

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-533649

(P2010-533649A)

(43) 公表日 平成22年10月28日 (2010. 10. 28)

|                                   |                      |             |
|-----------------------------------|----------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                     | F I                  | テーマコード (参考) |
| <b>C 0 7 K 14/705 (2006. 01)</b>  | C O 7 K 14/705 Z N A | 4 C O 8 4   |
| <b>C 0 7 K 19/00 (2006. 01)</b>   | C O 7 K 19/00        | 4 H O 4 5   |
| <b>A 6 1 K 38/00 (2006. 01)</b>   | A 6 1 K 37/02        |             |
| <b>A 6 1 P 37/04 (2006. 01)</b>   | A 6 1 P 37/04        |             |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006. 01)</b>   | A 6 1 P 35/00        |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 58 頁) 最終頁に続く |                      |             |

|               |                              |          |                      |
|---------------|------------------------------|----------|----------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2010-516276 (P2010-516276) | (71) 出願人 | 505011280            |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年7月11日 (2008. 7. 11)     |          | ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシテ  |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成22年1月12日 (2010. 1. 12)     |          | イー                   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2008/069819            |          | アメリカ合衆国 メリーランド州 バルテ  |
| (87) 国際公開番号   | W02009/029342                |          | イモア 5 ス フロアー エヌ. チャー |
| (87) 国際公開日    | 平成21年3月5日 (2009. 3. 5)       |          | ルズ ストリート 1 0 0       |
| (31) 優先権主張番号  | 60/949, 785                  | (74) 代理人 | 100078282            |
| (32) 優先日      | 平成19年7月13日 (2007. 7. 13)     |          | 弁理士 山本 秀策            |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      | (74) 代理人 | 100062409            |
|               |                              |          | 弁理士 安村 高明            |
|               |                              | (74) 代理人 | 100113413            |
|               |                              |          | 弁理士 森下 夏樹            |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B 7 - D C 改変体

## (57) 【要約】

T細胞を共刺激する（即ち、T細胞の抗原特異的増殖を高める、T細胞によるサイトカイン産生を増強する、T細胞の分化および（a d）エフェクター機能を刺激する、ならびに／あるいはT細胞の生存を促進する）ための組成物および方法が提供される。適切な組成物には、改変体B 7 - D Cポリペプチド、その断片およびその融合タンパク質が含まれる。改変体B 7 - D Cポリペプチドは、阻害性PD - I リガンドに対する低下した結合親和性を有し、T細胞を共刺激する能力を実質的に保持する。改変体B 7 - D Cポリペプチドを用いて、免疫応答の刺激を、それを必要とする対象において行う方法が提供される。

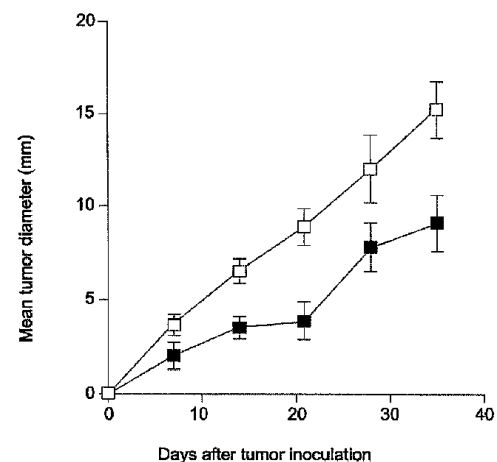


FIG. 14

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

改変体 B 7-D C ポリペプチドが、野生型 B 7-D C ポリペプチドの改変体であり、  
該改変体 B 7-D C ポリペプチドが、野生型 B 7-D C ポリペプチドと比較して、P D  
- 1 に対する減少した結合親和性を有しており、

該改変体 B 7-D C ポリペプチドが、T 細胞の抗原特異的増殖を高め、T 細胞によるサ  
イトカイン産生を増強し、T 細胞の分化およびエフェクター機能を刺激し、または T 細胞  
の生存を促進する能力を保持する

単離された改変体 B 7-D C ポリペプチドまたはその共刺激性断片。

## 【請求項 2】

10

前記ポリペプチドが、1 個または複数のアミノ酸の置換、欠失または挿入を含む、請求  
項 1 に記載の単離された改変体 B 7-D C ポリペプチド。

## 【請求項 3】

前記 B 7-D C ポリペプチドが、ヒト B 7-D C である、請求項 1 に記載の単離された  
ポリペプチド。

## 【請求項 4】

前記 1 個または複数のアミノ酸の置換、欠失または挿入が、A'、B、C、C'、C''  
、D、E、F もしくは G ストランド、またはそれらの任意の組合せ中にある、請求項 3 に  
記載の単離された改変体 B 7-D C ポリペプチド。

## 【請求項 5】

20

前記置換が、野生型のマウス B 7-D C またはヒト B 7-D C の 1 1 1 位にあるアミノ  
酸をセリン残基で置き換えることを含む、請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 6】

前記置換が、野生型ヒト B 7-D C の 1 1 3 位にあるアミノ酸をセリン残基で置き換え  
ることを含む、請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 7】

前記置換が、野生型ヒト B 7-D C の 5 6 位にあるアミノ酸をセリン残基で置き換える  
ことを含む、請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 8】

前記置換が、野生型ヒト B 7-D C の 6 7 位にあるアミノ酸をチロシン残基で置き換え  
ることを含む、請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

30

## 【請求項 9】

前記置換が、野生型ヒト B 7-D C の 7 1 位にあるアミノ酸をセリン残基で置き換える  
ことを含む、請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 10】

前記置換が、野生型ヒト B 7-D C の 1 0 1 位にあるアミノ酸をセリン残基で置き換え  
ることを含む、請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 11】

前記置換が、野生型のマウス B 7-D C またはヒト B 7-D C の 1 0 5 位にあるアミノ  
酸をアラニン残基で置き換えることを含む、請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

40

## 【請求項 12】

a) 第 1 の融合相手として請求項 1 に記載のポリペプチド、および

b) 第 2 の融合相手として第 2 のポリペプチド

を含み、該第 1 の融合相手が、該第 2 の融合相手に直接融合しており、または場合によ  
り、該第 2 の融合相手に融合しているリンカー配列に、融合している

単離された融合ポリペプチド。

## 【請求項 13】

前記第 2 のポリペプチドが、I g 重鎖定常領域の 1 つまたは複数のドメインを含む、  
請求項 12 に記載の融合ポリペプチド。

## 【請求項 14】

50

前記第2のポリペプチドが、ヒト免疫グロブリンC $\gamma$ 1鎖のヒンジ、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3領域に対応するアミノ酸配列を含む、

請求項13に記載の融合ポリペプチド。

【請求項15】

前記第1のポリペプチドが、前記B7-DCの細胞外ドメインまたはその共刺激性断片を含み、

前記第2のポリペプチドが、ヒト免疫グロブリンC $\gamma$ 1鎖のヒンジ、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3領域に対応するアミノ酸配列を含む、

請求項14に記載の融合ポリペプチド。

【請求項16】

T細胞の抗原特異的増殖を高め、T細胞によるサイトカイン産生を増強し、T細胞の分化およびエフェクター機能を刺激し、またはT細胞の生存を促進する方法であって、

a) 第1の融合相手として、単離された改変体B7-DCポリペプチドまたはその共刺激性断片

を含み、該改変体B7-DCポリペプチドが、野生型B7-DCポリペプチドの改変体であり、

該改変体B7-DCポリペプチドが、野生型B7-DCポリペプチドと比較して、PD-1に対する減少した結合親和性を有しており、

該改変体B7-DCポリペプチドが、T細胞の抗原特異的増殖を高め、T細胞によるサイトカイン産生を増強し、T細胞の分化およびエフェクター機能を刺激し、またはT細胞の生存を促進する能力を保持しており、

b) 第2の融合相手として、第2のポリペプチド

を含み、

該第1の融合相手が、該第2の融合相手に直接融合しており、または場合により、該第2の融合相手に融合しているリンカー配列に、融合している、

単離された融合ポリペプチドと、T細胞を接触させる工程を含む方法。

【請求項17】

前記第2のポリペプチドが、Ig重鎖定常領域の1つまたは複数のドメインを含む、

請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記第2のポリペプチドが、ヒト免疫グロブリンC $\gamma$ 1鎖のヒンジ、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3領域に対応するアミノ酸配列を含む、

請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記第1のポリペプチドが、B7-DCの細胞外ドメインまたはその共刺激性断片を含み、

前記第2のポリペプチドが、ヒト免疫グロブリンC $\gamma$ 1鎖のヒンジ、C<sub>H</sub>2およびC<sub>H</sub>3領域に対応するアミノ酸配列を含む、

請求項18に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連する出願への相互参照

本願は、2007年7月13日に出願された米国仮特許出願第60/949,785号の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、T細胞活性化を調節するための組成物および方法、特にT細胞活性化を増強するための組成物および方法に関する。

【0003】

10

20

30

40

50

## 政府の援助

本発明は、補助金第 R 0 1 C A 8 5 7 2 1 号のもと国立衛生研究所により授与された政府の援助でなされた。米国政府は、本発明における特定の権利を有する。

## 【背景技術】

## 【0004】

リンパ球の抗原特異的な活性化および増殖は、共刺激性分子からの正負双方のシグナルにより調節される。特性決定が最も広範になされた T 細胞共刺激経路は B 7 - C D 2 8 であり、そこでは B 7 - 1 ( C D 8 0 ) および B 7 - 2 ( C D 8 6 ) が各々、刺激性 C D 2 8 受容体および阻害性 C T L A - 4 ( C D 1 5 2 ) 受容体に会合することができる。T 細胞受容体を介するシグナル伝達と共に、C D 2 8 リガンドの結合が、T 細胞の抗原特異的増殖を高め、サイトカイン産生を増強し、分化およびエフェクター機能を刺激し、T 細胞の生存を促進する（非特許文献 1；非特許文献 2 および非特許文献 3）。対照的に、C T L A - 4 を介するシグナル伝達は、T 細胞の増殖、I L - 2 の産生および細胞周期の進行を阻害する負のシグナルを送ると考えられる（非特許文献 4 および非特許文献 5）。B 7 ファミリーの他のメンバーには、B 7 - H 1（非特許文献 6 および非特許文献 7）、B 7 - D C（非特許文献 8 および非特許文献 9）、B 7 - H 2（非特許文献 10；非特許文献 11 および非特許文献 12）、B 7 - H 3（非特許文献 13）、および B 7 - H 4（非特許文献 14；非特許文献 15；非特許文献 16 および非特許文献 17）が含まれる。B 7 - H 1 および B 7 - D C は、P D - 1 のリガンドであり、B 7 - H 2 は I C O S のリガンドであり、B 7 - H 3 は、現在のところオーファンリガンドのままである（非特許文献 18）。

## 【0005】

B 7 ファミリー分子は、膜近位定常 I g C ドメインおよび膜遠位 I g V ドメインを有するホモ二量体として、細胞表面上に発現する。こうしたリガンドの受容体は、共通の細胞外 I g V 様ドメインを共有する。受容体-リガンド対の相互作用は、リガンドおよび受容体の I g V ドメインにある残基を通して主に媒介される（非特許文献 19）。一般に、I g V ドメインは、各々が  $\beta$  ストランドの層を含有する 2 枚のシートを有すると記載されている（非特許文献 20）。C T L A - 4 の前方および後方シートは、それぞれストランドの A' G F C' C および A B E D C, " を含有し（非特許文献 21）、一方、B 7 I g V ドメインの前方および後方シートは、それぞれストランドの A G F C C' C " および B E D で構成される（非特許文献 22；非特許文献 23 および非特許文献 24）。結晶学的解析によれば、C T L A - 4 / B 7 結合界面は、M Y P P P Y モチーフからなる C T L A - 4 由来の C D R 3 類似ループと、G、F、C、C' および C " のストランドにより主に形成される B 7 上の表面との相互作用に支配されていることが明らかとなった（非特許文献 22 および非特許文献 23）。アミノ酸 ( a m m o a c i d ) の相同性、変異およびコンピュータモデリングに関するデータは、このモチーフが、C D 2 8 にとっても主要な B 7 結合部位であるという概念を支持している（非特許文献 25）。M Y P P P Y モチーフは I C O S 中に保存されていないが、配列 F D P P P F を有し、類似の位置にある関連モチーフが、I C O S が B 7 - H 2 に結合するための主要な決定基であることが、研究によって示された（非特許文献 26）。

## 【0006】

B 7 - D C（別名 P D - L 2）は、B 7 ファミリーの比較的新しいメンバーであり、B 7 - H 1（別名 P D - L 1）と約 34% 相同性のアミノ酸配列を有する。ヒトおよびマウスの B 7 - D C オルソログは、約 70% のアミノ酸同一性を共有する。B 7 - H 1 および B 7 - D C の転写物は、各種組織中に見出される（非特許文献 6；非特許文献 9 および非特許文献 27）が、それらのタンパク質の発現プロファイルは全く異なる。B 7 - H 1 タンパク質の発現は、マクロファージ様細胞以外の正常組織中には本質的に見出されないが、多様な組織および細胞型において誘発することができる（非特許文献 6；非特許文献 27 および非特許文献 28）。対照的に、B 7 - D C は、樹状細胞および単球だけに発現する（非特許文献 8 および非特許文献 28）。

## 【0007】

B7-H1およびB7-DCは共に、PD-1（プログラム細胞死1）に結合することが示された（非特許文献29；非特許文献8および非特許文献9）が、これは、細胞質ドメイン中に免疫受容抑制性チロシンモチーフ（ITIM）を有するCD28ファミリーの遠縁メンバーである（非特許文献30）。PD-1は、胸腺細胞のサブセット上に発現し、活性化後にT細胞、B細胞および骨髄細胞上で上方調節される（非特許文献31）。PD-1<sup>-/-</sup>マウスの表現型から、PD-1がインビボにおける免疫応答の負の調節因子である直接的証拠が得られる。PD-1の非存在下では、C57BL/6バックグラウンドのマウスは、狼瘡様の糸球体腎炎および進行性関節炎を徐々に発現する（非特許文献32）。BALB/cバックグラウンドのPD-1<sup>-/-</sup>マウスは、致命的な自己免疫性拡張型心筋症を急速に発現する（非特許文献33）。しかし、実質的証拠から、B7-DCは、T細胞応答を共刺激するように機能できることが示されている。最適以下のTCRシグナルの存在下、B7-DCは、インビトロにおいて増加した増殖およびサイトカイン産生を刺激する（非特許文献34）。他方、インビトロの試験によれば、T細胞応答におけるB7-DCの負の調節的役割が示されている（非特許文献9）。こうした見掛け上相反するデータは、T細胞上において、B7-DCに対するPD-1以外の追加の受容体が発現することにより、最も良く解釈される。

10

## 【0008】

T細胞の抗原特異的増殖を高め、サイトカイン産生を増強し、分化およびエフェクター機能を刺激し、T細胞の生存を促進する組成物を提供すれば、有利となる。野生型B7-DCと比較して、PD-1に対する低下した結合親和性を有するが、T細胞を共刺激する（即ち、T細胞の抗原特異的増殖を高め、T細胞によるサイトカイン産生を増強し、T細胞の分化およびエフェクター機能を刺激し、またはT細胞の生存を促進する）能力を保持している改変体B7-DCポリペプチドを提供すれば、それも有利となる。

20

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0009】

【非特許文献1】Lenshowら、Annu. Rev. Immunol.、14巻、233～258頁（1996年）

【非特許文献2】Chambers and Allison、Curr. Opin. Immunol.、9巻、396～404頁（1997年）

30

【非特許文献3】Rathmell and Thompson、Annu. Rev. Immunol.、17巻、781～828頁（1999年）

【非特許文献4】Krummel and Allison、J. Exp. Med.、183巻、2533～2540頁（1996年）

【非特許文献5】Walunasら、J. Exp. Med.、183巻、2541～2550頁（1996年）

【非特許文献6】Dongら、Nature Med.、5巻、1365～1369頁（1999年）

【非特許文献7】Freemanら、J. Exp. Med.、192巻、1～9頁（2000年）

40

【非特許文献8】Tsengら、J. Exp. Med.、193巻、839～846頁（2001年）

【非特許文献9】Latchmanら、Nature Immunol.、2巻、261～268頁（2001年）

【非特許文献10】Wangら、Blood、96巻、2808～2813頁（2000年）

【非特許文献11】Swallowら、Immunity、11巻、423～432頁（1999年）

【非特許文献12】Yoshinagaら、Nature、402巻、827～832頁

50

(1999年)

【非特許文献13】Chapovalら、Nature Immunol.、2巻、269～274頁(2001年)

【非特許文献14】Choiら、J. Immunol.、171巻、4650～4654頁(2003年)

【非特許文献15】Sicaら、Immunity、18巻、849～861頁(2003年)

【非特許文献16】Prasadら、Immunity、18巻、863～873頁(2003年)

【非特許文献17】Zangら、Proc. Natl. Acad. Sci.、U. S. A.、100巻、10388～10392頁(2003年) 10

【非特許文献18】Dongら、Immunol. Res.、28巻、39～48頁(2003年)

【非特許文献19】Schwartzら、Nature Immunol.、3巻、427～434頁(2002年)

【非特許文献20】Williams and Barclay、Annu. Rev. Immunol.、6巻、381～405頁(1988年)

【非特許文献21】Ostrovら、Science、290巻、816～819頁(2000年)

【非特許文献22】Schwartzら、Nature、410巻、604～608頁(2001年) 20

【非特許文献23】Stamperら、Nature、410巻、608～611頁(2001年)

【非特許文献24】Ikemizuら、Immunity、12巻、51～60頁(2000年)

【非特許文献25】Bajorathら、J. Mol. Graph. Model.、15巻、135～139頁(1997年)

【非特許文献26】Wandら、J. Exp. Med.、195巻、1033～1041頁(2002年)

【非特許文献27】Tamura、Blood、97巻、1809～1816頁(2001年) 30

【非特許文献28】Ishidaら、Immunol. Lett.、84巻、57～62頁(2000年)

【非特許文献29】Freemanら、J. Exp. Med.、192巻、1027～1034頁(2000年)

【非特許文献30】Ishidaら、EMBO J.、11巻、3887～3895頁(1992年)

【非特許文献31】Agataら、Int. Immunol.、8巻、765～772頁(1996年)

【非特許文献32】Nishimuraら、Immunity、11巻、141～151頁(1999年) 40

【非特許文献33】Nishimuraら、Science、291巻、319～322頁(2001年)

【非特許文献34】Tsengら、J. Exp. Med.、193巻、839～846頁(2001年)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

したがって、本発明の目的は、野生型B7-DCと比較して、PD-1に対する低下した結合親和性を有するが、T細胞を共刺激する能力を保持している改変体B7-DCポリ 50

ペプチドを提供することである。

【0011】

本発明の別の目的は、改変体 B 7-D C ポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供することである。

【0012】

本発明の別の目的は、改変体 B 7-D C ポリペプチドをコードする核酸分子を発現するベクターを含有する細胞を提供することである。

【0013】

本発明のさらに別の目的は、改変体 B 7-D C ポリペプチドとの接触により、T 細胞を共刺激する方法を提供することである。

【0014】

本発明のさらに別の目的は、改変体 B 7-D C ポリペプチド、これをコードする核酸、または改変体 B 7-D C ポリペプチドをコードする核酸をトランスフェクトもしくは形質導入した細胞の投与を、それを必要とする哺乳動物に行う方法を提供することである。

【0015】

本発明のさらに別の目的は、抗原またはワクチンと組み合わせて改変体 B 7-D C ポリペプチドを投与することにより、抗原またはワクチンに対する免疫応答を増強する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

T 細胞を共刺激する（即ち、T 細胞の抗原特異的増殖を高める、T 細胞によるサイトカイン産生を増強する、T 細胞の分化およびエフェクター機能を刺激する、ならびに／あるいは T 細胞の生存を促進する）ための組成物および方法が提供される。適切な組成物には、改変体 B 7-D C ポリペプチドが含まれる。改変体 B 7-D C ポリペプチドは、阻害性 PD-1 リガンドに対する低下した結合親和性を有し、T 細胞を共刺激する能力を実質的に保持する。ある種の実施形態では、改変体 B 7-D C ポリペプチドは、限定されることなく、マウスまたはヒト B 7-D C の A'  $\beta$ -ストランドの 33 位、B  $\beta$ -ストランドの 39 もしくは 41 位、C  $\beta$ -ストランドの 56 もしくは 58 位、C'  $\beta$ -ストランドの 65 もしくは 67 位、C''  $\beta$ -ストランドの 71 もしくは 72 位、D  $\beta$ -ストランドの 84 位、E  $\beta$ -ストランドの 88 位、F  $\beta$ -ストランドの 101、103 もしくは 105 位、または G  $\beta$ -ストランドの 111、113 もしくは 116 位に、置換、欠失または挿入を含有することができる。

【0017】

改変体 B 7-D C ポリペプチドの断片および改変体 B 7-D C ポリペプチドを含有する融合タンパク質も、提供される。いくつかの実施形態では、改変体 B 7-D C ポリペプチドの断片には、細胞外ドメインまたはその断片を含む、可溶性断片が含まれる。改変体 B 7-D C ポリペプチドの適当な他の断片には、Ig V および Ig C ドメインを含有する断片、または Ig V ドメインだけを含有する断片が含まれる。改変体 B 7-D C ポリペプチドおよびその断片は、他のポリペプチドと連結して融合タンパク質を形成することができる。変異体 B 7-D C タンパク質の全てもしくは一部を含む第 1 の融合相手が、(i) 第 2 のポリペプチドに直接融合している、または (ii) 場合により、第 2 のポリペプチドに融合したリンカーペプチド配列に融合している、変異体 B 7-D C 融合ポリペプチドが提供される。該融合相手の存在は、改変体 B 7-D C ポリペプチドの溶解性、親和性および／または数価を変えることができる。ある種の実施形態では、改変体 B 7-D C ポリペプチドは、ヒト免疫グロブリン C  $\gamma$  1 鎖のヒンジ、C<sub>H2</sub> および C<sub>H3</sub> 領域に対応するアミノ酸配列を好ましくは有する、Ig 重鎖定常領域の 1 つまたは複数のドメインに融合している。

【0018】

改変体 B 7-D C ポリペプチドおよび改変体 B 7-D C 融合タンパク質をコードする核酸、ならびにベクター中にこのような核酸を含有する宿主細胞も、提供される。

10

20

30

40

50

## 【0019】

改变体B7-D Cポリペプチドおよび改变体B7-D C融合タンパク質を含有する免疫原性組成物も、提供される。免疫原性組成物は、抗原、改变体B7-D Cポリペプチド源、ならびに場合によりアジュバントおよび標的指向分子を含む。適切な抗原には、ウイルス、細菌、寄生生物、環境性および腫瘍の抗原が含まれる。

## 【0020】

改变体B7-D Cポリペプチドおよび改变体B7-D C融合タンパク質を使用して、T細胞を共刺激する方法も、提供される。T細胞は、インビトロ、エクスピボまたはインビボで、改变体B7-D C組成物で共刺激することができる。改变体B7-D C組成物を用いるT細胞の共刺激は、T細胞の抗原特異的活性化の前、間または後に行うことができる。

10

## 【0021】

改变体B7-D Cポリペプチド、改变体B7-D C融合タンパク質およびそれらをコードする核酸の治療的使用が、提供される。改变体B7-D C組成物は、癌、およびウイルス感染症を含む感染性疾患に対する免疫応答を刺激するために、使用することができる。改变体B7-D C組成物は、免疫抑制対象の免疫応答を刺激するためにも、使用することができる。ある種の実施形態では、改变体B7-D C組成物は、ワクチンと共に投与される。

## 【0022】

本発明の1つまたは複数の実施形態に関する詳細は、付属の図面および下記の説明において提示される。本発明の他の特徴、目的および利点は、この記載および図面、ならびに特許請求の範囲から明らかとなる。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0023】

【図1】ヒトB7-D C (h B7-D C) の全長未成熟アミノ酸配列 (配列番号1) を示す描写である。ヒトB7-D Cのシグナル配列は、この全長未成熟アミノ酸配列の最初の19アミノ酸を含有する。

【図2】マウスB7-D C (m B7-D C) の全長未成熟アミノ酸配列 (配列番号2) を示す描写である。マウスB7-D Cのシグナル配列は、この全長未成熟アミノ酸配列の最初の19アミノ酸を含有する。

30

【図3】図1に示すアミノ酸配列を有する全長未成熟ヒトB7-D Cポリペプチド (配列番号1) をコードする、ヌクレオチド配列 (配列番号3) を示す描写である。ヒトB7-D Cのシグナル配列は、この全長未成熟核酸配列の最初の57ヌクレオチドによりコードされる。

【図4】図2に示すアミノ酸配列を有する全長未成熟マウスB7-D Cポリペプチド (配列番号2) をコードする、ヌクレオチド配列 (配列番号4) を示す描写である。マウスB7-D Cのシグナル配列は、この全長未成熟核酸配列の最初の57ヌクレオチドによりコードされる。

【図5】マウスおよびヒトB7分子の構造志向的な配列整列 (sequence alignment) を示す図である。この整列には、ヒトCD86 (h CD86) (配列番号5)、ヒトCD80 (h CD80) (配列番号6)、ヒトB7-H1 (h B7-H1) (配列番号7)、マウスB7-H1 (m B7-H1) (配列番号8)、ヒトB7-H2 (h B7-H2) (配列番号9)、ヒトB7-H3 (h B7-H3) (配列番号10)、ヒトB7-D C (h PD-L2) (配列番号11) およびマウスB7-D C (m PD-L2) (配列番号12) のN末端IgVドメイン由来の配列を包含する。CD80およびCD86のX線構造中に観察したβストランドは、(A' ~ G) と標識されており、B7ファミリー共通に最もよく保存されている残基位置 (例えば、大型疎水性、荷電/極性、またはシステインの残基) には、陰影を付けてある。潜在的なN連結グリコシル化部位は、箱囲いしてある。イタリックで示したCD86残基は、ホモ二量体結晶界面の形成に関与し、CD80内に保存されており、太字イタリックで示した残基は、複合体構造中のCTLA

40

50

－4結合に関与する。変異原性試験に基づいてPD－1結合に最も重要である、mB7－H1およびmB7－DC内の残基位置は、下線を引き、太字で示してある。変異誘発した際にPD－1に対するアビディティの増加を示した、mB7－H1内の残基は、丸囲いしてある。残基番号は、mB7－H1（上側の番号）およびmB7－DC（下側の番号）内の位置を示す。

【図6】B7－DCのPD－1に対する結合の表面プラズモン共鳴分析の結果を示す線グラフである。このグラフは、野生型B7－DC IgおよびK113S B7－DC Ig改変体の固定化されたPD－1 Igに対する結合の結果を示す。データは、秒単位の時間の関数としての応答単位（RU）により報告されている。

【図7】野生型および改変体B7－DC Ig融合タンパク質のPD－1を発現するCHO細胞に対する結合を示す一連のグラフである。B7－DC Ig融合タンパク質は、示した野生型または改変体B7－DC改変体融合タンパク質と共に、次いでFITC標識ヤギ抗ヒトIgGと共にインキュベートし、FACSにより分析した。媒体単独およびヒトIgGを陰性対照として用い、抗ヒトPD－1抗体を陽性対照として用いた。グラフは、放射蛍光レベルの関数としての細胞数を表示している。グラフの右側および左側の数字は、示した組成物の結合について、それぞれ陽性および陰性に見なされた細胞百分率を表す。

【図8】野生型および改変体B7－DC分子のT細胞共刺激に対する効果を示すグラフである。図8Aのデータは、96ウェルプレートのウェル底部上に表示濃度で被覆した抗CD3 mAbの存在下、示した野生型（－◇－）または改変体（－■－D111；－×－K113）B7－DC Ig融合タンパク質で刺激した後のT細胞増殖を表す。T細胞増殖は、抗CD3 mAb濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の関数としての $^3\text{H}$ －チミジン（ $^3\text{H}$ －TdR）（ $\times 10^3 \text{ cpm}$ ）の取込みとして測定した。ヒトIg（hIg）（－○－）およびPBS単独（－▲－）を、共刺激性分子に対する陰性対照として用いた。データは、3実験の代表的な1実験を表す。図8Bのデータは、示したIg融合タンパク質（■野生型；□D111；□K113）および抗CD3の存在下、48または72時間培養したT細胞によるIFN－ $\gamma$ 分泌（ $\text{ng}/\text{ml}$ ）を表す。ヒトIg（□）およびPBS（□）を、陰性対照として用いた。データは、3実験の代表的な1実験を表す。

【図9】抗CD3 mAbの存在下、示した野生型（－●－）または改変体（－△－D111；－×－K113）B7－DC Ig融合タンパク質とインキュベーションした後のPD－1－/－T細胞の増殖を示す線グラフである。T細胞増殖は、抗CD3 mAb濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の関数としての $^3\text{H}$ －チミジン（ $^3\text{H}$ －TdR）（ $\times 10^3 \text{ cpm}$ ）の取込みとして測定した。ヒトIg（－■－）およびPBS（－○－）を、陰性対照として用いた。データは、3実験の代表的な1実験を表す。

【図10】同系の免疫応答性マウス（C57BL/6）における、擬似（mock）トランスフェクト（－□－）したかのいずれかである、または野生型B7－DC（－■－）もしくはK113S B7－DC（－●－）でトランスフェクトした、EG7マウス腫瘍細胞の増殖（mm単位の平均腫瘍直径）を時間（日）の関数として示す線グラフである。

【図11】免疫欠損ヌード（nu/nu）マウスにおける、擬似トランスフェクト（－□－）した、または野生型B7－DC（－■－）もしくはK113S B7－DC（－●－）でトランスフェクトしたかのいずれかである、EG7マウス腫瘍細胞の増殖（mm単位の平均腫瘍直径）を時間（日）の関数として示す線グラフである。

【図12】同系の免疫応答性マウス（DBA/2）における、擬似トランスフェクト（－□－）した、または野生型B7－DC（－■－）もしくはK113S B7－DC（－●－）でトランスフェクトしたかのいずれかである、P815マストロサイトーマ（mastocytoma）マウス腫瘍細胞の増殖（mm単位の平均腫瘍直径）を時間（日）の関数として示す線グラフである。

【図13】免疫欠損ヌード（nu/nu）マウスにおける、擬似トランスフェクト（－□－）した、または野生型B7－DC（－■－）もしくはK113S B7－DC（－●－）でトランスフェクトした、P815マストロサイトーマ（mastocytoma）マウス腫瘍細胞の増殖（mm単位の平均腫瘍直径）を時間（日）の関数として示す線グラ

10

20

30

40

50

フである。

【図14】同系の免疫応答性マウス（DBA／2）におけるP815マストロサイトーマ（mastocytooma）マウス腫瘍細胞の増殖（mm単位の平均腫瘍直径）に対する、野生型B7-DCIgの腹腔内注射の効果を時間（日）の関数として示す線グラフである。マウスには、対照Ig（—□—）または野生型B7-DCIg（—■—）の0.1mgを、3日目および8日目に腹腔注入した。

【発明を実施するための形態】

【0024】

I. 定義

本明細書で使用する場合、用語「単離された」とは、対象化合物（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）が天然に存在する環境とは異なる環境中にある、例えば、ペプチドを自然中には見出されない濃度に濃縮することなどにより、自然環境から分離されている該化合物を表現することを意図している。「単離された」とは、対象化合物が実質的に富化されている、および／または対象化合物が部分的もしくは実質的に精製されている試料内にある化合物を包含することを意図している。

【0025】

本明細書で使用する場合、用語「ポリペプチド」とは、改変（例えば、リン酸化またはグリコシル化）に関係なく、任意の長さのアミノ酸連鎖を指す。

【0026】

本明細書で使用する場合、用語「共刺激性ポリペプチド」とは、T細胞上の細胞表面分子と相互作用した際、T細胞応答を増強し、T細胞増殖を増強し、T細胞によるサイトカインの産生および／または分泌を増強し、T細胞の分化およびエフェクター機能を刺激し、あるいは共刺激性ペプチドと接触していないT細胞に比して、T細胞の生存を促進するポリペプチドである。

【0027】

本明細書で使用する場合、用語「改変体」ポリペプチドは、対応する野生型ポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の少なくとも1つの変化を含有する。

【0028】

本明細書で使用する場合、「アミノ酸配列の変化」は、例えば、1個または複数のアミノ酸の置換、欠失または挿入でもよい。

【0029】

本明細書で使用する場合、「ベクター」とは、別のDNAセグメントを挿入することにより、挿入セグメントの複製を起こし得る、プラスミド、ファージまたはコスミドなどのレプリコンである。本明細書に記載のベクターは、発現ベクターでもよい。

【0030】

本明細書で使用する場合、「発現ベクター」とは、1つまたは複数の発現制御配列を含むベクターである。

【0031】

本明細書で使用する場合、「発現制御配列」とは、別のDNA配列の転写および／または翻訳を制御し、調節するDNA配列である。

【0032】

本明細書で使用する場合、「作動可能に連結された」とは、発現制御配列が、対象コード配列の発現を有効に制御するように、遺伝子（genetic）構築体中に組み込まれていることを意味する。

【0033】

本明細書で使用する場合、ポリペプチドの「断片」とは、全長タンパク質中のより短いポリペプチドである、該ポリペプチドの任意のサブセットを指す。一般に、断片の長さは、アミノ酸5個以上である。

【0034】

本明細書で使用する場合、「数価」とは、1分子当たり利用可能な結合部位の数を指す

10

20

30

40

50

。

#### 【0035】

本明細書で使用する場合、「保存的」アミノ酸置換とは、置換されたアミノ酸が、類似の構造的または化学的性質を有する置換である。

#### 【0036】

本明細書で使用する場合、「非保存的」アミノ酸置換とは、置換されたアミノ酸の電荷、疎水性または嵩が、有意に変化している置換である。

#### 【0037】

本明細書で使用する場合、「単離核酸」とは、哺乳類ゲノム中で当該核酸の片側または両側に通常は隣接している核酸（例えば、非 B7-D C タンパク質をコードする核酸）を含む、哺乳類ゲノム中に存在する他の核酸分子から分離されている核酸を指す。

10

#### 【0038】

核酸に関して本明細書で使用する場合、「単離された」という用語は、任意の非天然核酸配列も包含するが、その理由は、このような非天然配列が、自然には見出されず、天然に存在するゲノム中で直接隣接配列を有していないからである。

#### 【0039】

本明細書で使用する場合、用語「宿主細胞」とは、組換え発現ベクターを導入できる原核性および真核性の細胞を指す。

#### 【0040】

本明細書で使用する場合、「形質転換された」および「トランスフェクトされた」とは、当技術分野で公知の多くの技法によって、細胞中に核酸（例えば、ベクター）を導入することを包含する。

20

#### 【0041】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」とは、抗原結合部位を含む、無傷な分子ならびにその断片の双方を包含することを意図している。こうしたものには、無傷な抗体の Fc 断片を欠いた Fab および F(a b')<sub>2</sub> 断片が含まれる。

#### 【0042】

用語「個体」、「宿主」、「対象」および「患者」は、本明細書では互換的に使用され、それだけに限らないが、ネズミ、サル、ヒト、家畜哺乳動物、スポーツ哺乳動物および愛玩哺乳動物を含めた哺乳動物を指す。

30

#### 【0043】

本明細書で使用する場合、用語「有効量」または「治療有効量」とは、治療している炎症反応または自己免疫疾患状態の 1 つまたは複数の症状を治療、抑制または緩和するのに十分な用量、あるいはそうでない場合、所望の薬理学的および／または生理学的効果を提供するのに十分な用量を意味する。正確な用量は、対象依存性の変数（例えば、年齢、免疫系の健全性など）、疾患、および施している治療などの多様な要因に従って変動する。

#### 【0044】

##### II. 組成物

##### A. 単離 B7-D C ポリペプチド

##### 1. 改変体 B7-D C ポリペプチド

単離 B7-D C ポリペプチドを本明細書で開示する。B7-D C ポリペプチドは、任意起源の種でもよい。一実施形態では、B7-D C ポリペプチドは、哺乳動物種に由来する。好ましい実施形態では、B7-D C ポリペプチドは、マウスまたはヒトが起源である。マウス B7-D C の全長未成熟アミノ酸配列（配列番号 2）は、図 2 に描写されている。マウス B7-D C のシグナル配列は、その全長未成熟アミノ酸配列の最初の 19 アミノ酸を含有する。ヒト B7-D C の全長未成熟アミノ酸配列（配列番号 1）は、図 1 に描写されている。ヒト B7-D C のシグナル配列は、その全長未成熟アミノ酸配列の最初の 19 アミノ酸を含有する。本明細書で使用する場合、用語「ポリペプチド」とは、改変（例えば、リン酸化またはグリコシル化）に関係なく、長さ任意のアミノ酸の鎖を指す。

40

#### 【0045】

50

一実施形態では、改変体 B 7-D C ポリペプチドは、野生型 B 7-D C と同じ活性、実質的に同じ活性、または異なる活性を有する。実質的に同じ活性とは、それが T 細胞を共刺激する能力を保持していることを意味する。

#### 【0046】

本明細書に開示するポリペプチドは、改変体 B 7-D C ポリペプチドを包含する。本明細書で使用する場合、「改変体」ポリペプチドは、対応する野生型ポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の少なくとも 1 つの変化を含有する。アミノ酸配列の変化は、例えば、1 個または複数のアミノ酸の置換、欠失または挿入でもよい。

#### 【0047】

改変体 B 7-D C ポリペプチドは、アミノ酸の置換、欠失または挿入の任意の組合せを有することができる。一実施形態では、単離した B 7-D C 改変体ポリペプチドは、そのアミノ酸配列が、野生型 B 7-D C ポリペプチドのアミノ酸配列と、少なくとも 60、70、80、85、90、95、97、98、99、99.5 または 100% の同一性を共有するように、整数個のアミノ酸変化を有する。好ましい実施形態では、B 7-D C 改変体ポリペプチドは、野生型マウスまたは野生型ヒト B 7-D C ポリペプチドのアミノ酸配列と、少なくとも 60、70、80、85、90、95、97、98、99、99.5 または 100% の同一性を共有するアミノ酸配列を有する。

#### 【0048】

配列同一性百分率は、コンピュータプログラムまたは直接の配列比較を用いて計算することができる。2 種の配列間の同一性を決定する好ましいコンピュータプログラム法には、それだけに限らないが、GCG プログラムパッケージ、FASTA、BLASTP および TBLASTN が挙げられる（例えば、D. W. Mount、2001 年、Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y. を参照されたい）。BLASTP および TBLASTN のプログラムは、NCBI および他の提供源から公的に入手できる。同一性を決定するために、周知の Smith Waterman のアルゴリズムも使用し得る。

#### 【0049】

アミノ酸配列を比較する例示的なパラメーターには、次のもの：1) Needleman and Wunsch のアルゴリズム (J. Mol. Biol.、48 巻、443~453 頁 (1970 年))、2) Hentikoff and Hentikoff の BLOSSUM62 の比較行列 (Proc. Natl. Acad. Sci.、U. S. A.、89 巻、10915~10919 頁 (1992 年))、3) ギャップペナルティー=12、および 4) ギャップ長ペナルティー=4 が含まれる。これらのパラメーターを用いた有用なプログラムは、「ギャップ」プログラムとして公的に入手できる (Genetics Computer Group、Madison、Wis.)。上記のパラメーターは、ポリペプチド比較用のデフォルトパラメーターである（末端ギャップにはペナルティーがない）。

#### 【0050】

代替法として、ポリペプチドの配列同一性は、次の等式を用いて計算することができる。即ち、% 同一性 = (同一残基数) / (アミノ酸残基の整列長) × 100。この計算の場合、整列長には、内部ギャップは含まれるが、末端ギャップは含まれない。

#### 【0051】

B 7-D C ポリペプチドにおけるアミノ酸置換は、「保存的」または「非保存的」でもよい。本明細書で使用する場合、「保存的」アミノ酸置換は、置換アミノ酸が、類似の構造的または化学的性質を有する置換であり、「非保存的」アミノ酸置換は、置換アミノ酸の電荷、疎水性または嵩が、有意に変化している置換である。非保存的置換は、(a) 置換域におけるペプチド骨格の構造、例えば、シートもしくは螺旋立体構造としての構造、(b) 標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または (c) 側鎖の嵩を維持する上で効果がより有意に異なる。

## 【0052】

保存的アミノ酸置換の例には、当該置換が以下の5群：1) 小型脂肪族で非極性またはやや極性の残基 (Ala、Ser、Thr、Pro、Gly)、2) 極性で負荷電の残基およびそのアミド (Asp、Asn、Glu、Gln)、極性で正荷電の残基 (His、Arg、Lys)、大型脂肪族で非極性の残基 (Met、Leu、Ile、Val、Cys)、ならびに大型芳香族の残基 (Phe、Tyr、Trp) のうち、1つの群に入る置換が含まれる。非保存的アミノ酸置換の例は、1) 親水性残基、例えば、セリルもしくはスレオニルが、疎水性残基、例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルもしくはアラニルに代わって (もしくは、によって) 置換される、2) システインもしくはプロリンが、他の任意の残基に代わって (もしくは、によって) 置換される、3) 正の電荷を持った側鎖を有する残基、例えば、リシル、アルギニルもしくはヒスチジルが、負の電荷を持った残基、例えば、グルタミルもしくはアスパルチルに代わって (もしくは、によって) 置換される、または4) 嵩高い側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、側鎖を有していない残基、例えば、グリシンに代わって (もしくは、によって) 置換される、置換である。

10

## 【0053】

B7ファミリー分子は、B7-DCを含め、膜近位定常IgCDメインおよび膜遠位IgVドメインを有するホモ二量体として、細胞表面上に発現する。こうしたリガンドの受容体は、共通の細胞外IgV様ドメインを共有する。受容体-リガンド対の相互作用は、リガンドおよび受容体のIgVドメインにある残基を通して主に媒介される。一般に、IgVドメインは、各々がβストランドの層を含有する2枚のシートを有すると説明されている。こうしたβストランドは、A'、B、C、C'、C''、D、E、FおよびGと呼称される。一実施形態では、B7-DC改変体ポリペプチドは、こうしたβストランドの1つまたは複数内に任意の可能な組合せで、アミノ酸変化 (即ち、置換、欠失または挿入) を含有する。別の実施形態では、B7-DC改変体は、A'、C、C'、C''、D、E、FまたはGのβストランド内に、1つまたは複数のアミノ酸変化 (即ち、置換、欠失または挿入) を含有する。好ましい実施形態では、B7-DC改変体は、Gのβストランド内に、1つまたは複数のアミノ酸変化を含有する。

20

## 【0054】

マウスB7-DCまたはヒトB7-DCに関しては、改変体B7-DCポリペプチドは、限定することなく、A'βストランドの33位、Bβストランドの39もしくは41位、Cβストランドの56もしくは58位、C'βストランドの65もしくは67位、C''βストランドの71もしくは72位、Dβストランドの84位、Eβストランドの88位、Fβストランドの101、103もしくは105位、またはGβストランドの111、113もしくは116位に、置換、欠失または挿入を含有することができる。

30

## 【0055】

一実施形態では、改変体B7-DCポリペプチドは、33位における置換 (例えば、33位におけるアスパラギン酸の代わりにセリン置換)、39位における置換 (例えば、39位におけるセリンの代わりにチロシン置換)、41位における置換 (例えば、41位におけるグルタミン酸の代わりにセリン置換)、56位における置換 (例えば、56位におけるアルギニンの代わりにセリン置換)、58位における置換 (例えば、58位におけるセリンの代わりにチロシン置換)、65位における置換 (例えば、65位におけるアスパラギン酸の代わりにセリン置換)、67位における置換 (例えば、67位におけるセリンの代わりにチロシン置換)、71位における置換 (例えば、71位におけるグルタミン酸の代わりにセリン置換)、72位における置換 (例えば、72位におけるアルギニンの代わりにセリン置換)、84位における置換 (例えば、84位におけるリシンの代わりにセリン置換)、88位における置換 (例えば、88位におけるヒスチジンの代わりにアラニン置換)、101位における置換 (例えば、101位におけるアルギニンの代わりにセリン置換)、103位における置換 (例えば、103位におけるロイシンの代わりにアラニ

40

50

ン置換)、105位における置換(例えば、105位におけるイソロイシンの代わりにアラニン置換)、111位における置換(例えば、111位におけるアスパラギン酸の代わりにセリン置換)、113位における置換(例えば、113位におけるリシンの代わりにセリン置換)、または116位における置換(例えば、116位におけるスレオニンの代わりにチロシン置換)を含有する。

#### 【0056】

しかし、列挙したアミノ酸位置における置換は、任意のアミノ酸またはアミノ酸類縁体を用いてなし得ることが理解されている。例えば、列挙した位置における置換は、天然に存在するアミノ酸(例えば、アラニン、アスパラギン酸、アスパラギン、アルギニン、システイン、グリシン、グルタミン酸、グルタミン、ヒスチジン、ロイシン、バリン、イソロイシン、リシン、メチオニン、プロリン、スレオニン、セリン、フェニルアラニン、トリプトファンまたはチロシン)のいずれでもなし得る。

10

#### 【0057】

本明細書に記載の置換は、マウスおよびヒトのB7-DCに関するが、当業者であれば、他の種(例えば、ラット、ハムスター、モルモット、アレチネズミ、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ウシまたはヒト以外の霊長類)由来の対応するポリペプチドに同等な変化を容易になし得ることに留意する。

#### 【0058】

##### 2. 改変体B7-DCポリペプチドの性質

開示した単離B7-DCポリペプチドは、T細胞を共刺激することができる。「共刺激性ポリペプチド」は、T細胞上の細胞表面分子と相互作用した際、T細胞応答を増強し、T細胞増殖を増強し、T細胞によるサイトカインの産生および／または分泌を増強し、T細胞の分化およびエフェクター機能を刺激し、あるいは共刺激性ペプチドと接触していないT細胞に比して、T細胞の生存を促進するポリペプチドである。この相互作用から生じるT細胞応答は、共刺激性ポリペプチドの非存在下における応答より通常大きい。共刺激性ポリペプチドの非存在下におけるT細胞の応答は、無応答のこともあれば、共刺激性ポリペプチドの存在下における場合より、有意に低い応答のこともある。T細胞の応答は、エフェクター(例えば、CTLもしくは抗体産生B細胞)応答、1つもしくは複数のエフェクター(例えば、CTLもしくは抗体産生B細胞)応答を補助するヘルパー応答、または抑制的応答のこともある。

20

30

#### 【0059】

本明細書に開示する改変体B7-DCポリペプチドは、対応する野生型B7-DCポリペプチドの結合親和性と比較して、PD-1に対する低下した結合親和性を有する。改変体の結合親和性は、対応する野生型ポリペプチドの結合親和性と比較して、少なくとも50%、55%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、99%または99%超低下している。

#### 【0060】

2分子間の結合親和性を測定する方法は、当技術分野で周知である。PD-1に対するB7-DC改変体ポリペプチドの結合親和性を測定する方法には、それだけに限らないが、蛍光活性化細胞分取(FACS)、表面プラズモン共鳴、蛍光異方性、アフィニティークロマトグラフィーおよび親和性選択質量分析が挙げられる。

40

#### 【0061】

それに加え、PD-1に対する低下した結合親和性を有する、開示の改変体B7-DCポリペプチドは、実質的な共刺激活性を保持する。例えば、改変体B7-DCポリペプチドは、対応する野生型B7-DCポリペプチドが示す共刺激活性レベルの少なくとも20%、25%、30%、40%、50%、60%、75%、90%、100%または100%超を有することができる。

#### 【0062】

T細胞の共刺激性を測定する方法は、当技術分野で周知であり、T細胞の増殖、ならびに、それだけに限らないが、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、I

50

L-13およびIFN- $\gamma$ を含む、サイトカインの分泌の測定を包含する。T細胞の増殖は、それだけに限らないが、細胞計数、標識ヌクレオチド（ $[^3\text{H}]$  TdRおよびBrdUなど）の取込みによるDNA合成の測定、およびテトラゾリウム塩を用いた代謝活性の測定を含む、多くの方法により測定することができる。サイトカインの分泌を測定する方法には、それだけに限らないが、ELISAが挙げられる。

#### 【0063】

##### 3. 改変体B7-DCポリペプチドの断片

本明細書に開示するB7-DCポリペプチドは、全長ポリペプチドでもよく、または全長B7-DCポリペプチドの断片でもよい。本明細書で使用する場合、B7-DCの断片とは、全長タンパク質中のより短いポリペプチドである、該ポリペプチドの任意のサブセットを指す。

10

#### 【0064】

一実施形態では、改変体B7-DCポリペプチドの断片は、T細胞を共刺激する能力を保持する断片である。全長B7-DCの断片である改変体B7-DCポリペプチドは、全長改変体B7-DCポリペプチドの共刺激活性の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、100%または100%超さえを有している。

#### 【0065】

ヒトおよびマウスのB7-DCタンパク質は、短い細胞質内ドメイン、単一の膜貫通型ドメインおよび細胞外ドメインを含有する。細胞外ドメインは、2つのIgドメイン、即ち膜近位IgCドメインおよび膜遠位IgVドメインを含有する。改変体B7-DCポリペプチドの有用な断片は、可溶性断片を包含する。可溶性B7-DC断片は、産生細胞から流出し、分泌し、またはそうでなければ抽出し得る、B7-DCの断片である。一実施形態では、改変体B7-DCポリペプチドの断片は、B7-DCの全細胞外ドメインを含む。B7-DCの細胞外ドメインは、マウスもしくはヒトB7-DCまたはその共刺激性断片の約26個から約226個までのアミノ酸を含む。別の実施形態では、改変体B7-DCポリペプチドの断片は、B7-DCのIgCおよびIgVドメインを含む。別の実施形態では、改変体B7-DCポリペプチドの断片は、B7-DCのIgVドメインを含む。

20

#### 【0066】

一実施形態では、改変体B7-DCポリペプチドの断片は、PD-1に対する結合親和性にとって重要なポリペプチド領域を含有し得る。こうしたポリペプチド断片は、PD-1に結合するために競合し、天然のB7-DCのPD-1との結合を防止するのに、有用となり得る。PD-1との結合のために競合することによって、こうした断片は、B7-H1およびB7-DCのPD-1との相互作用の阻害が、そうでない場合には起こる免疫応答の抑制も阻害し得るので、免疫応答の増強に有用となり得る。PD-1に競合的に結合し得る、マウスまたはヒトB7-DCのポリペプチド断片は、例えば、67~71位、101~105位または111~113位のアミノ酸を含有することができる。B7-DCのPD-1との結合は、該断片の非存在下でのB7-DCのPD-1との結合レベルに比較して、通常、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%または95%超、阻害される。

30

40

#### 【0067】

##### 4. 改変された改変体B7-DCポリペプチド

改変体B7-DCポリペプチドは、正常な細胞環境においてポリペプチド中に存在し得る化学成分による改変、例えば、リン酸化、メチル化、アミド化、硫酸化、アシル化、グリコシル化、スモイル化（sumoylation）およびユビキチル化を受け得る。改変体B7-DCポリペプチドは、それだけに限らないが、放射性同位体および蛍光化合物を含め、直接的または間接的のいずれかで検出可能シグナルを供与できる標識でも改変し得る。

#### 【0068】

50

改変体 B 7-D C ポリペプチドは、細胞環境においてはポリペプチドに通常付加されない化学成分によっても改変し得る。このような改変物は、選択された側鎖または末端残基と反応できる有機誘導体化剤と、該ポリペプチドの標的アミノ酸残基を反応させることにより、その分子中に導入し得る。別の改変は、該タンパク質の環化である。

#### 【0069】

ポリペプチドの化学的誘導体の例には、コハク酸または他のカルボン酸の無水物で誘導体化したりシニル残基およびアミノ末端残基が含まれる。環状カルボン酸無水物による誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆転させる効果を有する。アミノ含有残基を誘導体化する適切な他の試薬には、メチルピコリニミデートなどのイミドエステル、ピリドキサルリン酸、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソウレア、2, 4-ペンタンジオン、およびグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応が挙げられる。カルボキシル側鎖基のアスパルチルまたはグルタミルは、カルボジイミド ( $R-N=C=N-R'$ ) (1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4, 4-ジメチルペンチル)カルボジイミドなど) との反応により、選択的に改変し得る。さらに、アスパルチルおよびグルタミル残基は、アンモニアとの反応により、アスパラギンおよびグルタミン残基に変換することができる。ポリペプチドは、1個または複数の L-アミノ酸に代わって置換される、1個または複数の D-アミノ酸も含み得る。

#### 【0070】

##### 5. 改変体 B 7-D C 融合ポリペプチド

本明細書で開示する改変体 B 7-D C ポリペプチドは、他のポリペプチドと連結して融合タンパク質を形成し得る。変異体 B 7-D C タンパク質の全てもしくは一部を含む第1の融合相手が、(i) 第2のポリペプチドに直接融合している、または(ii) 場合により、第2のポリペプチドに融合したリンカーペプチド配列に融合している、変異体 B 7-D C 融合ポリペプチドが提供される。該融合相手の存在は、改変体 B 7-D C ポリペプチドの溶解性、親和性および/または数価を変えることができる。本明細書で使用する場合、「数価」とは、1分子当たり利用可能な結合部位の数を指す。本明細書に記載の改変体 B 7-D C 融合タンパク質は、上記したようなアミノ酸変化(即ち、置換、欠失もしくは挿入)、B 7-D C の断片、および/または改変の任意の組合せを包含する。一実施形態では、改変体 B 7-D C 融合タンパク質は、第1の結合相手として、B 7-D C タンパク質の細胞外ドメイン、またはその共刺激性断片を含む。別の実施形態では、改変体 B 7-D C 融合タンパク質は、第1の結合相手として、B 7-D C タンパク質の Ig V および Ig C ドメインを含む。別の実施形態では、改変体 B 7-D C 融合タンパク質は、第1の結合相手として、B 7-D C タンパク質の Ig V ドメインを含む。

#### 【0071】

第2のポリペプチド結合相手は、改変体 B 7-D C ポリペプチドに対して N 末端側または C 末端側にあってもよい。好ましい実施形態では、第2のポリペプチドは、改変体 B 7-D C ポリペプチドに対して C 末端側にある。

#### 【0072】

融合タンパク質の結合相手として常套的に使用される多数のポリペプチド配列が、当技術分野で周知である。有用なポリペプチド結合相手の例には、それだけに限らないが、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、ポリヒスチジン、myc、ヘマグルチニン (hemagglutinin)、Flag (商標) タグ (Kodak、New Haven、CT)、マルトース E 結合タンパク質およびプロテイン A が挙げられる。一実施形態では、改変体 B 7-D C 融合タンパク質は、ヒト免疫グロブリン C $\gamma$ 1 鎖のヒンジ、C $H_2$  および C $H_3$  領域に対応するアミノ酸配列を好ましくは有する、Ig 重鎖定常領域の1つまたは複数のドメインに融合している。

#### 【0073】

##### B. 単離核酸分子

改変体 B 7-D C ポリペプチドをコードする単離核酸配列が、本明細書で開示される。

本明細書で使用する場合、「単離核酸」とは、哺乳類ゲノム中で当該核酸の片側または両側に通常は隣接している核酸（例えば、非 B 7-D C タンパク質をコードする核酸）を含む、哺乳類ゲノム中に存在する他の核酸分子から分離されている核酸を指す。核酸に関して本明細書で使用する場合の「単離された」という用語は、任意の非天然核酸配列も包含するが、その理由は、このような非天然配列が、天然には見出されず、天然に存在するゲノム中には直接隣接配列を有していないからである。

#### 【0074】

単離核酸分子は、例えば DNA 分子でもよいが、但し、天然に存在するゲノム中でその DNA 分子に直接隣接して通常見出される核酸配列の一方が、除去されているか存在しないことを条件とする。したがって、単離核酸分子には、限定することなく、他の配列から独立した個別分子として存在する DNA 分子（例えば、化学合成核酸、または PCR もしくは制限エンドヌクレアーゼ処理で生成する cDNA もしくはゲノム DNA 断片）、ならびにベクター、自己複製プラスミド、ウイルス（例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルスもしくはヘルペスウイルス）中に、または原核生物もしくは真核生物のゲノム DNA 中に組み込まれる組換え DNA も含まれる。それに加え、単離核酸には、ハイブリッドまたは融合核酸の一部である組換え DNA 分子などの操作された核酸も含むことができる。数百から数百万の他の核酸中、例えば、cDNA ライブラリーもしくはゲノムライブラリー、またはゲノム DNA 制限酵素消化物を含むゲルスライス内に存在する核酸は、単離核酸と見なされない。

#### 【0075】

核酸は、センスもしくはアンチセンス配向を取ることでもでき、または B 7-D C ポリペプチドをコードする基準配列に相補的になることもできる。基準配列には、例えば、図 1 に提示したアミノ酸配列（配列番号 1）を有する全長未成熟 B 7-D C をコードする、図 3 に提示のヒト B 7-D C のヌクレオチド配列（配列番号 3）、および図 2 に提示したアミノ酸配列（配列番号 2）を有する全長未成熟 B 7-D C をコードする、図 4 に提示のマウス B 7-D C のヌクレオチド配列（配列番号 4）が含まれる。

#### 【0076】

核酸は、DNA、RNA または核酸類縁体でもよい。核酸類縁体は、塩基部、糖部またはリン酸塩骨格において改変することができる。このような改変は、例えば、その核酸の安定性、ハイブリッド形成または溶解性を改善することができる。塩基部における改変は、デオキシチミジンに対するデオキシウリジン、およびデオキシシチジンに対する 5-メチル-2'-デオキシシチジンまたは 5-ブromo-2'-デオキシシチジンを包含することができる。糖部の改変は、リボース糖の 2'-ヒドロキシの改変による 2'-O-メチル糖または 2'-O-アシル糖の形成を包含することができる。デオキシリボースリン酸塩骨格は、各塩基部が 6 員モルホリノ環に連結しているモルホリノ核酸、またはデオキシリン酸塩骨格が偽ペプチド骨格に置き換えられ、4 種の塩基は保持されているペプチド核酸を生成するように、改変することができる。例えば、Summertown and Weller (1997 年) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7 巻、187~195 頁および Hyrupら (1996 年) Bioorganic Med. Chem. 4 巻、5~23 頁を参照されたい。それに加え、デオキシリン酸塩骨格は、例えば、ホスホロチオエートもしくはホスホロジチオエート骨格、ホスホラミダイト、またはアルキルホスホトリエステル骨格で置き換えることができる。

#### 【0077】

##### C. ベクターおよび宿主細胞

上記のような核酸は、細胞中で発現させるためにベクター中に挿入することができる。本明細書で使用する場合、「ベクター」とは、別の DNA セグメントを挿入することにより、挿入セグメントの複製を起こし得る、プラスミド、ファージまたはコスミドなどのレプリコンである。ベクターは、発現ベクターでもよい。「発現ベクター」とは、1 つまたは複数の発現制御配列を含むベクターであり、「発現制御配列」とは、別の DNA 配列の転写および／または翻訳を制御し、調節する DNA 配列である。

## 【0078】

ベクター中の核酸は、1つまたは複数の発現制御配列に作動可能に連結することができる。本明細書で使用する場合、「作動可能に連結された」とは、発現制御配列が、対象コード配列の発現を有効に制御するように、遺伝子構築体中に組み込まれていることを意味する。発現制御配列の例には、プロモーター、エンハンサーおよび転写終結領域が挙げられる。プロモーターは、転写が開始する点の上流にある（一般に、RNAポリメラーゼIの開始部位近傍）、通常ヌクレオチド100個以内のDNA分子の領域で構成された発現制御配列である。コード配列をプロモーターの制御下に置くためには、当該ポリペプチドの翻訳リーディングフレームの翻訳開始部位を、プロモーターから下流のヌクレオチド1個と約50個の間に配置することが必要である。エンハンサーは、時間、位置およびレベルによって発現特異性をもたらす。プロモーターと異なり、エンハンサーは、転写部位から様々な距離に位置するときに機能することができる。エンハンサーは、転写開始部位から下流に位置することもできる。コード配列は、RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写できるとき、細胞中で「作動可能に連結され」、発現制御配列の「制御下」にあり、その後mRNAは、コード配列がコードするタンパク質に翻訳することができる。

10

## 【0079】

適切な発現ベクターには、限定することなく、プラスミド、ならびに例えば、バクテリオファージ、バキュロウイルス、タバコモザイクウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスから誘導されるウイルスベクターが挙げられる。多数のベクターおよび発現系が、Novagen (Madison, WI)、Clontech (Palo Alto, CA)、Stratagene (La Jolla, CA) および Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA) などの企業から市販されている。

20

## 【0080】

発現ベクターはタグ配列を含むことができる。タグ配列は、コードされるポリペプチドとの融合体として通常発現される。このようなタグは、カルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかの位置を含め、ポリペプチド内の任意の箇所に挿入することができる。有用なタグの例には、それだけに限らないが、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、ポリヒスチジン、c-myc、ヘマグルチニン、Flag (商標) タグ (Kodak, New Haven, CT)、マルトースE結合タンパク質およびプロテインAが挙げられる。一実施形態では、改変体B7-DC融合タンパク質は、ヒト免疫グロブリンCγ1鎖のヒンジ、CH<sub>2</sub> および CH<sub>3</sub> 領域に対応するアミノ酸配列を好ましくは有する、Ig重鎖定常領域の1つまたは複数のドメインをコードする核酸を含有するベクター中に存在している。

30

## 【0081】

発現させようとする核酸 (nucleic acid) を含有するベクターは、宿主細胞中に移入することができる。用語「宿主細胞」とは、組換え発現ベクターを導入できる原核性および真核性の細胞を包含することを意図している。本明細書で使用する場合、「形質転換された」および「トランスフェクトされた」とは、多くの技法の1つによって、細胞中に核酸分子 (例えば、ベクター) を導入することを包含する。特定の技法に限定されないが、多数のこうした技法が当技術分野内で十分に確立されている。原核細胞は、例えば、エレクトロポレーションまたは塩化カルシウム媒介形質転換により、核酸で形質転換することができる。核酸は、哺乳類細胞中に、例えば、リン酸カルシウム共沈、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーションまたはマイクロインジェクションを含む技法によって、トランスフェクトすることができる。宿主細胞 (例えば、原核細胞またはCHO細胞などの真核細胞) は、本明細書に記載の改変体B7-DCポリペプチドを産生するために、使用することができる。いくつかの実施形態では、宿主細胞 (例えば、抗原提示細胞) は、本明細書に開示する改変体B7-

40

50

DCポリペプチドを発現して、T細胞に提示するために、使用することができる。

#### 【0082】

##### D. 抗体

モノクローナル抗体 (mAb) ならびにその生成および使用の方法は、Kohler and Milstein、Nature 256巻、495～497頁 (1975年) ; 米国特許第4376110号 ; Hartlow, Eら、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N. Y.、1988年) ; Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses、Plenum Press、New York、N. Y. (1980年) ; H. Zolaら、Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications内、CRC Press、1982年) に記載されている。

10

#### 【0083】

免疫アッセイ法は、Coligan, J. E. ら編、Current Protocols in Immunology、Wiley-Interscience、New York 1991年 (または現行版) ; Butt, W. R. (編) Practical Immunoassay: The State of the Art、Dekker、N. Y.、1984年 ; Bizollon, Ch. A. 編、Monoclonal Antibodies and New Trends in Immunoassay、Elsevier、N. Y.、1984年 ; Butler, J. E.、ELISA (29章)、van Oss, C. J. ら (編)、IMMUNOCHEMISTRY内、Marcel Dekker, Inc.、New York、1994年、759～803頁 ; Butler, J. E. (編)、Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay、CRC Press、Boca Raton、1991年 ; Weintraub, B.、Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques、The Endocrine Society、1986年3月 ; Work, T. S. ら、Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology、North Holland Publishing Company、NY、(1978年) (Chard, T. による章、「An Introduction to Radioimmune Assay and Related Techniques」) に記載されている。

20

30

#### 【0084】

抗イデオタイプ抗体は、例えば、Idiotypy in Biology and Medicine、Academic Press、New York 1984年 ; Immunological Reviews 79巻、1984年 ; Immunological Reviews 90巻、1986年 ; Curr. Top. Microbiol., Immunol. 119巻、1985年 ; Bona, C. ら、CRC Crit. Rev. Immunol.、33～81頁 (1981年) ; Jerne, N K、Ann. Immunol. 125C巻、373～389頁 (1974年) ; Jerne, N K、Idiotypes—Antigens on the Inside内、Westen-Schnurr, I. 編、Editiones Roche、Basel、1982年 ; Urbain, J. ら、Ann. Immunol. 133D巻、179頁～ (1982年) ; Rajewsky, K. ら、Ann. Rev. Immunol. 1巻、569～607頁 (1983年) に記載されている。

40

#### 【0085】

既知のB7ファミリータンパク質には存在しないB7-DCの新規エピトープと反応性

50

のある、モノクローナルおよびポリクローナル抗体が、本明細書に記載されている。該抗体は、異種、同種、同系、またはヒト化もしくはキメラ抗体などのそれらの改変体でもよい。抗B7-D C抗体のイディオタイプに特異的な抗イディオタイプ抗体も、含まれている。用語「抗体」とは、抗原結合部位を含み、B7-D Cエピトープに結合できる、無傷な分子ならびにその断片の双方を包含することを意図している。こうしたものには、無傷な抗体のFc断片を欠き、循環血中からより迅速に消失し、無傷抗体より低い非特異的組織結合性を有し得る、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片が含まれる(Wahlら、J. Nuc. Med. 24巻、316～325頁(1983年))。Fv断片も含まれる(Hochman, J.ら(1973年) Biochemistry 12巻、1130～1135頁; Sharon, J.ら(1976年) Biochemistry 15巻、1591～1594頁)。こうした各種の断片は、プロテアーゼ切断または化学切断などの従来技法を用いて生成される(例えば、Rousseauxら、Meth. Enzymol.、121巻、663～69頁(1986年)を参照されたい)。

10

#### 【0086】

ポリクローナル抗体は、ウサギ、ヤギ、げっ歯類などの免疫動物の血清として得られ、さらなる処理をせずに直接使用し得る、または硫酸アンモニウム沈殿、イオン交換クロマトグラフィーおよびアフィニティクロマトグラフィーなどの従来からの富化もしくは精製方法を受け得る。

#### 【0087】

免疫原は、完全なB7-D Cタンパク質、またはその断片もしくはその誘導体を含み得る。好ましい免疫原は、ヒトB7-D Cの細胞外ドメイン(ECD)の全部または一部であって、これらの残基が、天然B7-D C上に見出される、グリコシル化などの翻訳後改変を含有するものを含む。細胞外ドメインを含む免疫原は、当技術分野で公知の多様な方法、例えば、従来の組換え法を用いたクローン化遺伝子の発現、起源細胞、多量のB7-D Cを発現する細胞集団などからの単離で生成される。

20

#### 【0088】

モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein(Nature、256巻、495～97頁(1975年))により紹介された手順、およびその改変法(上記参考文献を参照されたい)などの従来式ハイブリドーマ技術を用いて生成し得る。動物、好ましくはマウスに、上記のような免疫原を用いた免疫付与により、プライム化することによって、プライム化したその動物中に所望の抗体応答を誘発させる。プライム化を受けた動物のリンパ節、脾臓または末梢血のBリンパ球は、一般に、ポリエチレングリコール(PEG)などの融合促進剤の存在下、骨髓腫細胞と融合される。多くのマウス骨髓腫細胞系、即ちP3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-k0Ag8.653、Sp2/0-Ag14またはHL1-653骨髓腫系(ATCC、Rockville、Md.から入手可能)のいずれでも、このような使用に利用できる。その後のステップには、未融合の骨髓腫親細胞およびドナーリンパ球細胞が結局は死滅する一方、ハイブリドーマ細胞だけが生き残るような選択培地中での増殖が含まれる。こうしたハイブリドーマ細胞をクローニングし、増殖させ、その上清を、例えば、B7-D C融合タンパク質を用いた免疫アッセイ法により、所望の特異性がある抗体の有無についてスクリーニングする。陽性クローンは、例えば限界希釈によりサブクローニングし、モノクローナル抗体を単離する。

30

40

#### 【0089】

こうした方法に従って生成したハイブリドーマは、当技術分野で公知の技法(全般的には、Finkら、Prog. Clin. Pathol.、9巻、121～33頁(1984年)を参照されたい)を用いて、インビトロまたはインビボ(腹水中)で増殖させることができる。一般に、個々の細胞系は、培養で増殖させ、単一のモノクローナル抗体を高濃度に含有する培地を、デカンテーション、ろ過または遠心により採集することができる。

#### 【0090】

50

該抗体は、通常の多量体構造の代わりに、1本鎖抗体またはs c F vとして産生し得る。1本鎖抗体は、対象I g由来の超可変領域を含み、無傷I gのサイズの一部でありながら、その元のI gの抗原結合部位を再現する（S k e r r a, A. ら（1988年）S c i e n c e、240巻、1038～1041頁；P l u c k t h u n, A. ら（1989年）M e t h o d s E n z y m o l. 178巻、497～515頁；W i n t e r, G. ら、（1991年）N a t u r e、349巻、293～299頁）。好ましい実施形態では、該抗体は、従来の分子生物学技法を用いて産生される。

#### 【0091】

##### E. 免疫原組成物

ワクチンは、癌細胞および感染細胞を消滅させるために、強いT細胞応答を必要とする。本明細書に記載の改変B7-D C改変体（複数）は、ワクチンの成分として投与することにより、T細胞に共刺激性シグナルを与えることができる。本明細書に開示するワクチンには、抗原、改変体B7-D Cポリペプチド源、ならびに場合によりアジュバントおよび標的指向分子が含まれる。改変体B7-D Cポリペプチド源には、任意の改変体B7-D Cポリペプチド、改変体B7-D C融合タンパク質、改変体B7-D Cポリペプチドもしくは改変体B7-D C融合タンパク質をコードする核酸、またはB7-D Cポリペプチドもしくは改変体B7-D C融合タンパク質を発現するベクターを含有する宿主細胞が挙げられる。

#### 【0092】

##### 1. 抗原

抗原は、ペプチド、タンパク質、多糖類、糖類、脂質、核酸またはそれらの組合せでもよい。抗原は、ウイルス、細菌、寄生生物、植物、原虫、真菌、組織、または癌もしくは白血病細胞などの形質転換細胞に由来することができ、細胞全体、またはその免疫原成分、例えば、細胞壁成分もしくはその分子成分でもよい。

#### 【0093】

適切な抗原は、当技術分野で公知であり、商業的な政府および科学機関から入手できる。一実施形態では、抗原は、不活化または弱毒化した有機体全体である。こうした有機体は、ウイルス、寄生生物および細菌などの感染性有機体の場合もある。こうした有機体はまた、腫瘍細胞の場合もある。該抗原は、腫瘍またはウイルスもしくは細菌の源に由来する、精製または部分精製ポリペプチドのこともある。該抗原は、異種発現系中でポリペプチド抗原をコードするDNAの発現により、産生される組換えポリペプチドでもよい。該抗原は、抗原タンパク質の全部または一部をコードするDNAでもよい。該DNAは、プラスミドDNAなどのベクターDNAの形態を取り得る。

#### 【0094】

抗原は、単一抗原として供与されてもよく、または組合せで供与されてもよい。抗原はまた、ポリペプチドまたは核酸の複合混合物として供与されてもよい。

#### 【0095】

##### i. ウイルス抗原

ウイルス抗原は、それだけに限らないが、以下のウイルス科のいずれかからのウイルスを含む、任意のウイルスから単離することができる。即ち、A r e n a v i r i d a e、A r t e r i v i r u s、A s t r o v i r i d a e、B a c u l o v i r i d a e、B a d n a v i r u s、B a r n a v i r i d a e、B i r n a v i r i d a e、B r o m o v i r i d a e、B u n y a v i r i d a e、C a l i c i v i r i d a e、C a p i l l o v i r u s、C a r l a v i r u s、C a u l i m o v i r u s、C i r c o v i r i d a e、C l o s t e r o v i r u s、C o m o v i r i d a e、C o r o n a v i r i d a e（例えば、重症急性呼吸器症候群（SARS）ウイルスなどのC o r o n a v i r u s）、C o r t i c o v i r i d a e、C y s t o v i r i d a e、D e l t a v i r u s、D i a n t h o v i r u s、E n a m o v i r u s、F i l o v i r i d a e（例えば、マールブルグウイルスおよびエボラウイルス（例えば、ザイール、レストン、象牙海岸またはスーダン株））、F l a v i v i r i d a e（例えば、C型肝炎ウイルス

10

20

30

40

50

、1型デング熱ウイルス、2型デング熱ウイルス、3型デング熱ウイルスおよび4型デング熱ウイルス)、Hepadnaviridae、Herpesviridae (例えば、1型、3型、4型、5型および6型ヒトヘルペスウイルス、ならびにサイトメガロウイルス)、Hypoviridae、Iridoviridae、Leviviridae、Lipothrixviridae、Microviridae、Orthomyxoviridae (例えば、A型、B型およびC型インフルエンザウイルス)、Papovaviridae、Paramyxoviridae (例えば、麻疹、ムンプスおよびヒト呼吸器合胞体ウイルス)、Parvoviridae、Picornaviridae (例えば、ポリオウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルスおよびアフトウイルス)、Poxviridae (例えば、ワクシニアおよび天然痘ウイルス)、Reoviridae (例えば、ロタウイルス)、Retroviridae (例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV) 1型およびHIV 2型などのレンチウイルス)、Rhabdoviridae (例えば、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルスなど)、Togaviridae (例えば、風疹ウイルス、デング熱ウイルスなど)、ならびにTotiviridaeである。適切なウイルス抗原には、デング熱プロテインM、デング熱プロテインE、デング熱D1NS1、デング熱D1NS2およびデング熱D1NS3の全部または一部も含まれる。

#### 【0096】

ウイルス抗原は、パピローマウイルス、ヘルペスウイルス、即ち1型および2型単純疱疹、肝炎ウイルス、例えばA型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、D型デルタ肝炎ウイルス(HDV)、E型肝炎ウイルス(HEV)およびG型肝炎ウイルス(HGV)、ダニ媒介性脳炎ウイルス、パラインフルエンザ、水疱帯状疱疹、サイトメガロウイルス(cytomegalovirus)、エプスタインバー、ロタウイルス、ライノウイルス、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、馬脳炎、日本脳炎、黄熱病、リフトバレー熱、およびリンパ球性脈絡髄膜炎などの特定株に由来し得る。

#### 【0097】

##### ii. 細菌抗原

細菌抗原は、それだけに限らないが、Actinomyces、Anabaena、Bacillus、Bacteroides、Bdellovibrio、Bordetella、Borrelia、Campylobacter、Caulobacter、Chlamydia、Chlorobium、Chromatium、Clostridium、Corynebacterium、Cytophaga、Deinococcus、Escherichia、Francisella、Halobacterium、Helicobacter、Haemophilus、Hemophilus influenza type B(HIB)、Hyphomicrobium、Legionella、Leptospiriosis、Listeria、Meningococcus A、BおよびC、Methanobacterium、Micrococcus、Mycobacterium、Mycoplasma、Myxococcus、Neisseria、Nitrobacter、Oscillatoria、Prochloron、Protus、Pseudomonas、Phodospirillum、Rickettsia、Salmonella、Shigella、Spirillum、Spirochaeta、Staphylococcus、Streptococcus、Streptomyces、Sulfolobus、Thermoplasma、Thiobacillus、ならびにTreponema、VibrioおよびYersiniaを含む任意の細菌に由来することができる。

#### 【0098】

##### iii. 寄生生物抗原

寄生生物抗原は、それだけに限らないが、Cryptococcus neoformans、Histoplasma capsulatum、Candida albic

ans、Candida tropicalis、Nocardia asteroides、Rickettsia rickettsii、Rickettsia typhi、Mycoplasma pneumoniae、Chlamydial psittaci、Chlamydial trachomatis、Plasmodium falciparum、Trypanosoma brucei、Entamoeba histolytica、Toxoplasma gondii、Trichomonas vaginalisおよびSchistosoma mansoni由来の抗原など、寄生生物から得ることができる。こうした抗原には、スポロゾイト周囲タンパク、スポロゾイト表面タンパク、肝臓ステージ（liver stage）抗原、頂端膜付随タンパクまたはメロゾイト表面タンパクの全部または一部などの胞子虫抗原、プラスモジウム抗原が含まれる。

10

#### 【0099】

##### iv. アレルゲンおよび環境抗原

該抗原は、アレルゲンまたは環境抗原、それだけに限らないが、花粉アレルゲン（木、薬草、海草および草の花粉アレルゲン）、昆虫アレルゲン（吸入物、唾液および毒液のアレルゲン）、毛およびふけの動物アレルゲン、ならびに食物アレルゲンなどの天然に存在するアレルゲンに由来する抗原などでもよい。木、草および薬草の重要な花粉アレルゲンは、即ちカバノ木（Betula）、ハンノ木（Alnus）、ハシバミ（Corylus）、シデ（Carpinus）およびオリーブ（Olea）、シーダー（CryptomeriaおよびJuniperus）、プラタナス（Platanus）を含む、Fagales、Oleales、Pinalesおよびplatanaceaeの分類学の目、即ちLolium、Phleum、Poa、Cynodon、Dactylis、Holcus、Phalaris、SecaleおよびSorghum各属の草を含むPoales目、即ちAmbrosia属、Artemisia属およびParietaria属の薬草を含むAsterales目およびUrticales目に由来する。使用し得る他のアレルゲン抗原には、Dermatophagoides属およびEuroglyphus属のイエダニ、貯蔵ダニ、例えばLepidoglyphys、GlycypagusおよびTyrophagusのアレルゲン、ゴキブリ、ミジおよびノミ、例えばBlattella、Periplaneta、ChironomusおよびCtenocephalidesのアレルゲン、ネコ、イヌおよびウマなどの哺乳類、鳥類のアレルゲン、ハチ（bee）（Apidae超科）、ハチ（wasp）（Vespidae超科）およびアリ（Formicoidae超科）を含む分類学のHymenoptera目のアレルゲンなどの針刺しまたは咬み付き昆虫由来のものを含む毒液アレルゲンが含まれる。使用し得るさらに他のアレルゲン抗原には、Alternaria属およびCladosporium属などの真菌の吸入アレルゲンが含まれる。

20

30

#### 【0100】

##### v. 腫瘍抗原

該抗原は、腫瘍抗原でもよく、それには、それだけに限らないが、 $\alpha$ -アクチニン-4、Bcr-Abl融合タンパク質、Casp-8、 $\beta$ -カテニン、cdc27、cdk4、cdkn2a、coa-1、dek-can融合タンパク質、EF2、ETV6-AML1融合タンパク質、LDLR-フコシルトランスフェラーゼAS融合タンパク質、HLA-A2、HLA-A11、hsp70-2、KIAA0205、Mart2、Mum-1、2および3、neo-PAP、ミオシンクラスI、OS-9、pml-RAR $\alpha$ 融合タンパク質、PTPRK、K-ras、N-ras、トリオースホスフェートイソメラーゼ（isomerase）、Bage-1、Gage3、4、5、6、7、GnTV、Herv-K-mel、Lage-1、Mage-A1、2、3、4、6、10、12、Mage-C2、NA-88、NY-Eso-1/Lage-2、SP17、SSX-2、およびTRP2-Int2、MelanA（MART-1）、gp100（Pmel17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15（58）、CEA、RAGE、NY-ESO（LA

40

50

GE)、SCP-1、Hom/Mel-40、PRAME、p53、H-Ras、HER-2/neu、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、エプスタインバーウイルス抗原、EBNA、ヒトパピローマウイルス(HPV)抗原E6およびE7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA19-9、CA72-4、CAM17.1、NuMa、K-ras、 $\beta$ -カテニン、CDK4、Mum-1、p16、TAGE、PSMA、PSCA、CT7、テロメラゼ、43-9F、5T4、791Tgp72、 $\alpha$ -フェトプロテイン、13HCG、BCA225、BTAA、CA125、CA15-3(CA27.29\BCAA)、CA195、CA242、CA-50、CAM43、CD68\KP1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733(EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB\70K、NY-CO-1、RCA S1、SDCCAG16、TA-90(Mac-2結合タンパク質\シクロフィリンC付随タンパク質)、TAAL6、TAG72、TLPおよびTPSなどの腫瘍関連抗原または腫瘍特異抗原が含まれる。

#### 【0101】

##### 2. 標的指向分子

抗原提示細胞の主要型(B細胞、マクロファージおよび樹状細胞(DC))のうち、DCは、最も効力があり、全ての抗原特異的免疫応答の開始を担っている。したがって、DCを標的にすることは、抗原の送達および抗原の応答を増強する機会をもたらす。

#### 【0102】

樹状細胞は、結合抗原のエンドサイトーシスを媒介できるいくつかの細胞表面受容体を発現する。全身に分布する抗原提示細胞上の取込み作用性表面分子を外因性抗原の標的とすることにより、抗原の取込みが促進され、したがって免疫付与、即ちワクチン接種における主要な律速段階が克服される。

#### 【0103】

樹状細胞標的化分子には、樹状細胞の表面上に示されるエピトープを認識し、それに結合するモノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはそれらの断片が挙げられる。樹状細胞標的化分子には、樹状細胞上の細胞表面受容体に結合するリガンドも挙げられる。このような一受容体のレクチンDEC-205は、体液性(抗体に依拠)および細胞性(CD8<sup>+</sup>T細胞)応答の双方を2~4桁引き上げるために、インビトロおよびマウス中で使用されてきた(Hawigerら、J. Exp. Med.、1994巻(6号)、769~79頁(2001年); Bonifazら、J. Exp. Med.、1996巻(12号)、1627~38頁(2002年); Bonifazら、J. Exp. Med.、1999巻(6号)、815~24頁(2004年))。これらの実験では、抗原が抗DEC205重鎖に融合され、組換え抗体分子が、免疫付与に使用された。

#### 【0104】

マンノース特異的レクチン(マンノース受容体)およびIgG Fc受容体を含む、各種の他のエンドサイトーシス性受容体も、このように標的とされ、抗原提示効率を同様に増強してきた。標的にし得る他の適切な受容体には、それだけに限らないが、DC-SIGN、33D1、SIGLEC-H、DCIR、CD11c、熱ショックタンパク受容体およびスカベンジャー受容体が挙げられる。

#### 【0105】

標的にし得る他の受容体には、tol様受容体(TLR)が含まれる。TLRは、病原体関連分子パターン(PAMP)を認識し、それに結合する。PAMPは、樹状細胞の表面上でTLRを、および内部でシグナルを標的とすることにより、DCの抗原取込み、成熟化およびT細胞刺激能を潜在的に高める。粒子表面に結合され、または共封入されるPAMPには、非メチル化CpG DNA(細菌性)、2本鎖RNA(ウイルス性)、リポ多糖(細菌性)、ペプチドグリカン(細菌性)、リポアラビノマンニン(細菌性)、ザイモサン(酵母)、MALP-2などのマイコプラズマリポタンパク質(細菌性)、フラ

ゲリン（細菌性）、ポリ（イノシンーシチジル）酸（細菌性）、リボテイコ酸（細菌性）またはイミダゾキノリン（合成）が挙げられる。

#### 【0106】

##### 3. アジュバント

場合により、本明細書に記載のワクチンは、アジュバントを含んでもよい。アジュバントは、それだけに限らないが、以下の1種または複数でもよい。即ち、オイル乳濁液（例えば、フロイントのアジュバント）、サポニン製剤、ウィロソームおよびウイルス様粒子、細菌および微生物誘導体、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、ADPリボシル化毒素および解毒誘導体、ミョウバン、BCG、無機物含有組成物（例えば、アルミニウム塩およびカルシウム塩、水酸化物、リン酸塩、硫酸塩などの無機塩）、生体接着剤および／または粘液性接着剤、微粒子、リポソーム、ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル製剤、ポリホスファゼン、ムラミルペプチド、イミダゾキノロン化合物、ならびに界面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイル乳濁液、キーホールリンペットヘモシニアンおよびジニトロフェノール）である。

10

#### 【0107】

アジュバントには、サイトカイン、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12など）、インターフェロン（例えば、インターフェロン-γ）、マクロファージコロニー刺激因子および腫瘍壊死因子などの免疫調節剤も含み得る。変体B7-DCポリペプチド以外に、B7ファミリーの他のポリペプチドを含む、他の共刺激性分子も投与し得る。このようなタンパク質性アジュバントは、全長ポリペプチドもしくはその活性断片として、またはプラスミドDNAなどのDNAの形態で与えてもよい。

20

#### 【0108】

##### F. 医薬組成物

変体B7-DCポリペプチド、変体B7-DC融合タンパク質、変体B7-DCポリペプチドおよび融合タンパク質をコードする核酸、ならびにそれを含むベクターを含む医薬組成物が、提供される。医薬組成物は、経口、非経口（筋肉内、腹腔内、静脈内（IV）もしくは皮下注射）、経皮（受動的に、またはイオン導入もしくはエレクトロポレーションを用いて）、経粘膜（鼻、膣、直腸もしくは舌下）の投与経路による、または生体侵食可能な（bioerodible）インサートを用いる投与に合わせてもよく、各投与経路のための適当な剤形に処方することができる。好ましい実施形態では、該ペプチドは、特に非経口注射のために水溶液で投与される。一般に、医薬組成物は、変体B7-DCポリペプチド、融合タンパク質もしくはそれらをコードする核酸または誘導体生成物の有効量、ならびに医薬として許容可能な希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、助剤および／または担体を含めて提供される。このような組成物には、様々な緩衝剤内容物（例えば、Tris-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pHおよびイオン強度の希釈剤；界面活性剤ならびに可溶化剤（例えば、Tween 20、Tween 80、Polysorbate 80）などの添加物、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、Thimersol、ベンジルアルコール）および膨張性物質（例えば、ラクトース、マンニトール）；ポリ乳酸、ポリグリコール酸などのポリマー化合物の粒状調製物中、またはリポソーム中へ当該物質を導入したものが含まれる。ヒアルロン酸も使用し得る。このような組成物は、本タンパク質および誘導体の物理的状态、安定性、インビボ放出速度およびインビボ消失速度に影響を及ぼし得る。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、18版（1990年、Mack Publishing Co.、Easton、Pa. 18042）1435～1712頁を参照されたい。該組成物は、液状形態に調製してもよく、または乾燥粉末形態（例えば、凍結乾燥）にしてもよい。

30

40

#### 【0109】

##### 1. 経口送達

50

改変体 B7-D C ポリペプチド、融合タンパク質およびそれらをコードする核酸は、経口送達用に処方することができる。経口固体剤形は、Remington's Pharmaceutical Sciences、18 版 1990 年 (Mack Publishing Co.、Easton Pa. 18042) の 89 章に全般的に記載されている。固体剤形には、錠剤、カプセル、丸薬、トローチもしくはロゼンジ、カシェ、小丸薬、散剤または顆粒剤が含まれる。リポソームまたはプロテイノイド封入も、本組成物を処方するために使用し得る (例えば、米国特許第 4925673 号に報告されているプロテイノイドミクロスフェアとして)。リポソーム封入を使用してもよく、リポソームは、各種ポリマーで誘導体化し得る (例えば、米国特許第 5013556 号)。治療薬に対して可能な固体剤形に関する記載は、Marshall, K. により Modern Pharmaceutics、G. S. Banker and C. T. Rhodes 編 10 章、1979 年中に示されている。一般に、製剤は、胃環境に対する保護および生物活性物質の腸内放出を可能にする、ABC 輸送体リガンド (またはその化学改変体) および不活性成分を含む。

10

#### 【0110】

別の実施形態は、医薬として許容可能な乳濁液、溶液、懸濁液およびシロップを含め、不活性希釈剤；湿潤剤、乳化剤および懸濁剤などの助剤；ならびに甘味剤、香味剤および芳香剤を含む他の成分を含有し得る、経口投与用液体剤形を提供する。

#### 【0111】

ポリペプチド拮抗剤は、その誘導体の経口送達が効果的となるように化学改変をしてもよい。一般に、想定される化学改変は、その成分分子自体への少なくとも 1 つの部分の結合であり、該部分は、(a) タンパク質分解の阻害、および (b) 胃または腸からの血流中への取込みを可能にする。また、その 1 つまたは複数の成分の総合的安定性の増加、および体内循環時間の増加も望ましい。PEG 化は、医薬用途にとって好ましい化学改変である。使用し得る他の部分には、プロピレングリコール、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリプロリン、ポリ-1, 3-ジオキソランおよびポリ-1, 3, 6-チオキソカン (thioxocane) が挙げられる [例えば、Abuchowski and Davis (1981 年) 「Soluble Polymer-Enzyme Adducts」、Enzymes as Drugs 内、Hocenberg and Roberts 編 (Wiley-Interscience: New York, N. Y.) 367~383 頁および Newmark ら (1982 年) J. Appl. Biochem. 4 巻、185~189 頁を参照されたい]。

20

30

#### 【0112】

経口製剤の場合、放出箇所は、胃、小腸 (十二指腸、空腸 (jejunum) もしくは回腸)、または大腸のこともある。当業者は、胃の中では溶解しないが、十二指腸または腸の他箇所では当該物質を放出する製剤を利用できる。好ましくは、その放出は、ペプチド (もしくは誘導体) の保護、または腸内などの胃環境を過ぎた後のペプチド (もしくは誘導体) 放出のいずれかにより、胃環境の悪影響を回避することになる。

#### 【0113】

十分な胃耐性を確実にするために、少なくとも pH 5.0 に対して不透過性のコーティングが必須である。腸溶コーティングとして使用される一般性のより高い不活性成分の例は、セルロースアセテートトリメリテート (CAT)、フタル酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMCP)、HPMCP 50、HPMCP 55、ポリビニルアセテートフタレート (PVAP)、Eudragit L30D、Aquateric、セルロースアセテートフタレート (CAP)、Eudragit L、Eudragit S およびシェラックである。これらのコーティング剤は、混合フィルムとして使用し得る。

40

#### 【0114】

コーティング剤またはコーティング剤の混合物は、胃に対する保護を意図していない錠剤上にも使用することができる。これには、糖衣剤、または錠剤をより飲み込みやすくす

50

るコーティング剤を含むことができる。カプセルは、乾燥治療薬（即ち、粉末）の送達のためのハードシェル（ゼラチンなど）からなることができ、液剤にはソフトゼラチンシェルを使用し得る。カシェのシェル材料は、厚澱粉または他の食べられる紙でもよい。丸薬、ロゼンジ、成形錠剤または粉薬錠剤には、水分集合技法（moist massing technique）を使用することができる。

#### 【0115】

改変体 B7-D C ポリペプチド、改変体 B7-D C 融合タンパク質、またはそれ（もしくは誘導体）をコードする核酸は、粒径約 1 mm の顆粒またはペレット形態の微細な多粒子として、製剤中に含めることができる。当該物質のカプセル投与のための製剤は、散剤、軽度圧縮プラグ、または錠剤にさえもし得る。こうした治療薬は、圧縮成形により調製できる。

10

#### 【0116】

着色剤および／または香味剤も、含めてもよい。例えば、s H 4 拮抗剤（または誘導体）は、製剤化した（リボソームまたはミクロスフェア封入などにより）後、着色剤および香味剤を含んだ清涼飲料などの食品内にさらに含有させてもよい。

#### 【0117】

改変体 B7-D C ポリペプチド、改変体 B7-D C 融合タンパク質、またはそれ（もしくは誘導体）をコードする核酸の容量を、不活性物質で希釈する、または増加させてもよい。こうした希釈剤には、炭水化物、殊にマンニトール、 $\alpha$ -ラクトース、無水ラクトース、セルロース、スクロース、改変デキストランおよび澱粉が挙げられ得る。三リン酸カルシウム、炭酸マグネシウムおよび塩化ナトリウムを含む、ある種の無機塩も、充填剤として使用し得る。いくつかの市販希釈剤は、Fast-Flow、Emdex、STARX 1500、Emcompress および Avicel である。

20

#### 【0118】

治療剤を固体剤形とした製剤中に、崩壊剤を含めてもよい。崩壊剤として使用される物質には、それだけに限らないが、澱粉系の市販崩壊剤 ExploTab を含む澱粉が挙げられる。デンプングリコール酸ナトリウム、Amberlite、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ウルトラミロベクチン、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、オレンジピール、酸性カルボキシメチルセルロース、天然スポンジおよびベントナイトは、全て使用し得る。崩壊剤はまた、不溶性の陽イオン交換樹脂でもよい。粉末状ガムは、崩壊剤および結合剤として使用してもよく、それには、寒天、カラヤまたはトラガカントなどの粉末状ガムを含むことができる。アルギン酸およびそのナトリウム塩も、崩壊剤として有用である。

30

#### 【0119】

改変体 B7-D C ポリペプチド、改変体 B7-D C 融合タンパク質、またはそれ（もしくは誘導体）をコードする核酸を一緒にして、硬い錠剤を形成するために、結合剤を使用してもよく、それには、アカシア、トラガカント、澱粉およびゼラチンなどの天然物由来物質が挙げられる。他の結合剤には、メチルセルロース（MC）、エチルセルロース（EC）およびカルボキシメチルセルロース（CMC）が挙げられる。ポリビニルピロリドン（PVP）およびヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）は共に、アルコール性の溶液中で使用して、該ペプチド（または誘導体）を顆粒化することができる。

40

#### 【0120】

製剤化工程中の粘着を防止するために、s H 4 拮抗剤（または誘導体）の製剤中に、減摩剤を含めてもよい。滑剤は、該ペプチド（または誘導体）と金型壁との間の層として使用してもよく、こうした滑剤には、それだけに限らないが、マグネシウム塩およびカルシウム塩を含むステアリン酸、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、液状パラフィン、植物油およびワックスを挙げることができる。ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウム、各種分子量のポリエチレングリコール、Carbowax 4000 および 6000 などの可溶性滑剤も、使用し得る。

#### 【0121】

50

製剤化中に薬物の流動性を改善して、圧縮成形中の再配列を補助し得る流動促進剤を、添加してもよい。流動促進剤には、澱粉、タルク、焼成シリカおよびシリコアルミン酸塩水和物を含み得る。

#### 【0122】

該ペプチド（または誘導体）の水性環境中への溶解を補助するために、界面活性剤を湿潤剤として添加してもよい。界面活性剤には、ラウリル硫酸ナトリウム、スルホコハク酸ジオクチルナトリウムおよびジオクチルスルホン酸ナトリウムなどの陰イオン界面活性剤を含み得る。陽イオン界面活性剤を使用してもよく、それには、塩化ベンザルコニウムまたは塩化ベンゼトミウム（benzethonium）を含めることができる。界面活性剤として製剤中に含め得る、潜在的な非イオン界面活性剤のリストは、ラウロマクロゴール400、ポリオキシル40ステアレート、ポリオキシエチレン水素化ひまし油10, 50および60、グリセロールモノステアレート、ポリソルベート20, 40, 60, 65および80、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースである。これらの界面活性剤は、該タンパク質または誘導体の製剤中に、単独または様々な比率の混合物として存在することができる。

#### 【0123】

改変体B7-DCポリペプチド、改変体B7-DC融合タンパク質、またはそれ（もしくは誘導体）をコードする核酸の取込みを潜在的に増強する添加剤は、例えば、脂肪酸のオレイン酸、リノール酸およびリノレン酸である。

#### 【0124】

制御放出経口製剤が望ましい場合もある。改変体B7-DCポリペプチド、改変体B7-DC融合タンパク質、またはそれ（もしくは誘導体）をコードする核酸は、拡散、浸出いずれかの機構で放出を可能にする不活性マトリックス、例えばガムの中に導入することができる。徐々に変質するマトリックスも、製剤中に導入し得る。いくつかの腸溶性コーティングも遅延放出効果を有する。別形態の制御放出は、Oros治療システム（Alza Corp.）に基づく方法による。即ち、水が、浸入して、浸透圧作用により単一の小開口部から薬物を押し出すことを可能にする、半透膜中に薬物を内包させる。

#### 【0125】

他のコーティング剤も製剤中に使用し得る。こうしたものには、コーティングパン中で施し得る多様な糖類が含まれる。改変体B7-DCポリペプチド、改変体B7-DC融合タンパク質、またはそれ（もしくは誘導体）をコードする核酸は、フィルムコート錠中にも供与でき、この場合に使用される物質は、2群に分けられる。第1群は、非腸溶性物質であり、これには、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、プロビドンおよびポリエチレングリコールが挙げられる。第2群は、通常フタル酸のエステルである腸溶性物質からなる。

#### 【0126】

最適なフィルムコートを生ずるために、物質の混合物を使用し得る。フィルムコーティングは、パンコーターもしくは流動床中で、または圧縮コーティングにより実施し得る。

#### 【0127】

##### 2. 非経口送達

本発明による非経口製剤には、滅菌した水性または非水性の溶液、懸濁液または乳濁液が含まれる。非水性の溶媒または媒体の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油およびコーンオイルなどの植物油、ゼラチン、ならびにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。このような剤形は、防腐剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などの助剤も含有し得る。該剤形は、例えば、細菌保持フィルターを通す過程、その組成物中への殺菌剤の導入、その組成物の照射、またはその組成物の加熱によって、滅菌し得る。該剤形は、使用直前に、滅菌水または他の滅菌注射可能な媒体を用いて

も、製造することができる。

#### 【0128】

##### 3. 粘膜送達

直腸または腔投与用組成物は、好ましくは、活性物質以外に、ココアバターまたは坐薬用ワックスなどの賦形剤を含有し得る坐薬である。鼻または舌下投与用組成物も、当技術分野で周知の標準的賦形剤を用いて調製される（以下参照）。

#### 【0129】

##### 4. 肺送達

s H 4 拮抗剤（またはその誘導体）の肺送達も、本発明において想定されている。改変体 B 7-D C ポリペプチド、改変体 B 7-D C 融合タンパク質、またはそれ（もしくは誘導体）をコードする核酸は、吸入しながら哺乳動物の肺に送達され、肺上皮層を通過して血流へ入る（例えば、Adj ei ら（1990年）Pharmaceutical Research 7巻、565～569頁；Adj ei ら（1990年）Int. J. Pharmaceutics 63巻、135～144頁（酢酸ロイプロリド）；Braquet ら（1989年）J. Cardiovascular Pharmacology 13巻（補遺5）、143～146頁（エンドセリン-1）；Hubbard ら（1989年）Annals of Internal Medicine、第3巻、206～212頁（ $\alpha 1$ -抗トリプシン）；Smith ら（1989年）J. Clin. Invest. 84巻、1145～1146頁（ $\alpha 1$ -プロテイナーゼ）；Oswain ら（1990年）「Aerosolization of Proteins」、Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II Keystone, Colorado（組換えヒト成長ホルモン）；Debs ら（1988年）J. Immunol. 140巻、3482～3488頁（インターフェロン $\gamma$ および腫瘍壊死因子 $\alpha$ ）ならびにPlatz らの米国特許第5284656号（顆粒球コロニー刺激因子）を参照されたい）。全身作用薬を肺送達する方法および組成物は、Wong らの米国特許第5451569号に記載されている。

#### 【0130】

治療薬製品の肺送達用に設計された広範囲の機械的装置が、それだけに限らないが、ネブライザー、定量吸入器および粉末吸入器を含めて使用できるが、それらは全て当業者が熟知しているものである。本発明の実施に適切な市販装置のいくつかの具体例は、Ult ravent ネブライザー（Mallinckrodt Inc.、St. Louis、Mo.）、Acorn II ネブライザー（Marquest Medical Products、Englewood、Colo.）、Ventolin 定量吸入器（Glaxo Inc.、Research Triangle Park、N. C.）およびSpinhaler 粉末吸入器（Fisons Corp.、Bedford、Mass.）である。

#### 【0131】

このような装置は全て、改変体 B 7-D C ポリペプチド、改変体 B 7-D C 融合タンパク質、またはそれ（もしくは誘導体）をコードする核酸の投薬に適した製剤の使用を必要とする。通常は、各製剤は、使用する装置の種類に特有であり、治療に有用な普通の希釈剤、助剤および／または担体の他に、適当な噴射剤物質の使用を含み得る。リボソーム、マイクロカプセルもしくはミクロスフェア、包接錯体、または他種類の担体の使用も、想定されている。化学改変ペプチドも、化学改変のタイプまたは使用する装置の種類に応じて異なる製剤に調製し得る。

#### 【0132】

ジェット式、超音波式いずれかのネブライザーとの使用に適した製剤は、通常、溶液 1 mL 当たり生物活性タンパク質約 0.1～25 mg の濃度で、水に溶解したペプチド（または誘導体）を含む。製剤は、緩衝剤および単純糖（例えば、目的はタンパク質の安定化および浸透圧の調節）も含み得る。ネブライザー製剤は、エアロゾル形成時の溶液の霧化で起こるペプチド（または誘導体）の表面誘発凝集を減少させるまたは防止するために、

界面活性剤も含み得る。

### 【0133】

定量吸入装置との使用に適した製剤には、一般に、界面活性剤の補助で噴射剤中に懸濁したペプチド（または誘導体）を含有する微細粉末が含まれる。噴射剤は、この目的に使用される従来の任意の物質でもよく、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタノールおよび1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタンまたはそれらの組合せを含む、クロロフルオロカーボン、ハイドロクロロフルオロカーボン、ハイドロフルオロカーボンまたは炭化水素などである。適切な界面活性剤には、ソルビタントリオレートおよび大豆レシチンが含まれる。オレイン酸も、界面活性剤として有用になり得る。

10

### 【0134】

粉末吸入装置から投薬するための製剤は、ペプチド（または誘導体）を含有する微細乾燥粉末を含み、ラクトース、ソルビトール、スクロースまたはマンニトールなどの増量剤も、装置からの粉末の散布を促進する量で、例えば製剤重量の50～90%で含んでもよい。改変体B7-D Cポリペプチド、改変体B7-D C融合タンパク質、またはそれ（もしくは誘導体）をコードする核酸は、遠位肺へ最も有効に送達するために、最も有利には、平均粒径が10mm未満（またはミクロン）、最も好ましくは0.5～5mmの粒子形態で調製すべきである。

### 【0135】

#### 5. ポリマーマトリックス

非生分解性、生分解性双方のマトリックスは、改変体B7-D Cポリペプチド、改変体B7-D C融合タンパク質、またはそれらをコードする核酸の送達のために使用できるが、生分解性マトリックスが好ましい。こうしたものは、天然または合成のポリマーでもよいが、合成ポリマーは、分解および放出プロファイルの特性決定がより良好なために好ましい。該ポリマーは、放出が望ましい期間に基づいて選択される。いくつかの場合には、線形放出が最も有用になり得るが、他の場合には、パルス放出または「バルク放出」の方が有効な結果をもたらし得る。該ポリマーは、ヒドロゲルの形態を取ってもよく（通常、最大約90重量%の水を吸収したとき）、場合により多価のイオンまたはポリマーで架橋することができる。

20

### 【0136】

送達のために使用できる代表的な合成ポリマーには、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキサイド、ポリアルキレンテレフタレート、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタンおよびそのコポリマー、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、アクリルエステルおよびメタクリルエステルのポリマー、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートフタレート、カルボキシエチルセルロース、セルローストリアセテート、硫酸セルロースナトリウム塩、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリ（メタクリル酸エチル）、ポリ（メタクリル酸ブチル）、ポリ（メタクリル酸イソブチル）、ポリ（メタクリル酸ヘキシル）、ポリ（メタクリル酸イソデシル）、ポリ（メタクリル酸ラウリル）、ポリ（メタクリル酸フェニル）、ポリ（アクリル酸メチル）、ポリ（アクリル酸イソプロピル）、ポリ（アクリル酸イソブチル）、ポリ（アクリル酸オクタデシル）、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキサイド）、ポリ（エチレンテレフタレート）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（酢酸ビニル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレンおよびポリビニルピロリドン）が挙げられる。

30

40

### 【0137】

非生分解性ポリマーの例には、エチレンビニルアセテート、ポリ（メス）アクリル酸、

50

ポリアミド、それらのコポリマーおよび混合物が挙げられる。生分解性ポリマーの例には、合成ポリマーとして、乳酸およびグリコール酸のポリマー、ポリ酸無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリウレタン、ポリ（ブチックアシッド（b u t i c a c i d））、ポリ（吉草酸）およびポリ（ラクチドーc o oカプロラクトン）などと、天然ポリマーとして、アルギネートならびにデキストランおよびセルロースを含む他の多糖類、コラーゲン、それらの化学的誘導体（化学基、例えばアルキル、アルキレンの置換、付加、ヒドロキシル化、酸化、および当業者が常套的に行う他の改変）、アルブミンおよび他の親水性タンパク質、ゼインおよび他のプロラミンならびに疎水性タンパク質、それらのコポリマーおよび混合物とが挙げられる。一般に、こうした物質は、インビボで酵素的加水分解または水への曝露のいずれかにより、表面またはバルク侵食によって分解する。

10

#### 【0138】

特に興味ある生体接着性ポリマーには、H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubell, *Macromolecules*, 1993年、26巻、581～587頁に記載されている生体侵食可能なヒドロゲル、ポリヒアルロン酸、カゼイン、ゼラチン、グルチン、ポリ酸無水物、ポリアクリル酸、アルギネート、キトサン、ポリ（メタクリル酸メチル）、ポリ（メタクリル酸エチル）、ポリ（メタクリル酸ブチル）、ポリ（メタクリル酸イソブチル）、ポリ（メタクリル酸ヘキシル）、ポリ（メタクリル酸イソデシル）、ポリ（メタクリル酸ラウリル）、ポリ（メタクリル酸フェニル）、ポリ（アクリル酸メチル）、ポリ（アクリル酸イソプロピル）、ポリ（アクリル酸イソブチル）およびポリ（アクリル酸オクタデシル）が挙げられる。

20

#### 【0139】

そのマトリックスは、ミクロスフェアなどの微粒子の形態を取ることができ、ペプチドは、固体ポリマーマトリックスまたはマイクロカプセル内に分散し、コアは、ポリマーシエルとは異なる物質からなり、ペプチドは、性質が液体または固体でもよいコア中に分散または懸濁している。本明細書で特に明記しない限り、微粒子、ミクロスフェアおよびマイクロカプセルは、互換的に使用される。あるいは、ポリマーは、ナノメートルから4センチメートルの範囲にある薄板もしくは薄膜、粉砕もしくは他の標準技法で生成する粉末、またはヒドロゲルなどのゲルとしてさえも成形し得る。

#### 【0140】

該マトリックスは、溶媒蒸発、噴霧乾燥、溶媒抽出、および当業者に公知の他の方法によって形成することができる。

30

#### 【0141】

生体侵食可能なミクロスフェアは、薬物送達用のミクロスフェアを作製するために開発された方法のいずれを用いても調製できるが、そのような方法は、例えば、Mathiowitz and Langer, J. *Controlled Release* 5巻、13～22頁（1987年）；Mathiowitzら、*Reactive Polymers* 6巻、275～283頁（1987年）およびMathiowitzら、J. *Appl. Polymer Sci.* 35巻、755～774頁（1988年）に記載されている。その方法の選定は、ポリマーの選定、サイズ、外形および所望の結晶化度に依存するが、それに関しては、例えば、Mathiowitzら、*Scanning Microscopy* 4巻、329～34頁（1990年）；Mathiowitzら、J. *Appl. Polymer Sci.* 45巻、125～134頁（1992年）およびBenitaら、J. *Pharm. Sci.* 73巻、1721～1724頁（1984年）に記載されている。例えば、Mathiowitzら（1990年）、BenitaおよびJaffeの米国特許第4272398号に記載の溶媒蒸発では、ポリマーを揮発性有機溶媒中に溶解する。可溶形態をした、または微粒として分散したアナゴニスト（anagonist）は、ポリマー溶液に添加し、その混合物を、ポリ（ビニルアルコール）などの界面活性剤を含有する水性相中に懸濁させる。生成した乳濁液を、有機溶媒の大部分が蒸発するまで攪拌すると、固体ミクロスフェアが後に残る。一般に、ポリマーは塩化メチレンに溶解することができる。サイズ（1～1000ミクロン

40

50

）および形態が異なるミクロスフェアは、ポリエステルおよびポリスチレンなどの比較的安定なポリマーに有用であるこの方法により、得ることができる。しかし、ポリ酸無水物などの不安定ポリマーは、水に曝されるために分解する場合がある。このようなポリマーの場合、ホットメルトカプセル充填および溶媒除去が好ましいこともある。

#### 【0142】

ホットメルトカプセル充填では、まずポリマーを溶融した後、改変体B7-D Cポリペプチド、改変体B7-D C融合タンパク質、またはそれらをコードする核酸の固体粒子と混合する。混合物を、シリコン油などの非混和性溶媒中に懸濁し、攪拌を継続しながら、ポリマーの融点より5℃まで高く加熱する。乳濁液が安定化した後、ポリマー粒子が固化するまで冷却する。生成したミクロスフェアを、石油エーテルを用いたデカンテーションで洗浄することにより、自由流動性の粉末が得られる。1～1000ミクロンの間の直径を有するミクロスフェアをこの方法で得ることができる。この技法で調製したスフェアの外表面は、普通、平滑で緻密である。この手順は、水に不安定なポリマーに有用であるが、分子量が1000～50000の間のポリマーに使用に限られる。溶媒除去は、主としてポリ酸無水物との使用に設計されたものである。この方法では、改変体B7-D Cポリペプチド、改変体B7-D C融合タンパク質、またはそれらをコードする核酸を、塩化メチレンなどの揮発性有機溶媒における選定ポリマーの溶液中に分散または溶解する。次いで、混合物をシリコン油などの油中に懸濁し攪拌することにより、乳濁液が形成される。24時間以内に、溶媒が油相中に拡散し、乳濁液滴が、固体のポリマーミクロスフェアに硬化する。溶媒蒸発と異なり、この方法は、融点が高く、分子量範囲が広いポリマーからミクロスフェアを作製するために、使用することができる。1～300ミクロンの間の直径を有するミクロスフェアをこの手順で得ることができる。スフェアの外部形態は、使用するポリマーの種類に強く依存する。噴霧乾燥では、ポリマーを塩化メチレンに溶解する(0.04 g/ml)。このポリマー溶液中に、既知量の活性薬物を懸濁(不溶であれば)または共溶解(可溶であれば)する。次いで、溶液または分散液を噴霧乾燥する。Mathowitzの米国特許第4861627号によれば、二重壁ミクロスフェアを調製することができる。

#### 【0143】

アルギネートもしくはポリホスファジンまたは他のジカルボン酸ポリマーなどのゲル型ポリマーで作製するヒドロゲルミクロスフェアは、ポリマーを水溶液中に溶解し、当該物質を懸濁して混合液中に導入し、窒素ガスジェットを備えた微小滴形成装置からポリマー混合液を押し出すことにより、調製することができる。生成したミクロスフェアは、例えば、Salibら、Pharmazeutische Industrie 40巻11A号、1230頁(1978年)に記載のように、ゆっくりと攪拌している硬化用イオンバス中に落とす。キトサンミクロスフェアは、酸性溶液中にポリマーを溶解し、トリポリホスフェートで架橋することにより、調製することができる。例えば、カルボキシメチルセルロース(CMC)のミクロスフェアは、酸溶液中にポリマーを溶解し、鉛イオンでミクロスフェアを沈殿させることにより、調製される。アルギネート/ポリエチレンイミド(PEI)は、アルギネートマイクロカプセル上のカルボキシル基の量を減少させて調製することができる。

#### 【0144】

フィルム、コーティング、ペレット、スラブおよび装置を含めた他の送達系は、標準的な複合物作製法だけでなく、溶媒または溶融キャスト法および押出し法を用いても、作製することができる。そのポリマーは、Sawhneyらが記載するようにまずモノマーおよびペプチドを混合し、モノマーをUV光で重合することにより、生成することができる。重合は、インビトロならびにインビボで実施することができる。

#### 【0145】

##### II. 製造法

##### A. 改変体B7-D Cポリペプチドを生成する方法

単離した改変体B7-D Cポリペプチドは、例えば、化学合成または宿主細胞内での組

10

20

30

40

50

換え産生により、得ることができる。共刺激性ポリペプチドを組換え産生するために、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有した核酸を使用して、細菌性または真核性宿主細胞（例えば、昆虫、酵母または哺乳動物の細胞）を形質転換、形質導入またはトランスフェクトすることができる。一般に、核酸構築体は、共刺激性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に、作動可能に連結した調節配列を含む。調節配列（本明細書では、発現制御配列とも呼称される）は、通常、遺伝子産物をコードせず、代わりに、それらが作動可能に連結されている核酸配列の発現に影響を及ぼす。

#### 【0146】

ポリペプチドを発現し、産生する有用な原核系および真核系は、当技術分野で周知であり、例えば、BL-21などの*Escherichia coli*株およびCHO細胞などの培養哺乳動物細胞を包含する。

10

#### 【0147】

真核性宿主細胞では、改変体B7-DCポリペプチドを発現させるために、多くのウイルススペースの発現系を利用することができる。ウイルススペースの発現系は、当技術分野で周知であり、それだけに限らないが、バキュロウイルス、SV40、レトロウイルスまたはワクシニアに基づくウイルスベクターを包含する。

#### 【0148】

共刺激性改変体ポリペプチドを安定に発現する哺乳動物細胞系は、適当な制御要素および選択可能なマーカーを有する発現ベクターを用いて作製することができる。例えば、真核性発現ベクターのpCR3.1 (Invitrogen Life Technologies) およびp91023 (B) (Wongら、(1985年) Science 228巻、810～815頁を参照されたい) は、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、COS-1細胞、ヒト胚性腎293細胞、NIH3T3細胞、BHK21細胞、MDCK細胞およびヒト血管内皮細胞 (HVEC) 中に、共刺激性改変体ポリペプチドを発現するために適切である。エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム、または塩化カルシウム共沈、DEAEデキストランもしくは適切な他のトランスフェクション法の後、安定な細胞系を選択することができる（例えば、G418、カナマイシンまたはハイグロマイシンに対する抗生物質耐性により）。トランスフェクト細胞は、対象ポリペプチドを発現するように培養でき、そのポリペプチドを、例えば細胞培養上清または溶解細胞から回収することができる。あるいは、改変体B7-DCポリペプチドは、(a) 増幅した配列をpcDNA3 (Invitrogen Life Technologies) などの哺乳動物発現ベクター中に連結し、(b) 小麦胚抽出物またはウサギ網状赤血球溶解物を用いて、インビトロで転写し、翻訳することにより、産生することができる。

20

30

#### 【0149】

共刺激性改変体ポリペプチドは、例えば、DEAEイオン交換、ゲルろ過およびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法を用いて、単離することができる。例えば、細胞培養上清または細胞質抽出物中の共刺激性ポリペプチドは、プロテインGカラムを用いて単離することができる。いくつかの実施形態では、共刺激性改変体ポリペプチドは、親和性マトリックス上にそのポリペプチドを捕捉することを可能にする、アミノ酸配列を含有するように「操作」することができる。例えば、c-myc、ヘマグルチニン、ポリヒスチジンまたはFlag (商標) (Kodak) などのタグを使用して、ポリペプチドの精製を補助することができる。このようなタグは、カルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかの位置を含め、ポリペプチド内の任意の箇所に挿入することができる。有用になり得る他の融合体には、アルカリホスファターゼなどのポリペプチドの検出を補助する酵素が含まれる。免疫アフィニティクロマトグラフィーも、共刺激性ポリペプチドの精製に使用することができる。

40

#### 【0150】

##### B. 単離核酸分子を生成する方法

単離核酸分子は、限定することなく、通常の方法クローニング法および核酸化学合成法

50

を含む標準法を含む標準的技法によって、生成することができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて、共刺激性改変体ポリペプチドをコードする単離核酸を得ることができる。PCRは、標的核酸を酵素的に増幅する技法である。通常、対象領域の複数の末端またはさらに遠方の配列情報を用いて、増幅しようとする鋳型の反対鎖と配列が同じオリゴヌクレオチドプライマーを設計することができる。PCRは、DNAならびにRNAの特異的配列を、全ゲノムDNAまたは全細胞RNAの配列を含めて増幅するために、使用することができる。プライマーは、通常、長さが14～40ヌクレオチドであるが、長さが10ヌクレオチドから数百ヌクレオチドに及ぶことができる。全般的なPCR技法は、例えば、PCR Primer: A Laboratory Manual、Dieffenbach and Dveksler編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1995年に記載されている。鋳型源としてRNAを使用する場合、相補DNA（cDNA）鎖を合成するために、逆転写酵素を使用することができる。リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、自立配列複製または核酸配列ベース増幅も、単離核酸を得るために使用することができる。例えば、Lewis（1992年）Genetic Engineering News 12巻、1頁；Guatelliら（1990年）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87巻、1874～1878頁およびWeiss（1991年）Science 254巻、1292～1293頁を参照されたい。

#### 【0151】

単離核酸は、単一核酸分子として、または一連のオリゴヌクレオチド（即ち、3'から5'方向への自動化DNA合成のためのホスホラミダイト技術を用いて）としてのいずれかで、化学的に合成することができる。例えば、所望の配列を含有しており、各対が、そのオリゴヌクレオチド対をアニールした際に二重鎖が形成されるように、相補性の短鎖セグメント（例えば、約15ヌクレオチド）を含有した、1対または複数対の長鎖オリゴヌクレオチド（例えば、>100ヌクレオチド）を合成することができる。DNAポリメラーゼを使用して、そのオリゴヌクレオチドを伸長させ、オリゴヌクレオチド1対当たり単一の2本鎖核酸分子を生成することができ、次いでそれをベクター中に連結することができる。単離核酸は、変異誘発によっても得ることができる。B7-DCコード核酸は、PCRを介したオリゴヌクレオチド指定変異誘発および／または部位指定変異誘発を含む標準的技法を用いて、変異させることができる。Short Protocols in Molecular Biology、8章、Green Publishing Associates and John Wiley & Sons、Ausubelら編、1992年を参照されたい。改変できるアミノ酸位置の例には、本明細書に記載の位置が含まれる。

#### 【0152】

##### III. 使用法

##### A. T細胞の共刺激

改変体B7-DCポリペプチド、改変体B7-DC融合タンパク質、改変体B7-DCポリペプチドもしくはB7-DC融合タンパク質をコードする核酸、または改変体B7-DCポリペプチドを発現する細胞は、T細胞を共刺激する（即ち、T細胞の抗原特異的増殖を高める、T細胞によるサイトカイン産生を増強する、T細胞の分化およびエフェクター機能を刺激する、ならびに／あるいはT細胞の生存を促進する）ために使用することができる。

#### 【0153】

B7-DCは、免疫受容抑制性チロシンモチフィニツ（motifinitis）細胞質ドメインを有するCD28相同体である、PD-1（プログラム細胞死1）に結合することができる（Ishidaら（1992年）EMBO J. 11巻、3887～3895頁）。PD-1は、胸腺細胞のサブセット上に発現し、活性化後のT細胞、B細胞および骨髄細胞上で上方調節される（Agataら（1996年）Int. Immunol. 8巻、765～772頁）。PD-1は、インビボにおける免疫応答の負の調節因子とし

て現れる。例えば、C57BL/6バックグラウンドのPD-1<sup>-/-</sup>マウスは、狼瘡様の糸球体腎炎および進行性関節炎を徐々に発現した（Nishimuraら（1999年）Immunity 11巻、141～151頁）。それに加え、BALB/cバックグラウンドのPD-1<sup>-/-</sup>マウスは、致命的な自己免疫性拡張型心筋症を急速に発現した（Nishimuraら（2001年）Science 291巻、319～322頁）。しかし、証拠から、B7-DCは、T細胞応答を共刺激するように機能できることも示されている。最適以下のTCRシグナルの存在下、B7-DCは、インビトロにおいて増加した増殖およびサイトカイン産生を刺激することができる。したがって、B7-DCは、PD-1以外のT細胞受容体にも結合するように現れる。下記の実施例に記載した実験では、B7-DCおよび本明細書に記載のB7-DCの改変体の共刺激活性は、PD-1受容体によって媒介されないことが示されている。

10

#### 【0154】

本明細書に記載のB7-DC改変体は、野生型B7-DCと比較して、PD-1に対する低下した結合性を示すが、T細胞を共刺激する能力を保持している。したがって、本明細書に記載のB7-DC改変体は、T細胞を共刺激する能力を保持し、PD-1との結合によりT細胞活性化を抑制する能力が低下している。そのため、こうしたB7-DC改変体は、T細胞の共刺激にとって野生型B7-DCより有利である。PD-1に対する親和性が低下した改変体B7-DCポリペプチドおよび改変体B7-DC融合タンパク質を用いて、T細胞応答を刺激する方法が、本明細書に開示されている。該方法は、単離された改変体共刺激性ポリペプチドをT細胞と接触させることを含み得る。この接触は、インビトロ、エキスピボまたはインピボ（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ウシ、ブタ、ヒト以外の霊長類、またはヒト）でもよい。

20

#### 【0155】

接触は、T細胞の活性化の前、間または後で行うことができる。通常、改変体共刺激性ポリペプチドとT細胞の接触は、活性化と実質的に同時にすることができる。活性化は、例えば、T細胞受容体（TCR）と結合する抗体、またはTCRと物理的に会合するCD3複合体のポリペプチドの1つに、T細胞を曝すことによりなし得る。あるいは、T細胞は、例えばAPC〔例えば、嵌合樹状細胞（本明細書では樹状細胞と呼称する）、マクロファージ、単球もしくはB細胞〕上のアロ抗原（例えば、MHCアロ抗原）、または上記APCのいずれかによるタンパク抗原のプロセッシングで産生され、APC表面上のMHC分子によりT細胞へ提示される抗原性ペプチドのいずれかに曝すことができる。T細胞は、CD4<sup>+</sup>T細胞またはCD8<sup>+</sup>T細胞でもよい。

30

#### 【0156】

いくつかの実施形態では、単離された改変体共刺激性ポリペプチドは、T細胞に直接投与することができる。あるいは、マクロファージ、単球、嵌合樹状細胞（本明細書では樹状細胞と呼称する）またはB細胞などのAPCを、改変体共刺激性ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質転換、形質導入またはトランスフェクトすることができ、T細胞を形質転換、形質導入またはトランスフェクトしたそのAPCに接触させることができる。形質転換、形質導入またはトランスフェクトしたその細胞は、形質転換、形質導入またはトランスフェクトする前に、投与する対象または別の対象（例えば、同種の別の対象）から取得した細胞または細胞の子孫でもよい。

40

#### 【0157】

改変体B7-DCポリペプチドは、開示したアミノ酸変換体、ポリペプチド断片、融合タンパク質およびそれらの組合せのいずれをも含め、本明細書に記載するそうしたいずれでもよい。

#### 【0158】

活性化がインビトロであれば、改変体B7-DC分子を、適当な培養器の床、例えばプラスチック製マイクロタイタープレートのウェルに結合することができる。

#### 【0159】

単離された改変体共刺激性ポリペプチドのインビトロ適用は、例えば、免疫機構の科学

50

的基礎研究において、またはT細胞機能もしくは例えば受動免疫治療の研究に使用する活性化T細胞の産生のために、有用となり得る。さらに、改変体B7-D Cポリペプチドは、T細胞を取得した対象における興味ある抗原に対する免疫性を試験するように設計した、インビトロアッセイ（例えば、T細胞増殖アッセイ）に添加することもできる。このようなアッセイに改変体共刺激性ポリペプチドを添加すれば、より強力で、したがってより検出しやすいインビトロ応答が得られると予想される。その上、改変体B7-D Cポリペプチド、またはこのようなポリペプチドをコードする核酸で形質転換、トランスフェクトまたは形質導入したAPCは、（a）他分子の共刺激活性を試験するアッセイにおける陽性対照として、または（b）T共刺激の阻害に有用な化合物（例えば、自己免疫疾患もしくは臓器移植片拒絶の治療に潜在的に有用な化合物）を求めるスクリーニングアッセイにおいて、使用することもできる。

10

#### 【0160】

##### B. B7-D C改変体の治療的使用

##### 1. 治療すべき病態

本明細書に示す改変体B7-D Cポリペプチドは、免疫応答刺激性治療薬としてインビボおよびエクシボで一般に有用である。一般に、本明細書に記載の組成物は、対象の免疫系が免疫応答を高める任意の疾患もしくは障害を有する、またはその素因を有する対象の治療に有用である。改変体B7-D CポリペプチドのT細胞共刺激能のために、開示する組成物は、T細胞が関わる免疫応答の刺激または増強に有用となる。したがって、好ましい実施形態では、治療または予防すべき疾患の種類は、悪性腫瘍、または細胞内に侵入し、即ち細胞傷害性Tリンパ球の攻撃を受ける細菌、ウイルス、原虫、蠕虫もしくは他の微生物病原体が起こす慢性感染性疾患である。本明細書に記載の改変体B7-D C組成物を用いるT細胞の共刺激は、免疫抑制を特徴とする病態の治療または予防にも有利である。

20

#### 【0161】

##### i. ウイルス感染症

ウイルス感染症は、主にT細胞によって一掃されるので、T細胞活性の増加は、感染性ウイルス病原体のより迅速または徹底的な一掃が、動物またはヒト対象にとって有益である状況では、治療的に有用となる。したがって、改変体B7-D Cポリペプチドおよび改変体B7-D C融合タンパク質は、それだけに限らないが、免疫不全症（例えば、HIV）、パピローマ（例えば、HPV）、ヘルペス（例えば、HSV）、脳炎、インフルエンザ（例えば、ヒトA型インフルエンザウイルス）および感冒（例えば、ヒトライノウイルス）のウイルス感染症を含む、局所的または全身的ウイルス感染症の治療のために投与することができる。例えば、B7-D C組成物要素の医薬製剤は、疱疹病変もしくは帯状疱疹などのウイルス性皮膚病、または陰部疣贅を治療するために、局所的に投与することができる。改変体B7-D C組成物の医薬製剤は、それだけに限らないが、AIDS、インフルエンザ、感冒または脳炎を含む全身性ウイルス疾患を治療するためにも、投与することができる。

30

#### 【0162】

##### ii. 癌

改変体B7-D Cポリペプチド、改変体B7-D C融合タンパク質およびそれらをコードする核酸は、腫瘍免疫の誘発に有用となり得る。例えば、それだけに限らないが、肉腫、メラノーマ、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫を含む腫瘍細胞、または癌腫細胞は、本明細書に記載の改変体B7-D Cポリペプチドまたは改変体B7-D C融合タンパク質をコードする核酸を保持するように、操作することができ、次いで対象における腫瘍特異的寛容を妨害するために、対象へ投与することができる。顕著なことには、B7陰性マウス腫瘍細胞におけるB7-1の異所性発現は、マウスにおける腫瘍拒絶および腫瘍の侵害に対する長期防御を伴うT細胞媒介特異免疫を誘発することが示された（L. Chenら、上記；S. Townsendら、上記；S. Baskarら、上記）。B7関連因子を利用した腫瘍または癌細胞の遺伝子治療処置は、動物実験（K. Dunussi

40

50

Joannopoulosら(1997年) J. Pediatr. Hematol. Oncol. 19巻、356～340頁; K. Hiroishiら(1999年) Gene Ther. 6巻、1988～1994頁; B. K. Martinら(1999年) J. Immunol. 162巻、6663～6670頁; M. Kuiperら(2000年) Adv. Exp. Med. Biol. 465巻、381～390頁を参照)、またはヒトの第1相臨床実験(H. L. Kaufmanら(2000年) Hum. Gene Ther. 11巻、1065～1082頁)においてモデル化し得るが、そこでは遺伝子移入治療にB7-1またはB7-2を使用している。このような方法は、各種の腫瘍または癌細胞を扱う使用に適合し得ることは理解される。それに加え、腫瘍免疫は、免疫細胞を直接刺激する改変体B7-DCポリペプチドおよび改変体B7-DC融合タンパク質の投与によっても、実現し得る。

10

#### 【0163】

治療し得る悪性腫瘍は、本明細書では、腫瘍が由来する組織の胚性起源に従って分類される。癌腫は、皮膚、または内臓および腺の上皮層などの内胚葉性または外胚葉性組織から生じる腫瘍である。発現頻度がより少ない肉腫は、骨、脂肪および軟骨などの中胚葉性結合組織に由来する。白血病およびリンパ腫は、骨髄の造血細胞の悪性腫瘍である。白血病が単一細胞として増殖するのに対し、リンパ腫は腫瘍塊として増殖する傾向がある。悪性腫瘍は、身体の数多くの器官または組織に出現し得、癌を定着させる。

#### 【0164】

提供される組成物および方法で治療できる癌の種類には、それだけに限らないが、以下のもの、即ち、膀胱、脳、乳房、子宮頸部、結腸直腸、食道、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、すい臓、前立腺、皮膚、胃、子宮などが挙げられる。投与は、存在する腫瘍または感染症の治療に限らず、個体におけるそのような疾患を発現する危険性の防止または低下、即ち予防的使用のために、使用することもできる。予防的ワクチン接種の潜在的候補者には、癌発症の危険性が高い、即ちある種の癌に関する個人的または家系的病歴のある個人が挙げられる。

20

#### 【0165】

##### i i i . 免疫抑制病態

改変体B7-DCポリペプチドおよび改変体B7-DC融合タンパク質は、それだけに限らないが、AIDSまたはAIDS関連複合体、他のウイルスまたは環境誘発病態、およびある種の先天性免疫不全症を含む、免疫抑制を特徴とする病状の治療に使用することができる。改変体B7-DCポリペプチドおよび改変体B7-DC融合タンパク質は、免疫抑制薬(例えば、ある種の化学療法剤)の放射線療法の使用で傷害を受けた免疫機能を高めるためにも、用いることができ、したがってこのような薬物または放射線療法と共に投与すると、特に有用となり得る。

30

#### 【0166】

##### 2. ワクチンにおけるB7-DC改変体の使用

改変体B7-DCポリペプチド、改変体B7-DC融合タンパク質および/またはそれらをコードする核酸は、単独または他の任意の適切な治療との組合せで投与し得る。一実施形態では、改変体B7-DCポリペプチド、改変体B7-DC融合タンパク質および/またはそれらをコードする核酸は、ワクチン組成物と共に、またはその成分として投与し得る。ワクチン組成物の適切な成分は、上記したとおりである。本明細書に記載の改変体B7-DC組成物は、ワクチン投与の前、それと同時に、またはその後に投与することができる。一実施形態では、改変体B7-DC組成物は、ワクチン投与と同時に投与される。

40

#### 【0167】

本明細書に記載の改変体B7-DC組成物は、感染性病原体へのその後の曝露に対して対象に抵抗性を付与する予防的ワクチンと共に、または、癌を有する対象における腫瘍抗原としてもしくはウイルス感染している対象におけるウイルス抗原としての既存抗原に対し、対象の免疫応答を開始もしくは増強するために使用できる治療的ワクチンと共に、投与してもよい。

50

## 【0168】

予防的、治療的または脱感作免疫応答の望ましい結果は、疾患に従って、当技術分野で周知の原理に従って変化し得る。例えば、感染性病原体に対する免疫応答は、感染性病原体のコロニー形成および複製を完全に防止し、「無菌免疫」および任意の疾患症状の欠如に影響し得る。しかし、感染性病原体に対するワクチンは、症状の数、重度もしくは期間を低減させた場合、症状のある集団における個体数を減少させた場合、または感染性病原体の伝染を減少させた場合に有効と見なし得る。同様に、癌、アレルゲンまたは感染性病原体に対する免疫応答は、疾患を完全に治療することもあり、症状を緩和することもあり、または疾患に対する総合的治療介入の一側面となることもある。例えば、癌に対する免疫応答の刺激は、外科的、化学療法的、放射線医学的、ホルモンのおよび他の免疫的な手法と組み合わせることにより、治療に影響し得る。

10

## 【0169】

## C. 改変体B7-D Cポリペプチドの投与法

いくつかのインビボ手法では、改変体B7-D Cポリペプチドまたは改変体B7-D C融合タンパク質自体が、治療有効量で対象に投与される。通常、該ポリペプチドは、医薬として許容可能な担体中に懸濁することができる。医薬として許容可能な担体は、ヒトへの投与に適切な、生体適合性の媒体（例えば、生理食塩水）である。治療有効量とは、治療される動物に医学的に望ましい結果（例えば、T細胞応答の増強）を生むことができる、改変体共刺激性ポリペプチドの量である。改変体B7-D CポリペプチドおよびB7-D C融合タンパク質は、経口もしくは静脈内注入により投与し、または皮下、筋肉内、腹腔内、直腸内、膈内、鼻腔内、胃内、気管内もしくは肺内に注射することができる。改変体共刺激性ポリペプチドは、適当なリンパ系組織（例えば、脾臓、リンパ節または粘膜関連リンパ系組織）に直接、送達させることができる。

20

## 【0170】

## D. 核酸および細胞の投与法

改変体B7-D Cポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸は、それを必要とする対象に投与することができる。核酸の送達には、「外来」核酸の細胞内導入、および最終的には生存動物中への導入を含む。遺伝子治療に対するいくつかの一般戦略が、研究され、広範に総説されてきた（Yang, N-S, Crit. Rev. Biotechnol. 12巻、335～356頁（1992年）；Anderson, W. F., Science 256巻、808～813頁（1992年）；Miller, A. S., Nature 357巻、455～460頁（1992年）；Crystal, R. G., Amer. J. Med. 92巻（補遺6A）、44S～52S頁（1992年）；Zwiebel, J. A. ら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 618巻、394～404頁（1991年）；McLachlin, J. R. ら、Prog. Nuc. Acid Res. Molec. Biol. 38巻、91～135頁（1990年）；Kohn, D. B. ら、Cancer Invest. 7巻、179～192頁（1989年））。

30

## 【0171】

一手法には、培養時の一次細胞に核酸を移入した後、エクスピボで形質転換したその細胞の宿主への全身または特定の器官もしくは組織中への自家移植が含まれる。一実施形態では、改変体B7-D Cポリペプチドをコードする核酸を含有するベクターが、それを必要とする対象に投与される細胞中にトランスフェクトされる。好ましい実施形態では、改変体B7-D Cポリペプチドをコードする核酸を含有するベクターを含んだ細胞は、抗原提示細胞である。

40

## 【0172】

エクスピボ法は、例えば、対象から細胞を採集するステップ、細胞を培養するステップ、細胞に発現ベクターを形質導入するステップ、および本明細書に示す改変体共刺激性ポリペプチドの発現に適切な条件下で細胞を維持するステップを含むことができる。こうした方法は、分子生物学の技術分野で公知である。形質導入ステップは、例えば、リン酸カ

50

ルシウム、リポフェクション、エレクトロポレーション、ウイルス感染およびバイオリステック (b i o l i s t i c) 遺伝子移入を含む、エクスピボ遺伝子治療に使用される任意の標準手段によって実現することができる。あるいは、リボソームまたはポリマー微粒子を使用することができる。首尾よく形質導入された細胞は、次いで、例えば、コード配列または薬物耐性遺伝子の発現について選択することができる。次いで、その細胞を致死的に照射し (望ましい場合)、対象中へ注射または移植することができる。

#### 【0173】

いくつかのエクスピボ法では、末梢血単核細胞 (P B M C) を患者または適切なドナーから抜き取り、活性化刺激剤 (上記を参照) および改変体共刺激性ポリペプチド (可溶性か、固体 (s o l d) 支持体に結合しているかを問わず、標準的手順によって) にエクスピボで曝すことができる。次いで、高度に活性化した T 細胞を含有する P B M C を、同じまたは異なる患者に導入することができる。

#### 【0174】

代替的なエクスピボ戦略では、改変体 B 7-D C ポリペプチドをコードする核酸で、対象から得た細胞をトランスフェクトまたは形質導入することを含むことができる。次いで、トランスフェクトまたは形質導入済み細胞を対象に戻すことができる。このような細胞は、通常、造血性細胞 (例えば、骨髄細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞または B 細胞) であるが、20 それらはまた、対象中で生存している限り改変体 B 7-D C ポリペプチド源として作用する、繊維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、角質細胞または筋細胞を限定なしに含む、広範囲の種類のいずれでもよい。上記 A P C を含む造血性細胞の使用は、そうした細胞が、通常、とりわけリンパ系組織 (例えば、リンパ節または脾臓) にホーミングすると予想されるので、特に有用になることができ、こうして改変体 B 7-D C ポリペプチドを、その効果 (即ち、免疫応答の増強) を発揮する部位で高濃度に産生することができる。それに加え、A P C を使用する場合、外因性の改変体共刺激性分子を発現する A P C が、関与 T 細胞へアロ抗原または抗原ペプチドを提示する同一の A P C となり得る。改変体 B 7-D C は、A P C により分泌され、またはその表面上に発現することができる。

#### 【0175】

核酸治療は、哺乳動物の体細胞性組織または器官内にインビボで機能活性な D N A を直接移入することにより、実現することができる。例えば、B 7-D C 変異体ポリペプチドをコードする核酸は、リンパ系組織へ直接、投与することができる。あるいは、リンパ系組織特異的ターゲティングを、B 細胞、T 細胞、または樹状細胞特異的な T R E などのリンパ系組織特異的な転写調節エレメント (T R E) を用いて、実現することができる。リンパ系組織特異的 T R E には、例えば、当技術分野で公知のものが含まれる [例えば、T h o m p s o n ら (1992 年) M o l . C e l l . B i o l . 12 巻、1043 ~ 1053 頁; T o d d ら (1993 年) J . E x p . M e d . 177 巻、1663 ~ 1674 頁および P e n i x ら (1993 年) J . E x p . M e d . 178 巻、1483 ~ 1496 頁を参照されたい]。

#### 【0176】

D N A 移入は、下記の多くの手法を用いて実現することができる。こうした系は、D N A を発現するトランスフェクト済みクローンを選択するための選択マーカー (例えば G 418 抵抗性) の使用により、続いて、適当な免疫アッセイにおける当該産物に対する抗体を用いた、B 7-H 4 発現産物の存在の検出 (誘導系の場合は誘導因子で処理した後) により、インビトロでの首尾よい発現について試験することができる。D N A の取込み、プラスミドへの組込みおよび組込み済みプラスミドの安定性を含む、この手順の効率は、既知の方法を用いたプラスミド D N A の線状化、および高分子量哺乳類 D N A を「担体」として用いた共トランスフェクションにより、改善することができる。

#### 【0177】

当技術分野で報告されている首尾よい「遺伝移入」の例には、(a) プラスミド D N A のマウス筋肉組織中への直接注射による、マーカー遺伝子が無期限発現に導く (W o l f

10

20

30

40

50

f, J. A. ら、Science 247巻、1465頁(1990年); Acasadi, G. ら、The New Biologist 3巻、71頁(1991年)、(b)レトロウイルスベクターは、血管組織のインビボおよびインサイチュ(in situ)感染に有効であること、(c)レトロウイルス調製物の肝臓内への門脈注射および直接注射は、遺伝子移入およびインビボ発現を起こしたこと(Horzaglou, M. ら、J. Biol. Chem. 265巻、17285頁(1990年); Koleko, M. ら、Human Gene Therapy 2巻、27頁(1991年); Ferry, N. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88巻、8387頁(1991年))、(d)組換えアデノウイルスの肺組織内への気管内注入は、肺呼吸上皮における外来遺伝子のインビボ遺伝子移入および長期発現に有効であったこと(Rosenfeld, M. A. ら、Science 252巻、431頁(1991年))、(e)単純疱疹ウイルスベクターは、脳組織中へのインビボ移入を実現したこと(Ahmad, F. ら編、Miami Short Reports - Advances in Gene Technology: The Molecular Biology of Human Genetic Disease、1巻、Boerringer Mannheim Biochemicals、USA、1991年)が含まれる。

#### 【0178】

レトロウイルス媒介ヒト治療は、アンホトロフィックな(amphotrophic)複製欠損レトロウイルス系を利用する(Temin, H. M.、Human Gene Therapy 1巻、111頁(1990年); Temin ら、米国特許第4980289号; Temin ら、米国特許第4650764号; Temin ら、米国特許第5124263号; Wills, J. W. 米国特許第5175099号; Miller, A. D.、米国特許第4861719号)。このようなベクターを使用して、機能的DNAをヒトの細胞または組織内に、例えば、アデノシンデアミナーゼ遺伝子をリンパ球内に、NPT-1I 遺伝子および腫瘍壊死因子に関する遺伝子を腫瘍浸潤リンパ球内に導入してきた。レトロウイルス媒介遺伝子送達には、一般に、遺伝子移入のために標的細胞の増殖が必要である(Miller, D. G. ら、Mol. Cell. Biol. 10巻、4239頁(1990年))。この条件は、本DNA分子を導入しようとする好ましい標的細胞のうちの特定のもの、即ち、増殖活発な腫瘍細胞によって満たされる。多くの方法のいずれかを用いたプラスミドによる、およびレトロウイルスベクターによるトランスフェクションを使用した嚢胞性線維症の遺伝子治療は、Collins らの米国特許第5240846号により記載されている。

#### 【0179】

改変体B7-DCポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする核酸分子は、当技術分野で周知のように、複製欠損レトロウイルスを生成するパッケージング細胞系を用いて、レトロウイルスベクター中にパッケージングし得る(例えば、Cone, R. D. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81巻、6349~6353頁(1984年); Mann, R. F. ら、Cell 33巻、153~159頁(1983年); Miller, A. D. ら、Molec. Cell. Biol. 5巻、431~437頁(1985年); Sorge, J. ら、Molec. Cell. Biol. 4巻、1730~1737頁(1984年); Hock, R. A. ら、Nature 320巻、257頁(1986年); Miller, A. D. ら、Molec. Cell. Biol. 6巻、2895~2902頁(1986年)を参照されたい)。遺伝子移入に効率的で安全な、より新しいパッケージング細胞系も、記載されている(Bank ら、米国特許第5278056号)。

#### 【0180】

この手法は、選定した組織または器官にレトロウイルスベクターを送達するために、部位特異的様式で利用することができる。したがって、例えばカテーテル送達システムを使用することができる(Nabel, E. G. ら、Science 244巻、1342頁

10

20

30

40

50

(1989年))。レトロウイルスベクターまたはリボソームベクターのいずれかを用いるこのような方法は、発現させようとする核酸を、血管壁に、または腫瘍の血流中に送達するのに特に有用である。

#### 【0181】

他のウイルスベクターも、組換えアデノウイルス (Horowitz, M. S., Virology 内、Fields, B Nら編、Raven Press、New York、1990年、1679頁; Berkner, K. L., Biotechniques 6巻、616 9191988)、Strauss, S. E., The Adenoviruses、Ginsberg, H S編、Plenum Press、New York、1984年、11章内)、神経細胞特異的な送達および持続のための単純疱疹ウイルス (HSV) を含めて使用し得る。ヒト遺伝子治療にとってのアデノウイルスの利点には、組換えが稀であり、このようなウイルスに関係するヒトの悪性疾患は知られておらず、アデノウイルスゲノムは、サイズが7.5 kbまでの外来遺伝子を受け容れるように操作できる2本鎖DNAであり、さらに生のアデノウイルスは安全なヒトワクチン有機体であるという事実が含まれる。アデノ随伴ウイルスも、ヒトの治療にとって有用である (Samulski, R. J. ら、EMBO J. 10巻、3941頁 (1991年))。

10

#### 【0182】

開示するDNA分子を発現でき、本治療状況、特にヒトに有用な別のベクターは、ワクシニアウイルスであり、これは非複製的にすることができる (米国特許第5225336号、第5204243号、第5155020号、第4769330号、Sutter, G. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992年) 89巻、10847~10851頁; Fuerst, T. R. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989年) 86巻、2549~2553頁; Falkner, F. G. ら、Nucl. Acids Res (1987年) 15巻、7192頁; Chakrabarti, S ら、Molec. Cell. Biol. (1985年) 5巻、3403~3409頁)。組換えワクシニアウイルスおよび異種DNAを含有する他のウイルス、ならびに免疫およびDNA治療におけるそれらの使用に関する説明は、Moss, B., Curr. Opin. Genet. Dev. (1993年) 3巻、86~90頁; Moss, B., Biotechnology (1992年) 20巻、345~362頁; Moss, B., Curr Top Microbiol Immunol (1992年) 158巻、25~38頁; Moss, B., Science (1991年) 252巻、1662~1667頁; Piccini, A ら、Adv. Virus Res. (1988年) 34巻、43~64頁; Moss, B. ら、Gene Amplif Anal (1983年) 3巻、201~213頁に総説されている。

20

30

#### 【0183】

裸のDNAもしくはRNA、またはウイルスベクター以外に、操作された細菌もベクターとして使用し得る。サルモネラ、BCGおよびListeria monocytogenes (LM) を含む多くの細菌株 (Hoiseth & Stocker, Nature 291巻、238~239頁 (1981年); Poirier, T P ら、J. Exp. Med. 168巻、25~32頁 (1988年); (Sadoff, J. C. ら、Science 240巻、336~338頁 (1988年); Stover, C. K. ら、Nature 351巻、456~460頁 (1991年); Aldovini, A. ら、Nature 351巻、479~482頁 (1991年); Schaffer, R. ら、J. Immunol. 149巻、53~59頁 (1992年); Ikonomidis, G. ら、J. Exp. Med. 180巻、2209~2218頁 (1994年))。こうした有機体は、ワクチンベクターとして使用するための2つの有望な特性: (1) 経口ワクチン送達の可能性を示す腸感染経路、および (2) 単球/マクロファージに感染することによる、専門的APCにとっての抗原の標的

40

50

化を示す。

【0184】

インビボでのウイルス媒介遺伝子移入の他に、当技術分野で周知の物理的手段も、DNAの直接移入のために使用できるが、それには、プラスミドDNAの投与（Wolfら、1990年、上記）、および粒子衝突（particle-bombardment）媒介遺伝子移入（Yang, N. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87巻、9568頁（1990年）；Williams, R. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88巻、2726頁（1991年）；Zelenin, A. V. ら、FEBS Lett. 280巻、94頁（1991年）；Zelenin, A. V. ら、FEBS Lett. 244巻、65頁（1989年）；Johnston, S. A. ら、In Vitro Cell. Dev. Biol. 27巻、11頁（1991年））が含まれる。さらに、インビトロで細胞中に遺伝子に移入する周知の手段であるエレクトロポレーションを用いて、DNA分子をインビボで組織に移入することができる（Titomirov, A. V. ら、Biochim. Biophys. Acta 1088巻、131頁（1991年））。

10

【0185】

「担体媒介遺伝子移入」も、記載されている（Wu, C. H. ら、J. Biol. Chem. 264巻、16985頁（1989年）；Wu, G. Y. ら、J. Biol. Chem. 263巻、14621頁（1988年）；Soriano, P. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80巻、7128頁（1983年）；Wang, C-Y. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84巻、7851頁（1982年）；Wilson, J. M. ら、J. Biol. Chem. 267巻、963頁（1992年））。好ましい担体は、標的指向リポソーム（Nicolaou, C. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80巻、1068頁（1983年）；Sorianoら、上記）であり、脂質二重層中にアシル化mAbを組み入れることができる免疫リポソームなどがある（Wangら、上記）。アシアログリコプロテイン／ポリリシン（Wuら、1989年 上記）などのポリカチオンを使用してもよく、そのコンジュゲートは、標的組織を認識する分子（例えば、肝臓に対するアシアロオロソムコイド）およびトランスフェクトしようとするDNAに結合するためのDNA結合性化合物を含む。ポリリシンは、損傷を与えずにDNAに結合するDNA結合性分子の例である。次いで、このコンジュゲートをプラスミドDNAと複合する。

20

30

【0186】

トランスフェクションまたはマイクロインジェクションに使用されるプラスミドDNAは、当技術分野で周知の方法、例えば、Qiagen手順（Qiagen）を用いた後、本明細書に例示した方法などの既知の方法を用いたDNA精製を使用して、調製し得る。

【0187】

E. 投与量

改変体B7-DCポリペプチド、改変体B7-DC融合タンパク質、B7-DCポリペプチドおよび改変体B7-DC融合タンパク質をコードする核酸については、さらなる研究が行われるにつれて、多様な患者の多様な病態を治療するための適当な投与量レベルに関して、情報が明らかとなり、また、当業者であれば、受容者の治療状況、年齢および健康状態を考慮して、適切な投薬を確かめることができる。選択される投与量は、所望の治療効果、投与経路、および所望の治療期間に依存する。一般に、1日当たり0.001～10mg/kg体重の投与量レベルが、哺乳動物に投与される。一般に、静脈内注射または注入の場合、投与量がより少なくなり得る。

40

【実施例】

【0188】

50

本発明は、以下の非限定的な実施例を参照することによって、さらに理解を深め得る。

#### 【0189】

(実施例1)

B7-D Cの分子モデリングおよび三次元での配列分析

材料および方法：

ヒトB7-H1 (hB7-H1)、マウスB7-H1 (mB7-H1)、ヒトB7-D C (hB7-D C) およびマウスB7-D C (mB7-D C) のIg V型ドメインの分子モデルを、CD80/CTLA-4およびCD86/CTLA-4複合体の構造に見られるようなヒトCD80およびCD86のX線座標に基づいて、ホモロジー（または比較）モデリングにより生成した。まず、CD80およびCD86のVドメインを最適に重ね合わせ、B7ファミリーメンバーの配列をこの重ね合せに基づいて整列させた。重ね合せおよび初期整列は、MOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group, Montreal, Quebec, Canada) の配列-構造整列機能を用いて実施した。次いで、整列を、Ig コンセンサス位置を合わせ、標的配列中の他の保存された疎水性残基をX線構造のコア位置に位置付けるように、手操作で調整した。したがって、整列配列中の対応残基は、大まかに等価な空間位置を占めていると予測された。この種の構造情報を考慮することは、この事例のように同一性が低い場合、配列同一性だけより、信頼性のより高い整列規準である。整列領域では、2種の構造鋳型CD80およびCD86に対して比較されたB7配列の平均同一性は、わずかに約16%であった。モデル構築の基礎となる、構造指向的配列整列の最終版は、図5に示されている。整列に続いて、4種のモデルのコア領域は、構造鋳型からMOEで自動的に組み立てられ、ループ領域の挿入および欠失は、セグメント合致手順を適用してモデル化した (Levitt, J. Mol. Biol., 226巻、507~533頁 (1992年) およびFechtelerら、J. Mol. Biol., 253巻、114~131頁 (1995年))。側鎖の置換は、高分解能タンパク質データバンク構造に見られる、好ましい回転異性体のコンホメーションを用いて実施した (Ponder and Richards, J. Mol. Biol., 193巻、775~791頁 (1987年) およびBermanら、Nuc l. Acid s Res., 28巻、235~242頁 (2000年))。各事例において、12種の間中モデルを生成し、平均座標を計算し、さらに得られた構造に対して、各モデルの分子内接触および立体化学が妥当になるまで、タンパク質力場を用いてエネルギー最小化を行った (Eng h and Huber, Ada Cryst., A47巻、392~400頁 (1991年))。溶媒接近可能表面の計算 (Connolly, J. Appl. Cryst., 16巻、548~558頁 (1983年)) を含むモデルのグラフ分析および残基マッピング研究は、Insight II (Accelrys, San Diego, California) を用いて実施した。

#### 【0190】

結果：

CD80およびCD86のV領域は、限られた配列同一性しか共有しない (約20%) が、それらの三次元構造は、個々の結晶学的解析研究で明らかのように非常に類似している。CD80/CD86に見られるコアまたはIg スーパーファミリーコンセンサス残基の多くの位置も、B7-H1およびB7-D Cを含む他のB7ファミリーメンバーにおいて、保存されており、または保存的に置換されている (図5)。

#### 【0191】

マウスおよびヒトのB7-H1およびB7-D C分子の分子モデルが、構築された。これらのモデルから、V領域では、B7-H1およびB7-D Cは、B7ファミリー全体の平均値より高い配列同一性、即ち約34%を共有することが判明した。B7-H1およびB7-D Cは共にPD-1に結合するので、残基保存は、その受容体結合構造の形成にとって重要となり得る。したがって、こうしたモデルを用いて、タンパク質表面上に露出している保存残基の推定分布を比較した。これらの分子モデルの並列比較によって、B7-

H1およびB7-DCのBED面上では表面残基の相当な保存が明らかとなり、マウスタンパク質よりヒトタンパク質で顕著であった。対照的に、反対のA'GFCC'C"面は、さほど残基保存を示さなかった。この結果は、CD80、CD86双方の対応するA'GFCC'C"面がCD28/CTLA-4結合部位を含有するので、やや意外であった。

#### 【0192】

(実施例2)

受容体結合部位の変異誘発分析

材料および方法：

マウスおよび細胞系：

C57BL/6 (B6) 雌性マウスを国立癌研究所 (Frederick, MD) から購入した。PD-1欠損 (PD-1<sup>-/-</sup>) マウスを以前に記載されたように生成した (Nishimuraら、Int. Immunol.、10巻、1563~1572頁 (1998年))。融合タンパク質を分泌する、安定にトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞クローンを、1%の透析したウシ胎仔血清 (FBS; HyClone、Logan、UT) を補給したCHO-SFII培地 (Invitrogen Life Technologies) 中で維持した。リンパ球およびCOS細胞を、10% FBS、25mM HEPES、2mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、1% MEM非必須アミノ酸、100U/ml ペニシリンGおよび100μg/ml 硫酸ストレプトマイシンを補給した、ダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM; Invitrogen Life Technologies) 中で増殖させた。

#### 【0193】

部位指定変異誘発：

B7-DCIgの全ての改変体は、鋳型としてB7-DCIg cDNAを用いた2段階PCR法を用いて構築した。所望の変異をコードするために、重複オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、2つの5'および3'隣接プライマーを、各々EcoRIおよびBglII制限酵素部位を含有するように設計した。cDNAの適当な領域は、対応する重複および隣接プライマーを用いて増幅した。5'および3'隣接プライマーを用いて、重複配列を有する断片を一緒に融合し、増幅した。PCR産物は、EcoRIおよびBglIIで消化し、EcoRI/BglIIで消化したpHIgベクター中に連結した。所望の変異が導入されたことを確認するために、各改変体は、ABI Prism 310 Genetic Analyzerを用いて配列決定した。プラスミドをCOS細胞中にトランスフェクトし、無血清上清を採集し、インビトロ結合アッセイのために使用し、またはBIAcore分析および機能分析のためにプロテインGカラム上で単離した。

#### 【0194】

Ig融合タンパク質：

マウスIgG2aのFc部分に連結したマウスPD-1の細胞外ドメインを含有する融合タンパク質 (PD-1 Ig) を、安定にトランスフェクトしたCHO細胞中で産生し、既述したように (Wandra、上記) プロテインGアフィニティカラムにより単離した。全RNAをマウス脾臓細胞から単離し、B7-DC cDNAを逆転写PCRにより取得した。マウスB7-DCIgを、ヒトIgG1のCH2-CH3部分とフレーム内で連結したマウスB7-DCの細胞外ドメインを含む、キメラcDNAを含有するプラスミドでCOS細胞を一時的にトランスフェクトすることにより、調製した。ヒトB7-DCIgを、ヒトIgG1のCH2-CH3部分とフレーム内で連結したヒトB7-DCの細胞外ドメインを含む、キメラcDNAを含有するプラスミドでCOS細胞を一時的にトランスフェクトすることにより、調製した。トランスフェクトしたCOS細胞は、無血清DMEM中で培養し、濃縮上清を、初期結合アッセイ用のIg融合タンパク質源として使用した。Igタンパク質を、既述したように (Wandra、上記)、BIAcore分析および機能分析のためにプロテインGカラム上でさらに単離した。

## 【0195】

## E L I S A :

B7-DCIgに特異的なサンドイッチELISAを確立した。マイクロタイタープレートを25 µg/mlのヤギ抗ヒトIgG (Sigma, St. Louis, MO)で終夜4℃で被覆した。ウェルをブロッキングバッファー (PBS中10% FBS)で1時間ブロックし、0.05% Tween 20を含有するPBS (PBS-Tween)で洗浄した。COS細胞培養上清を添加し、室温で2時間インキュベートした。標準曲線を作成するために、既知濃度の単離B7-DCIgも、各プレート上の個々のウェルに添加した。徹底的な洗浄後、1:2000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG (TAGO, Inc., Burlingame, CA)を添加し、その後TMB基質で発現した後、0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の添加で反応を停止させた。吸光度をマイクロタイタープレートリーダー上で405 nmで測定した。改変体融合タンパク質の濃度は、B7-DCIgの標準曲線の直線範囲と比較することにより、決定した。三つ組のウェルのテータを収集し、平均値からの標準偏差は<10%であった。実験は、少なくとも3回繰り返した。

10

## 【0196】

変異体および野生型のB7-DCIg融合ポリペプチドがPD-1と結合する能力は、捕捉ELISAアッセイを用いて測定した。組換えPD-1 Ig融合タンパク質を、マイクロタイタープレート上に5 µg/mlで終夜4℃で被覆した。プレートをブロックし、洗浄し、COS細胞培地を添加し、室温で2時間インキュベートした。徹底的な洗浄後、HRPコンジュゲートヤギ抗ヒトIgGを添加した後、TMB基質を添加し、吸光度を405 nmで測定した。

20

## 【0197】

## フローサイトメトリー:

ヒト胚性腎293細胞を、全長マウスPD-1 cDNAのC末端とフレーム内でGFP (緑色蛍光タンパク質cDNA)を融合することにより構築した、PD-1 GFPベクターでトランスフェクトした。その細胞をトランスフェクションから24時間後に採集し、45分間氷上のCOS細胞培地中で、野生型B7-DCIgを用いて力価を予め決定した等量の融合タンパク質と共に、FACS (蛍光活性化細胞分取) バッファー (PBS、3% FBS、0.02% NaN<sub>3</sub>) 中でインキュベートした。ヒトIgを含有する無関係な融合タンパク質を、陰性対照として使用した。細胞を洗浄し、フルオレセインイソチオシアネート (PE) コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG (BioSource, Camarillo, CA)と共にさらにインキュベートし、Cell Questソフトウェア (Becton Dickinson)を用いたFACS caliber (Becton Dickinson, Mountain View, CA)上で分析した。GFP陽性細胞は、FL1でゲート (gate) した。

30

## 【0198】

## 表面プラズモン共鳴分析:

野生型および改変体の単離B7-DCポリペプチドの親和性を、BIAcore (商標) 3000計器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden)上で分析した。融合タンパク質以外の全ての試薬を購入し、予備ろ過し、BIAcoreから脱気した。全ての実験は、操作バッファーとして0.1M HEPES、0.15M NaCl (pH 7.4)を用いて25℃で行った。手短に言えば、PD-1 Igを、BIAcore手順に従ったアミンカップリングによって、CM5センサーチップ (BIAcore)上にまず固定化した。CM5チップのフローセルは、1:1 EDC:NHS [N-エチル-N'- (ジエチルアミノプロピル) カルボジイミド:N-ヒドロキススクシンイミド] 混合物を7分間注入後、10mM酢酸ナトリウム (pH 4.5) 中で希釈したPD-1 Igの20 µg/mlを10 µl/分で注入することにより、誘導体化した。PD-1 Igは、2000RUで固定化した。この後、残存する活性化カルボキシル基を1Mエタノールアミン (pH 8.5)でブロックした。対照フローセルは、PD-1 Igの代わりに操作

40

50

バッファーだけを代用して上記と同様に調製した。融合タンパク質は、3.75、7.5、15、30および60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度系列に操作バッファー中で希釈した。該タンパク質は、20  $\mu\text{l}$  /分の流速で3分間注入し、解離データのために、バッファーを表面上に5分間流した。フローセルは、10mM NaOHの30秒パルス1回で再生した。データ解析は、BIAevaluationソフトウェアパッケージ3.1 (BIAcore) を用いて行った。

#### 【0199】

結果：

分子モデルを補助にして、B7-DCのVドメインを重要な残基について走査した。B7-DCおよびA'GFCC'C"の両面上にある保存残基および非保存残基を、部位特異的な変異誘発のために選定した。マウス分子中の残基を、選定した変異タンパク質の機能研究が後で可能になるように、変異させた。得られた改変体ポリペプチドの結合特性は、特異的なELISAおよびFACS分析により、PD-1との結合性について評価した。mB7-DCを改変体合計17種調製し、試験した。その結果は表1にまとめてある。mB7-DC内の特定残基は、変異によって、FACSによる結合減少が少なくとも50%、またはELISAによって減少が少なくとも1桁起こった場合にのみ、リガンド-受容体相互作用にとって重要であると見なした。

#### 【0200】

これらの残基の約半数の変異は、mPD-1に対する結合性を有意に失った。特に、mB7-DC残基のE71、I105、D111およびK113は、mPD-1に対する結合性にとって重要であると確認された。mB7-DC中の残基S58の変異は、ELISAで決定した場合、mPD-1に対する結合性を増加させた。したがって、この残基は、必ず受容体-リガンド界面に近接しており、置換に対するある程度の寛容を有するだけでなく、結合相互作用の潜在的な最適化も有している。

#### 【0201】

ヒトB7-DCの改変体も、ELISAおよびFACS分析を用いてPD-1に対する結合性について試験した。hB7-DC残基のK113およびD111の変異は、PD-1に対する結合性にとって重要であると確認された。FACS分析の結果は、図7に示してある。

#### 【0202】

10

20

30

【表 1】

表 1：マウス B7-D C 変異体のアミノ酸置換および結合特性の概要

| 変異体 <sup>a</sup> | 部位        | 置換 <sup>b</sup> |      | PD-1 結合性          |                        |
|------------------|-----------|-----------------|------|-------------------|------------------------|
|                  |           | 核酸              | アミノ酸 | FACS <sup>c</sup> | ELISA (%) <sup>d</sup> |
| B7-DC            |           |                 |      | ++++              | 100                    |
| D33S             | A' ストランド  | GAC→AGC         | D→S  | ++++              | 30                     |
| S39Y             | B ストランド   | AGC→TAC         | S→Y  | ++++              | 60                     |
| E41S             | B ストランド   | GAG→AGC         | E→S  | ++++              | 100                    |
| R56S             | C ストランド   | AGA→TCT         | R→S  | +++ / ++          | 5                      |
| S58Y             | C ストランド   | AGT→TAC         | S→Y  | ++++              | 170                    |
| D65S             | C' ストランド  | GAT→AGC         | D→S  | ++++              | 100                    |
| S67Y             | C' ストランド  | TCT→TAC         | S→Y  | +++ / ++          | 3                      |
| E71S             | C'' ストランド | GAA→AGC         | E→S  | +++ / ++          | 2                      |
| R72S             | C'' ストランド | AGA→AGC         | R→S  | ++++              | 60                     |
| K84S             | D ストランド   | AAG→AGC         | K→S  | +++ / +++++       | 13                     |
| H88A             | E ストランド   | CAC→GCC         | H→A  | +++ / +++++       | 20                     |
| R101S            | F ストランド   | CGT→AGC         | R→S  | +++               | 7                      |
| L103A            | F ストランド   | CTG→GCC         | L→A  | +++               | 25                     |
| I105A            | F ストランド   | ATC→GCC         | I→A  | ++                | 0.5                    |
| D111S            | G ストランド   | GAC→AGC         | D→S  | ++                | 0.3                    |
| K113S            | G ストランド   | AAG→AGC         | K→S  | - / +             | <0.1                   |
| T116Y            | G ストランド   | ACG→TAC         | T→Y  | +++ / +++++       | 20                     |

10

20

30

反対の A' G F C C' C'' 面上の等価領域に位置付けられた PD-1 結合部位。結合部位領域の位置付けから、変異が PD-1 結合性に負（または正）に影響する残基は、両リガンドにおいて干渉性表面を形成できることが明らかになった。結合にとって重要な残基と重要でない一部の残基との近接性からも、観察された効果が、特異的であって、全体的構造変化の結果ではないことが示唆された。重要な残基位置の比較によって、m B7-D C における推定結合部位の位置は、C D 8 6 および C D 8 0 における C D 2 8 / C T L A - 4 結合部位に密接に対応することが確認された。

## 【0203】

野生型および変異体タンパク質の PD-1 との結合に関する表面プラズモン共鳴分析は、FACS および ELISA 分析の結果と大体一致していた。野生型 B7-D C タンパク質は、227RU の  $R_{max}$  を有しており、B7-D C 改変体 K113 は、PD-1 に全く結合しなかった（図 6）。こうしたデータは、野生型 B7-D C が、変異体 K113 より大きな、PD-1 に対する定常状態親和性を有することを実証した。B7-D C K113 改変体は、野生型 B7-D C と比較して遅いオンおよびオフ速度を示し、またはそのような速度を全く示さなかった。

40

## 【0204】

（実施例 3）

B7-D C 改変体の共刺激性機能

材料および方法：

50

T細胞の増殖およびサイトカインアッセイ：

野生型 B 6 マウスまたは PD-1<sup>-/-</sup>マウスの T 細胞を、既述したように (Wang ら、上記)、ナイロンウールカラム (Robbins Scientific Co、Sunnyvale、CA) を用いて単離した。富化 T 細胞を、融合または対照ポリペプチド 5 μg/ml の存在下、抗 CD3 mAb (クローン 145-2C11、Pharmingen、San Diego、CA) で予備被覆した平底 96 ウェルマイクロプレート中で、3 × 10<sup>5</sup> 細胞/ウェルで培養した。T 細胞の増殖は、3 日培養の最後の 12 時間中における 1 μCi/ウェルの <sup>3</sup>H-TdR を取り込むことによって、決定した。<sup>3</sup>H-TdR の取込みは、MicroBeta Trilux 液体シンチレーションカウンター (Wallac、Finland) を用いて計数した。サイトカインを検出するために、培養上清を様々な時点で収集し、IFN-γ の濃度を、製造業者の教示 (Pharmingen) に従ったサンドイッチ ELISA により測定した。

10

【0205】

結果：

選定した改変体の共刺激能も試験した。B7-DC 改変体の K113 および D111 が、分析用に選択された。K113 および D111 は共に、FACS および ELISA の両アッセイにおいて PD-1 に対する最小限の結合性を示した (表 1)。図 8A および 8B に示すように、これらの改変体は、野生型 B7-DC と比較して、T 細胞の増殖および IFN-γ の産生を依然として共刺激することができた。

【0206】

20

B7-DC は、未知の受容体を介して T 細胞の増殖を共刺激し得るが、以上の知見は、未確認の共刺激性受容体 (複数可) および PD-1 の統合的刺激効果と解釈することができる。したがって、B7-DC 改変体の共刺激効果を PD-1 欠損 T 細胞において試験した。野生型および改変体の B7-DC ポリペプチドは、PD-1<sup>+/+</sup>細胞と同様に、またはそれより良好に PD-1<sup>-/-</sup> T 細胞の増殖を共刺激した (図 8A と比較した図 9)。したがって、以上の観察は、B7-DC が、非 PD-1 受容体を介して T 細胞の増殖を共刺激することを強く示唆している。

【0207】

(実施例 4)

免疫適格および免疫不全の同系マウスにおける腫瘍細胞の増殖に対する野生型および改変体 B7-DC の効果

30

上記の実施例は、抑制的受容体のプログラム死-1 (PD-1) に対する結合性を失った B7-DC 変異体が、T 細胞に対する共刺激機能を保持していることを示す。これらの結果は、B7-DC 変異体が、抗腫瘍免疫応答の増強に適用し得ることを示している。したがって、B7-DC および B7-DC 改変体が、まるごとの動物において抗腫瘍免疫を刺激する能力を調べた。点変異をコードする cDNA を含有したプラスミド K113S B7-DC を、エレクトロポレーションによってマウス腫瘍系 EG7 中にトランスフェクトした。K113S B7-DC を安定に発現する EG7 細胞系を樹立した。EG7 トランスフェクタントの垂系 EG7/K113S の細胞表面における B7-DC の発現は、B7-DC に特異的なモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー分析で示された。EG7 細胞を、陰性対照としての親プラスミド (偽物) または追加対照としての野生型 B7-DC を含有するプラスミド (EG7/Wt B7-DC) のいずれかでトランスフェクトした。偽物トランスフェクト EG7 細胞 (mock EG7 transfectant cell) は、検出可能な B7-DC を発現しないが、wt B7-DC 安定トランスフェクタントは、K113S B7-DC で安定にトランスフェクトされた細胞と同等量の B7-DC を発現する。

40

【0208】

免疫適格な同系の C57BL/6 マウス 10 匹に EG7/K113S 細胞を皮下接種すると、結節としての腫瘍の一時的増殖が誘発された。しかし、これらの腫瘍は急速に消失した。20 日目に、全ての腫瘍が完全に消失した。対照的に、偽物 EG7 系の接種は、次

50

第に増殖する腫瘍を誘発し、最終的に30～40日でマウスが死んだ。Wt B7-DC系の細胞によるマウスの接種も、次第に増殖する腫瘍を誘発した。しかし、その増殖は、偽物EG7系より遥かに遅かった(図10)。

#### 【0209】

以上の結果は、腫瘍細胞上のK113S B7-DCの発現が、免疫適格マウスにおいて腫瘍の消失を誘発することを示唆するが、この効果が免疫系に媒介されているか否かは不明である。これを確認するために、K113S B7-DC細胞を免疫欠損ヌードマウスの皮下に導入した。その結果は、EG7/K113S細胞が、偽物系およびWt B7-DC系の細胞と類似の増殖速度を有しており、腫瘍は消失しなかった(図11)。したがって、以上の結果は、腫瘍消失が免疫系に媒介され、K113S B7-DCの発現が、強い免疫応答を刺激することを実証している。

10

#### 【0210】

K113S B7-DCによる抗腫瘍免疫の刺激が、EG7腫瘍細胞に限らないことを実証するために、安定にトランスフェクトされたマウスP815肥満細胞腫細胞を用いて同様な実験を行った。対照細胞系を樹立するために、K113S B7-DC、親プラスミドならびにWt B7-DCを含有するプラスミドも、トランスフェクトした。類似のレベルのB7-DCを発現する腫瘍細胞の亜系を、上記のような特異抗体を用いたフローサイトメトリ分析の後に選択した。EG7/K113S腫瘍系と同様に、免疫適格な同系のDBA/2マウス10匹にP815/K113S細胞を皮下接種すると、一時的増殖が誘発され、全ての腫瘍は急速に消失した。偽物をトランスフェクトしたP815細胞の接種は、次第に増殖する腫瘍を誘発したが、P815/Wt B7-DC細胞の注射も、次第に増殖する腫瘍を誘発した。しかし、その増殖は、偽物P815系より遥かに遅かった(図12)。これらの腫瘍系を免疫欠損nu/nuマウスに接種すると、類似の速度で腫瘍の増殖が誘発された(図13)ため、B7-DCトランスフェクタントの増殖抵抗性には、免疫系が役割を演じていることが支持された。

20

#### 【0211】

(実施例5)

マウスにおける腫瘍増殖に対するB7-DC Igの治療効果

腫瘍増殖に対するB7-DCタンパク質の治療効果を決定するために、免疫適格なマウス中で樹立したP815腫瘍を有するマウスを、B7-DC Ig融合タンパク質で処置した。wt P815細胞をマウス中に接種すると、次第に増殖する腫瘍を誘発した。B7-DC Igを0.1mgマウスの腹腔内に3日目および8日目に注射すると、腫瘍の増殖が阻害された(図14)。

30

#### 【0212】

別途明記しない限り、本明細書に使用する全ての技術用語および科学用語は、開示した発明が属する技術分野の技術者が通常理解している意味と同じ意味を有する。

#### 【0213】

当業者であれば、本明細書に記載する本発明の特定の実施形態に対する多くの等価形態を認識され、または単なる常套的実験を用いて、それらを確認することができる。このような等価形態は、以下の特許請求の範囲に包含されることを意図している。

40

【图 2】

MetLeuLeuLeuProIleLeuAsnLeuSerLeuGlnLeuHisProValAlaAla  
LeuPheThrValThrAlaProLysGluValTyrThrValAspValGlySerSerVal  
SerLeuGluCysAspPheAspArgArgGluCysThrGluLeuGluGlyIleArgAla  
SerLeuGlnLysValGluAsnAspThrSerLeuGlnSerGluArgAlaThrLeuLeu  
GluGluGlnLeuProLeuGlyLysAlaLeuPheHisIleProSerValGlnValArg  
AspSerGlyGlnTyrArgCysLeuValIleCysGlyAlaAlaTrpAspTyrLysTyr  
LeuThrValLysValLysAlaSerTyrMetArgIleAspThrArgIleLeuGluVal  
ProGlyThrGlyGluValGlnLeuThrCysGlnAlaArgGlyTyrProLeuAlaGlu  
ValSerTrpGlnAsnValSerValProAlaAsnThrSerHisIleArgThrProGlu  
GlyLeuTyrGlnValThrSerValLeuArgLeuLysProGlnProSerArgAsnPhe  
SerCysMetPheTrpAsnAlaHisMetLysGluLeuThrSerAlaIleIleAspPro  
LeuSerArgMetGluProLysValProArgThrTrpProLeuHisValPheIlePro  
AlaCysThrIleAlaLeuIlePheLeuAlaIleValIleIleGlnArgLysArgIle

(配列番号 2)

FIG. 2

【图 5】

Sequence logos for 12 nucleotide positions (1-12) showing the conservation of nucleotides across 1000 sequences. The y-axis represents information content in bits, ranging from 0 to 1.2. The x-axis shows the 12 positions. Nucleotides are color-coded: A (green), C (blue), G (red), and T (orange).

| Position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| hCD86    | G | A | C | G | A | C | G | A | C | G  | A  | C  |
| hCD80    | G | A | C | G | A | C | G | A | C | G  | A  | C  |
| hB7-1    | G | A | C | G | A | C | G | A | C | G  | A  | C  |
| hB7-H1   | G | A | C | G | A | C | G | A | C | G  | A  | C  |
| hB7-H2   | G | A | C | G | A | C | G | A | C | G  | A  | C  |
| hB7-H3   | G | A | C | G | A | C | G | A | C | G  | A  | C  |
| hB7-D1   | G | A | C | G | A | C | G | A | C | G  | A  | C  |
| hB7-D2   | G | A | C | G | A | C | G | A | C | G  | A  | C  |
| hB7-D3   | G | A | C | G | A | C | G | A | C | G  | A  | C  |

**FIG. 5**

【图 4】

hCD86  
hCD80  
hB7-H1  
mB7-H1  
hB7-H2  
hB7-H3  
hB7-DC  
mB7-DC

hCD86  
hCD80  
hB7-H1  
mB7-H1  
hB7-H2  
hB7-H3  
hB7-DC  
mB7-DC

hCD86  
hCD80  
hB7-H1  
mB7-H1  
hB7-H2  
hB7-H3  
hB7-DC  
mB7-DC

FIG. 4

【図 6】

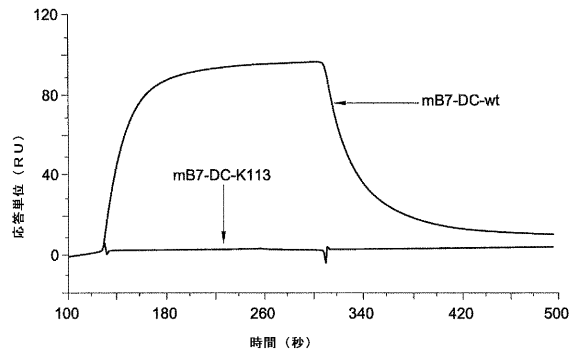


FIG. 6

【図 7】

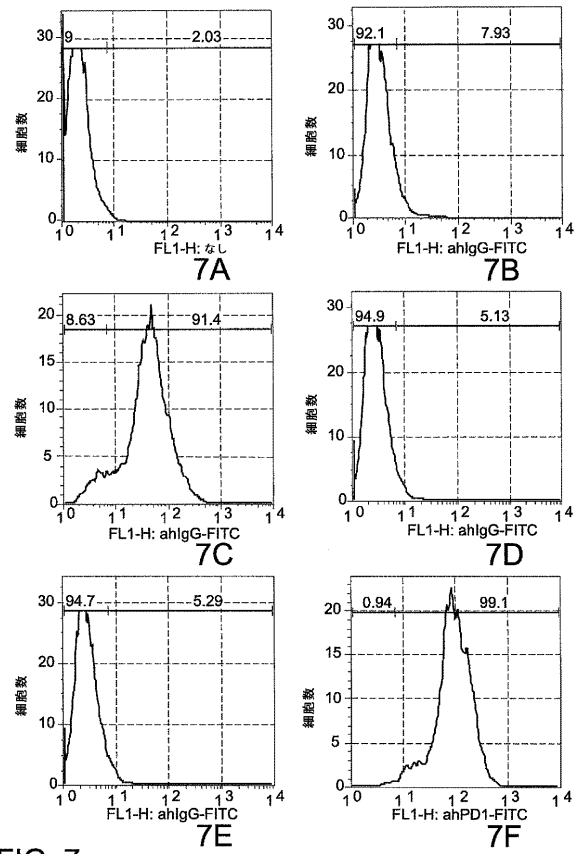
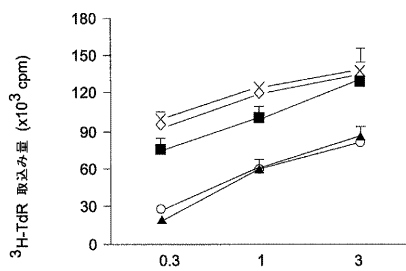
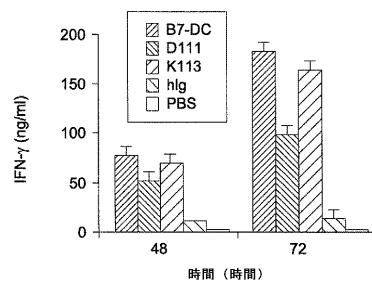


FIG. 7

【図 8】



8A



8B

FIG. 8

【図 9】

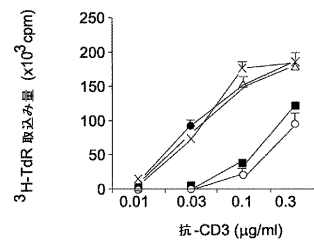


FIG. 9

【図 10】

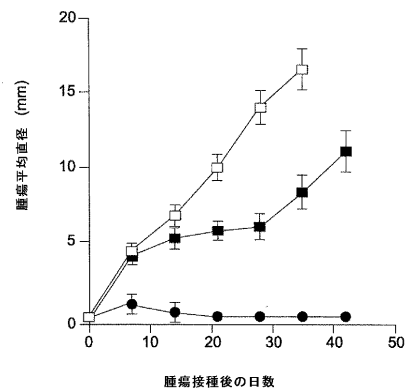


FIG. 10

【図 1 1】

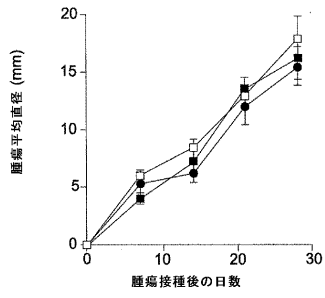


FIG. 11

【図 1 3】

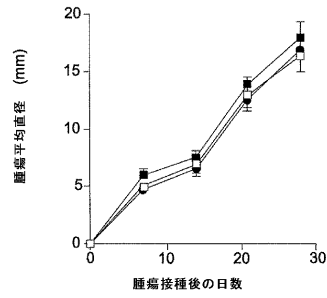


FIG. 13

【図 1 2】

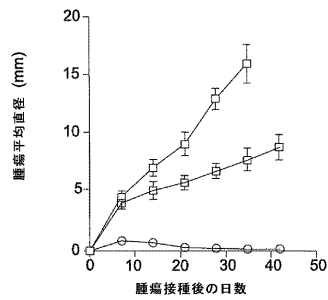


FIG. 12

【図 1 4】

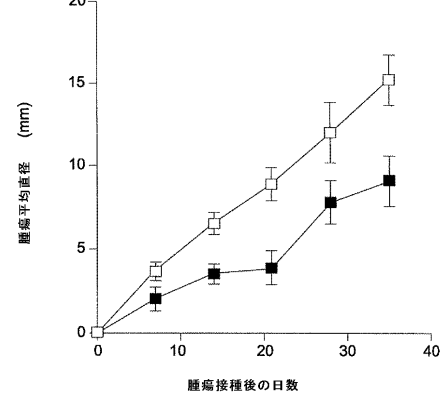


FIG. 14

【配列表】

2010533649000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2008/069819

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. C07K14/705 C12N15/12 C12N15/62 A61K38/17 A61P37/04                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                      |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                      |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                      |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                      |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                      |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                               | Relevant to claim No.                                                |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | WANG SHENGDIAN ET AL: "Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction."<br>JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 197, no. 9, 5 May 2003 (2003-05-05), pages 1083-1091, XP002517347<br>ISSN: 0022-1007<br>the whole document | 1-5,<br>12-19                                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | WO 01/83750 A (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; PARDOLL DREW M [US]; TSUCHIYA HARUO [US]; GOR) 8 November 2001 (2001-11-08)<br>the whole document                                                                                                                                                        | 1-5,<br>12-19                                                        |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                      |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                      |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>2 March 2009                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Date of mailing of the international search report<br><br>10/07/2009 |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Authorized officer<br><br>Wiame, Ilse                                |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2008/069819**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers allsearchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-4, 12-19 (all partially) and 5 (completely)

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008 /069819

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 1-4,12-19 (all partially) and 5 (completely)

An isolated variant B7-DC polypeptide or a costimulatory fragment thereof,  
wherein the variant B7-DC polypeptide is a variant of wild-type B7-DC polypeptide,  
wherein the variant B7-DC polypeptide has reduced binding affinity for PD-1 compared to wild-type B7-DC polypeptide, and  
wherein the variant B7-DC polypeptide retains the ability to increase antigen-specific proliferation of T cells, enhance production of cytokines by T cells, stimulate differentiation and effector function of T cells or promote survival of T cells;  
wherein the polypeptide comprises a substitution which replaces the amino acid at position 111 of wt murine B7-DC or human B7-DC with a serine residue.  
Fusion polypeptide comprising said B7-DC variant or costimulatory fragment thereof and use of said fusion polypeptide in a method for increasing antigen-specific proliferation of T cells, enhancing production of cytokines by T cells, stimulating differentiation and effector function of T cells or promoting survival of T cells.

2. claims: 1-4,12-19 (all partially) and 6 (completely)

Same as invention 1, but wherein the substitution replaces the amino acid at position 113 of wt human B7-DC with a serine residue.

3. claims: 1-4,12-19 (all partially) and 7 (completely)

Same as invention 1, but wherein the substitution replaces the amino acid at position 56 of wt human B7-DC with a serine residue.

4. claims: 1-4,12-19 (all partially) and 8 (completely)

Same as invention 1, but wherein the substitution replaces the amino acid at position 67 of wt human B7-DC with a tyrosine residue.

5. claims: 1-4,12-19 (all partially) and 9 (completely)

Same as invention 1, but wherein the substitution replaces the amino acid at position 71 of wt human B7-DC with a serine residue.

International Application No. PCT/US2008 /069819

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210**

6. claims: 1-4,12-19 (all partially) and 10 (completely)

Same as invention 1, but wherein the substitution replaces the amino acid at position 101 of wt human B7-DC with a serine residue.

---

7. claims: 1-4,12-19 (all partially) and 11 (completely)

Same as invention 1, but wherein the substitution replaces the amino acid at position 105 of wt murine B7-DC or human B7-DC with an alanine residue.

---

### Information on patent family members

PCT/US2008/069819

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)  
A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/12

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

(72)発明者 チェン, リーピン  
アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 1 5 2, スパークス グレンコー, セージウッド コー  
ト 1 1 5

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA06 BA08 BA22 BA23 DC50 NA14 ZB092 ZB262 ZB332  
4H045 AA10 BA10 CA40 DA50 EA20 FA74