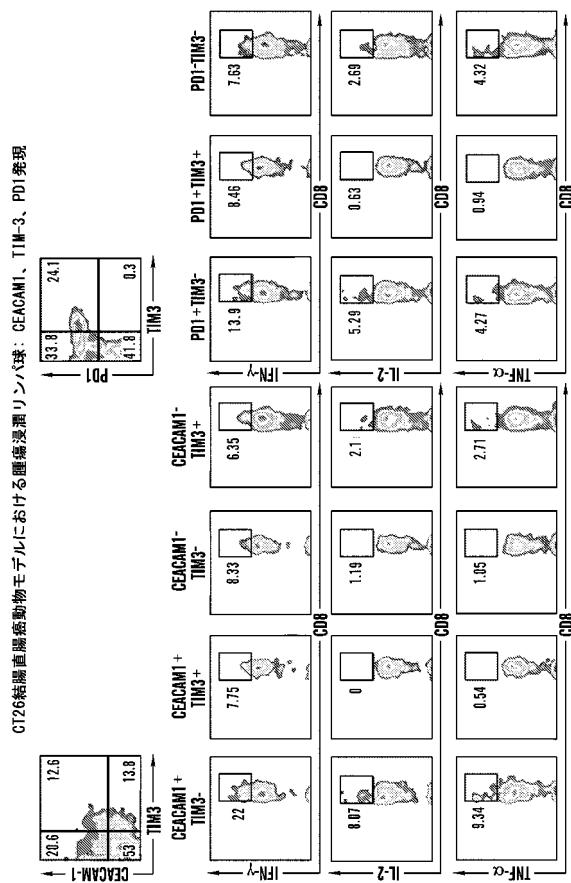
【 図 1 0 B - 2 】



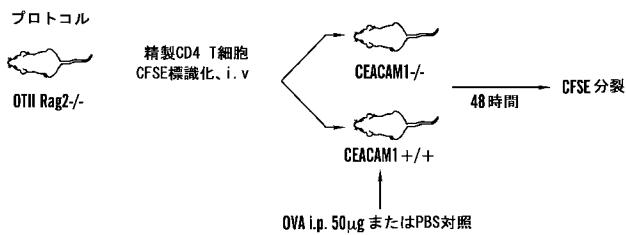
【図 1 1】



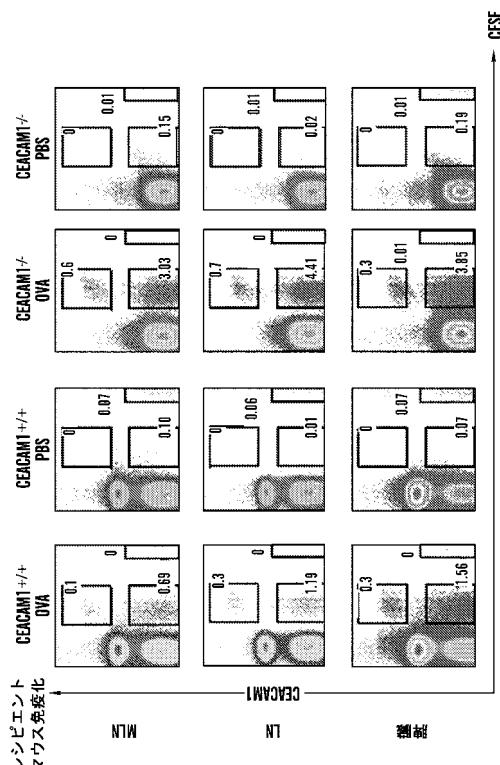
【図 1 2】



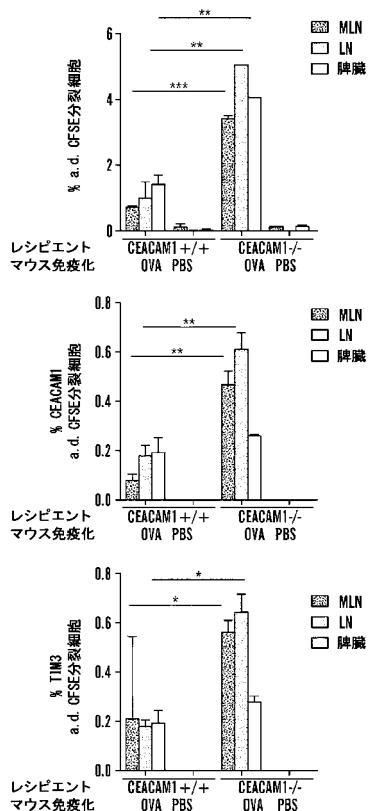
【図 1 3 A】



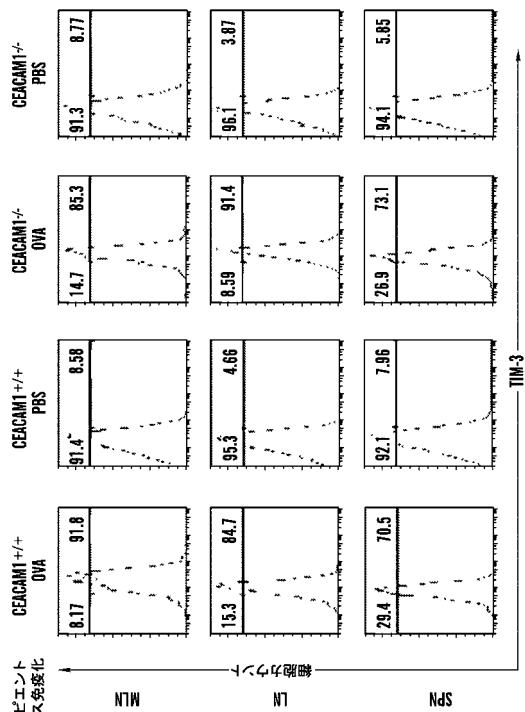
【図 1 3 B】



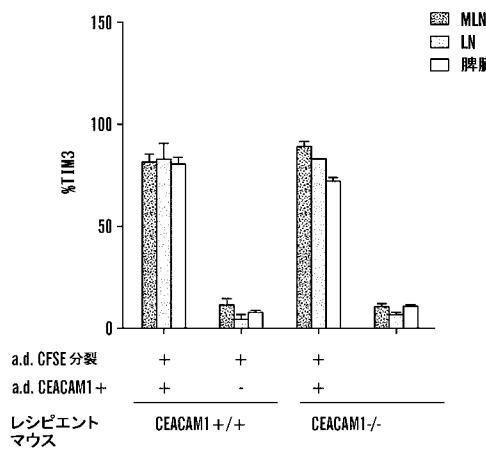
【図 1 3 C】



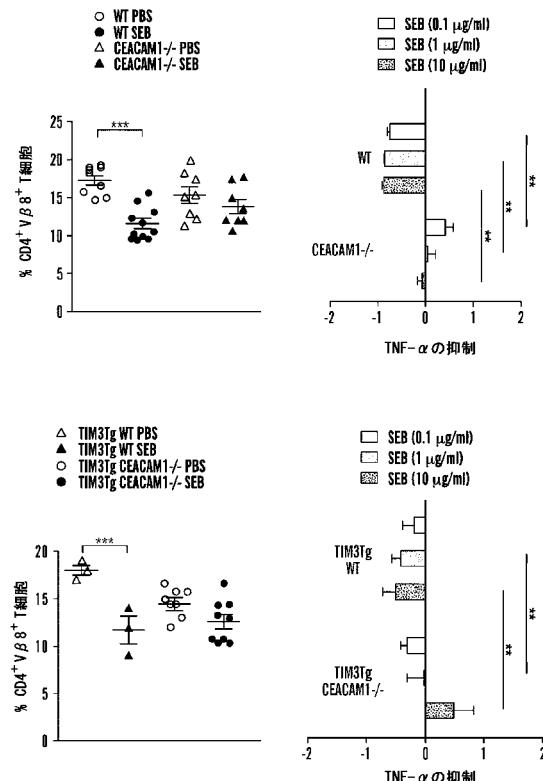
【図 1 4 - 1】



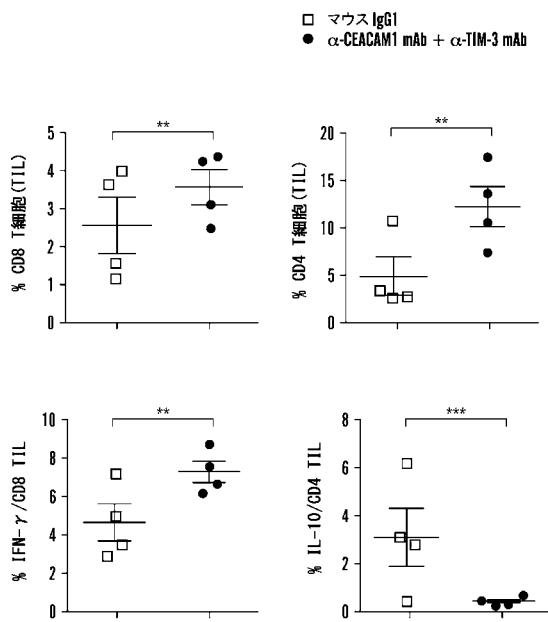
【図 1 4 - 2】



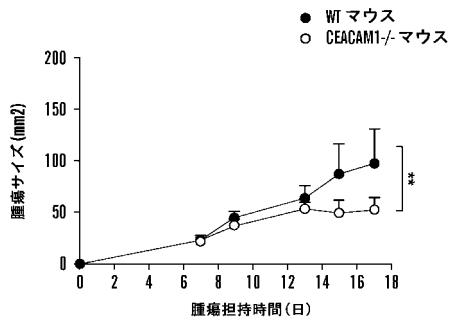
【図 1 5】



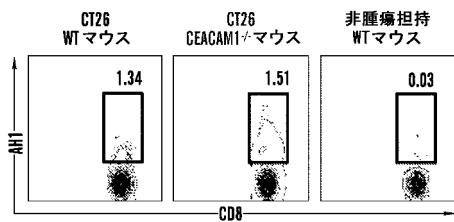
【図 1 6】



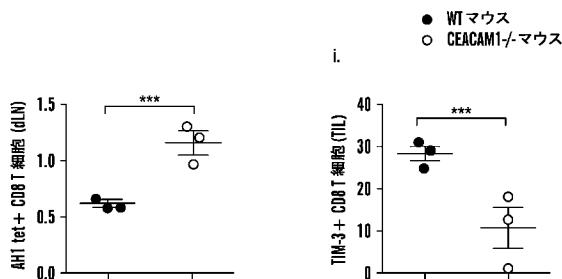
【図 1 7 A】



【図 1 7 B】



【図 1 7 C】



【手続補正書】

【提出日】平成27年4月7日(2015.4.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2015525781000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2013/052612															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <p style="text-align: center;"><i>A61K 39/395 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)</i></p>																	
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 39/395, C07K 14/00, A61K 48/00, A61P 37/02, 37/04																	
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) CIPO, DEPATISNET, DWPI, EAPATIS, EMBL, EPO-Internal, ESP@CE, Esp@cenet, Google, KIPRIS, PAJ, PabMED, RUPTO, SCIENCEDIRECT, SIPO, USPTO, WIPO, ВИНИТИ (VINITI)																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 2011/159877 A2 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. et al.) 22.12.2011, claims 1, 2, paragraph [0014]</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-33</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">US 2007/0110668 A1 (GAL MARKEL) 17.05.2007, claims 1-9, 12, 17-19, paragraphs [0004], [0006], [0007], [0009]</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-33</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">DE 102010024636 A1 (UNIVERSITAT DUISBURG-ESSEN) 22.12.2011, claim 1</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-33</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">US 2010/0061992 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.) 11.03.2010, claims 1-12</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-33</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO 2011/159877 A2 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. et al.) 22.12.2011, claims 1, 2, paragraph [0014]	1-33	A	US 2007/0110668 A1 (GAL MARKEL) 17.05.2007, claims 1-9, 12, 17-19, paragraphs [0004], [0006], [0007], [0009]	1-33	A	DE 102010024636 A1 (UNIVERSITAT DUISBURG-ESSEN) 22.12.2011, claim 1	1-33	A	US 2010/0061992 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.) 11.03.2010, claims 1-12	1-33
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
A	WO 2011/159877 A2 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. et al.) 22.12.2011, claims 1, 2, paragraph [0014]	1-33															
A	US 2007/0110668 A1 (GAL MARKEL) 17.05.2007, claims 1-9, 12, 17-19, paragraphs [0004], [0006], [0007], [0009]	1-33															
A	DE 102010024636 A1 (UNIVERSITAT DUISBURG-ESSEN) 22.12.2011, claim 1	1-33															
A	US 2010/0061992 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.) 11.03.2010, claims 1-12	1-33															
<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: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" 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																	
Date of the actual completion of the international search 21 October 2013 (21.10.2013)		Date of mailing of the international search report 28 November 2013 (28.11.2013)															
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 O. Kolontaevskaya Telephone No. 8(495)531-65-15															

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/00

(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,R,S,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,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,H,R,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,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

(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74) 代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72) 発明者 ブラムバーグ リチャード エス.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウォルサム フォックス ロード 195 ユニット 1
01
(72) 発明者 クチルー ビジャ ケイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン フェアヘーブン ロード 30
(72) 発明者 ファン ユ - ホワ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ラウダース レーン 60
(72) 発明者 チュー チエン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックライン ハイ ストリート 36 アパートメン
ト 6
(72) 発明者 アンダーソン アナ シー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックライン サイプレス ストリート 110 #3
11

F ターム(参考) 4C085 AA14 CC07 DD62
4H045 AA11 CA40 DA76 EA20 EA22 FA71 FA74