

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6620094号
(P6620094)

(45) 発行日 令和1年12月11日(2019.12.11)

(24) 登録日 令和1年11月22日(2019.11.22)

(51) Int.Cl. F I
 GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 N
 GO 1 N 33/15 (2006.01) GO 1 N 33/15

請求項の数 2 (全 66 頁)

(21) 出願番号	特願2016-534169 (P2016-534169)	(73) 特許権者	503146324
(86) (22) 出願日	平成26年11月25日(2014.11.25)		ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス ピタル インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2016-538297 (P2016-538297A)		The Brigham and Wom en's Hospital, Inc.
(43) 公表日	平成28年12月8日(2016.12.8)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 1 1 5 ポストン フランシス ストリ ート 7 5
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/067332		
(87) 国際公開番号	W02015/081073	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成27年6月4日(2015.6.4)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成29年11月24日(2017.11.24)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	61/909, 229		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成25年11月26日(2013.11.26)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 山口 裕孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫応答を調節するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する抗FcRn抗体を含む組成物が投与される処置を受けた対象からの試料を提供する段階；

(b) 試料中のIL-12のレベルをアッセイする段階；および

(c) 対象からの試料中のIL-12のレベルが参照試料中でのレベルと比べて低い場合は、該処置が有効であることを指示し、または対象からの試料中のIL-12のレベルが参照試料中でのレベルと比べて高い場合は、該処置が有効ではないことを指示する段階を含み、

対象は自己免疫疾患を有する、その必要がある対象における処置の効力を評価するための方法。

【請求項 2】

抗体が、モノクローナル抗体もしくはその断片、ポリクローナル抗体もしくはその断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、および一本鎖抗体からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年11月26日付で出願された米国特許仮出願第61/909,229の35 U.S.C. §

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

【0002】

政府支援

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された、助成金交付番号DK53056の下での政府支援によりなされた。政府は、本発明に対して一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は、分子免疫学および細胞生物学に関する。具体的には、IgGとFcRnとの間の相互作用を調節することによりIL-12の産生を増加させるための組成物、ならびに対象においてがんおよび感染性疾患を処置するために該組成物を使用する方法が、本明細書において記述される。IgGとFcRnとの間の相互作用を調節することによりIL-12の産生を減少させるための組成物、ならびに対象において自己免疫疾患を処置するために該組成物を使用する方法も、本明細書において記述される。さまざまなサイトカインのレベルをモニタリングすることにより、対象における処置の効力を評価するための方法も、本明細書において提供される。

10

【背景技術】

【0004】

発明の背景

本明細書において引用される全ての刊行物は、各個々の刊行物または特許出願が具体的かつ個別的に参照により組み入れられることが示されたのと同じ程度に、参照によりその全体が組み入れられる。以下の記述は、本発明を理解するのに有用でありうる情報を含む。本明細書において提供される情報のいずれもが先行技術であり、または主張される本発明に関連しているということ、あるいは具体的または黙示的に言及されるいずれの刊行物も先行技術であるということ認めものではない。

20

【0005】

粘膜関門部位、特に肺、大腸(LI)、胃および頸部に生じるがんは、ヒト悪性腫瘍のかなりの部分を占める(Siegel et al., 2012)。悪性形質転換に対する結腸の感受性に寄与する一因は、その免疫抑制環境であり(MacDonald et al., 2011)、これは微生物抗原および食餌性抗原に対する寛容に必要であるが、でもまた、抑制された抗がん免疫応答を引き起こす(Revaz and Nardelli-Haefliger, 2005; Saleh and Trinchieri, 2011)。局所寛容に固有のこの否定的側面に対抗できる生理的因子を特定することは、この、そしてもしかしたら他の、粘膜部位での発がんを理解し、巧みに扱うのに不可欠である。

30

【0006】

IgGの産生および取り扱いは、とりわけIgGが恒常的な粘膜免疫グロブリン分泌の大部分を占めるLIにおいては、粘膜免疫の重要な要素である(Kozlowski et al., 1997)。腸管腔におけるIgGの存在は、大部分のマウスおよびヒト内皮細胞、上皮細胞および造血細胞において生涯にわたり発現される双方向性IgG輸送受容体FcRn (IgGに対する新生児Fc受容体)の作用に関連している(Claypool et al., 2004; Zhu et al., 2001)。FcRnは、唯一、IgGを内腔へ送達することが可能であり、また、固有層(LP)の局所免疫系へ送達される、内腔IgGおよび含IgG免疫複合体(IgG IC)を回収することも可能である(Claypool et al., 2004; Yoshida et al., 2004)。樹状細胞(DC)のような抗原提示細胞内のFcRnはまた、IgG ICとして送達された抗原のプロセッシングにおいて重要な役割を果たし、主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)クラスIおよびクラスII拘束性T細胞応答を能動的に促進するが(Baker et al., 2011; Qiao et al., 2008)、これはその代わりに、抗細菌IgG駆動性結腸炎を促進し(Kobayashi et al., 2009)、粘膜病原菌から防御しうる(Qiao et al., 2008; Yoshida et al., 2006)。

40

【0007】

細胞傷害性CD8+ T細胞媒介性の応答は効率的な抗腫瘍免疫に不可欠であることが広く受け入れられており(Pages et al., 2005)、FcRnはCD8-CD11b+ DCによるIgG複合体化抗原の

50

、非常に効率的な交差提示を可能にすることが最近になって明らかにされた(Baker et al., 2011)。特に悪性腫瘍との関連での、粘膜組織中のIgGおよびCD8- CD11b+単級由来DCの両方の存在量(Kozlowski et al., 1997; Ma et al., 2011; MacSween and Eastwood, 1980)を考へて、恒常性CD8+ T細胞応答でのおよび抗がん免疫監視機構のエフェクタとしてのFcRnの役割について調べた。含IgG免疫複合体(IgG IC)とのFcRnのライゲーションは、免疫応答の重要な調節因子である、IL-12の産生に直接関与していることを示す所見が、本明細書において記述される。したがって、がんおよび/もしくは感染性疾患を処置するためにFcRn/IgG相互作用の改変を介してIL-12産生を増加させる剤により、または自己免疫疾患を処置するためにFcRn/IgG相互作用の改変を介してIL-12産生を減少させる剤によりIL-12の産生を標的化し、それゆえ、がん、感染性疾患および自己免疫疾患を処置するための治療剤に対する要求を満たすことができる。

10

【発明の概要】

【0008】

以下の態様およびその局面は、例示かつ例証であるものと意図され、範囲の限定ではないものと意図されるシステム、組成物および方法と併せて記述および例証される。

【0009】

その必要がある対象においてIL-12産生を増加させるための組成物および方法が、本明細書において提供される。その必要がある対象においてIL-12産生を減少させるための組成物および方法も、本明細書において提供される。

【0010】

20

いくつかの局面において、IL-12産生を増加させるための組成物であって、免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む該組成物が、本明細書において記述される。

【0011】

1つの態様において、免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物は、IgGとFcRnとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増加させる。

【0012】

1つの態様において、免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物は、抗原に対する免疫応答を増加させる。

【0013】

30

1つの態様において、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3および/またはIgG4を含むIgGのいずれかのアイソタイプでありうる。

【0014】

1つの態様において、変種IgGは428位でのメチオニンのロイシンへの置換および434位でのアスパラギンのセリンへの置換を含む。

【0015】

1つの態様において、免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物は、FcRnを架橋結合できる多量体構造を作出するようにIgGまたはその変種またはその断片に結合された抗原をさらに含む。

【0016】

40

1つの態様において、免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物は、FcRnを架橋結合できる単量体構造または多量体構造を作出するようにIgGまたはその変種またはその断片と複合体化された抗原をさらに含む。

【0017】

さまざまな態様において、抗原は、腫瘍抗原、内因性抗原、細胞関連抗原、アポトーシス小体、微生物抗原、ウイルス抗原、寄生虫抗原またはそれらの組み合わせである。

【0018】

さまざまな態様において、抗原は、タンパク質もしくはそのタンパク質模倣体、ペプチドもしくはそのペプチド模倣体、脂質またはそれらの組み合わせである。

【0019】

50

いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、哺乳動物のものである。

【0020】

いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、ヒトのものである。

【0021】

いくつかの局面において、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤を含むIL-12産生を減少させるための組成物が、本明細書において記述される。

【0022】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤は、ペプチド、タンパク質、小分子、核酸、アプタマー、オリゴヌクレオチド、抗体またはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数である。

10

【0023】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する核酸剤は、FcRnに特異的なsiRNAである。

【0024】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する抗体剤は、モノクローナル抗体またはその断片、ポリクローナル抗体またはその断片、キメラ抗体、ヒト化抗体および一本鎖抗体からなる群より選択される。

【0025】

20

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤は、IgGおよびFcRnに対する結合部位を含む二重特異性剤である。

【0026】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤は、IgGの組み換えFc部分またはその生物学的に活性な部分またはそのタンパク質模倣体である。

【0027】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤は、IgGのFc部分またはその生物学的に活性な部分が哺乳動物のものである、IgGの組み換えFc部分またはその生物学的に活性な部分またはそのタンパク質模倣体

30

【0028】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤は、IgGのFc部分またはその生物学的に活性な部分がヒトのものである、IgGの組み換えFc部分またはその生物学的に活性な部分またはそのタンパク質模倣体である。

【0029】

FcRnとIgGとの間の相互作用を調節するための方法も、記述される。本方法は、FcRnおよび/またはIgGを結合させかつIgGへのFcRnの結合を調節する剤と細胞を接触させる段階を含む。

40

【0030】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用を調節するための方法で用いるための剤は、FcRnおよびIgGの相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増加させる。

【0031】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用を調節するための方法で用いるための剤は、FcRnおよびIgGの相互作用によって媒介されるシグナル伝達を減少させる。

【0032】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用を調節するための方法で用いるための剤は、IgGおよびFcRnに特異的な結合部位を含む。

【0033】

50

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用を調節するための方法で用いるための剤は、IgGおよびFcRnに特異的な結合部位を含む。

【0034】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用を調節するための方法で用いるための剤は、IgGのFc部分に特異的な結合部位を含む。

【0035】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用を調節するための方法で用いるための剤は、IgGおよびFcRnに特異的な結合部位を含む二重特異性ポリペプチド剤を含む。

【0036】

いくつかの態様において、FcRnとIgGとの間の相互作用を調節するための方法で用いるための二重特異性ポリペプチド剤は、FcRnを特異的に結合させる抗体またはその抗原結合部分およびIgGを特異的に結合させる抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0037】

その必要がある対象において、がんを処置するため、がんを阻害するため、がんの転移を予防するため、またはがんの再発を予防するための方法も、本明細書において提供される。本方法は、免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物を提供する段階、および対象におけるがんを処置するように、がんを阻害するように、がんの転移を予防するように、またはがんの再発を予防するように、対象に該組成物の有効量を投与する段階を含む。

【0038】

いくつかの態様において、その必要がある対象において、がんを処置するため、がんを阻害するため、がんの転移を予防するため、またはがんの再発を予防するための方法で用いるための組成物は、IgGおよびFcRnの相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増加させる。

【0039】

いくつかの態様において、その必要がある対象において、がんを処置するため、がんを阻害するため、がんの転移を予防するため、またはがんの再発を予防するための方法で用いるための組成物は、抗原に対する免疫応答を増加させる。

【0040】

いくつかの態様において、その必要がある対象において、がんを処置するため、がんを阻害するため、がんの転移を予防するため、またはがんの再発を予防するための方法で用いるための組成物は、428位でのメチオニンのロイシンへの置換および434位でのアスパラギンのセリンへの置換を有する変種IgGを含む。

【0041】

いくつかの態様において、その必要がある対象において、がんを処置するため、がんを阻害するため、がんの転移を予防するため、またはがんの再発を予防するための、免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物は、抗原をさらに含む。いくつかの態様において、抗原はIgGまたはその変種またはその断片に結合される。いくつかの態様において、抗原はIgGまたはその変種またはその断片と複合体化される。

【0042】

その必要がある対象において感染性疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法も本明細書において提供される。本方法は、免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物を提供する段階、および対象における感染性疾患を処置もしくは阻害するようにまたはその重症度を低下させるように対象に該組成物の有効量を投与する段階を含む。

【0043】

いくつかの態様において、その必要がある対象において感染性疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法で用いるための組成物は、IgGおよびFcRnの相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増加させる。

10

20

30

40

50

【0044】

いくつかの態様において、その必要がある対象において感染性疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法で用いるための組成物は、抗原に対する免疫応答を増加させる。

【0045】

いくつかの態様において、その必要がある対象において感染性疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法で用いるための組成物は、428位でのメチオニンのロイシンへの置換および434位でのアスパラギンのセリンへの置換を有する変種IgGを含む。

【0046】

いくつかの態様において、その必要がある対象において感染性疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物は、抗原をさらに含む。いくつかの態様において、抗原はIgGまたはその変種またはその断片に結合される。いくつかの態様において、抗原はIgGまたはその変種またはその断片と複合体化される。

10

【0047】

本方法のさまざまな態様において、抗原は、腫瘍抗原、内因性抗原、細胞関連抗原、アポトーシス小体、微生物抗原、ウイルス抗原、寄生虫抗原またはそれらの組み合わせである。

【0048】

その必要がある対象において自己免疫疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法も提供される。本方法は、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤を含む組成物を提供する段階および対象における自己免疫疾患を処置もしくは阻害するようにまたはその重症度を低下させるように対象に該組成物の有効量を投与する段階を含む。

20

【0049】

いくつかの態様において、その必要がある対象において自己免疫疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法で用いるための剤は、IL-12の産生を低減または阻害する。

【0050】

いくつかの態様において、その必要がある対象において自己免疫疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法で用いるための剤は、ペプチド、タンパク質、小分子、核酸、アプタマー、オリゴヌクレオチド、抗体またはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数である。

30

【0051】

いくつかの態様において、その必要がある対象において自己免疫疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法で用いるための核酸剤は、FcRnに特異的なsiRNAである。

【0052】

いくつかの態様において、その必要がある対象において自己免疫疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法で用いるための抗体剤は、モノクローナル抗体またはその断片、ポリクローナル抗体またはその断片、キメラ抗体、ヒト化抗体および一本鎖抗体からなる群より選択される。

40

【0053】

いくつかの態様において、その必要がある対象において自己免疫疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法で用いるための剤は、IgGおよびFcRnに対する結合部位を含む二重特異性剤である。

【0054】

いくつかの態様において、その必要がある対象において自己免疫疾患を処置もしくは阻害するためまたはその重症度を低下させるための方法で用いるための剤は、IgGの組み換

50

えFc部分またはその生物学的に活性な部分またはそのタンパク質模倣体である。

【0055】

その必要がある対象における処置の効力を判定するための方法が、本明細書においてさらに提供される。本方法は、免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物の有効量が投与された、対象からの試料を提供する段階、および試料中のIL-12、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルをアッセイする段階を含む。1つの態様において、対象からの試料中のIL-12、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルが参照試料中でのレベルと比べて高いならば、処置は有効である。別の態様において、対象からの試料中のIL-12、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルが参照試料中でのレベルと比べて低いならば、処置は有効ではない。1つの態様において、対象はがんまたは感染性疾患を有する。いくつかの態様において、試料は血液、血漿または組織である。

10

【0056】

その必要がある対象における処置の効力を判定するための方法も、本明細書において提供される。本方法は、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤を含む組成物が投与された、対象からの試料を提供する段階、および試料中のIL-12、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルをアッセイする段階を含む。1つの態様において、対象からの試料中のIL-12、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルが参照試料中でのレベルと比べて低いならば、処置は有効である。別の態様において、対象からの試料中のIL-12、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルが参照試料中でのレベルと比べて高いならば、処置は有効ではない。1つの態様において、対象は自己免疫疾患を有する。いくつかの態様において、試料は血液、血漿または組織である。

20

【図面の簡単な説明】

【0057】

本特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含む本特許または特許出願公開のコピーは、請求および必要手数料の支払いがあり次第、特許庁によって提供される。

30

【0058】

例示的な態様は、参照図面において例証される。本明細書において開示される態様および図面は、限定ではなく例証と見なされるべきであることが意図される。

【0059】

【図1】図1A~1Gは、本発明のさまざまな態様にしたがって、FcRnが腸内微生物叢とは無関係な機構を通じて結腸直腸がんの発生を防御することを描く。(図1A) $Apc^{Min/+}$ および $Apc^{Min/+} Fcgrt^{-/-}$ マウスにおける5ヶ月齢時の大腸(LI)腫瘍発生および代表的な腫瘍組織像。スケールバー = 100 μ m。(図1B) 8用量のアゾキシメタン(AOM)で処置したWTおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔における腫瘍発生。(図1C) AOM/DSS処置WTおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔における腫瘍発生。(図1D) $n = 3$ 匹のマウス/群/実験による4回の独立した実験の各々でのWTおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔における腫瘍発生および最大の腫瘍直径。(図1E) AOM/DSSで処置したWTおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔の生存率。有意性はログランク検定によって評価された。(図1F) T-RFLP分析, $n = 3 \sim 5$ 匹のマウス/群によって明らかにされた、未処置8週齢WTおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔の遠位LIに関連した微生物叢の豊かさ指数。(図1G) qPCRによって評価された未処置7週齢WTおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔の遠位LIにおける特異的な微生物種の存在量。 $n = 9$ 匹のマウス/群。それぞれ $n = 4 \sim 10$ 匹のマウス/群による2回(1A、1B、1E)または4回(1D)の独立した実験の代表的な結果。全てのデータは、平均 \pm 標準誤差を表す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ 。

40

50

【図2】図2A~2Dは、本発明のさまざまな態様にしたがって、FcRnが、腫瘍防御を付与する腫瘍反応性の細胞傷害性CD8⁺ T細胞の活性化および保持を駆動することを描く。(図2A) AOM/DSS処置後のWTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔(上パネル)における腫瘍および隣接LI組織の固有層リンパ球(LPL)画分中のCD8⁺ T細胞の頻度。グランザイムBの細胞内染色(中パネル)またはLAMP1の表面染色(下パネル)により、CD3⁺CD8⁺ ゲート内の細胞の細胞傷害能を評価した。(図2B) 3回の独立した実験の各々での、フローサイトメトリーにより評価された、WTおよびFcgrt^{-/-} マウスにおける平均のCD8⁺ T細胞頻度および細胞傷害能。(図2C) 抗CD3および抗CD28による24時間の再刺激後のAOM/DSS処置WTおよびFcgrt^{-/-} マウスの腫瘍および隣接組織のLPからの選別されたエフェクタCD8⁺CD44⁺CD62L⁻ 細胞のサイトカイン分泌。(図2D) WTまたはFcgrt^{-/-} AOM/DSS処置ドナー由来のCD8⁺ T細胞を養子移入したレシピエントマウスにおける腫瘍発生および腫瘍細胞量(全腫瘍の直径の合計)。有意差をマン・ホイットニー検定により評価した。n = 4匹のマウス/群/実験による3回の独立した実験の代表的な結果。全てのデータは、平均±標準誤差を表す。NS = 有意差なし。ND = 検出されず。* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005。

【図3】図3A~3Gは、本発明のさまざまな態様にしたがって、CD8⁺CD11b⁺ DCがFcRnを利用して、防御的な抗腫瘍CD8⁺ T細胞応答を効率的にプライミングすることを描く。(図3A) AOM/DSS処置WTまたはFcgrt^{-/-} マウスの血清またはMLNおよびLIホモジネート中の腫瘍抗原特異的IgG。腫瘍上皮由来の溶解物でコーティングしたELISAプレートを、腫瘍担持マウス由来の血清または組織ホモジネートの希釈液でプローブした。(図3B) AOM/DSS処置WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔の表示の組織区画から単離され選別されたCD8⁺CD11b⁺およびCD8⁺CD11b⁻ DCサブセットの転写産物プロファイル。(図3C) AOM/DSS処置WTまたはFcgrt^{-/-} ドナーのMLNおよびLP由来のDCを養子移入したFcgrt^{-/-} レシピエントにおける腫瘍発生および生存。カイ二乗検定を用いてエンドポイントの生存を評価した。(図3D) AOM/DSS処置Fcgrt^{-/-} レシピエントへのWT DCの移入後のLI LPにおけるCD8⁺ T細胞頻度。(図3E) AOM/DSS処置によるItgax^{Cre} Fcgrt^{F1/F1} マウスおよびその同腹仔Fcgrt^{F1/F1} 対照における腫瘍発生およびLI LP CD8⁺ T細胞頻度。(図3F~3G) WT DCを養子移入したCD8⁺ T細胞枯渇Fcgrt^{-/-} マウスの腫瘍発生(図3F)および生存(図3G)。CD8⁺ T細胞を抗CD8抗体(またはアイソタイプ対照)の長期腹腔内投与によって枯渇させた。n = 3~6匹のマウス/群/実験による3回(図3B~3E)または2回(図3A、3F)の独立した実験の代表的な結果。全てのデータは、平均±標準誤差を表す。NS = 有意差なし。* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005。

【図4】図4A~4Fは、本発明のさまざまな態様にしたがって、FcRnが内因性の腫瘍反応性CD8⁺ T細胞の誘導を駆動し、治療的に標的化されうることを描く。(図4A) WTもしくはFcgrt^{-/-} マウスまたはWTもしくはFcgrt^{-/-} DCを予め免疫したFcgrt^{-/-} マウスでの、静脈内投与されたOVA発現B16黒色腫細胞(OVA-B16)により形成された肺転移性結節の発生。(図4B) WTおよびFcgrt^{-/-} 転移担持マウスでの内因的に存在するOVA特異的CD8⁺ T細胞の頻度。左パネルは、単一実験での個々の動物由来の結果を実証する。右パネルは、それぞれn = 3~6匹のマウス/群による3回の独立した実験の結果を示す。(図4C) (図4A)のように処置し、CD8⁺ T細胞枯渇性の抗体またはアイソタイプ対照のどちらかを投与したマウスからの肺転移の頻度。(図4D) Fcgrt^{F1/F1} およびItgax^{Cre} Fcgrt^{F1/F1} 同腹仔の肺における肺転移性結節およびOVA特異的CD8⁺ T細胞の頻度。(図4E) WTもしくはFcgrt^{-/-} マウスまたは含OVA IgG IC、FcRn非結合性IHH-IgG ICもしくは可溶性OVAを負荷したDCによりエクスピボでプライミングされたOVA特異的CD8⁺ T細胞を養子移入したFcgrt^{-/-} マウスにおける肺転移性結節の発生。(図4F) IgGまたは増強FcRn結合性LS-IgGと形成された含OVA ICをエクスピボで負荷したWT DCで予め免疫されたOVA-B16処置WTおよびFcgrt^{-/-} マウスにおける肺結節の発生。n = 3~6匹のマウス/群/実験による3回(図4A、4B、4D)または2回(図4C、4E、4F)の独立した実験の代表的な結果。全てのデータは、平均±標準誤差を表す。NS = 有意差なし。(*) p = 0.09, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005。

【図5】図5A~5Gは、本発明のさまざまな態様にしたがって、DC内のFcRnがLIにおける恒常性のCD8⁺ T細胞活性化およびIL-12産生を可能にすることを描く。(図5A) 未処置WTおよ

10

20

30

40

50

びFcgrt^{-/-} 同腹仔における血清およびLIまたはMLNホモジネートのIgGアイソタイプ含量。(図5B) 単一実験(左パネル)におけるまたは3回の独立した実験の繰り返し(右パネル)にわたる未処置WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔のLI LPL画分のCD8⁺ T細胞頻度。(図5C) Fcgrt^{F1/F1} およびItgax^{Cre} Fcgrt^{F1/F1} 同腹仔のLPL画分におけるCD8⁺ T細胞の頻度。(図5D) 抗CD3および抗CD28による24時間の再刺激後の未処置WTおよびFcgrt^{-/-} マウスのLI LPから選別されたCD8⁺ T細胞によるサイトカイン分泌。(図5E) 未処置の同腹仔対照マウスのLI LPから選別されたCD8⁺ T細胞の転写産物レベル。(図5F) 未処置WTおよびFcgrt^{-/-} マウスのMLNおよびLIの24時間の組織外植片培養からのサイトカイン分泌。(図5G) 未処置同腹仔のMLNから選別されたCD8⁻CD11b⁺ DCの転写産物プロファイル。n = 3~5匹のマウス/群/実験による3回の独立した実験の代表的な結果。全てのデータは、平均±標準誤差を表す。NS = 有意差なし。* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005。

10

【図6】図6A~6Fは、本発明のさまざまな態様にしたがって、CD8⁻CD11b⁺ DCにおけるFcRnのIgG ICライゲーションが、シグナル伝達カスケードの活性化によってIL-12産生を誘導したことを描く。(図6A) 6時間、IgG ICまたはFcRn非結合性IHH-IgG ICを用いた、脾臓またはMLN由来WT CD8⁻CD11b⁺ DCのエクスピボ刺激によるIL-12p35の誘導。(図6B) AOM/DSS処置WTおよびFcgrt^{-/-} マウスのMLNから選別されたCD8⁻CD11b⁺ およびCD8⁺CD11b⁻ DCの24時間のIgG IC刺激後のIL-12分泌。(図6C) WTまたはFcgrt^{-/-} マウスから単離されたDCのIgG IC刺激によるSTAT-1のリン酸化ならびにIRF-1およびNF- κ B p65の核移行。(図6D) 6時間、IgGまたはIHH-IgG ICでの刺激後のWTまたはStat-1^{-/-} CD8⁻CD11b⁺ DCによるIL-12転写産物の産生。(図6E) 4時間IgG ICまたはIHH-IgG ICでのWTまたはFcgrt^{-/-} DCの刺激によるIL-12p35およびIL-12p40のプロモーターへのIRF-1およびNF- κ B p65の結合。(図6F) WT DCを養子移入し、中和抗IL-12抗体またはアイソタイプ対照で処置したマウスにおける腫瘍発生。n = 3~7匹のマウス/群/実験による3回(図6A~6E)または1回(図6F)の独立した実験の代表的な結果。全てのデータは、平均±標準誤差を表す。* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005。

20

【図7】図7A~7Fは、本発明のさまざまな態様にしたがって、FcRn発現DCがヒトCRCの生存を予測し、FcRn刺激によってIL-12を分泌することを描く。(図7A) CRC (上パネル)およびCRC隣接正常LI (下パネル)の間質中のFcRn⁺CD11c⁺ DCの二重免疫組織化学的染色。FcRn = 褐色, CD11c = 赤色。左パネルのスケールバー = 100 μ m。右パネルのスケールバー = 20 μ m。(図7B) CRC (上パネル)およびCRC隣接正常LI (下パネル)の間質中のFcRn⁺ DC およびCD8⁺ T細胞の共局在。矢じりは共局在域を示す。(図7C) CD11c⁺FcRn⁺ 細胞による高い(コアあたり10以上)および低い(コアあたり10以下)腫瘍浸潤を有する患者183名の Kaplan-Meier生存曲線。(図7D) AOM/DSSで処置したキメラマウスにおける腫瘍の発生。WTレシピエントをWT骨髄で再構成した。Fcgrt^{-/-} レシピエントをFcgrt^{-/-}、WTまたはhFCGR2-hB2M-mFcgrt^{-/-} 骨髄で再構成した。n = 4~5匹のマウス/群/実験による2回の独立した実験の代表的な結果。(図7E) FcRn結合性(IgG IC)またはFcRn非結合性(IHH-IgG IC)免疫複合体での刺激によるhMoDCにおけるhIL-12p35およびhIL-12p40転写産物の発現。(図7F) IgG ICまたはIHH-IgG ICでの刺激によるhMoDCにおけるIRF-1の核移行およびSTAT-1のリン酸化。パネル図7A~7Bにおけるデータは、計50例の適合させたCRCおよび隣接正常LI対を代表する。パネル図7E~7Fにおけるデータは、3回の独立した実験の各々において対

30

40

【図8】図8A~8Kは、本発明のさまざまな態様にしたがって、FcRnの喪失が腸内微生物叢とは無関係な機構を介していっそう重篤な炎症関連および非炎症関連の結腸直腸がん(CRC)の発生を起しやすくすることを描く。(図8A) 5ヶ月齢の時点で評価したApc^{Min/+}およびApc^{Min/+} Fcgrt^{-/-} マウスの大腸(LI)に存在する腺腫の組織学的分類。(図8B) 2回の独立した実験の各々でのn = 4~6匹のマウス/群の、Apc^{Min/+}およびApc^{Min/+} Fcgrt^{-/-} マウスの小腸(SI)における腺腫の頻度。(図8C) n = 3匹のマウス/群による1つの代表的な実験での、8回の毎週投与のアゾキシメタン(AOM)で処置したWTおよびFcgrt^{-/-} マウスにおいて測定された最大の腫瘍直径。(図8D) 炎症関連の結腸直腸がんの誘導において用い

50

られたアゾキシメタン/デキストラン硫酸ナトリウム(AOM/DSS)処置の詳細。マウスを腹腔内注射により単回の10 mg/kg用量のAOMで処置した(-7日目)。7日後(0日目)に、マウスに7日間、その飲料水中1.5%のDSSを与えた。DSSを取り除き、マウスに14日間(7~21日目)、通常の水を飲ませた。DSSを1週(21~28日目)および通常の水を2週(28~42日目)のサイクルを1回繰り返した。マウスを42日目に殺処理した。(図8E) $Fcgrt^{-/-}$ マウス由来の病変における重度の異形成および固有層を通じた浸潤(矢印)を示す、WTおよび $Fcgrt^{-/-}$ の両方のマウスに存在する腫瘍の代表的な組織像。スケールバー = 100 μ m。(図8F) AOM/DSSレジメンを受けているマウスの最初の20日の処置間の重量曲線。マウスを1~2日ごとに秤量した。データは、n = 5匹のマウス/群/実験による2回の独立した実験を代表する。(図8G) n = 3~5匹のマウス/群の、T-RFLP分析によって明らかにされた、未処置8週齢WTおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔の糞便において認められた微生物叢の豊かさ指数。(図8H) T-RFLP分析によって明らかにされた、未処置2週齢WTおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔の遠位LIまたは糞便に関連していると認められた微生物叢の豊かさ指数。n = 4~9匹のマウス/群。(図8I) T-RFLP分析によって評価された未処置8週齢および2週齢WTおよび $Fcgrt^{-/-}$ マウスの表示の組織区画の各々における微生物群集の組成を実証する多次元尺度(MDS)プロット。Bray Curtis類似度指数行列のANOSIM分析によって、いずれの年齢または組織区画についてもWTマウスと $Fcgrt^{-/-}$ マウスとの間に有意差のないことが明らかにされた。(図8J) 遺伝子型にかかわらず、各年齢群内の組織区画間の微生物差異の分析のためのANOSIMの結果。(図8K) qPCRによって評価された未処置7週齢WTおよび $Fcgrt^{-/-}$ マウスの糞便に関連した特異的な微生物種の存在量。各種由来の値を全細菌(16S)に対して標準化した。各ドットは個々の動物を表す。n = 9匹のマウス/群。全てのデータは、平均 \pm 標準誤差を表す。ND = 検出されず。* p < 0.05。

【図9】図9A~9Gは、本発明のさまざまな態様にしたがって、FcRnを介した腫瘍免疫監視機構が腸LPにおける $CD8^+$ T細胞の選択的な活性化および保持によって媒介されることを描く。(図9A) AOM/DSS処置後のWIおよび $Fcgrt^{-/-}$ マウスにおける腫瘍および隣接LI組織の固有層リンパ球(LPL)画分中の $CD4^+$ T細胞、NK細胞(NK1.1)またはマクロファージ(F4/80)の頻度のフローサイトメトリー分析。(図9B) 固定容量の試料のフローサイトメトリー染色および収集によって評価された、AOM/DSS処置マウスでの隣接LI、腫瘍LIまたは未処置(ベースライン) LIのLP組織から単離された $CD8^+$ T細胞の絶対数。(図9C~9D) 未処置 $Apc^{Min/+}$ および $Apc^{Min/+}$ $Fcgrt^{-/-}$ マウス(図9C)におけるならびにAOM処置WIおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔(図9D)における腫瘍隣接LI組織の固有層(LP)画分中の $CD8^+$ T細胞の頻度のフローサイトメトリー分析。n = 3匹のマウス/群/実験による3中1回の実験からの代表的な結果。(図9E) AOM/DSS処置後のWIおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔における腫瘍および隣接LI組織のLP画分中の $CD8^+$ T細胞増殖(Ki-67)およびアポトーシス(アネキシンV)の程度のフローサイトメトリー分析。プロットは細胞の $CD3^+CD8^+$ ゲート内の細胞を描く。n = 3匹のマウス/群/実験による3回の独立した実験からの代表的なプロット。(図9F) AOM/DSSで処置したWIおよび $Fcgrt^{-/-}$ 同腹仔の表示の組織区画中の $CD8^+$ T細胞の表現型。n = 3~4匹のマウス/群/実験による3回の独立した実験からの代表的なプロット。(図9G) AOM/DSS処置WIおよび $Fcgrt^{-/-}$ ドナーのMLNおよびLI LPから採取された $CD4^+$ T細胞を養子移入したAOM/DSS処置レシピエントマウスの生存率。n = 4匹のマウス/群/実験による2中1回の独立した実験からの代表的な結果。生存曲線の有意性をログランク検定によって評価した。全てのデータは、平均 \pm 標準誤差を表す。* p < 0.05。

【図10】図10A~10Lは、本発明のさまざまな態様にしたがって、FcRn依存性の樹状細胞(DC)を介した腫瘍防御が、腸組織中の腫瘍抗原反応性IgGの存在および局所Th1/Tc1極性化サイトカイン環境の作出に関連していることを描く。(図10A) AOM/DSS処置WTまたは $Fcgrt^{-/-}$ マウスの血清またはLIホモジネート中の腫瘍抗原特異的IgGのアイソタイプ分布。腫瘍上皮由来の溶解物でコーティングしたELISAプレートを、腫瘍担持マウス由来の血清または組織ホモジネートの希釈液でプローブし、アイソタイプ特異的な二次抗体で発色させた。(図10B) 8匹のAOM/DSS処置マウスの各々の血清およびLIホモジネート中の腫瘍抗原特異的IgGを実証する免疫プロット。腫瘍腸上皮細胞(IEC)または非腫瘍対照IECから調製さ

10

20

30

40

50

れIgGを枯渇させた溶解物を、還元条件の下でSDS-PAGEによって分離し、転写された溶解物の膜を腫瘍担持マウス由来の血清またはLIホモジネートでプローブした。n = 4匹のマウス/群/実験による2回の独立した実験からの代表的なプロット。2次Ab = 抗マウスIgG-HRP。(図10C) WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔における血清抗ホスファチジルセリン(-PS)および抗カルジオリピン(-CL) IgG含量の、ベースライン値を超えての倍増加。(図10D) AOM/DSS処置WTおよびFcgrt^{-/-} マウスにおける血清、LIホモジネートおよびMLNホモジネートのIgGアイソタイプ含量。(図10E) AOM/DSS処置WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔の粘膜組織中のCD8⁺ vs CD11b⁺ DCの頻度(上列, CD11c⁺ 細胞に対しゲーティング)およびCD11c⁺CD8⁻CD11b⁺ DCの特徴付け(下4列)のフローサイトメトリー分析。(図10F~10H) AOM/DSS処置WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔(図10F)、未処置Apc^{Min/+}およびApc^{Min/+} Fcgrt^{-/-} 同腹仔(図10G)ならびにAOM処置WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔(図10H)由来の、表示した組織区画の全組織サイトカイン転写産物プロファイル。n = 3~6匹のマウス/群/実験による2~4回の独立した実験からの代表的な結果。データは、平均±標準誤差を表す。(図10I) 図3C、3Fにおいて移入されたDCの純度(上パネル)およびサブセット分布(下パネル)。(図10J) 腹腔内移入から3日および7日後のレシピエント(CD45.1)マウスのMLNおよびLI LP中の同種(CD45.2) WTまたはFcgrt^{-/-} DCの頻度。PBSを注射したレシピエントマウスを、対照として示してある。(図10K) 表示したAOM/DSS処置DCレシピエントマウスのMLNから単離し、FcRn結合性(IgG)免疫複合体(IC)、非FcRn結合性(IHH-IgG) ICまたは可溶性抗原(OVA)を含んだICを負荷し、OT-I CD8⁺ T細胞と共培養したDCによるエキスピボ抗原交差提示。(図10L) WT、Fcgrt^{-/-}、Fcgrt^{F1/F1}またはItgax^{Cre} Fcgrt^{F1/F1} マウスから精製されたDC (CD11c)、マクロファージ(CD11b)および肝細胞においてqPCRにより評価された相対的Fcgrt転写産物レベル。データは、n = 3~5匹のマウス/群/実験による2回の独立した実験を代表する。全てのデータは、平均±標準誤差を表す。* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005。

【図11】図11A~11Fは、本発明のさまざまな態様にしたがって、CD8⁺ T細胞および腫瘍特異的IgGの両方が肺転移からのFcRn媒介性の防御に必要とされることを描く。(図11A) 未処置WTまたはFcgrt^{-/-} マウスの肺におけるCD8⁺ T細胞頻度。(図11B~11C) 肺転移を担持するWTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔の肺ホモジネート(図11B)または血清(図11C)中の腫瘍特異的抗OVA IgG。0.5 × 10⁶個のOVA発現B16黒色腫細胞(OVA-B16)の静脈内注射から2週間後に肺を回収した。抗OVA IgG含量をELISAによって評定し、(図11B)の場合のホモジネートのタンパク質含量に対して標準化した。(図11D) OVA-B16肺転移担持WTおよびFcgrt^{-/-} マウスのリンパ節(LN)または脾臓中のOVA特異的IgG産生B細胞の頻度。B細胞を単離し、OVAでコーティングされたELISpotプレート上で24時間培養した。(図11E) OVA-B16細胞を注射した免疫または非免疫マウスからの代表的な肺葉。(図11F) NIP-OVAおよびFcRn結合性(IgG IC)免疫グロブリン、非FcRn結合性(IHH-IgG IC)免疫グロブリンまたは増強FcRn結合性(LS-IgG IC)免疫グロブリンのいずれかと形成された免疫複合体(IC)で刺激し、OT-I CD8⁺ T細胞と共培養したDCを用いたエキスピボ抗原交差提示。全てのデータは、n = 3~6匹のマウス/群/実験による3中1回の独立した実験の結果を代表する。データは、平均±標準誤差を表す。NS = 有意差なし。* p < 0.05。

【図12】図12A~12Eは、本発明のさまざまな態様にしたがって、DC中のFcRnがCD8⁺ T細胞の恒常性の局所活性化およびLI LP内のCD4⁺ T細胞のTh1極性を、Tc1およびTh1極性化サイトカインの産生の促進によって駆動することを描く。(図12A) 未処置WTおよびFcgrt^{-/-} レシピエントマウス(CD45.2)のLI LPおよびMLNにおける養子移入された同種CD8⁺ T細胞(CD45.1)の頻度(上パネル)およびエフェクタ状態(下パネル)。1 × 10⁶個のCD8⁺ T細胞を静脈内注射によりレシピエントマウスへ移入し、その分布および表現型を10日後に評価した。(図12B) 移入から7日後の未処置レシピエントマウス(CD45.1)のLI LPおよびMLNにおけるWTおよびFcgrt^{-/-} ドナーマウス(CD45.2)から養子移入された同種CD8⁺ T細胞の頻度。(図12C) qPCRによって評価された、未処置WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔(左パネル)またはFcgrt^{F1/F1}およびItgax^{Cre} Fcgrt^{F1/F1} 同腹仔(右パネル)からのLIの全組織転写産物プロファイル。(図12D) 未処置WTおよびFcgrt^{-/-} マウスのLI LPから磁気選別により単離され、抗CD3 (CD3)および抗CD28 (CD28)で24時間再刺激されたCD4⁺ T細胞によるサイトカイン

10

20

30

40

50

分泌。(図12E) 未処置WIおよびFcgrt^{-/-} マウス(左パネル)またはFcgrt^{F1/F1}およびItgax^{Cre} Fcgrt^{F1/F1} マウス(右パネル)のLI LPにおけるCD4⁺ T細胞頻度。n = 3~5匹のマウス/群/実験による3回の独立した実験からの代表的な結果。データは、平均±標準誤差を表す。* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.005。

【図13】図13A~13Cは、本発明のさまざまな態様にしたがって、FcRn依存性のIL-12誘導がMYD88に依存せず、FcRnを介した交差プライミングに必要とされないことを描く。(図13A) 6時間、FcRn結合性IC (IgG IC)またはFcRn非結合性IC (IHH-IgG IC)を用いたMyd88^{-/-} CD8⁻CD11b⁺ DCのエクスピボ刺激によるIL-12p35の誘導。(図13B) 4時間、IgG ICまたはIHH-IgG ICを用いたMyd88^{-/-} CD8⁻CD11b⁺ DCの刺激によるIL-12p35プロモーターへのIRF-1の結合。(図13C) IL-12中和抗体(IL-12)またはアイソタイプ対照の存在下におけるエクスピボ抗原交差提示。DCをIgG ICまたはIHH-IgG ICで刺激し、OT-I CD8⁺ T細胞と共培養した。3中1回の独立した実験からの代表的なデータを示す。データは、平均±標準誤差を表す。* p < 0.05, ** p < 0.01。

【図14】図14A~14Hは、本発明のさまざまな態様にしたがって、ヒトDCがFcRnを強発現し、正常LIとCRC関連LIの両方の間質に局在することを描く。(図14A) さらなるヒトCRC症例のCRC担持(上パネル) LIおよび腫瘍に隣接する正常(下パネル) LIの間質中のFcRn⁺CD11c⁺ DCの二重免疫組織化学的染色。図7Aも参照されたい。左パネルのスケールバー = 100 μm。右パネルのスケールバー = 20 μm。(図14B) さらなるヒトCRC症例のCRC担持(上パネル) LIおよび腫瘍に隣接する正常(下パネル) LIの間質中のFcRn⁺ DCおよびCD8⁺ T細胞の共同在。矢じりは共同在域を示す。図7Bも参照されたい。図14A~14B中のデータは、評価した50例の、適合させた正常LIおよびCRCを代表する。(図14C) CRCに隣接する正常LIの間質中のFcRn⁺CD11c⁺ DCとCD8⁺ T細胞の数の間の相関関係。スピアマンの順位相関を用いて有意差を評価した。(図14D) ヒトCRC患者183例での患者の生存に及ぼす結腸LP CD11c⁺ FcRn⁺ 細胞の影響の多変量分析。漸増数のCD11+FcRn+ 細胞は患者の生存にプラスの効果(単変量分析 p = 0.0333)を有し、この効果は表示のパラメータで多変量分析において維持される。図7Cも参照されたい。(図14E) AOM/DSSで処置したキメラマウスの腫瘍LPにおけるCD8⁺ T細胞頻度。WTレシピエントをWTドナー由来の骨髄で再構成した。Fcgrt^{-/-} レシピエントをFcgrt^{-/-}、WTまたはhFCGRT-hB2M-mFcgrt^{-/-} ドナーのいずれか由来の骨髄で再構成した。n = 4~5匹のマウス/群/実験による2中1回の独立した実験からの代表的な結果。(図14F) フローサイトメトリー分析によって判定されたヒト単球由来DC (hMoDC)の表現型。影付きの曲線はアイソタイプ対照を表す。(図14G) CRC症例の免疫組織化学的染色に利用された同一の抗体によって評価された、hMoDCにおけるFcRnの発現。(図14H) 図7Fにおいて描かれたIgG ICで刺激したhMoDCのウエスタンブロットのデンシトメトリー分析。パネル図14F~14Hにおけるデータは、3回の独立した実験の各々において対で処理されたドナー6名を代表する。全てのデータは、平均±標準誤差を表す。

【図15】図15A~15Bは、本発明のさまざまな態様にしたがって、抗体を介したFcRnの遮断がIgGを介した大腸炎の間にTh1サイトカイン転写産物レベルを減少させることを描く。(図15A) DSS大腸炎の発症の前および最中にDVN24またはアイソタイプ対照のどちらかで処置したフラジェリン免疫hFCGRT/hB2M/mFcgrt^{-/-} キメラマウスからの全結腸サイトカイン転写産物レベル。(図15B) DSS大腸炎の間にDVN24で処置されたhFCGRT/hB2M/mFcgrt^{-/-} BMキメラまたはPBSで処置されたアイソタイプ対照もしくはmFcgrt^{-/-} BMキメラの固有層から単離されたCD8⁺ T細胞からのサイトカイン転写産物レベル。* P < 0.05. ** P < 0.01。

【図16】本発明のさまざまな態様にしたがって、FcRnを介したIL-12p35の上方制御が、細胞骨格再構成ではなく、ERKおよびカルモジュリンに依存することを描く。初代マウス樹状細胞を、野生型であったが、IgGのFcドメイン中の3つの変異によってFcRnもしくは変異体FcRnに結合でき、FcRn (IHH-IC)に結合できない、ニワトリオポアルブミンに対する、含IgG免疫複合体で刺激した。RNAを、細胞骨格(サイトカラシンDおよびラトランクリン)、カルモジュリン(W7)またはERKに対する阻害剤で処理された当該細胞から5または11時間後に単離した。RNAを逆転写し、IL-12 p35をqPCRによって定量化した。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0060】

発明の詳細な説明

本明細書において引用される全ての参考文献は、全文記載されたものとして参照によりその全体が組み入れられる。他に定義されない限り、本明細書において用いられる技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); および Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001)は、本出願において用いられる用語の多くに対する一般的な指針を当業者に提供する。

10

【0061】

当業者は、本明細書において記述されるものと同様または等価であり、本発明の実践において用いられうる多くの方法および材料を認識するであろう。実際に、本発明は、記述される方法および材料に決して限定されない。本発明の目的で、以下の用語を下記に定義する。

【0062】

本明細書において用いられる場合、「抗体」という用語は、完全な免疫グロブリンを指し、または本明細書において「Fc断片」もしくは「Fcドメイン」といわれる、Fc (結晶化可能な断片)領域もしくはFc領域のFcRn結合断片を有するモノクローナルもしくはポリクローナル抗原結合断片を指す。抗原結合断片は、組み換えDNA技法により、または完全抗体の酵素的もしくは化学的切断により産生されうる。抗原結合断片は、とりわけ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dAb、および相補性決定領域(CDR)断片、一本鎖抗体(scFv)、単ドメイン抗体、キメラ抗体、ダイアボディ、テトラボディおよび他の多量体化scFv部分ならびにポリペプチドに特異的抗原結合を与えるのに十分である免疫グロブリンの少なくとも一部分を含むポリペプチドを含む。Fcドメインは、抗体の2つまたは3つのクラスに寄与する2つの重鎖の部分を含む。Fcドメインは、組み換えDNA技法によりまたは完全抗体の酵素的切断(例えばパパイン切断)もしくは化学的切断により産生されうる。Fcドメインのアミノ酸配列を改変して、FcRnとのその親和性を増加させ、IL-12、インターフェロン- γ 、IL-2、腫瘍壊死因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、IL-3およびグランザイムBのような分泌タンパク質もしくはt-betのような転写因子のさらに良好な誘導を可能にすることができ、またはFcドメインのアミノ酸配列を改変して、FcRnに対するその親和性ならびにこれらの前記のサイトカインおよび転写因子の誘導を減少させることができる。

20

30

【0063】

本明細書において用いられる「抗体断片」という用語は、一般に完全抗体の抗原結合部位を含み、したがって抗原を結合させる能力を保持した、完全抗体の一部分のみを含むタンパク質断片を指す。本定義によって包含される抗体断片の例としては、(i) VL、CL、VHおよびCH1ドメインを有する、Fab断片；(ii) CH1ドメインのC末端に1つもしくは複数のシステイン残基を有するFab断片である、Fab'断片；(iii) VHおよびCH1ドメインを有するFd断片；(iv) VHおよびCH1ドメインならびにCH1ドメインのC末端の1つもしくは複数のシステイン残基を有するFd'断片；(v) 抗体の単腕のVLおよびVHドメインを有するFv断片；(vi) VHドメインからなるdAb断片(Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)); (vii) 単離されたCDR領域；(viii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFab'断片を含む二価断片であるF(ab')₂断片；(ix) 一本鎖抗体分子(例えば、一本鎖Fv; scFv) (Bird et al., Science 242:423-426 (1988); およびHuston et al., PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988)); (x) 同じポリペプチド鎖中の軽鎖可変ドメイン(VL)に連結された重鎖可変ドメイン(VH)を含む、2つの抗原結合部位を有する「ダイアボディ(diabody)」(例えば、EP 404,097; WO 93/11161; およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照のこと); (xi) 相補軽鎖ポリペプチドとともに、抗原結合領域の

40

50

対を形成する、タンデムなFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)の対を含む「直線状抗体」(Zapata et al. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995); および米国特許第5,641,870号)が挙げられる。

【0064】

本明細書において記述されるように、「抗原」は、抗体またはその抗体断片などのポリペプチド剤上の結合部位によって結合される分子である。通常、抗原は抗体リガンドによって結合され、インビボで抗体応答を上昇させることができる。抗原は、ポリペプチド、タンパク質、核酸、脂質または他の分子でありうる。従来の抗体およびその断片の場合、可変ループ(L1、L2、L3およびH1、H2、H3)によって定義される抗体結合部位は、抗原に結合することができる。「抗原決定基」という用語は、抗原結合分子によって、より詳細には前記分子の抗原結合部位によって認識される抗原上のエピトープを指す。

10

【0065】

「Fv」断片は、完全な抗原認識および結合部位を含む抗体断片である。この領域は、例えばscFvでは、本質的に共有結合でありうる、堅固に結合した1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。それは、この配置において、各可変ドメインの3つのCDRが相互に作用して、VH-VL二量体の表面の抗原結合部位を規定するということである。6つのCDRまたはこれらのサブセットは、集成的に、抗体に抗原結合特異性を与える。しかしながら、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でも、通常は結合部位全体よりも低い親和性であるが、抗原を認識しかつ結合させる能力を有する。

20

【0066】

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

30

【0067】

本明細書において用いられる場合、「複合体化され」とは、任意の2つの分子間の非共有結合性相互作用を指す。例としては、抗原と抗体が非共有結合によって相互作用している、抗原と抗体(例えば、IgGまたはその変種またはその断片)との間で形成された複合体が挙げられるが、これに限定されることはない。非共有結合性相互作用の例としては、静電相互作用(例えば、イオン性相互作用、水素結合、ハロゲン結合)、ファンデルワールス力(双極子-双極子、双極子誘起、ロンドン分散力)、効果(- 相互作用、陽イオン-、陰イオン-、極性-)および/または疎水性相互作用が挙げられるが、これらに限定されることはない。さまざまな態様において、IgGまたはその断片またはその変種と抗原との間の複合体は、FcRnと架橋結合(cross-link/bind)できる多量体構造を形成する。

40

【0068】

本明細書において用いられる場合、「結合され」とは、任意の2つの分子間の共有結合性相互作用を指す。例としては、抗原および抗体(例えば、IgGまたはその変種またはその断片)を含む融合タンパク質または共有結合的に連結されうるその他任意の抗原-抗体複合体が挙げられるが、これらに限定されることはない。さまざまな態様において、IgGまたはその断片またはその変種と抗原との間の結合は、FcRnと架橋結合(cross-link/bind)できる単量体構造または多量体構造を形成する。

【0069】

本明細書において用いられる場合、「エピトープ」は、連続アミノ酸、またはタンパク質の三次折り畳み構造によって隣接される非連続アミノ酸の両方から形成されうる。連続アミノ酸から形成されるエピトープは、通常、変性溶媒にさらされたときに保持されるが

50

、三次折り畳み構造によって形成されるエピトープは、通常、変性溶媒により処理されると失われる。エピトープは、通常、独特の空間配置の少なくとも3個、より一般的には少なくとも5個、約9個、または約8~10個のアミノ酸を含む。「エピトープ」は、免疫グロブリンVH/VL対によって従来通りに結合される構造の単位を含む。エピトープは抗体に対する最小限の結合部位を規定し、したがって抗体の特異性の標的を表す。単ドメイン抗体の場合、エピトープは、単離された状態で可変ドメインによって結合される構造の単位を表す。「抗原決定基」および「エピトープ」という用語は、本明細書において互換的に用いることもできる。さまざまな態様において、エピトープはタンパク質、ペプチド、核酸、脂質、他の分子またはそれらの組み合わせでありうる。

【0070】

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

【0071】

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

【0072】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書において用いられる場合、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在しうる天然に存在する可能な変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原に対するものである。さらに、通常異なる決定基(エピトープ)に対して作られる異なる抗体を含むポリクローナル抗体製剤とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して作られる。「モノクローナル」という修飾語は、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明によって用いられるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 256:495 (1975)によって最初に記述されたハイブリドーマ法によって作出することができ、あるいは組み換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと)によって作出することもできる。また、「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)またはMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)に記述されている技法を用いて、ファージ抗体ライブラリから単離することもできる。

【0073】

本明細書において用いられる場合、「選択的に結合する」または「特異的に結合する」とは、本明細書において記述される抗体またはその抗体断片が、KD 10^{-5} M (10000 nM)またはそれ以下、例えば 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} Mまたはそれ以下で、細胞表面に存在する分子などの標的に結合することができることを指す。特異的結合は、例えば、ポリペプチド剤の親和性および結合力ならびにポリペプチド剤の濃度により影響を受ける可能性がある。当業者は、適当な細胞結合アッセイ法における

10

20

30

40

50

ポリペプチド剤の滴定などの任意の適当な方法を用いて、本明細書において記述されるポリペプチド剤が標的と選択的に結合するための適切な条件を決定することができる。

【0074】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」は、診断、予後診断または治療が望まれる任意の対象、特に哺乳動物対象を意味する。いくつかの態様において、対象はがんを有する。いくつかの態様において、対象は、対象の生涯のある時点でがんを有していた。さまざまな態様において、対象のがんは寛解期にあり、再発性であり、または非再発性である。いくつかの態様において、対象は感染性疾患を有する。いくつかの態様において、対象は自己免疫疾患を有する。

【0075】

本明細書において用いられる「哺乳動物」とは、非限定的に、ヒト、家畜、農場動物、動物園動物、スポーツ動物、愛玩動物、例えばイヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、雌ウシなど；霊長類、例えば類人猿、サル、オランウータンおよびチンパンジーなど；イヌ科動物、例えばイヌおよびオオカミなど；ネコ科動物、例えばネコ、ライオンおよびトラなど；ウマ類、例えばウマ、ロバおよびシマウマなど；食用動物、例えば雌ウシ、ブタおよびヒツジなど；有蹄動物、例えばシカおよびキリンなど；げっ歯類、例えばマウス、ラット、ハムスターおよびモルモットなどを含む、哺乳綱(Mammalia)の任意の成員を指す。ある種の態様において、哺乳動物はヒト対象である。この用語は、特定の年齢または性別を意味しない。したがって、成体および新生の対象、ならびに胎児は、雄性または雌性にかかわらず、この用語の範囲内に含まれることが意図される。

【0076】

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

【0077】

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

【0078】

特定のがんに関連しているいくつかの腫瘍抗原が同定されている。本明細書において用いられる場合、「腫瘍抗原」および「がん抗原」という用語は、新生細胞により差次的に発現され、それによって、新生細胞を標的化するために活用されうる抗原を指すように互換的に用いられる。がん抗原は、見かけ上は腫瘍特異的な免疫応答を刺激する可能性がある抗原である。これらの抗原のいくつかは正常細胞によって、コードされているが、必ずしも発現されるわけではない。これらの抗原は、正常細胞においては通常サイレントである(すなわち、発現されない)もの、ある分化段階においてのみ発現されるもの、ならびに

10

20

30

40

50

胚抗原および胎児抗原などの一時的に発現されるものとして特徴付けられうる。他のがん抗原は、がん遺伝子(例えば、活性化されたrasがん遺伝子)、抑制遺伝子(例えば、変異p53)、内部欠失または染色体転座に起因する融合タンパク質などの変異細胞遺伝子によりコードされる。さらに他のがん抗原は、RNA腫瘍ウイルスおよびDNA腫瘍ウイルスが保持しているものなどのウイルス遺伝子によってコードされうる。多くの腫瘍抗原が、複数の固形腫瘍に関して定義されている: 免疫により定義されたMAGE 1、2、および3; MART-1/Melan-A、gp100、癌胎児性抗原(CEA)、HER-2、ムチン(すなわち、MUC-1)、前立腺特異抗原(PSA)、ならびに前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)。加えて、B型肝炎(HBV)、エプスタインバー(EBV)、およびヒトパピローマ(HPV)などのウイルスタンパク質は、それぞれ、肝細胞癌、リンパ腫、および子宮頸がんの発症において重要であることが示されている。しかしながら、がんと診断された患者の免疫抑制のため、これらの患者の免疫系は、腫瘍抗原に対して応答できないことが多い。

10

【0079】

本明細書において用いられる「内因性抗原」とは、体内で作出された抗原を指す。それらは、異種間(異種)の、自家の、イディオタイプのまたは同種の抗原および自己抗原を含む。

【0080】

FcRnは新生児Fc受容体である。FcRnは構造が、主要組織適合性遺伝子複合体I (MHC I)と類似している。ヒトFcRnは、その特異性に関して非常にストリンジェントであり、ヒトFcを結合させるが、しかしマウス、ラット、ウシまたはヒツジFcを結合させない。FcRnはIgGの2つの部位に結合することができる(Sanchez et al., 1999; Schuck et al., 1999; West A.P. and Bjorkman, 2000)。マウスIgGはヒトFcRnに効率的に結合せず、それゆえヒト中で短い半減期を有する(Frodin et al., 1990)が、免疫複合体としてのマウスIgGは、ヒトFcRnを結合させることが可能であり、シグナル伝達を誘導することが可能である。対照的に、マウスFcRnは、分析されたあらゆる種由来のIgGを結合させる(Ober et al., 2001)。

20

【0081】

大部分の血清タンパク質は、短い血清中半減期(約1~2日)を有する。しかしながら、2種類の血清タンパク質、すなわちアルブミンおよびIgGクラスの抗体は、非常に長い血清中半減期を有する。例えば、IgGの大部分のサブクラスは、ヒト中で約10~20日の半減期を有する。IgGのFc領域はこの半減期伸長に必要とされる。かくして、Fc領域のみを保有している短縮IgGポリペプチド、もしかすると同様に、短いFcRn結合ペプチド配列(FcBP)を保有しているタンパク質(Sokolosky et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2012, 109, 16095-100)も、そのような伸長された血清中半減期を示す。さらに、Fc領域が融合パートナー(例えば、生物学的に活性なタンパク質)と融合される場合、このFc融合タンパク質はFcRnとのその相互作用によって、伸長された血清中半減期を示す。

30

【0082】

FcRnがIgGおよびIgG Fc融合タンパク質の血清中半減期を伸ばす機構は、十分に確立されている(Ghetie and Ward, 2000, 2002; Roopenian and Akilesh, 2007)。FcRnは、血管内皮を含む、多くの細胞種のエンドソーム区画に局在している。血清タンパク質は、絶えずエンドサイトーシスされており、初期エンドソーム小胞へ向けられる。FcRnは、主としてこの酸性小胞中に含まれる。この酸性環境中で、Fc領域はFcRnを結合させると、IgG/FcRn複合体が次に、原形質膜の頂端または側底へ再循環され、そこで中性pH 7.2の細胞外環境に曝されると、循環血中へのその放出を引き起こす。対照的に、FcRnを結合させないエンドサイトーシスされたその他のタンパク質は、救出されず、したがって、エンドソーム経路を異化除去まで進み続け、その短い半減期という結果に終わる。IgGのFc領域が酸性環境中でFcRnを結合させる生化学的機構は、十分に理解されている。Fc領域のCH2-CH3-ヒンジ領域は、溶媒に曝されるヒスチジン残基を含んでおり、これがプロトン化されると、FcRn再循環経路を探索して異化除去を回避することをIgGに許容するのに十分な親和性でFcRn上の残基を結び付ける。

40

50

【0083】

本明細書において記述されるように、本発明者らは、FcRnに対するリガンドとして機能する、抗原/抗体免疫複合体と樹状細胞上のFcRnを架橋結合させることで、これらの細胞によるIL-12の産生、ならびにCD8+ T細胞によるインターフェロン- γ 、腫瘍壊死因子、グランザイムBおよびt-betの産生に直接つながることを発見した。FcRnは、細胞骨格の要素および分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)を含む、必要なタンパク質を組織化することによりシグナル伝達分子として機能し、IRF-1およびNF- κ Bのような因子を通じてIL-12の転写を直接促進する。本明細書において実証されるように、FcRnを介したIL-12p35の上方制御は、ERKおよびカルモジュリンに依存するが、しかし細胞骨格再構成には依存しない。FcRn依存性のIL-12の産生は、インターフェロン- γ 、腫瘍壊死因子、グランザイムBおよびt-betのような因子を通じたCD8+エフェクタT細胞の作出とそのエフェクタ機能に不可欠である。そのようなエフェクタT細胞は、抗感染性免疫を媒介し、腫瘍の免疫監視機構および根絶を媒介する。IL-12が中和されれば、腫瘍根絶に関連するCD8+エフェクタT細胞機能に及ぼすFcRn媒介性の効果は失われる。

10

【0084】

相同的に、FcRn機能の遮断はFcRn媒介性のシグナル伝達の減少、したがって、炎症性腸疾患の動物モデルにおいて示されるように自己免疫障害からの防御に関連している、IL-12および関連因子の産生の減少に関連している。任意の特定の機構または理論によって束縛されることを望むわけではないが、本明細書において記述される局面および態様は、抗原/抗体免疫複合体へのFcRnの結合が、治療目的で操作されうる、樹状細胞によるIL-12の産生を調節するという所見に基づく。IL-12は、一方では腫瘍および抗感染性免疫、他方では不適切な炎症に関連した免疫応答の主要な調節因子であるので、抗腫瘍免疫のためにはIL-12を増加させること、抗炎症の目的ではIL-12を減少させることが望ましい。したがって、がんおよび感染性疾患を処置するためにIL-12産生を増加させる/増大させる/上方制御するための組成物および方法、ならびに自己免疫障害を処置するためにIL-12産生を減少させるための組成物および方法が、本明細書において記述される。

20

【0085】

がんおよび/または感染性疾患を処置するための組成物および方法

いくつかの局面において、本明細書において記述される組成物および方法は、(例えば、IgGに結合された抗原に応じて、またはIgGとFcRnとの間の結合を増加させるIgGにおける変異によって) IgGとFcRnとの間の相互作用を増加させる/増大させることによりIL-12の産生を上方制御する/増加させる/増大させる。IgGとFcRnとの間の相互作用は、樹状細胞によるIL-12の産生を引き起こすシグナルを生じさせる。本明細書において提供される組成物は、IL-12産生を増加させるようにIgGまたはその変種またはその断片を含む。本明細書において記述されるように、組成物は、IL-12産生を増加させるように、腫瘍抗原、細菌抗原、ウイルス抗原、寄生虫抗原またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない、抗原をさらに含むことができる。本明細書において用いられる場合、「IgG」は、IgG1、IgG2、IgG3および/またはIgG4を含むIgGのいずれかのアイソタイプを指すことができる。

30

【0086】

いくつかの態様において、本明細書において記述される組成物および方法におけるIgGの変種は、IL-12産生を増加させるように、IgGとFcRnとの間の結合を増強させる機能的な、非天然のIgG変種である。本明細書において記述される組成物および方法で有用な、本明細書において用いられる「IgGの機能的変種」は、完全長IgG、またはIgG分子の定常領域において挿入、欠失および短縮のような、変異を含んだ分子を含むが、ただしそのような分子は、FcRnに結合し、かつIL-12産生を増加させる能力を保持していることを条件とする。そのような変種の1つの例としては、Kabat付番スキームによる428位でのメチオニンのロイシンへの置換および434位でのアスパラギンのセリンへの置換を含むIgGが挙げられるが、これに限定されることはない。本明細書において記述される組成物および方法で有用な機能的IgG変種の別の例は、「Engineering the Fc region of immunoglobulin G t

40

50

o modulate in vivo antibody levels」, Nature Biotechnology, 2005 (23): 10, pp 12 83-88に記述されているようにMet 252、Ser254、Thr256、His433およびAsn434のTyr252、Thr254、Glu256、Lys433およびPhe434への変異を含む操作されたヒトIgG1変種であり、その文献の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本明細書において記述される組成物および方法で有用なその他の機能的IgG変種は、US8188231、US8802823、US2011025068、US20060235208、W02012106578 A1に記述されており、この各々の内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【 0 0 8 7 】

例えば、機能的IgG変種は、Fc領域中の残基の付番がKabatにあるようなEUインデックスのものである、Fc 230位、240位、244位、245位、247位、262位、263位、266位、273位、275位、299位、302位、313位、323位、325位、328位および332位にアミノ酸修飾を含むことができる。いくつかの態様において、機能的IgG変種は、Fc領域中の残基の付番がKabatにあるようなEUインデックスのものである、221位、222位、223位、224位、225位、227位、228位、230位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、241位、243位、244位、245位、246位、247位、249位、255位、258位、260位、262位、263位、264位、265位、266位、267位、268位、269位、270位、271位、272位、273位、274位、275位、276位、278位、280位、281位、282位、283位、284位、285位、286位、288位、290位、291位、292位、293位、294位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、301位、302位、303位、304位、305位、313位、317位、318位、320位、322位、323位、324位、325位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、332位、333位、334位、335位、336位および337位からなる群より選択される位置にFc領域中の少なくとも1つのアミノ酸置換を含むことができる。

【 0 0 8 8 】

いくつかの態様において、IgG変種は、Fc領域中の残基の付番がKabatにあるようなEUインデックスのものである、

D221K, D221Y, K222E, K222Y, T223E, T223K, H224E, H224Y,

T225E, T225K, T225W, P227E, P227G, P227K, P227Y, P228E, P228G, P228K, P228Y, P230A,

P230E, P230G, P230Y, A231E, A231G, A231K, A231P, A231Y, P232E, P232G, P232K, P232Y,

E233A, E233D, E233F, E233G, E233H, E233I, E233K, E233L, E233M, E233N, E233Q, E233R,

E233S, E233T, E233V, E233W, E233Y, L234A, L234D, L234E, L234F, L234G, L234H, L234I,

L234K, L234M, L234N, L234P, L234Q, L234R, L234S, L234T, L234V, L234W, L234Y, L235A,
 L235D, L235E, L235F, L235G, L235H, L235I, L235K, L235M, L235N, L235P, L235Q, L235R,
 L235S, L235T, L235V, L235W, L235Y, G236A, G236D, G236E, G236F, G236H, G236I, G236K,
 G236L, G236M, G236N, G236P, G236Q, G236R, G236S, G236T, G236V, G236W, G236Y, G237D,
 G237E, G237F, G237H, G237I, G237K, G237L, G237M, G237N, G237P, G237Q, G237R, G237S,
 G237T, G237V, G237W, G237Y, P238D, P238E, P238F, P238G, P238H, P238I, P238K, P238L,
 P238M, P238N, P238Q, P238R, P238S, P238T, P238V, P238W, P238Y, S239D, S239E, S239F,
 S239G, S239H, S239I, S239K, S239L, S239M, S239N, S239P, S239Q, S239R, S239T, S239V, 10
 S239W, S239Y, V240A, V240I, V240M, V240T, F241D, F241E, F241L, F241R, F241S, F241W,
 F241Y, F243E, F243H, F243L, F243Q, F243R, F243W, F243Y, P244H, P245A, K246D, K246E,
 K246H, K246Y, P247G, P247V, D249H, D249Q, D249Y, R255E, R255Y, E258H, E258S, E258Y,
 T260D, T260E, T260H, T260Y, V262A, V262E, V262F, V262I, V262T, V263A, V263I, V263M,
 V263T, V264A, V264D, V264E, V264F, V264G, V264H, V264I, V264K, V264L, V264M, V264N,
 V264P, V264A, V264R, V264S, V264T, V264W, V264Y, D265F, D265G, D265H, D265I, D265K,
 D265L, D265M, D265N, D265P, D265Q, D265R, D265S, D265T, D265V, D265W, D265Y, V266A, 20
 V266I, V266M, V266T, S267D, S267E, S267F, S267H, S267I, S267K, S267L, S267M, S267N,
 S267P, S267Q, S267R, S267T, S267V, S267W, S267Y, H268D, H268E, H268F, H268G, H268I,
 H268K, H268L, H268M, H268P, H268Q, H268R, H268T, H268V, H268W, E269F, E269G, E269H,
 E269I, E269K, E269L, E269M, E269N, E269P, E269R, E269S, E269T, E269V, E269W, E269Y,
 D270F, D270G, D270H, D270I, D270L, D270M, D270P, D270Q, D270R, D270S, D270T, D270W,
 D270Y, P271A, P271D, P271E, P271F, P271G, P271H, P271I, P271K, P271L, P271M, P271N,
 P271Q, P271R, P271S, P271T, P271V, P271W, P271Y, E272D, E272F, E272G, E272H, E272I,
 E272K, E272L, E272M, E272P, E272R, E272S, E272T, E272V, E272W, E272Y, V273I, K274D, 30
 K274E, K274F, K274G, K274H, K274I, K274L, K274M, K274N, K274P, K274R, K274T, K274V,
 K274W, K274Y, F275L, F275W, N276D, N276E, N276F, N276G, N276H, N276I, N276L, N276M,
 N276P, N276R, N276S, N276T, N276V, N276W, N276Y, Y278D, Y278E, Y278G, Y278H, Y278I,
 Y278K, Y278L, Y278M, Y278N, Y278P, Y278Q, Y278R, Y278S, Y278T, Y278V, Y278W, D280G,
 D280K, D280L, D280P, D280W, G281 D, G281 E, G281K, G281N, G281P, G281Q, G281Y,
 V282E, V282G, V282K, V282P, V282Y, E283G, E283H, E283K, E283L, E283P, E283R, E283Y,
 V284D, V284E, V284L, V284N, V284Q, V284T, V284Y, H285D, H285E, H285K, H285Q, H285W,
 H285Y, N286E, N286G, N286P, N286Y, K288D, K288E, K288Y, K290D, K290H, K290L, K290N, 40
 K290W, P291D, P291E, P291G, P291H, P291I, P291Q, P291T, R292D, R292E, R292T, R292Y,
 E293F, E293G, E293H, E293I, E293L, E293M, E293N, E293P, E293R, E293S, E293T, E293V,
 E293W, E293Y, E294F, E294G, E294H, E294I, E294K, E294L, E294M, E294P, E294R, E294S,
 E294T, E294V, E294W, E294Y, Q295D, Q295E, Q295F, Q295G, Q295H, Q295I, Q295M, Q295N,
 Q295P, Q295R, Q295S, Q295T, Q295V, Q295W, Q295Y, Y296A, Y296D, Y296E, Y296G, Y296H,
 Y296I, Y296K, Y296L, Y296M, Y296N, Y296Q, Y296R, Y296S, Y296T, Y296V, N297D, N297E,

N297F, N297G, N297H, N297I, N297K, N297L, N297M, N297P, N297Q, N297R, N297S, N297T,
 N297V, N297W, N297Y, S298D, S298E, S298F, S298H, S298I, S298K, S298M, S298N, S298Q,
 S298R, S298T, S298W, S298Y, T299A, T299D, T299E, T299F, T299G, T299H, T299I, T299K,
 T299L, T299M, T299N, T299P, T299Q, T299R, T299S, T299V, T299W, T299Y, Y300A, Y300D,
 Y300E, Y300G, Y300H, Y300K, Y300M, Y300N, Y300P, Y300Q, Y300R, Y300S, Y300T, Y300V,
 Y300W, R301D, R301E, R301H, R301Y, V302I, V303D, V303E, V303Y, S304D, S304H, S304L,
 S304N, S304T, V305E, V305T, V305Y, W313F, K317E, K317Q, E318H, E318L, E318Q, E318R,
 E318Y, K320D, K320F, K320G, K320H, K320I, K320L, K320N, K320P, K320S, K320T, K320V,
 K320W, K320Y, K322D, K322F, K322G, K322H, K322I, K322P, K322S, K322T, K322V, K322W,
 K322Y, V323I, S324D, S324F, S324G, S324H, S324I, S324L, S324M, S324P, S324R, S324T,
 S324V, S324W, S324Y, N325A, N325D, N325E, N325F, N325G, N325H, N325I, N325K, N325L,
 N325M, N325P, N325Q, N325R, N325S, N325T, N325V, N325W, N325Y, K326I, K326L, K326P,
 K326T, A327D, A327E, A327F, A327H, A327I, A327K, A327L, A327M, A327N, A327P, A327R,
 A327S, A327T, A327V, A327W, A327Y, L328A, L328D, L328E, L328F, L328G, L328H, L328I,
 L328K, L328M, L328N, L328P, L328Q, L328R, L328S, L328T, L328V, L328W, L328Y, P329D,
 P329E, P329F, P329G, P329H, P329I, P329K, P329L, P329M, P329N, P329Q, P329R, P329S,
 P329T, P329V, P329W, P329Y, A330E, A330F, A330G, A330H, A330I, A330L, A330M, A330N,
 A330P, A330R, A330S, A330T, A330V, A330W, A330Y, P331D, P331F, P331H, P331I, P331L,
 P331M, P331Q, P331R, P331T, P331V, P331W, P331Y, I332A, I332D, I332E, I332F, I332H, I332K,
 I332L, I332M, I332N, I332P, I332Q, I332R, I332S, I332T, I332V, I332W, I332Y, E333F, E333H,
 E333I, E333L, E333M, E333P, E333T, E333Y, K334F, K334I, K334L, K334P, K334T, T335D,
 T335F, T335G, T335H, T335I, T335L, T335M, T335N, T335P, T335R, T335S, T335V, T335W,
 T335Y, I336E, I336K, I336Y, S337E, S337H, および S337N

10

20

30

からなる群より選択される少なくとも1つの置換を含む。

【 0 0 8 9 】

いくつかの態様において、IgG変種は、Fc領域中の残基の付番がKabatにあるようなEUインデックスのものである、以下の置換の組み合わせ

S239D/A330L/I332E, S239D/A330Y/I332E/L234I,

S239D/A330Y/I332E/V266I, S239D/D265F/N297D/I332E, S239D/D265H/N297D/I332E,

S239D/D265I/N297D/I332E, S239D/D265L/N297D/I332E, S239D/D265T/N297D/I332E,

S239D/D265Y/N297D/I332E, S239D/E272I/A330L/I332E, S239D/E272I/I332E,

S239D/E272K/A330L/I332E, S239D/E272K/I332E, S239D/E272S/A330L/I332E,

40

S239D/E272S/I332E, S239D/E272Y/A330L/I332E, S239D/E272Y/I332E,

S239D/F241S/F243H/V262T/V264T/N297D/A330Y/I332E, S239D/H268D, S239D/H268E,

S239D/I332D, S239D/I332E, S239D/I332E/A327D, S239D/I332E/A330I, S239D/I332E/A330Y,

S239D/I332E/E272H, S239D/I332E/E272R, S239D/I332E/E283H, S239D/I332E/E283L,

S239D/I332E/G236A, S239D/I332E/G236S, S239D/I332E/H268D, S239D/I332E/H268E,

S239D/I332E/K246H, S239D/I332E/R255Y, S239D/I332E/S267E, S239D/I332E/V264I,

S239D/I332E/V264I/A330L, S239D/I332E/V264I/S298A, S239D/I332E/V284D,

50

S239D/I332E/V284E, S239D/I332E/V284E, S239D/I332N, S239D/I332D,
 S239D/K274E/A330L/I332E, S239D/K274E/I332E, S239D/K326E/A330L/I332E,
 S239D/K326E/A330Y/I332E, S239D/K326E/I332E, S239D/K326T/A330Y/I332E,
 S239D/K326T/I332E, S239D/N297D/A330Y/I332E, S239D/N297D/I332E,
 S239D/N297D/K326E/I332E, S239D/S267E/A330L/I332E, S239D/S267E/I332E,
 S239D/S298A/K326E/I332E, S239D/S298A/K326T/I332E, S239D/V240I/A330Y/I332E,
 S239D/V264T/A330Y/I332E, S239D/Y278T/A330L/I332E, S239D/Y278T/I332E, S239E,
 S239E/D265G, S239E/D265N, S239E/D265Q, S239E/I332D, S239E/I332E, S239E/I332N, 10
 S239E/I332Q, S239E/N297D/I332E, S239E/V264I/A330Y/I332E, S239E/V264I/I332E,
 S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E, S239F, S239G, S239H, S239I, S239K, S239L, S239M, S239N,
 S239N/I332D, S239N/I332E, S239N/I332E/A330L, S239N/I332E/A330Y, S239N/I332N,
 S239N/I332Q, S239P, S239Q, S239Q/I332D, S239Q/I332E, S239Q/I332N, S239Q/I332Q,
 S239Q/V264I/I332E, S239R, S239T, S239V, S239W, S239Y, V240A, V240I, V240I/V266I, V240M,
 V240T, F241D, F241E, F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E, F241E/F243Q/V262T/V264E,
 F241E/F243R/V262E/V264R/I332E, F241E/F243R/V262E/V264R, 20
 F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E, F241E/F243Y/V262T/V264R, F241L,
 F241L/F243L/V262I/V264I, F241L/V262I, F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E,
 F241R/F243Q/V262T/V264R, F241W, F241W/F243W, F241W/F243W/V262A/V264A, F241Y,
 F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E, F241Y/F243Y/V262T/V264T, F243E, F243L,
 F243L/V262I/V264W, F243L/V264I, F243W, P244H, P244H/P245A/P247V, P245A, K246D,
 K246E, K246H, K246Y, P247G, P247V, D249H, D249Q, D249Y, R255E, R255Y, E258H, E258S,
 E258Y, T260D, T260E, T260H, T260Y, V262E, V262F, V263A, V263I, V263M, V263T, V264A,
 V264D, V264E, V264E/N297D/I332E, V264F, V264G, V264H, V264I, V264I/A330L/I332E, 30
 V264I/A330Y/I332E, V264I/I332E, V264K, V264L, V264M, V264N, V264P, V264Q, V264R,
 V264S, V264T, V264W, V264Y, D265F, D265F/N297E/I332E, D265G, D265H, D265I, D265K,
 D265L, D265M, D265N, D265P, D265Q, D265R, D265S, D265T, D265V, D265W, D265Y,
 D265Y/N297D/I332E, D265Y/N297D/T299L/I332E, V266A, V266I, V266M, V266T, S267D,
 S267E, S267E, S267E/A327D, S267E/P331D, S267E/S324I, S267E/V282G, S267F, S267H, S267I,
 S267K, S267L, S267L/A327S, S267M, S267N, S267P, S267Q, S267Q/A327S, S267R, S267T,
 S267V, S267W, S267Y, H268D, H268E, H268F, H268G, H268I, H268K, H268L, H268M, H268P,
 H268Q, H268R, H268T, H268V, H268W, E269F, E269G, E269H, E269I, E269K, E269L, E269M, 40
 E269N, E269P, E269R, E269S, E269T, E269V, E269W, E269Y, D270F, D270G, D270H, D270I,
 D270L, D270M, D270P, D270Q, D270R, D270S, D270T, D270W, D270Y, P271A, P271D, P271E,
 P271F, P271G, P271H, P271I, P271K, P271L, P271M, P271N, P271Q, P271R, P271S, P271T,
 P271V, P271W, P271Y, E272D, E272F, E272G, E272H, E272I, E272K, E272L, E272M, E272P,
 E272R, E272S, E272T, E272V, E272W, E272Y, V273I, K274D, K274E, K274F, K274G, K274H,
 K274I, K274L, K274M, K274N, K274P, K274R, K274T, K274V, K274W, K274Y, F275L, F275W,

N276D, N276E, N276F, N276G, N276H, N276I, N276L, N276M, N276P, N276R, N276S, N276T,
 N276V, N276W, N276Y, Y278D, Y278E, Y278G, Y278H, Y278I, Y278K, Y278L, Y278M, Y278N,
 Y278P, Y278Q, Y278R, Y278S, Y278T, Y278V, Y278W, Y278W, Y278W/E283R/V302I,
 Y278W/V302I, D280G, D280K, D280L, D280P, D280W, G281D, G281D/V282G, G281E, G281K,
 G281N, G281P, G281Q, G281Y, V282E, V282G, V282G/P331D, V282K, V282P, V282Y, E283G,
 E283H, E283K, E283L, E283P, E283R, E283R/V302I/Y278W/E283R, E283Y, V284D, V284E,
 V284L, V284N, V284Q, V284T, V284Y, H285D, H285E, H285K, H285Q, H285W, H285Y, N286E,
 N286G, N286P, N286Y, K288D, K288E, K288Y, K290D, K290H, K290L, K290N, K290W, P291D, 10
 P291E, P291G, P291H, P291I, P291Q, P291T, R292D, R292E, R292T, R292Y, E293F, E293G,
 E293H, E293I, E293L, E293M, E293N, E293P, E293R, E293S, E293T, E293V, E293W, E293Y,
 E294F, E294G, E294H, E294I, E294K, E294L, E294M, E294P, E294R, E294S, E294T, E294V,
 E294W, E294Y, Q295D, Q295E, Q295F, Q295G, Q295H, Q295I, Q295M, Q295N, Q295P, Q295R,
 Q295S, Q295T, Q295V, Q295W, Q295Y, Y296A, Y296D, Y296E, Y296G, Y296I, Y296K, Y296L,
 Y296M, Y296N, Y296Q, Y296R, Y296S, Y296T, Y296V, N297D, N297D/I332E,
 N297D/I332E/A330Y, N297D/I332E/S239D/A330L, N297D/I332E/S239D/D265V,
 N297D/I332E/S298A/A330Y, N297D/I332E/T299E, N297D/I332E/T299F, N297D/I332E/T299H, 20
 N297D/I332E/T299I, N297D/I332E/T299L, N297D/I332E/T299V, N297D/I332E/Y296D,
 N297D/I332E/Y296E, N297D/I332E/Y296H, N297D/I332E/Y296N, N297D/I332E/Y296Q,
 N297D/I332E/Y296T, N297E/I332E, N297F, N297G, N297H, N297I, N297K, N297L, N297M,
 N297P, N297Q, N297R, N297S, N297S/I332E, N297T, N297V, N297W, N297Y, S298A/I332E,
 S298A/K326E, S298A/K326E/K334L, S298A/K334L, S298D, S298E, S298F, S298H, S298I, S298K,
 S298M, S298N, S298Q, S298R, S298T, S298W, S298Y, T299A, T299D, T299E, T299F, T299G,
 T299H, T299I, T299K, T299L, T299M, T299N, T299P, T299Q, T299R, T299S, T299V, T299W, 30
 T299Y, Y300A, Y300D, Y300E, Y300G, Y300H, Y300K, Y300M, Y300N, Y300P, Y300Q, Y300R,
 Y300S, Y300T, Y300V, Y300W, R301D, R301E, R301H, R301Y, V302I, V303D, V303E, V303Y,
 S304D, S304H, S304L, S304N, S304T, V305E, V305T, V305Y, W313F, K317E, K317Q, E318H,
 E318L, E318Q, E318R, E318Y, K320D, K320F, K320G, K320H, K320I, K320L, K320N, K320P,
 K320S, K320T, K320V, K320W, K320Y, K322D, K322F, K322G, K322H, K322I, K322P, K322S,
 K322T, K322V, K322W, K322Y, V323I, S324D, S324F, S324G, S324H, S324I, S324I/A327D,
 S324L, S324M, S324P, S324R, S324T, S324V, S324W, S324Y, N325A, N325D, N325E, N325F,
 N325G, N325H, N325I, N325K, N325L, N325M, N325P, N325Q, N325R, N325S, N325T, N325V, 40
 N325W, N325Y, K326I, K326L, K326P, K326T, A327D, A327E, A327F, A327H, A327I, A327K,
 A327L, A327M, A327N, A327P, A327R, A327S, A327T, A327V, A327W, A327Y, L328A, L328D,
 L328D/I332E, L328E, L328E/I332E, L328F, L328G, L328H, L328H/I332E, L328I, L328I/I332E,
 L328I/I332E, L328K, L328M, L328M/I332E, L328N, L328N/I332E, L328P, L328A, L328Q/I332E,
 L328Q/I332E, L328R, L328S, L328T, L328T/I332E, L328V, L328V/I332E, L328W, L328Y, P329D,
 P329E, P329F, P329G, P329H, P329I, P329K, P329L, P329M, P329N, P329Q, P329R, P329S,

P329T, P329V, P329W, P329Y, A330E, A330F, A330G, A330H, A330I, A330L, A330L/I332E, A330M, A330N, A330P, A330R, A330S, A330T, A330V, A330W, A330Y, A330Y/I332E, P331D, P331F, P331H, P331I, P331L, P331M, P331Q, P331R, P331T, P331V, P331W, P331Y, I332A, I332D, I332E, I332E/G281D, I332E/H268D, I332E/H268E, I332E/S239D/S298A, I332E/S239N/S298A, I332E/V264I/S298A, I332E/V284E, I332F, I332H, I332K, I332L, I332M, I332N, I332P, I332Q, I332R, I332S, I332T, I332V, I332W, I332Y, E333F, E333H, E333I, E333L, E333M, E333P, E333T, E333Y, K334F, K334I, K334P, K334T, T335D, T335F, T335G, T335H, T335I, T335L, T335M, T335N, T335P, T335R, T335S, T335V, T335W, T335Y, I336E, I336K, I336Y, S337E, S337H, および S337N

10

のいずれか1つを含む。

【 0 0 9 0 】

本明細書において記述されるIgGまたはFc変種は、それらを構成するアミノ酸修飾によって規定される。したがって、例えば、I332Eは、親Fcポリペプチドと比べてI332E置換を有するFc変種である。同様に、S239D/A330L/I332E (239D/330L/332Eともいわれる)は、親Fcポリペプチドと比べてS239D、A330LおよびI332E (239D、330Lおよび332E)置換を有するFc変種を規定する。置換が付与される順序は任意であること、すなわち、例えば、S239D/A330L/I332EはS239D/I332E/A330Lなどと同じFc変種であることに留意されたい。本発明において論じられる位置の全てで、付番はEUインデックスまたはEU付番スキームによるものである(参照により組み入れられるKabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda)。EUインデックスまたはKabatにあるようなEUインデックスは、EU抗体の付番を指す(参照により組み入れられるEdelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85)。

20

【 0 0 9 1 】

IgGとFcRnとの間の相互作用を増加させ、かつIL-12産生を増加させるその他任意のIgG変異体/変種(挿入、欠失、置換、短縮またはフレームシフト変異のような)を、本明細書において記述される組成物および方法において用いることができる。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、哺乳動物のものである。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、ヒトのものである。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、組み換え体である。

30

【 0 0 9 2 】

いくつかの態様において、本明細書において記述される組成物において用いることができるIgGの断片は、IgGの野生型Fc断片またはIgGの変異体Fc断片を含むが、ただしそのような分子は、FcRnに結合し、かつIL-12産生を増加させる能力を保持していることを条件とする。

【 0 0 9 3 】

いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片を含む組成物は、FcRn特異抗体の可変領域または可変領域の多量体型(トリアボディのような)を含む。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片を含む組成物は、テトラボディのような多量体化されたscFv構造を含む。

40

【 0 0 9 4 】

いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片を含む組成物は、IgGもしくはその変種もしくはその断片に結合されうる抗原、またはIgGもしくはその変種もしくはその断片と複合体化されうる抗原をさらに含む。FcRnと、抗原と複合体化されたIgGまたは抗原に結合されたIgGとの間の相互作用は、抗原に応じたIL-12の産生の増加を引き起こす。さまざまな態様において、抗原は、腫瘍抗原、微生物抗原、ウイルス抗原、寄生虫抗原またはそれらの組み合わせである。いくつかの態様において、抗原は、タンパク質も

50

しくはそのタンパク質模倣体、ペプチドもしくはそのペプチド模倣体、脂質またはそれらの組み合わせである。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片が抗原と複合体化されている組成物であり、該抗原はIgGまたはその断片またはその変種に非共有結合されている。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片が抗原に結合されている組成物であり、該抗原はIgGまたはその断片またはその変種に共有結合されている。

【0095】

本明細書において用いられる場合、さまざまな態様において、IL-12産生は、IL-12レベルが、剤または刺激の存在下で、そのような剤または刺激のない場合と比べて、統計的に有意な量だけ増加される場合、例えば、少なくとも100%またはそれ以上までを含め、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%またはそれ以上、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍またはそれ以上だけ増加される場合、「増加され」ている。剤または刺激は、IL-12産生を増加させるようにFcRnのIgGまたはその断片またはその変種への結合であることができる。いくつかの態様において、IgGまたはその断片またはその変種は、本明細書において記述されるように、抗原と複合体化され、または抗原に結合されることができる。

【0096】

本明細書において記述される組成物は、その必要がある対象において、がんを処置するため、がんを阻害するため、がんの再発を予防するため、および/またはがんの転移を予防するために用いられる。対象においてがんを処置するため、がんを阻害するため、がんの再発を予防するため、および/またはがんの転移を予防するための方法は、IgGまたはその変種または断片を含む組成物を提供する段階、および対象に組成物の有効量を投与する段階を含む。いくつかの態様において、IgG変種は、Kabat付番スキームによる428位でのメチオニンのロイシンへの置換および434位でのアスパラギンのセリンへの置換を含む。組成物は、IgGまたはその変種または断片と結合または複合体化された抗原をさらに含むことができる。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、哺乳動物のものである。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、ヒトのものである。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、組み換え体である。いくつかの態様において、対象においてがんを処置するため、がんを阻害するため、がんの再発を予防するため、および/またはがんの転移を予防するための方法は、対象に、化学療法剤および/または放射線療法を、組成物と同時にまたは連続的に投与する段階をさらに含む。

【0097】

がんの例としては、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されることはない。そのようながんのより具体的な例としては、基底細胞癌、胆道がん；膀胱がん；骨がん；脳およびCNSのがん；乳がん；腹膜がん；子宮頸がん；絨毛癌；結腸がんおよび直腸がん；結合組織がん；消化器系がん；子宮内膜がん；食道がん；眼のがん；頭頸部がん；胃がん(胃腸がんを含む)；膠芽腫；肝癌；肝細胞癌；上皮内新生物；腎臓がんまたは腎がん；喉頭がん；白血病；肝がん；肺がん(例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺がん、および肺の扁平上皮癌)；ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫；黒色腫；骨髄腫；神経芽腫；口腔がん(例えば、唇、舌、口、および咽頭)；卵巣がん；睪がん；前立腺がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器のがん；唾液腺がん；肉腫；皮膚がん；扁平上皮がん；胃がん；精巣がん；甲状腺がん；子宮がんまたは子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰がん；ならびに他のがん腫および肉腫；ならびにB細胞リンパ腫(低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)；小リンパ球性(SL)NHL；中悪性度/濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL；巨大腫瘤病

変NHL; マントル細胞リンパ腫; エイズ関連リンパ腫; およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症を含む); 慢性リンパ球性白血病(CLL); 急性リンパ芽球性白血病(ALL); ヘアリーセル白血病; 慢性骨髄芽球性白血病; および移植後リンパ球増殖性障害(PTLD)、ならびに母斑症に関連した異常血管増殖、(脳腫瘍に関連したものなどの)浮腫、ならびにメイグス症候群が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【 0 0 9 8 】

本明細書において記述されるいくつかの態様において、本方法は、本明細書において記述されるIgGおよびFcRn相互作用を増加させるための組成物が投与されている対象に腫瘍またはがん抗原を投与する段階をさらに含む。例示的な態様において、IgGまたはその変種またはその断片と結合または複合体化されうる腫瘍特異的な抗原には、4-1BB、5T4、腺がん抗原、 α -フェトプロテイン、BAFF、B-リンパ腫細胞、C242抗原、CA-125、炭酸脱水酵素9 (CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23 (IgE受容体)、CD28、CD30 (TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44 v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNT0888、CTLA-4、DR5、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、フィブロネクチンエクストラドメイン-B、葉酸受容体1、GD2、GD3ガングリオシド、グリコプロテイン75、GPNMB、HER2/neu、HGF、ヒト散乱因子(human scatter factor)受容体キナーゼ、IGF-1受容体、IGF-1、IgG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン α 5 β 1、インテグリン α v β 3、MORAb-009、MS4A1、MUC1、ムチンCanAg、N-グリコリルノイラミン酸、NPC-1C、PDGF-R α 、PDL192、ホスファチジルセリン、前立腺がん細胞、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、テネイシンC、TGF- β 2、TGF- β 1、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、VEGF-A、VEGFR-1、VEGFR2またはビメンチンのいずれか1つまたは複数が含まれるが、これらに限定されることはない。がんの特異的な他の抗原は、当業者に明らかであり、本発明の代替の態様に関連して用いることができる。

【 0 0 9 9 】

本明細書において記述される方法のいくつかの態様において、本方法は、IgGおよびFcRnの相互作用を増加させるための組成物を投与される対象に化学療法剤を投与する段階をさらに含む。化学療法剤の非限定的な例としては、チオテパおよびサイトキサン(CYTOXAN) (登録商標)シクロフォスファミドなどのアルキル化剤; プスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファンなどのスルホン酸アルキル; ベンゾドローパ、カルボコン、メツレドローパ、およびウレドローパなどのアジリジン; アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド(trietylenephosphoramidate)、トリエチレンチオホスファオラミド(triethylenethiophosphoramidate)およびトリメチロロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミンおよびメチラメラミン; アセトゲニン(特にプラタシンおよびプラタシノン); カンプトテシン(合成類似体トポテカンを含む); プリオスタチン; カリスタチン; CC-1065 (そのアドゼレシン、カルゼルシンおよびピゼレシン合成類似体を含む); クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8); ドラスタチン; デュオカルマイシン(合成類似体KW-2189およびCB1-TM1を含む); エリュテロピン; パンクラチスタチン; サルコジクチン; スポンジスタチン; クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェンテルミン、プレドニマスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード; カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン(ranimustine)などのニトロソ尿素(nitrosoureas); 抗生物質、例えばエンジイン抗生物質(例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシン 11およびカリケアミシン 11(例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)を参照のこと); ダイネマイシンAを含むダイネマイシン; クロドロネートなどのビスホスホネート; エスペラマイシン; ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連した色素タンパク質エネジン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン(chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルピシン

、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、アドリアマイシン(ADRIAMYCIN) (登録商標)ドキシソルピシン(モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシンおよびデオキシドキシソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン; メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)などの代謝拮抗物質; デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサートなどの葉酸類似体; フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体; アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンなどのピリミジン類似体; カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン; アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタタンなどの抗副腎剤; フロリン酸などの葉酸補給剤; アセグラトン; アルドホスファミドグリコシド; アミノレプリン酸; エニルウラシル; アムサクリン; ベストラブシル; ピサントレン; エダトレキサート; デフォファミン; デメコルシン; ジアジクオン; エルホルミチン; 酢酸エリブチニウム; エポチロン; エトグルシド; 硝酸ガリウム; ヒドロキシウレア; レンチナン; ロニダイニン; メイタンシンおよびアンサマイトシンなどのメイタンシノイド; ミトグアゾン; ミトキサントロン; モピダンモール; ニトラエリン; ペントスタチン; フェナメット; ピラルピシン; ロソキサントロン; ポドフィリン酸; 2-エチルヒドラジド; プロカルバジン; PSK(登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); ラゾキサン; リゾキシシン; シゾフラン; スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジクオン; 2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン(特にT-2毒素、ベラクリンA、ロリジンAおよびアングイジン); ウレタン; ピンデシン; ダカルバジン; マンノムスチン; ミトプロニトール; ミトラクトール; ピボプロマン; ガシトシン; アラビノシド(「Ara-C」); シクロホスファミド; チオテパ; タキソイド、例えば、タキソール(TAXOL) (登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、アブラキサン(ABRAXANE) (登録商標)パクリタキセルのクレモフォール(Cremophor)無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)、およびタキソテール(TAXOTERE) (登録商標)ドキセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); クロランブシル; GEMZAR(登録商標)ゲムシタピン; 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキサート; シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチンなどの白金類似体; ピンラスチン; 白金; エトポシド(VP-16); イホスファミド; マイトキサントロン; ピンクリスチン; ナベルピン(NAVELBINE); ビノレルピン; ノバントロン; テニポシド; エダトレキサート; ダウノマイシン; アミノプテリン; ゼローダ; イバンドロナート; イリノテカン(Camptosar, CPT-11) (イリノテカンと5-FUおよびロイコボリンとの処置レジメンを含む); トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000; ジフルオロメチルオルニチン(DMFO); レチノイン酸などのレチノイド; カペシタピン; コンプレタスタチン; ロイコボリン(LV); オキサリプラチン処置レジメン(FOLFOX)を含む、オキサリプラチン; ラパチニブ(タイケルブ(Tykerb)); 細胞増殖を低減するPKC-、Raf、H-Ras、EGFR (例えば、エルロチニブ(タルセバ(Tarceva) (登録商標)))およびVEGF-Aの阻害剤ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を挙げることができる。加えて、処置の方法は放射線療法の使用をさらに含むことができる。

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

本明細書において記述される組成物はまた、その必要がある対象において感染性疾患を処置、阻害、および/またはその重症度を低下させるために用いられる。対象において感染性疾患を処置、阻害、および/またはその重症度を低下させるための方法は、IgGまたはその変種または断片を含む組成物を提供する段階、ならびに対象に組成物の有効量を投与する段階を含む。組成物は、本明細書において記述されるように、IgGまたはその変種ま

50

たは断片と結合または複合体化された抗原をさらに含むことができる。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、哺乳動物のものである。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、ヒトのものである。いくつかの態様において、IgGまたはその変種またはその断片は、組み換え体である。

【0101】

さまざまな態様において、細菌抗原は、感染性細菌に存在し、かつ対象において免疫応答を誘導する任意の抗原であることができる。感染性細菌の例としては、以下のものが挙げられる：ヘリコバクター・ピロリ、ボレリア・ブルグドルフェリ(*Borelia burgdorferi*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophilia*)、マイコバクテリア(*Mycobacteria*)種(例えば、結核菌(*M. tuberculosis*)、*M. アビウム*(*M. avium*)、*M. イントラセルラ* 10
M. intracellulare)、カンサシ菌(*M. kansasii*)、*M. ゴルドナエ*(*M. gordonae*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋菌、髄膜炎菌、リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*) (A群ストレプトコッカス)、ストレプトコッカス・アガラクチア(*Streptococcus agalactiae*) (B群ストレプトコッカス)、ストレプトコッカス(ピリダンス群)、ストレプトコッカス・フェカリス(*Streptococcus faecalis*)、ストレプトコッカス・ボビス(*Streptococcus bovis*)、ストレプトコッカス(嫌気性種)、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)、病原性カンピロバクター(*Campylobacter*)種、エンテロコッカス(*Enterococcus*)種、インフルエンザ菌、バチルス・アントラシス(*Bacillus anthracis*)、コリネバクテリウム・ジフテリエ(*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム種、ブタ丹毒菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、ウエルシュ菌(*Clostridium perfringens*)、破傷風菌(*Clostridium tetani*)、エンテロバクター・エロゲネス(*Enterobacter aerogenes*)、肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)、パストレラ・マルトシダ(*Pasturella multocida*)、バクテロイデス(*Bacteroides*)種、フソバクテリウム・ヌクレアタム(*Fusobacterium nucleatum*)、ストレプトバチルス・モニリフォルミス(*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒トレポネマ(*Treponema pallidum*)、トレポネマ・パーテヌエ(*Treponema pertenuae*)、レプトスピラ(*Leptospira*)、およびアクチノミセス・イスラエリイ(*Actinomyces israelii*)。本明細書において記述される組成物および方法は、これらの細菌性病原体による感染の処置における使用のために企図される。(原生物などの)他の感染性生物には、熱帯熱マラリア原虫およびトキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)が含まれる。本明細書において記述 30
される組成物および方法は、これらの病原体による感染の処置における使用のために企図される。

【0102】

さまざまな態様において、ウイルス抗原は、感染性ウイルスに存在し、かつ対象において免疫応答を誘導する任意の抗原であることができる。感染性ウイルスの例としては、以下のものが挙げられる：レトロウイルス科(例えば、HIV)；ピコルナウイルス科(例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス)；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス)；(胃腸炎を引き起こす株などの)カリシウイルス科；トガウイルス科(例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス)；フラビウイルス科(例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス)；コロナウイルス科(例えば、コロナウイルス)；ラブドウイルス科(例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス)；フィロウイルス科(例えば、エボラウイルス)；パラミクソウイルス科(例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルス)；オルトミクソウイルス科(例えば、インフルエンザウイルス)；ブニヤウイルス科(例えば、ハンタウイルス、ブニヤウイルス、フレボウイルス、およびナイロウイルス)；アレナウイルス科(出血熱ウイルス)；レオウイルス科(例えば、レオウイルス、オルビウイルス、およびロタウイルス)；ピルナウイルス科；ヘパドナウイルス科(B型肝炎ウイルス)；パルボウイルス科(パルボウイルス)；パポーバウイルス科(パピローマウイルス、ポリオーマウイルス)；アデノウイルス科(大部分のアデノウイルス)；ヘルペスウイルス科(単純ヘルペスウイルス(HSV)1型およびHSV-2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、ヘル 40
50

ペスウイルス); ポックスウイルス科(痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス); ならびに(アフリカブタコレラウイルスなどの)イリドウイルス科; ならびに未分類のウイルス(例えば、海綿状脳症の病原体、(B型肝炎ウイルスの欠陥サテライトであると考えられている)D型肝炎の病原体、非A非B型肝炎(クラス1=経口伝播型; クラス2=非経口伝播型(すなわち、C型肝炎))の病原体; ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス)。本明細書において記述される組成物および方法は、これらのウイルス性病原体による感染の処置における使用のために企図される。

【0103】

本明細書において記述される組成物および方法で処置できる真菌感染症の例としては、アスペルギルス症; (カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)により引き起こされる) 10
 鷺口瘡; (クリプトコッカス(*Cryptococcus*)により引き起こされる)クリプトコッカス症; およびヒストプラズマ症が挙げられるが、これらに限定されることはない。したがって、感染性真菌の例としては、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ(*Cryptococcus neoformans*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム(*Histoplasma capsulatum*)、コクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)、ブラストミセス・デルマチチジス(*Blastomyces dermatitidis*)、クラミジア・トラコマティス(*Chlamydia trachomatis*)、カンジダ・アルビカンスが挙げられるが、これらに限定されることはない。本明細書において記述される組成物および方法は、これらの真菌性病原体による感染の処置における使用のために企図される。

【0104】

本明細書において記述される局面のいくつかの態様において、本方法は、IgGまたはその変種またはその断片を含む組成物とともにウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、または寄生虫抗原の有効量を投与する段階をさらに含む。適当なウイルス抗原の非限定的な例としては、とりわけ、以下のものが挙げられる: インフルエンザHA抗原、NA抗原、M抗原、N 20
 P抗原、およびNS抗原; HIV p24、pol、gp41、およびgp120; メタニューモウイルス(*Metapneumovirus*) (hMNV)Fタンパク質およびGタンパク質; C型肝炎ウイルス(HCV)E1タンパク質、E2タンパク質、およびコアタンパク質; デングウイルス(DEN 1-4)E1タンパク質、E2タンパク質、およびコアタンパク質; ヒトパピローマウイルスL1タンパク質; エプスタインバーウイルスgp220/350およびEBNA-3Aペプチド; サイトメガロウイルス(CMV)gB糖タンパク質、gH糖タンパク質、pp65、IE1(エキソン4)、およびpp150; 水痘帯状疱疹ウイルス(VZ 30
 V)IE62ペプチドおよび糖タンパク質Eエピトープ; 単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Dエピトープ。抗原性ポリペプチドは、天然に存在する動物もしくはヒトのウイルス単離株のポリペプチドに相当してもよいし、または天然の(病原性もしくは非病原性の)単離株と比べて、1つもしくは複数のアミノ酸置換を組み込むために操作されてもよい。

【0105】

自己免疫疾患を処置するための組成物および方法

いくつかの局面において、IgGとFcRnとの間の相互作用を改変または阻害することによりIL-12の産生を減少させる/下方制御するための組成物が、本明細書において記述される。組成物は、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する(低減または遮断する)剤を含む。そのような剤は、抗体(「抗体」は、抗体の抗原結合部分、 40
 例えばエピトープ結合ペプチドもしくは抗原結合ペプチド、パラトープ、機能的CDR; 組み換え抗体; キメラ抗体; トリボディ(tribody); ミディボディ(midibody); またはそれらの抗原結合誘導体、類似体、変種、部分、もしくは断片を含む)、タンパク質結合剤、小分子、組み換えタンパク質、ペプチド、アプタマー、アビマー(avimer)およびそれらのタンパク質結合誘導体、部分または断片を含むが、これらに限定されることはない。いくつかの態様において、組成物は、例えば、FcRnとWAVE2との間、またはFcRnとカルモジュリンとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達のような、FcRnを介した下流のシグナル伝達を阻害する剤を含む。

【0106】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特にIgGおよび/またはFcRnアンタゴニストとして 50

、本明細書において記述される組成物および方法において有用である別のクラスの剤に相当する。このクラスの剤ならびにそれらを調製および使用するのための方法は、リボザイムおよびmiRNA分子のように、当技術分野において全て周知である。例えば、徹底的な議論についてはPCT US2007/024067を参照されたい。あるいは、IgGとFcRnとの間の相互作用を阻害する剤は、本明細書において記述される組成物および方法のいくつかの態様において、例えば、組み換えFcもしくは結合体、またはタンパク質もしくは抗体、FcRn mRNAに特異的なもしくはFcRn mRNAに標的化された低分子干渉RNA、およびFcRnのmRNAとハイブリダイズするアンチセンスRNAを含むことができる。

【 0 1 0 7 】

FcRnとのIgGの相互作用を阻害する、本明細書において記述される組成物および方法で用いるための他の剤には、例えば、FcRnに特異的に反応するか、またはFcRnに特異的に結合する、FcRnに対する抗体が含まれる。いくつかの態様において、抗体は、遮断抗体であり、モノクローナル抗体またはその断片、ポリクローナル抗体またはその断片、キメラ抗体、ヒト化抗体または一本鎖抗体のいずれかであることができる。いくつかの態様において、剤は、IgGおよびFcRnに対する結合部位を含む二重特異性剤である。いくつかの態様において、剤は、IgGの組み換えFc部分またはその生物学的に活性な部分またはそのタンパク質模倣体である。Fc部分またはその生物学的に活性な部分は、哺乳動物のものであることができる。Fc部分またはその生物学的に活性な部分は、ヒトのものであることができる。

【 0 1 0 8 】

本明細書において用いられる場合、「遮断」抗体または抗体「アンタゴニスト」は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害または低減するものである。例えば、IgG/FcRn二重特異性遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、IgGおよびFcRnに結合し、樹状細胞によるIL-12産生を誘導するIgGおよびFcRnの能力を阻害する。ある種の態様において、本明細書において記述される遮断抗体もしくはアンタゴニスト抗体またはその部分は、IgGとFcRnとの間の相互作用を完全に阻害する。ある種の態様において、本明細書において記述される遮断抗体もしくはアンタゴニスト抗体またはその部分は、IgGとFcRnとの間の相互作用を低減する/減少させる。1つの態様において、抗体は、FcRnに特異的に結合するモノクローナル抗体である。1つの態様において、FcRnに特異的に結合するモノクローナル抗体は、DVN24である。1つの態様において、DVN24はヒト化される。

【 0 1 0 9 】

単純な結合アッセイ法を用いて、FcRnもしくはIgGに結合する剤、またはFcRnとIgGとの間の相互作用を破壊する剤をスクリーニングまたは検出することができる。さらに、組み換えFcRnまたはIgGペプチド模倣体を含む、本明細書において記述される組成物および方法で用いるためのFcRn/IgG相互作用を阻害する剤は、例えば、細胞に、FcRnもしくはIgGまたはその部分を発現する発現ベクターをトランスフェクションすること；細胞を剤と接触させること；細胞を溶解すること；および剤と接触させていない細胞と比べてFcRn/IgG相互作用を特徴付けることによって特定することができる。細胞は、例えば、共免疫沈降を用いて特徴付けることができる。

【 0 1 1 0 】

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

【 0 1 1 1 】

いくつかの局面において、本明細書において記述されるように、FcRnとIgGとの間の相互作用の阻害剤、またはその下流のシグナル伝達の生成の阻害剤の治療的有効量を対象に投与する段階を含む、インビボで免疫応答を(例えばIL-12産生を減少させることにより)抑制するための方法が本明細書において提供される。IgGとFcRnとの間の相互作用を低減することまたは阻害することは、インビボで免疫応答を特異的に抑制するのに有用であり、これは、自己免疫疾患および移植(例えば、骨髄または臓器)を含む免疫機能に関連した状態の処置に有用でありうる。IgG/FcRn相互作用を減少させる阻害剤は、一次療法として単独で用いてもよく、または併用療法として他の治療用物質との組み合わせで用いて、他の医学的処置の治療的有用性を増強してもよい。

【0112】

さまざまな態様において、本明細書において用いられる場合、IgGとFcRnとの間の相互作用は、1つもしくは複数のシグナル伝達活性またはIL-12産生のような、FcRn活性の下流の読み出しが、阻害剤の存在下で、そのような阻害剤のない場合と比べて、統計的に有意な量だけ低減される場合、例えば、少なくとも100%またはそれ以上までを含め、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%またはそれ以上、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍またはそれ以上だけ低減される場合、「減少され」ている。さまざまな態様において、阻害剤は、IL-12産生を減少させるようにFcRn/IgG媒介性のシグナル伝達を変化させる。

【0113】

本明細書において記述される方法のいくつかの態様において、IgG/FcRn相互作用を減少させるための阻害剤を投与される対象は、自己免疫疾患と診断されているか、自己免疫疾患を有しているか、または自己免疫疾患に苦しんでいる。したがって、いくつかの局面において、FcRn/IgG相互作用を減少させるための剤の有効量を投与する段階を含む、自己免疫障害を有しているかまたは自己免疫障害と診断された対象を処置する方法が本明細書において提供される。FcRn/IgG相互作用を減少させるための剤の有効量を投与する段階を含む、対象における自己免疫障害を阻害するまたはその重症度を低下させるための方法も本明細書において提供される。

【0114】

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

【0115】

したがって、いくつかの態様において、本明細書において記述される方法を用いて処置または予防される自己免疫疾患には、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症、原発性硬化性胆管炎、全身性エリテマトーデス(SLE)、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症(MG)、橋本甲状腺炎、グッドパスチャー症候群、天疱瘡(例えば、尋常性天疱瘡)、グレーブズ病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、抗コラーゲン抗体による強皮症、混合結合組織病、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アディソン病、自己免疫関連不妊症、川崎病、糸球体腎炎(例えば、半月体形成性糸球体腎炎、増殖性糸球体腎炎)、水疱性類天疱瘡、シェーグレン症候群、インスリン抵抗性および自己免疫性糖尿病(1型糖尿病; インスリン依存型糖尿病)が含まれるが、これらに限定されることはない。自己免疫疾患は、アテローム性動脈硬化症およびアルツハイマー病も包含するものと認識されている。本明細書において記述される局面の1つの態様において、自己免疫疾患は、多発性硬化症、1型糖尿病、橋本甲状腺炎、クローン病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、胃炎、自己免疫性肝炎、溶血性貧血、自己免疫性血友病、自己免疫性リ

10

20

30

40

50

ンパ増殖性症候群(ALPS)、自己免疫性ブドウ膜網膜炎、糸球体腎炎、ギラン・バレー症候群、乾癬および重症筋無力症からなる群より選択される。

【0116】

本明細書において用いられる用語「有効量」は、疾患または障害の少なくとも1つまたは複数の症状を軽減するために必要とされる、FcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節する(増加させるまたは減少させる)ための剤の量を指し、所望の効果を与えるのに、例えばがんもしくは感染性疾患を処置するようにIL-12産生を増加させるのに、または自己免疫疾患を処置するようにIL-12産生を減少させるのに十分な薬理的組成物の量に関する。用語「治療的有效量」はそれゆえ、典型的な対象への投与時に特定の効果をもたらすのに十分である、本明細書において開示される方法を用いてFcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節するための剤の量を指す。本明細書において用いられる有効量はまた、疾患の症状の発現を遅延させるのに、疾患の症状の経過を変化させるのに(例えば、限定されることはないが、疾患の症状の進行を遅らせるのに)、または疾患の症状を逆行させるのに十分な量を含む。したがって、正確な「有効量」を指定することは可能ではない。しかしながら、いかなる所与の場合でも、当業者は通常の実験法のみを用いて適切な「有効量」を決定することができる。

10

【0117】

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

20

30

【0118】

抗体および他のポリペプチドを含む、本明細書において記述される組成物および方法による有用な剤は、単離された剤であり、これは、その剤が、実質的に純粋であって、天然またはインビボ系においてともに見出されうる他の物質を、その意図した用途に対して実用的かつ適切な程度にまで、本質的に含まないことを意味する。具体的には、剤は、例えば、薬学的調製物の産生で有用であるように、十分に純粋であって、宿主細胞の他の生物学的成分を実質的に含まない。単離された剤は薬学的調製物中で薬学的に許容される担体と混合されうるので、剤は調製物の重量でわずかな割合のみを構成してもよい。

【0119】

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

40

【0120】

いくつかの態様において、FcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節するための本明細書において記述される剤は、剤を全身に送達するかまたは所望の表面もしくは標的へ送達する、注射、注入、点滴注入、および吸入投与を含みうるがこれ

50

らに限定されない、任意の投与方法によって対象に投与される。ポリペプチド剤が消化管における不活化から防御されうる範囲で、経口投与形態も企図される。「注射」は、非限定的に、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、脳室内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、クモ膜下、脊髄内、脳脊髄内、および胸骨内への注射および注入を含む。好ましい態様において、本明細書において記述される方法において用いるための、FcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節するための剤は、静脈内への注入または注射により投与される。

【0121】

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

10

【0122】

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

20

【0123】

「薬学的に許容される」という語句は、健全な医学的判断の範囲内で、合理的な利益/リスク比に見合う、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、ヒトおよび動物の組織と接触させて用いるのに適した、化合物、材料、組成物、および/または剤形を指す。本明細書において用いられる「薬学的に許容される担体」という語句は、FcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節するための剤の安定性、可溶性、または活性の維持に關与する、液体または固体の増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒、媒質、封入材料、製造支援物質(例えば、滑沢剤、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムもしくはステアリン酸亜鉛、またはステアリン酸)、または溶媒を封入する材料などの、薬学的に許容される材料、組成物または媒体を意味する。各担体は、製剤の他の成分と適合性があり、患者にとって有害ではない、という意味で「許容され」なければならない。薬学的に許容される担体として働きうる材料のいくつかの例としては、(1) ラクトース、グルコースおよびスクロースなどの糖類；(2) トウモロコシデンプンおよびジャガイモデンプンなどのデンプン；(3) セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、エチルセルロース、微結晶セルロースおよび酢酸セルロース；(4) 粉末トラガカント；(5) 麦芽；(6) ゼラチン；(7) カカオ脂および坐剤ワックスなどの賦形剤；(8) 落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびダイズ油などの油；(9) プロピレングリコールなどのグリコール；(10) グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール(PEG)などのポリオール；(11) オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチルなどのエステル；(12) 寒天；(13) 水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；(14) アルギン酸；(15) 発熱物質を含まない水；(16) 等張食塩水；(17) リンゲル液；(19) pH緩衝化溶液；(20) ポリエステル、ポリカーボネートおよび/またはポリ無水物；(21) ポリペプチドおよびアミノ酸などの増量剤(22) 血清アルブミン、HD

30

40

50

LおよびLDLなどの血清成分；(23) エタノールなどのC2～C12アルコール；ならびに(24) 薬学的製剤中で採用される他の無毒性の適合物質が挙げられる。放出剤、コーティング剤、保存料、および抗酸化物質も、製剤中に存在しうる。「賦形剤」、「担体」、「薬学的に許容される担体」などのような用語は、本明細書において互換的に用いられる。

【0124】

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

10

【0125】

本明細書において記述される方法において用いることができるFcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節するための剤の投与の方法および製剤のさらなる態様を以下に例証する。

20

【0126】

非経口剤形

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

30

【0127】

開示の非経口剤形を提供するために用いられうる適当な媒体は、当業者には周知である。例としては、非限定的に、滅菌水；注射用水USP；生理食塩溶液；グルコース溶液；限定されることはないが、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロースおよび塩化ナトリウム注射液、ならびに乳酸加リンゲル注射液などの、水性媒体；限定されることはないが、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、およびプロピレングリコールなどの、水混和性媒体；ならびに限定されることはないが、トウモロコシ油、綿実油、落花生油、ゴマ油、オレイン酸エチル、ミリスチン酸イソプロピル、および安息香酸ベンジルなどの、非水性媒体が挙げられる。

40

【0128】

エアロゾル製剤

FcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節する(増加させるまたは減少させる)ための剤は、加圧エアロゾル容器中に、適当な高圧ガス、例えば、プロパン、ブタン、またはイソブタンなどの炭化水素の高圧ガスと通常の補助剤とともに充填することができる。FcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節するための剤は、噴霧器または霧吹きのような加圧されない形態で投与することもできる。FcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節するための剤は、乾燥粉

50

末の形態で、例えば、吸入具の使用により、気道に直接投与することもできる。

【0129】

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

【0130】

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

【0131】

水はいくつかの化合物の分解を助長しうるため、本明細書において記述されるFcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節する(増加させるまたは減少させる)ための剤の製剤は、開示された化合物を活性成分として含む、無水の薬学的組成物および剤形をさらに包含する。例えば、水(例えば、5%)の添加は、貯蔵寿命または経時的な製剤の安定性のような特徴を決定するための、長期保管をシミュレーションする手段として、薬学分野において広く認められている。例えば、Jens T. Carstensen, *Drug Stability: Principles & Practice*, 379-80 (2nd ed., Marcel Dekker, NY, N.Y.: 1995)を参照されたい。本開示の無水の薬学的組成物および剤形は、無水の成分または低水分含有成分、および低水分または低湿度の条件を用いて調製されうる。ラクトースおよび一級アミンまたは二級アミンを含む少なくとも1種の活性成分を含む薬学的組成物および剤形は、製造、パッケージング、および/または貯蔵の間の水分および/または湿気との実質的な接触が予想される場合、好ましくは、無水である。無水の組成物は、好ましくは、適当な処方キットに含まれうるよう、水への曝露を防止することが既知の材料を用いてパッケージングされる。適当なパッケージングの例としては、密閉ホイル、プラスチック、乾燥剤を含むまたは含まない単位用量容器(例えば、バイアル)、プリスタパック、およびストリップパックが挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0132】

放出制御性剤形および徐放性剤形

本明細書において記述される方法のいくつかの態様において、FcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節する(増加させるまたは減少させる)ための剤は、放出制御手段または徐放手段により対象へ投与することができる。理想的には、医学的

10

20

30

40

50

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

10

【0133】

種々の公知の放出制御性または長期放出性の剤形、製剤、および装置は、本明細書において記述されるFcRnとIgGまたはその断片またはその変種との間の相互作用を調節するための剤とともに用いるために適合されうる。例としては、各々、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第3,845,770号；同第3,916,899号；同第3,536,809号；同第3,598,123号；同第4,008,719号；同第5,674,533号；同第5,059,595号；同第5,591,767号；同第5,120,548号；同第5,073,543号；同第5,639,476号；同第5,354,556号；同第5,733,566号；および同第6,365,185 B1号に記述されたものが挙げられるが、これらに限定されることはない。これらの剤形は、変動する割合で、所望の放出プロファイルを提供するため、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、他の重合体マトリックス、ゲル、透過膜、浸透圧系(例えば、OROS(登録商標)(Alza Corporation, Mountain View, Calif. USA))、多層コーティング、微粒子、リポソームもしくはマイクロスフェア、またはそれらの組み合わせを用いて、1種または複数種の活性成分の徐放または放出制御を提供するために用いることができる。さらに、開示された化合物の固定化され、吸着された塩型を調製し、かくして、薬物の制御送達をもたらすために、イオン交換材料が用いられてもよい。具体的な陰イオン交換体の例としては、Duolite(登録商標) A568およびDuolite(登録商標) AP143 (Rohm&Haas, Spring House, Pa. USA)が挙げられるが、これらに限定されることはない。

20

30

【0134】

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

40

【0135】

パルス間の間隔は、必要な場合、当業者によって決定されうる。しばしば、パルス間の間隔は、組成物または組成物の活性成分が、次のパルスの送達前に対象においてもはや検出可能でない時、組成物をもう一回投与することにより計算されうる。間隔は、組成物のインビボ半減期からも計算されうる。間隔は、インビボ半減期より長く、または組成物半減期の2倍、3倍、4倍、5倍、さらには10倍として計算されうる。注入またはその他の型の送達により組成物を患者へパルス投与するためのさまざまな方法および装置は、米国特許第4,747,825号；同第4,723,958号；同第4,948,592号；同第4,965,251号および同第5,403,590号に開示されている。

50

【0136】

治療剤の効力を評価するためのアッセイ法

その必要がある対象における処置の効力を判定するための方法が、本明細書において提供される。本方法は、対象からの試料を提供する段階、IL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルについて試料をアッセイする段階および処置が有効であるかどうか判定する段階を含む。

【0137】

1つの態様において、対象は、がんまたは感染性疾患と診断され、免疫グロブリンG (IgG) またはその変種またはその断片を含む組成物を含む処置を受けているか、または受けたことがある。免疫グロブリンG (IgG) またはその変種またはその断片を含む組成物を受けている対象において、対象からの試料中のIL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルが参照試料中でのレベルと比べて高いならば、処置は有効であると判定される。免疫グロブリンG (IgG) またはその変種またはその断片を含む組成物を受けている対象において、対象からの試料中のIL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルが参照試料中でのレベルと比べて低いならば、処置は有効ではないと判定される。

【0138】

1つの態様において、対象は、自己免疫疾患と診断され、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤を含む組成物を含む処置を受けているか、または受けたことがある。FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤を含む組成物を受けている対象において、処置は、対象からの試料中のIL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルが参照試料中でのレベルと比べて低いならば、有効であると判定される。FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤を含む組成物を受けている対象において、処置は、対象からの試料中のIL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetまたはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数のレベルが参照試料中でのレベルと比べて高いならば、有効ではないと判定される。

【0139】

さまざまな態様において、試料は血液、血漿または組織である。

【0140】

さまざまな態様において、試料中のIL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、またはTbetのレベルをアッセイするための方法は、当業者には明らかであろう。例えば、関心対象の1つまたは複数のタンパク質の存在を検出するために、特異抗体が用いられる。試料中に存在する関心対象のタンパク質の存在を確かめるために、および任意で、試料中に存在する関心対象のタンパク質の量を定量化するために、市販されているものを含めて、任意の適当な免疫アッセイ法が利用される。さまざまな態様において、抗体はモノクローナル抗体またはその断片、ポリクローナル抗体またはその断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、および一本鎖抗体のいずれか1つまたは複数である。これらは当業者には知られているので、公知の免疫アッセイ技法の広範囲にわたる議論は、本明細書では必要とされない。典型的な適当な免疫アッセイ技法には、ウエスタンブロット、サンドイッチ酵素免疫測定法(ELISA)、放射性免疫測定法(RIA)、競合的結合アッセイ法、ホモジニアス(homogeneous)アッセイ法、ヘテロジニアス(heterogeneous)アッセイ法などが含まれる。さまざまな公知の免疫アッセイ法は、例えば、Methods in Enzymology, 70, pp. 30-70 and 166-198 (1980)に概説されている。

【0141】

さらに、「サンドイッチ型」アッセイ法は、本明細書において記述される方法で用いられる。サンドイッチ型アッセイ法のいくつかの例は、米国特許第4,168,146号および米

10

20

30

40

50

国特許第4,366,241号に記述されている。あるいは、「競合型」アッセイ法は、本明細書において記述される方法で用いられうる。競合アッセイ法においては、標識されたプローブが、分析物と、または分析物の類似体と同一である分子と一般的に結合される。したがって、標識されたプローブは、利用されうる受容の物質を求めて関心対象の分析物と競合する。競合免疫アッセイ法の装置の例は、米国特許第4,235,601号、米国特許第4,442,204号および米国特許第5,208,535号に記述されている。

【0142】

対象から得られた試料由来のIL-12、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムBまたはTbetのいずれか1つまたは複数をコードする核酸の量を評価するために用いられうる技法には、インサイチュハイブリダイゼーションが含まれるが、これに限定されることはない(例えば、Angerer (1987) Meth. Enzymol 152: 649)。好ましいハイブリダイゼーションに基づくアッセイ法には、サザンロットまたはインサイチュハイブリダイゼーション(例えば、FISHおよびFISHに加えてSKY)のような従来の「直接プローブ」法、ならびに比較ゲノムハイブリダイゼーション法(CGH)、例えば、cDNAに基づくCGHまたはオリゴヌクレオチドに基づくCGHのような「競合プローブ」法が含まれるが、これらに限定されることはない。これらの方法は、基材(例えば膜またはガラス)結合法またはアレイに基づく手法を含むが、これらに限定されない、多種多様の形式で用いることができる。核酸分析のために用いられうるプローブは、典型的には、例えば、放射性同位体または蛍光レポーターで標識される。好ましいプローブは、ストリンジェントな条件下で標的核酸と特異的にハイブリダイズするように十分に長い。好ましいサイズ範囲は約200塩基～約1000塩基である。本発明の方法で用いるのに適したハイブリダイゼーションプロトコルは、例えば、Albertson (1984) EMBO J. 3: 1227-1234; Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9138-9142; EPO Pub. No. 430,402; Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In situ Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (1994), Pinkel, et al. (1998) Nature Genetics 20: 207-211、および/またはKallioniemi (1992) Proc. Natl Acad Sci USA 89:5321-5325 (1992)に記述されている。

【0143】

「定量的」増幅の方法は、当業者には周知である。例えば、定量的PCRは、同じプライマーを用いて既知量の対照配列を同時に共増幅することを伴う。これは、PCR反応を校正するために用いられうる内部標準を提供する。定量的PCRの詳細なプロトコルは、Innis, et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.)において提供されている。定量的PCR分析を用いたマイクロサテライト遺伝子座でのDNAコピー数の測定は、Ginzinger, et al. (2000) Cancer Research 60:5405-5409に記述されている。遺伝子の公知の核酸配列は、当業者がプライマーを日常的に選択して、遺伝子の任意の部分を増幅できるようにするのに十分である。本発明の方法において、蛍光発生定量的PCRも使用されうる。蛍光発生定量的PCRにおいて、定量は蛍光シグナル、例えば、TaqManおよびsybrグリーンの量に基づく。

【0144】

他の適当な増幅方法には、リガーゼ連鎖反応(LCR) (Wu and Wallace (1989) Genomics 4: 560, Landegren, et al. (1988) Science 241: 1077、およびBarringer et al. (1990) Gene 89: 117を参照のこと)、転写増幅(Kwoh, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173)、自己維持配列複製(Guatelli, et al. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 1874)、ドットPCR、およびリンカーアダプタPCRなどが含まれるが、これらに限定されることはない。

【0145】

ある種の態様において、マイクロアレイ分析(Han, M., et al., Nat Biotechnol, 19: 631-635, 2001; Bao, P., et al., Anal Chem, 74: 1792-1797, 2002; Schena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10614-19, 1996; およびHeller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-55, 1997)およびSAGE (一連の遺伝子発現分析)を含め、他の技法を用いて、ポリヌクレオチド遺伝子産物の発現を判定することができる。MPSSのように、

10

20

30

40

50

SAGEはデジタルであって、MPSSのような技法から入手可能なものよりも何桁も大きさは小さいとはいえ、非常に多数の特徴的(signature)配列を生じさせることができる(例えば、Velculescu, V. E., et al., Trends Genet, 16: 423-425., 2000; Tuteja R. and Tuteja N. Bioessays. 2004 Aug; 26(8):916-22を参照のこと)。核酸マイクロアレイの例は、例えば、米国特許第6,391,623号、同第6,383,754号、同第6,383,749号、同第6,380,377号、同第6,379,897号、同第6,376,191号、同第6,372,431号、同第6,351,712号、同第6,344,316号、同第6,316,193号、同第6,312,906号、同第6,309,828号、同第6,309,824号、同第6,306,643号、同第6,300,063号において見出されうる。

【0146】

本明細書において記述される方法のさまざまな態様において、規準値は、対象(例えば、がん、感染性疾患または自己免疫疾患を有する対象)から得られた試料中のIL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、またはTbetのいずれか1つまたは複数を含む関心対象のタンパク質の存在および/または量に基づく。

10

【0147】

いくつかの態様において、規準値は、疾患状態を有しない対象の集団における関心対象のタンパク質(または関心対象のタンパク質をコードする核酸)の存在の平均または中央値である。例えば、がんを有する対象において、規準値は、がんを有しない対象の集団におけるIL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、またはTbetのいずれか1つまたは複数の存在の平均または中央値である。例えば、感染性疾患を有する対象において、規準値は、感染性疾患を有しない対象の集団におけるIL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、またはTbetのいずれか1つまたは複数の存在の平均または中央値である。例えば、自己免疫疾患を有する対象において、規準値は、自己免疫疾患を有しない対象の集団におけるIL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、またはTbetのいずれか1つまたは複数の存在の平均または中央値である。さまざまな態様において、IL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、またはTbetのいずれか1つまたは複数のレベルは、少なくともまたは約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%だけ規準値と比べて変化する(対象ががんまたは感染性疾患を有するなら増加し、対象が自己免疫疾患を有するなら減少する)。さまざまな態様において、IL-12、TNF-、IFN-、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、またはTbetのいずれか1つまたは複数のレベルは、少なくともまたは約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍またはそれらの組み合わせだけ規準値と比べて変化する(対象ががんまたは感染性疾患を有するなら増加し、対象が自己免疫疾患を有するなら減少する)。

20

30

【0148】

本明細書において開示されるさまざまな局面の特定の態様を示し、記述してきたが、本明細書における教示に基づき、本発明およびさらに広いその局面から逸脱することなく変更および修正を行うことが可能であり、それゆえ、添付の特許請求の範囲は、その範囲内において、そのような変更および修正の全てを、本発明の真の趣旨および範囲内であるとして包含するものであることが、当業者には明らかであろう。

40

【0149】

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

【0150】

50

本明細書において開示されるさまざまな局面の例示的な態様は、以下の番号付けされた項目の1つまたは複数によって記述されうる。

- A. IL-12産生を増加させるための組成物であって、免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む該組成物。
- B. IgGとFcRnとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増加させる、項目Aの組成物。
- C. 抗原に対する免疫応答を増加させる、項目Aの組成物。
- D. 変種IgGが428位でのメチオニンのロイシンへの置換および434位でのアスパラギンのセリンへの置換を含む、項目Aの組成物。
- E. FcRnを架橋結合できる単量体構造または多量体構造を作出するようにIgGまたはその変種またはその断片に結合された抗原をさらに含む、項目Aの組成物。 10
- F. FcRnを架橋結合できる多量体構造を作出するようにIgGまたはその変種またはその断片と複合体化された抗原をさらに含む、項目Aの組成物。
- G. 抗原が、腫瘍抗原、内因性抗原、細胞関連抗原、アポトーシス小体、微生物抗原、ウイルス抗原、寄生虫抗原またはそれらの組み合わせである、項目EまたはFの組成物。
- H. 抗原が、タンパク質もしくはそのタンパク質模倣体、ペプチドもしくはそのペプチド模倣体、脂質またはそれらの組み合わせである、項目Gの組成物。
- I. IgGまたはその変種またはその断片が、哺乳動物のものである、項目Aの組成物。
- J. IgGまたはその変種またはその断片が、ヒトのものである、項目Aの組成物。
- K. IL-12産生を減少させるための組成物であって、FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤を含む該組成物。 20
- L. 剤が、ペプチド、タンパク質、小分子、核酸、アプタマー、オリゴヌクレオチド、抗体またはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数である、項目Kの組成物。
- M. 核酸が、FcRnに特異的なsiRNAである、項目Lの組成物。
- N. 抗体が、モノクローナル抗体またはその断片、ポリクローナル抗体またはその断片、キメラ抗体、ヒト化抗体および一本鎖抗体からなる群より選択される、項目Lの組成物。
- O. 剤が、IgGおよびFcRnに対する結合部位を含む二重特異性剤である、項目Kの組成物。
- P. 剤が、IgGの組み換えFc部分またはその生物学的に活性な部分またはそのタンパク質模倣体である、項目Kの組成物。
- Q. IgGのFc部分またはその生物学的に活性な部分が哺乳動物のものである、項目Pの組成物。 30
- R. IgGのFc部分またはその生物学的に活性な部分がヒトのものである、項目Pの組成物。
- S. FcRnおよび/またはIgGを結合させかつIgGへのFcRnの結合を調節する剤と細胞を接触させる段階を含む、FcRnとIgGとの間の相互作用を調節するための方法。
- T. 剤が、FcRnおよびIgGの相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増加させる、項目Sの方法。
- U. 剤が、FcRnおよびIgGの相互作用によって媒介されるシグナル伝達を減少させる、項目Sの方法。
- V. 剤が、IgGおよびFcRnに特異的な結合部位を含む、項目Sの方法。
- W. 剤が、IgGまたはFcRnに特異的な結合部位を含む、項目Sの方法。 40
- X. 剤が、IgGのFc部分に特異的な結合部位を含む、項目Sの方法。
- Y. 剤が、IgGおよびFcRnに特異的な結合部位を含む二重特異性ポリペプチド剤を含む、項目Sの方法。
- Z. 二重特異性ポリペプチド剤が、FcRnを特異的に結合させる抗体またはその抗原結合部分およびIgGを特異的に結合させる抗体またはその抗原結合部分を含む、項目Yの方法。
- AA. (a) 免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物を提供する段階; および
- (b) 対象におけるがんを処置するように、がんを阻害するように、がんの転移を予防するように、またはがんの再発を予防するように、対象に該組成物の有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象において、がんを処置するため、がんを阻害するため、がん
- 50

の転移を予防するため、またはがんの再発を予防するための方法。

BB. (a) 免疫グロブリンG (IgG)またはその変種またはその断片を含む組成物を提供する段階; および

(b) 対象における感染性疾患を処置するように、感染性疾患を阻害するように、または感染性疾患の重症度を低下させるように、対象に該組成物の有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象において、感染性疾患を処置するため、感染性疾患を阻害するため、または感染性疾患の重症度を低下させるための方法。

CC. 組成物が、IgGおよびFcRnの相互作用によって媒介されるシグナル伝達を増加させる、項目AAまたはBBの方法。

DD. 組成物が、抗原に対する免疫応答を増加させる、項目AAまたはBBの方法。

EE. 変種IgGが428位でのメチオニンのロイシンへの置換および434位でのアスパラギンのセリンへの置換を含む、項目AAまたはBBの方法。

FF. 組成物は抗原をさらに含み、

該抗原はIgGもしくはその変種もしくはその断片に結合されるか、または

該抗原はIgGもしくはその変種もしくはその断片と複合体化される、

項目AAまたはBBの方法。

GG. 抗原が、腫瘍抗原、微生物抗原、ウイルス抗原、寄生虫抗原またはそれらの組み合わせである、項目FFの方法。

HH. 抗原が、タンパク質もしくはそのタンパク質模倣体、ペプチドもしくはそのペプチド模倣体、脂質またはそれらの組み合わせである、項目FFの方法。

II. (a) FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤を含む組成物を提供する段階; および

(b) 対象における自己免疫疾患を処置するように、自己免疫疾患を阻害するように、または自己免疫疾患の重症度を低下させるように、対象に該組成物の有効量を投与する段階を含む、その必要がある対象において、自己免疫疾患を処置するため、自己免疫疾患を阻害するため、または自己免疫疾患の重症度を低下させるための方法。

JJ. 剤が、IL-12の産生を低減または阻害する、項目IIの方法。

KK. 剤が、ペプチド、タンパク質、小分子、核酸、アプタマー、オリゴヌクレオチド、抗体またはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数である、項目IIの方法。

LL. 核酸が、FcRnに特異的なsiRNAである、項目KKの方法。

MM. 抗体が、モノクローナル抗体またはその断片、ポリクローナル抗体またはその断片、キメラ抗体、ヒト化抗体および一本鎖抗体からなる群より選択される、項目KKの方法。

NN. 剤が、IgGおよびFcRnに対する結合部位を含む二重特異性剤である、項目IIの方法。

OO. 剤が、IgGの組み換えFc部分またはその生物学的に活性な部分またはそのタンパク質模倣体である、項目KKの方法。

PP. (a) FcRn抗体を含む組成物を提供する段階; および

(b) 対象におけるIL-12の発現を下方制御するように対象に該組成物の有効量を投与する段階

を含む、対象におけるIL-12の発現を下方制御するための方法。

QQ. (a) 免疫グロブリンG (IgG)もしくはその変種もしくはその断片を含む組成物の有効量が投与された、対象からの試料を提供する段階;

(b) 試料中のIL-12、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetもしくはそれらの組み合わせのいずれか1つもしくは複数のレベルをアッセイする段階; および

(c) 対象からの試料中のIL-12、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetもしくはそれらの組み合わせのいずれか1つもしくは複数のレベルが参照試料中でのレベルと比べて高いならば、処置が有効であると判定する段階、または対象からの試料中のIL-12、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetもしくはそれらの組み合わせのいずれか1つもしくは複数のレベルが参照試料中でのレベルと比べて低い

10

20

30

40

50

ならば、処置が有効ではないと判定する段階を含み、

対象はがんまたは感染性疾患を有する、

その必要がある対象における処置の効力を判定するための方法。

RR. (a) FcRnとIgGとの間の相互作用によって媒介されるシグナル伝達を阻害する剤を含む組成物が投与された、対象からの試料を提供する段階；

(b) 試料中のIL-12、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetもしくはそれらの組み合わせのいずれか1つもしくは複数のレベルをアッセイする段階；および

(c) 対象からの試料中のIL-12、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetもしくはそれらの組み合わせのいずれか1つもしくは複数のレベルが参照試料中のレベルと比べて低いならば、処置が有効であると判定する段階、または対象からの試料中のIL-12、TNF- α 、IFN- γ 、GM-CSF、IL-3、IL-2、グランザイムB、Tbetもしくはそれらの組み合わせのいずれか1つもしくは複数のレベルが参照試料中のレベルと比べて高いならば、処置が有効ではないと判定する段階を含み、

対象は自己免疫疾患を有する、

その必要がある対象における処置の効力を判定するための方法。

SS. 試料が血液、血漿または組織である、項目QQまたはRRの方法。

【実施例】

【0151】

以下の実施例は、主張する本発明をよりよく例証するために提供されており、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。具体的な材料が言及される程度において、単に例示を目的とするものであり、本発明を限定することを意図するものではない。当業者は、発明の能力を実行することなく、かつ、本発明の範囲から逸脱することなく、同等の手段または反応物質を開発しうる。

【0152】

実施例1 実験方法

マウスおよび腫瘍モデル

遺伝的背景C57BL/6の、FcRnを欠損した、Fcgrt $^{-/-}$ マウス(Roopenian et al., 2003)を最初に、The Jackson Laboratoryから購入した。FcgrtF1/F1マウスは、E. Sally Ward博士(テキサス大学南西医療センター)から親切にも贈与していただいた(Montoyo et al., 2009)。hFCGRT-hB2M-mFcgrt $^{-/-}$ マウスは、既述されている(Yoshida et al., 2004)。全ての手順は、ハーバード医学部門動物監視委員会(Harvard Medical Area Standing Committee on Animal)によって承認された。既述のプロトコルを用いてAOM、AOM/DSS、Apc min/+ および肺転移腫瘍モデルを実施した(LeibundGut-Landmann et al., 2008; Meunier et al., 2009; Wirtz et al., 2007)。

【0153】

結腸直腸がんの誘導

炎症関連のCRCは、図8Dに概説の通りおよび既述(Wirtz et al., 2007)の通り、10 mg/kgのアゾキシメタン(AOM) (Sigma Aldrich)の単回腹腔内用量およびその後2回の、飲料水中1.5%のデキストラン硫酸ナトリウム(DSS) (MP Biomedicals)の7日間にわたる投与により誘導された。最終のDSS過程の中止から2週後に、腫瘍組織量を評価した。腫瘍組織量は、既述(Grivennikov et al., 2012)のように、全腫瘍の直径の合計として計算された。骨髄キメラは、レシピエントの致死線量照射(2 \times 6 Gy)と、その後、適切なドナー由来の骨髄細胞1 \times 10⁶個での再構成によって作出された。AOM/DSSによるキメラの処置は、再構成から8週後に開始された。非炎症関連のCRCは、10 mg/kg AOMの週1度8回の腹腔内注射によって誘導された。AOMの最終用量の投与から12週後に腫瘍組織量を評価した。未処置マウスでの5~6ヶ月齢の時点で、ApcMin/+およびApcMin/+ Fcgrt $^{-/-}$ マウスにおける腫瘍組織量を評価した。全ての実験において、腫瘍評価14は、目に見える腫瘍(直径が1 mm超)を肉

10

20

30

40

50

眼的に計数し、デジタルキャリパで各病変の最大の直径を測定することにより盲目的に行われた。

【0154】

養子移入実験

MLNおよびLI固有層からのCD8+ T細胞またはDCを、AOM/DSS処置過程21日目にドナーマウスから単離した(図8D参照)。細胞の単離は、既述(Baker et al., 2011)のように、連続的なコラゲナーゼ消化によって行った。CD8+ T細胞をその後、陰性の磁気選別(Miltenyi Biotec)を用いて精製した。DCをCD11c-マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)での陽性の磁気選別により精製し、主としてCD8-CD11b+のDCを得た(図10I)。 1×10^6 個のCD8+ T細胞またはDCをCD8+ T細胞の場合には0日目および21日目に、ならびにDCの場合には-7日目および14日目に腹腔内注射によってレシピエントマウスに養子移入した。レシピエントマウスのMLNおよびLI固有層へ移入された細胞の適切な局在が、Ly5.1発現について遺伝的背景が同一のマウスを用いた別個の実験において検証された(図10J)。CD8+ T細胞の枯渇のため、マウスを最初に、連日、初回DC移入の3日前に始めて3用量の抗CD8抗体(クローン53-6.72, BWHBRI Antibody Core Facility) (またはアイソタイプ対照) 0.5 mgで腹腔内処置した(Kruisbeek, 1991)。その後、CD8+ T細胞の枯渇を実験終了まで3日ごとに抗CD8抗体(またはアイソタイプ) 0.5 mgの投与によって維持した。IL-12中和のため、マウスを最初に、連日、初回DC移入の3日前に始めて3腹腔内用量の抗IL-12p40抗体(クローンC17.8) (親切にもGiorgio Trinchieri博士, National Cancer Instituteから提供していただいた) (またはアイソタイプ対照) 0.5 mgで処置した。実験終了まで週2回の抗IL-12p40抗体(またはアイソタイプ) 0.5 mgの投与によって中和を維持した。

【0155】

肺転移実験

肺転移は、対数増殖期にあるOVAトランスフェクションB16黒色腫細胞(OVA-B16細胞, Kenneth Rock博士, University of Massachusetts Medical Schoolからの寛容な贈与) 0.5×10^6 個の静脈内注射によって誘導された(Falo et al., 1995; LeibundGut-Landmann et al., 2008)。肺結節の評価は、肺膨張および10%ホルマリン中での固定にしたがって行われた。DC免疫実験のため、DCを転移担持ドナーマウスの肺および流入領域リンパ節からのコラゲナーゼ消化によって単離し、DC 1×10^6 個をレシピエントマウスの後足蹠中へ皮下注射した。2週間後、レシピエントに上記の通り、OVA-B16細胞を投与した。CD8+ T細胞防御実験のため、OVA特異的OT-I CD8+ T細胞を、5日間20 U/ml IL-2の存在下で、上記のように、IgG ICまたはIHH-IgG ICをパルスしたDCで刺激した後に、精製および24時間前にOVA-B16細胞を受けていたレシピエントマウスへT細胞 1×10^6 個の静脈内注射を行った。エクスピボ負荷DCによる免疫のため、LS-IgGを作出し、WT DCに含OVA IgG ICまたはLS-IgG ICをエクスピボで3時間負荷し、その後、皮下足蹠注射の前に徹底的に洗浄した。腫瘍抗原OVAに特異的なCD8+ T細胞の定量化のため、肺を既述(Olszak et al., 2012)のようにコラゲナーゼIIで消化し、単個細胞懸濁液を作出した。細胞を抗CD3、抗CD8およびSI INFEKL-H2-Kb四量体または対照LCMV-H2-Kb四量体(Beckman-Coulter)で染色した。フローサイトメトリーにより、CD3+CD8+ゲート内のSI INFEKL-H2-Kb四量体について陽性の細胞の頻度を評価した。

【0156】

微生物叢分析

既刊の方法(Uronis et al., 2011)を用いて、微生物叢の分析を行った。手短に言えば、T-RFLP分析のため、試料を成体(8週齢)および離乳期前(2週齢)の同腹仔の糞便、近位LIまたは遠位LIから回収し、液体窒素中で急速凍結した。既述(Uronis et al., 2011)のように、T-RFLP分析のため試料を処理した。Sequentix Gelquestを用いて分析を行い、サイズ(断片の長さ)およびピーク高さ(存在量)を各TRFに割り当てた。PRIMER v6を用い、TRF存在量を全体で標準化し、平方根で変換した。標準化された変換存在量をBray Curtis類似度指数行列へコンパイルし、類似度分析(ANOSIM)を用いて、遺伝子型間での全群集組成の統計的に有意な差異について検定した。シャノン多様性(H)、マーガレフ豊かさ(d)およ

10

20

30

40

50

びピールー均等度(Pielou evenness)(J)指数を用いて多様性を測定し、スチューデントのt検定によって差異を評価した。qPCRのため、試料を7週齢の同腹仔の糞便、近位LIまたは遠位LIから回収し、液体窒素中で急速凍結した。試料を上記のように処理した。既刊のプライマーセットを用いてqPCRを行った(Arthur et al., 2012; Miyamoto et al., 2002; Periasamy and Kolenbrander, 2009; Rabizadeh et al., 2007; Shames et al., 1995)。

【 0 1 5 7 】

ヒトDCおよび組織実験

Kraft Family Blood Donor Center of the Dana-Farber Cancer Institute and Brigham and Women's Hospitalから、ヒトロイコパック(leukopack)を入手した。1000 U/ml hGM-CSFおよび500 U/ml hIL-4中で5日間、既述(Zeissig et al., 2010)のようにhMoDCを得た。培養の最後の24時間の間に、100 U/ml IFN- γ を添加した。上記のようにIgGおよびIHH-IgG刺激を行った。同じドナーから適合させた腫瘍組織および隣接正常組織の50試料を含む1セットのヒトCRC組織マイクロアレイを、BioMax USAから入手した。患者220名それぞれの複数のパンチ生検材料(punches)を含み、生存データを利用可能なもう一つのTMAが、既述されている(Karamitopoulou et al., 2011)。10 mMクエン酸塩, 1 mM EDTA, 0.05% Tween (pH 6.0)中での熱によるエピトープ回復の後、Dako社のEnVision G2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) Kitを用いて組織を染色した。一次抗体は抗hFCGR4 (HPA012122, Sigma Aldrich)、抗hCD11c (Novocastra)および抗hCD8 (Dako)であり、これらの全てを50分の1で用いた。実験は、ブリガム・アンド・ウィメンズ病院調査委員会(Brigham and Women's Hospital Review Board)の承認の下で実施された。

【 0 1 5 8 】

生化学的方法

フローサイトメトリー、RNA分析、IgG定量化、ChIP、ウエスタンブロッティング、ELISpotおよびインビトロ共培養実験は、本明細書に記述のようおよび既述(Baker et al., 2011)のように行われた。

【 0 1 5 9 】

フローサイトメトリー

既述(Baker et al., 2011)のよう、コラゲナーゼ消化を用いて脾臓、MLNまたは結腸から細胞を単離した。フローサイトメトリー染色に用いた全ての抗体は、以下: Ki-67 (BD Pharmingen)、グランザイムB (eBioscience)、FCGR4 (Sino Biologicals)を除いてBioLegendから購入した。グランザイムBに対する細胞内染色は、PMA (30 ng/ml)およびイオノマイシン(2 μ g/ml) (Sigma)による4時間の再刺激ならびにGolgiStop (BD Pharmingen)の後にCytotfix/Cytopermキット(BD Pharmingen)を用いて行った。

【 0 1 6 0 】

RNA単離およびqPCR

RNAは、RNeasy MicroKit (Qiagen)を用いフローサイトメトリーにより選別された細胞集団(CD8+ T細胞もしくはDC)から、またはRNeasy MiniKit (Qiagen)を用い急速凍結組織から直接的に単離された。RNAを、SuperScriptIII (Life Technologies)を用いて逆転写し、SYBR Green technology (Roche)を用いてqPCRにより定量化した。

【 0 1 6 1 】

インビトロおよびエキスビボ培養

サイトメトリービーズアレイ(BD Pharmingen)を用いて、プレートに結合させた抗CD3および抗CD28による再刺激24時間後にCD8+またはCD4+ T細胞活性化を評価した。ハプテンNIP (4-ヒドロキシ-3-ヨード-5-ニトロフェニル酢酸)に結合させたオボアルブミンおよびNIP特異的キメラIgG (IgG)、IHH-IgGまたはLS-IgGを用いて免疫複合体を形成させた。IHH-IgGは既述(Baker et al., 2011)のよう、NIP特異的マウスFab断片およびヒトIgG1 Fc断片を含み、かつFcRnライゲーションに必要とされるFc領域中の3つの重要なアミノ酸における変異の導入によってFcRn結合ができなくされた、キメラIgGタンパク質の突然変異体である。QuikChange部位特異的変異誘発キット(Stratagene)を用いて、ハプテンの4-ヒドロキシ-3-ヨード-5-ニトロフェニル酢酸(NIP)に特異的な、かつヒトIgG1 Fcを含んだ既述

のキメラ抗体(Ober et al., 2001)の中に、FcRn結合を増強することが知られているM428L/N434S変異(Zalevsky et al., 2010)を導入することによりLS-IgGを作出した。単離されたDC 1×10^5 個に、あらかじめ形成された免疫複合体($0.5 \mu\text{g/ml}$ のNIP結合OVA + $100 \mu\text{g/ml}$ の抗NIP IgGまたは抗NIP IHH-IgG)を2~3時間パルスし、引き続いて徹底的な洗浄および精製OT-I CD8+ T細胞 2×10^5 個の添加により、インビトロでの交差提示アッセイを行った(Baker et al., 2011)。サイトカイン分泌を24時間または48時間後に、ELISA (BD Pharmingen)によって測定した。IL-12中和実験のため、表示された濃度のIL-12中和ヤギIgG (RnD Systems)またはヤギアイソタイプ対照IgG (RnD Systems)を、IgG ICパルス化後のDCに添加した。OT-I CD8+ T細胞の添加前に1時間、中和抗体の存在下でDCをインキュベートした。

【0162】

IgG分析

アイソタイプ特異的ELISA (Southern Biotech)を用いて、未処置または処置マウスの血清中のIgGアイソタイプを定量化した。組織IgGの定量化のため、急速凍結組織をさっと溶かし、その後、プロテアーゼ阻害剤(Roche)を含有するPBS中でホモジナイズした。不溶性物質を遠心分離によって除去し、清澄化された上清中のタンパク質濃度をBCAアッセイ法(Thermo Scientific)によって評価した。等量のタンパク質をIgGアイソタイプELISAにおいて使用し、IgG濃度を総タンパク質mgに対して標準化した。デイスパーゼおよびコラゲナーゼ消化により単離され、精製された腫瘍上皮細胞から作出した溶解物を用いて、腫瘍特異的IgGを評定した(Baker et al., 2011; Olszak et al., 2012)。4 でプロテインGセファ

20

ろースピーズ(GE Healthcare Life Sciences)との終夜インキュベーションにより、腫瘍溶解物からIgGを枯渇させた。ウエスタンブロットイングのため、腫瘍上皮または正常腸上皮由来の溶解物 $10 \mu\text{g}$ を、還元条件の下でSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に転写した。膜ストリップを次に、10分の1希釈の、個々のマウス由来の血清または腸ホモジネートでプローブし、抗マウスIgG-HRPで発色させた。プロットをECLウエスタンブロットイング試薬(Western Blotting Reagent) (GE Healthcare)で発色させた。ELISAのため、連続希釈の血清または組織ホモジネートの適用および抗マウスIgG-HRPでの発色の前に、コーティング緩衝液中10分の1希釈の腫瘍溶解物でプレートをコーティングした。OVA-B16転移担持マウス由来のOVA特異的IgG分泌B細胞を、CD19-マイクロビーズ(Miltenyi Biotech)によるB細胞の単離後に製造元の使用説明書にしたがってELISpot (mAbTech)

30

【0163】

核移行およびChIP

転写因子の核移行を、表示された時間、IgG IC (FcRn結合IgGまたは非FcRn結合IHH-IgGおよびNIP-OVAで上記のように形成された)による単離DCの刺激後に評価した。NE-PER核および細胞質抽出キット(Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit) (Thermo Scientific)を用いて、核画分および細胞質画分を単離した。抗NF- κ B p65抗体、抗IRF-1抗体および抗HDAC抗体は、全てCell Signaling Technologiesから購入した。ChIPは、Cell Signaling TechnologiesのSimpleChIP Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)によるICの刺激後に行った。

【0164】

統計分析

全てのデータは、平均 \pm 標準誤差として表した。特別の定めのない限り、データは、対応のない両側スチューデントのt検定を用いて分析した。独立した実験間の結果の有意性は、対でのスチューデントのt検定によって評価した。上記のように関連する場合、非正規分布データはマン・ホイットニー検定を用いて評価し、マウス生存実験はログランク検定またはカイ二乗検定を用いて評定した。ヒト生存分析は Kaplan-Meier法で実施し、2つの曲線はログランク検定で比較した。次に、FcRn+CD11c+ 状態を単変量および多変量Cox回帰分析へ入力した。ハザード比(HR)および95%信頼区間(CI)を用いて、生存時間に及ぼすFcRn+CD11c+ 細胞数の予後作用について判定した。全ての分析は、GraphPad Prism

10

20

30

40

50

ソフトウェア(GraphPad Software, Inc.)を用いて行った。

【0165】

実施例2 FcRnは結腸直腸がんの発生を防ぐ

散発性大腸がん(CRC)の大部分は、大腸腺腫症(APC)遺伝子の不活化を伴うことが多い、規定された一連の変異事象を受けて生じる(Walther et al., 2009)。本発明者らはしたがって、Apcの異常コピーを保有し、多数の小腸腺腫を自然発生するApcMin/+ マウスでのCRCの発生に、FcRnが寄与しているかどうか調べることから始めた(Saleh and Trinchieri, 2011)。典型的には、ApcMin/+ マウスは、腫瘍抑制遺伝子の追加的欠失のような、さらなる損傷がなければ結腸病変を発生しない(Aoki et al., 2003; Saleh and Trinchieri, 2011)。しかし、FcRnが欠損している(Fcgrt-/-)マウスと交配させたApcMin/+ マウスは、そのApcMin/+ 同腹仔よりも顕著に多くのLI腫瘍を自然発生した(図1A)。重要なことには、高度異形成およびLPを通じた局所浸潤が、ApcMin/+ 動物ではなくApcMin/+Fcgrt-/- 動物由来の病変においてのみ検出された(図1Aおよび8A)。小腸(SI)における腫瘍の頻度においては差異が検出されなかった(図8B)が、小腸ではApcMin/+ マウスでの腫瘍発生は第2の遺伝的事象に依存しない(Aoki et al., 2003; Saleh and Trinchieri, 2011)。本発明者らは次に、反復投与で、結腸直腸悪性腫瘍の発生を駆動する、化学的発がん物質アゾキシメタン(AOM)の長期投与によって誘導されるCRCの発生におけるFcRnの役割について調べた(Meunier et al., 2009)。本発明者らは、AOM投与の標準レジメンに供されたFcgrt-/- マウスが、WT同腹仔よりも顕著に大量のかつ大きな腫瘍を発生させることを観察した(図1Bおよび8C)。これらのデータは、散発性CRCの発生に対する感受性を決定する際のFcRnの重要性を実証するものである。

10

20

【0166】

炎症性腸疾患はCRCのリスクの高まりに関連していること、および炎症は散発的な新形成の駆動においてさえ重要な役割を果たすことが分かっていたので(Coghil et al., 2012; Herrinton et al., 2012)、本発明者らは、FcRnを介した腫瘍防御が炎症に関連したCRCにまで及ぶかどうか調べた。本発明者らは、AOMおよびデキストラン硫酸ナトリウム(AOM/DSS)で処置したFcgrt-/- マウス(図8D) (Wirtz et al., 2007)が、WT同腹仔よりも顕著に大きなかつ大量の結腸直腸腺がんを発生させることを見出した(図1C、1D、8E)。さらに、より高い濃度のDSSで、Fcgrt-/- マウスはそのWT同腹仔と比べて顕著に悪い生存率を経験したこと(図1E)から、FcRnを介した抗腫瘍免疫は疾患の転帰に影響を与えるのに十分に強力であることが示唆された。WT対照と比べてFcgrt-/- マウスで初期の体重減少が小さいこと(図8F)は、Fcgrt-/- マウスがIgG誘導性の結腸炎から防御されるといふ以前の所見(Kobayashi et al., 2009)と一致しており、FcRn欠損との関連での腫瘍の発生が単純に炎症の増加によるものではないことが示唆された。

30

【0167】

ある種の腸管微生物は、CRCの発生の促進に関与する可能性がある(Arthur and Jobin, 2011; Arthur et al., 2012)。本発明者らはしたがって、FcRnが腸微生物組成の調節を通じて腫瘍防御を発揮していたかどうかを判定するために、本発明者らのWTおよびFcgrt-/- 同腹仔マウスにおける腸内微生物叢をプロファイルした。WTおよびFcgrt-/- 同腹仔からの全微生物群集の組成および多様性の、末端制限酵素切断断片長多型(T-RFLP)分析から、腸に関連した3つの個別の組織区画(近位LI、遠位LIおよび糞便)のいずれでも、離乳後の、8週齢マウスまたは離乳前の、2週齢マウスのどちらにおいても有意差のないことが明らかにされた(図1Fおよび8G、8H)。しかしながら、遺伝子型にかかわらず、微生物叢はこれらの3つの組織部位で異なることが分かり、それによって、本発明者らの分析が微生物組成の差異を検出するのに十分な力を有することが確認された(図8I、8J)。CRC発生と以前に関連付けられた特異的生物の差異を排除するために(Arthur and Jobin, 2011)、本発明者らはまた、属または種特異的qPCRを用いて7週齢マウスの別個のコホートでのこれらの微生物の存在量について評価し、WTおよびFcgrt-/- 同腹仔の遠位LI (図1G)または糞便(図8K)のどちらにおいても有意差のないことを見出した。全体として、これらのデータは、FcRnが、腸管微生物の多様性を調節することにより、または腫瘍促進性の微生物の存在

40

50

を減少させることにより結腸直腸腫瘍の発生を防ぐわけではないことを実証している。

【 0 1 6 8 】

実施例3 FcRnは大腸における腫瘍防御CD8+ T細胞の保持および活性化を促進する

FcRn駆動性の抗腫瘍免疫の性質をもっとよく理解しようとして、本発明者らは、切除した腫瘍と肉眼的に腫瘍のない隣接組織との両方でLPリンパ球(LPL)の免疫学的組成を調べた。CD4+ T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞またはマクロファージの数に差異は示されなかった(図9A)が、顕著により多くの数のCD8+ T細胞がWT AOM/DSS処置マウスの腫瘍組織内および隣接組織内の両方において、そのFcgrt^{-/-} 同腹仔と比較して常に見られた(図2A、2B, 上パネル、および図9B)。FcRn欠損マウスの腫瘍微小環境へのCD8+ T細胞浸潤のこの同一の欠陥がまた、ApcMin^{+/+}Fcgrt^{-/-} 動物においてそのApcMin^{+/+} 同腹仔と比較して(図9 C)、およびAOMのみで処置されたFcgrt^{-/-} マウスにおいて(図9D)認められた。さらに、AOM/DSS処置WT動物由来のさらに高率のCD8+ T細胞が、そのFcgrt^{-/-} 同腹仔由来のものが発現するよりも細胞内グランザイムBまたは表面リソソーム関連膜タンパク質-1 (LAMP1) (図2A、2B, 下パネル)を発現した。本発明者らは、AOM/DSS処置マウスのLIから選別されたエフェクタCD8+CD44+CD62L⁻ T細胞の抗CD3および抗CD28再刺激を用いてこれを確認した(図2C)。Fcgrt^{-/-} 腫瘍担持マウス由来のCD8+ T細胞は、ごくわずかな量のインターフェロン- γ (IFN- γ)、腫瘍壊死因子(TNF)およびインターロイキン-10 (IL-10)を分泌し、これらのうち後者のものは、効率的な細胞傷害性CD8+ T細胞媒介性の抗ウイルス免疫および抗腫瘍免疫に重要であることが最近になって示された(Mumm et al., 2011; Zhang and Bevan, 2011)。それぞれ、Ki-67およびアネキシンV染色によって評価した場合、CD8+ T細胞増殖またはアポトーシスの比率には差異が認められなかったが(図9E)、T細胞保持に関連したインテグリンCD103の上方制御(Le Floch et al., 2007)と、CD62L+CD8+ T細胞上の活性化関連CD44の発現の増加の両方が、Fcgrt^{-/-}ではなくWT同腹仔のLPに浸潤しているCD8+ T細胞において観察された(図9F)。これらの差異が腸間膜リンパ節(MLN)では観察されなかったため、これは、腫瘍関連組織に特異的であって(図9F)、エフェクタ記憶(TEM)細胞表現型を担持する多数のCD8+CD44+CD62L⁺ 細胞の存在がヒトCRC患者での予後の改善に関連していたので、注目に値する(Pages et al., 2005)。これらのデータはしたがって、LIに帰巢された細胞傷害性T細胞の保持および活性化を促進させることにより抗腫瘍免疫を駆動させる際のFcRnの役割と最も一致している。

【 0 1 6 9 】

本発明者らは次に、レシピエントFcgrt^{-/-} AOM/DSS処置動物へのAOM/DSS処置WTまたはFcgrt^{-/-} マウスのMLNおよびLPから単離されたCD8+ T細胞の養子移入を用いて、FcRnを介したCD8+ T細胞活性化がその腫瘍防御機能に重要であることを確認しようとした。MLNおよび全LI LPの両方から単離されたCD8+ T細胞を移入することにより、本発明者らは、寛容化(tolerizing)腫瘍微小環境に曝された可能性が高いT細胞の数を最小化することを目指とした(Chen and Mellman, 2013)。WTドナー由来のCD8+ T細胞を受けたFcgrt^{-/-} レシピエントマウスは、非T細胞(PBS)処置した対照Fcgrt^{-/-} マウスよりも顕著に少ない腫瘍を発生させた(図2D)。Fcgrt^{-/-} レシピエントへのFcgrt^{-/-} ドナー由来のCD8+ T細胞の移入は、Fcgrt^{-/-} 対照と比べて腫瘍頻度の、有意でない減少を及ぼしたが、それはまた、新生物性であった結腸の全表面で測定した場合、腫瘍サイズの、かくして全腫瘍組織量の顕著な増加をもたらした(図2D) (Grivennikov et al., 2012)。養子移入されたCD4+ T細胞で実施した同様の実験から、CD4+ T細胞がFcRnを介した腫瘍防御に十分ではないことが明らかにされた。むしろ、本発明者らのデータは、細胞傷害性CD8+ T細胞の活性化が、FcRn駆動性の腫瘍免疫監視機構が作動する主要な機構であるということに一致している。

【 0 1 7 0 】

実施例4 樹状細胞によるFcRn依存性の交差プライミングは、有効な抗腫瘍CD8+ T細胞応答を誘導する

酸性のエンドソームおよびファゴソームpHがFcRnとIgGとの結合に有利に働く、CD8-CD11b+ DCにおけるFcRnは、IgG ICにより送達された抗原の交差提示と、その結果としての、FcRnを欠く、CD8+ T細胞の活性化を駆動するという本発明者らの最近の実証(Baker et al

10

20

30

40

50

., 2011)に照らして、本発明者らは、DCによるFcRn依存性の交差プライミングがその抗腫瘍効果に必要であるかどうか判定しようとした。この機構が、ICを形成させるために腫瘍反応性IgGの存在を必要とすること、および腫瘍反応性IgGがヒトCRCにおいて以前に立証されていること(Auer et al., 1988; Kijanka et al., 2010)を考慮して、本発明者らは初めに、本発明者らのモデルにおけるこれらのエフェクタ分子の存在について確認した。AOM/DSS処置マウス由来のIgG枯渇させた腫瘍上皮溶解物を用いたELISA (図3Aおよび10A)およびウエスタンブロットティング(図10B)の両方のアッセイ法から、腫瘍反応性IgGが、非腫瘍担持対照は除いてAOM/DSS処置WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔のMLNおよびLI組織ホモジネート中にならびに血清中に存在していることが検証された。本発明者らはまた、WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔の両方の血清中で、死にかけている腫瘍細胞によって放出された、アポトーシス小体またはミトコンドリアを含むICの形成を促進しうる、抗ホスファチジルセリンIgGおよび抗カルジオリピンIgGの同程度の増加(Kepp et al., 2009)に気付いた(図10C)。さらに、腫瘍反応性IgG (図3Aおよび10A)も全IgG (図10D)もともに、AOM/DSS処置WTおよびFcgrt^{-/-} マウスのMLNおよび腸組織の中に同様のレベルで存在していた。このように、FcRnは循環血中IgGを異化作用から防御するうえで極めて重要であり、本発明者らのFcgrt^{-/-} マウスは予想通り全身的に低ガンマグロブリン血症状態であったが(図10D) (Roopenian et al., 2003)、全IgG (図10D)または腫瘍特異的IgG (図3A)のどちらの場合でも、組織IgGレベルを正常化するのに常在形質細胞による局所IgG産生で十分な可能性が高い、組織ではそうでなかった。このように、腫瘍発生に対するFcgrt^{-/-} マウスの極端な感受性は、単純にFcRnに対するIgGリガンドの局所欠乏によるものとすることはできない。

【 0 1 7 1 】

WTマウスおよびFcgrt^{-/-} マウスの両方において腫瘍抗原を結合できるIgGの存在を確認したので、本発明者らは、WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔のLI LPにおけるDC Fc R発現またはDCサブセットの分布に差異がないことを検証した(図10E)。FcRn依存性の交差提示では初期IgG IC内部移行のためにFc Rを要することを考慮すると、これは特に重要であった(Baker et al., 2011)。AOM/DSS処置マウスのMLN組織、隣接組織、および腫瘍組織由来の選別されたCD8-CD11b⁺およびCD8-CD11b⁻ DCの機能的特徴の評価から、Fcgrt^{-/-} マウスは、効果的な細胞傷害性T細胞を介した免疫を駆動することが知られているサイトカイン(IFN- γ , IL-12)および転写因子(T-bet)の産生を顕著に欠損していることが明らかにされた(図3B) (Garrett et al., 2009; Gerosa et al., 1996; Trinchieri, 2003; Zhang and Bevan, 2011)。これらの差異は、FcRn依存性の交差提示で極めて効率的であるCD8-CD11b⁺ DCサブセットにおいて最も大きかった(Baker et al., 2011)。さらに、腫瘍担持マウスの腫瘍および隣接組織から採取された全組織転写産物の分析(図10F~10H)によって、FcRn欠損動物におけるこれらの細胞傷害性促進(pro-cytotoxicity)サイトカインの組織レベルでの転写産物の減少が明らかに実証された。これらのデータはしたがって、DC内のFcRnが、効率的なCD8⁺ T細胞活性化につながるLI内の組織レベルサイトカイン環境の確立のために必要とされることを示している。

【 0 1 7 2 】

FcRnが十分なDCは抗腫瘍免疫の駆動に直接関与することを実証するために、本発明者らは最初に、一連の養子移入実験を行った。AOM/DSS処置WTドナー由来のCD8-CD11b⁺ DCを受けたFcgrt^{-/-} マウス(図10I)は、両遺伝子型由来のドナーDCの等価な帰巢および残留(図10J)にもかかわらず、対照PBS処置Fcgrt^{-/-} マウスまたはFcgrt^{-/-} DCを投与したFcgrt^{-/-} マウスよりも顕著に少ない腫瘍を発生させた(図3C, 左)。さらに、Fcgrt^{-/-} DCではなく、WT DCの投与は、Fcgrt^{-/-} レシピエントをAOM/DSS誘導性の死亡から防御した(図3C, 右)。少数でさえもFcRnが十分なWT CD8-CD11b⁺ DCの移入は、Fcgrt^{-/-} マウスの隣接および腫瘍LI組織へのCD8⁺ T細胞の浸潤を正常化することができ(図3D)、その結果、CD8⁺ T細胞の主要な欠陥がFcgrt^{-/-} マウスにおいて作用していないことが確認された。WT DCの移入から7日後にFcgrt^{-/-} レシピエントのMLNから単離されたDCに対するエクスピボアッセイ法から、FcRn依存性の交差プライミング能が回復されていたことがさらに確認された(図10K)。本発明者らは、DC中のFcRnを特異的に欠失させるためにItgax^{cre}動物と交配された

、floxed Fcgrt遺伝子(FcgrtF1/F1) (Montoyo et al., 2009)を担持するマウスを用いてこれらの所見の検証を行った(図10L)。AOM/DSSによるItgaxcreFcgrtF1/F1マウスの処置は、そのFcgrtF1/F1同腹仔において見られるよりも顕著に多くの結腸直腸腫瘍を誘導した(図3E)。ItgaxcreFcgrtF1/F1マウスはまた、比較されたLI LP CD8+ T細胞浸潤が欠損しており(図3E, 下)、それによって、特にDC内のFcRnが腸内でCD8+ T細胞活性化を統合するという本発明者らの仮説がさらに支持された。本発明者らはこれを、同時のDC移入およびCD8+ T細胞枯渇実験を実施することによって検証し、これによって、AOM/DSS処置を受けているWT CD8-CD11b+ DCのFcgrt^{-/-} レシピエントからのCD8+ T細胞の除去は、WT DCによって付与された腫瘍発生およびがん生存率の改善を無効化することが明らかにされた(図3F, G)。これらのデータはしたがって、FcRnを介した腫瘍防御の重要な機構が、IgG ICにより送達された腫瘍抗原の交差プライミングおよびサイトカイン環境の調整によるCD8+ T細胞のDC依存的活性化であることを確認するものである。

10

【 0 1 7 3 】

実施例5 DC内のFcRnは、規定の同種腫瘍抗原に向けた内因性CD8+ T細胞の活性化を可能にする

抗原特異的な系におけるFcRnを介した腫瘍免疫監視機構の個々の構成要素を確認するため、および規定された単一の腫瘍抗原を、FcRnで可能とされる経路に標的化することの有効性を実証するため、本発明者らは、OVA抗原(OVA-B16)を発現する黒色腫細胞株(B16)による肺転移モデルを用いた(Falo et al., 1995)。FcRnは肺において高度に発現されることが分かっている(Spiekermann et al., 2002)、本発明者らは初めに、WTマウスの肺はそのFcgrt^{-/-} 同腹仔の肺と比べてCD8+ T細胞に富むことの検証をした(図11A)。これらのデータは、FcRnによって調節される粘膜CD8+ T細胞応答の範囲を、がんの影響を頻繁に受け(Siegel et al., 2012)、FcRn依存性の免疫応答(Yoshida et al., 2004)と腸との免疫学的クロストークの両方に関わることが知られている(Keely et al., 2011)第2の部位にまで広げる。OVA-B16の静脈内投与の後で、本発明者らは、WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔の両方由来の肺ホモジネートおよび血清中での抗OVA IgGの上昇を観察し(図11B, 11C)、WTおよびFcgrt^{-/-} マウスのLNおよび脾臓において等数の抗OVA IgG分泌B細胞を検出し(図11D)、それによってFcRn欠損動物で腫瘍抗原特異的IgGの局所産生に欠陥のないことが確認された。WTマウスはFcgrt^{-/-} マウスよりもかなり少ない肺結節を発生し、Fcgrt^{-/-} DCではなく、WT DCによる遠位部位での皮下ワクチン接種は、Fcgrt^{-/-} レシピエントに肺転移性播種からの防御を付与した(図4Aおよび11E)。SI INFEKL/H2kb四量体染色を用いて、本発明者らは、OVA-B16腫瘍細胞を与えられているWTマウスの肺で、そのFcgrt^{-/-} 同腹仔よりもOVA腫瘍抗原特異性を有する高い比率の内因性CD8+ T細胞が生ずることを立証した(図4B)。DCに基づく、FcRnを介した腫瘍防御がCD8+ T細胞の活性化に依存していたことを確認するために、本発明者らは、WT CD8-CD11b+ DCで免疫し、OVA-B16を与えたFcgrt^{-/-} レシピエントに枯渇性の抗CD8抗体を長期投与した。WT DCの移入はFcgrt^{-/-} レシピエントにおいて転移性肺結節の発生を顕著に減少させたが、この防御はCD8+ T細胞の枯渇によって無効化された(図4C)。本発明者らは、ItgaxcreFcgrtF1/F1マウスが、そのFcgrtF1/F1同腹仔が発生させるよりも多くの数の肺結節を発生させ、腫瘍特異的CD8+ T細胞の増大の駆動であまり効率的ではないことを示すことにより、FcRnを介した腫瘍免疫監視機構の主要座がDCであることをさらに確認した(図4D)。これらの所見は、内因的に生じた腫瘍反応性IgGと内因的に派生した同種CD8+ T細胞の両方を、DCがFcRn依存性の腫瘍免疫監視機構に力を及ぼす機構の重要な構成要素と特定するものである。

20

30

40

【 0 1 7 4 】

本発明者らは次に、単一のIgG複合体化腫瘍抗原でFcRnを介した交差提示を標的化することが、抗腫瘍免疫療法の実行可能かつ魅力的な戦略でありうることを実証しようとした。そうするために、本発明者らは、Fc受容体ではなく、FcRnの結合を無効にする、Fcドメイン中の3つの点突然変異を含んだ非FcRn結合性IHH-IgG (Baker et al., 2011)、およびpH依存性を維持しながらFcRn結合を増加させる、「LS」変異(M428L/N434S)を含んだ増強FcRn結合性LS-IgG (Claypool et al., 2004; Zalevsky et al., 2010)を利用した。OVA

50

反応性OT-I CD8+ T細胞を、含OVA IgGまたはIHH-IgG ICでプライミングしたWT DCによりエキスピボで刺激し、OVA-B16細胞の静脈内投与から24時間後にFcgrt^{-/-} レシピエントマウスに養子移入した場合、IgG ICパルスDCによりプライミングしたCD8+ T細胞だけが、肺転移の発生を防御した(図4E)。さらに、含OVA LS-IgG ICを負荷したDCでマウスを免疫することにより、IgG ICを負荷したDCによる免疫がするよりも顕著に高い、転移発生からの防御が付与された(図4F)。これは、インビトロにおいて低用量抗原の交差プライミングの誘導で天然IgG ICよりもLS-IgG ICがさらに強力であったという本発明者らの所見と一致している(図11F)。まとめて、これらのデータは、規定された単一の腫瘍抗原およびIgGまたはFcRn結合性増強IgGから形成された複合体を用いてFcRnの免疫刺激能を標的化することが、従順かつ有効な抗腫瘍治療法であることを実証している。

10

【 0 1 7 5 】

実施例6 樹状細胞FcRnはLIにおいて恒常性のCD8+ T細胞活性化およびTc1サイトカイン分泌を可能にする

既存の炎症の非存在下でLIに生じるFcRnを介した抗腫瘍免疫に関する本発明者らの発見は、FcRnが、がん発生の兆候前に腸免疫監視機構において積極的な役割を果たしている可能性のあることを示唆し、したがって本発明者らに、FcRnが恒常性の状況下でLIにおいてCD8+ T細胞活性化を調節するかどうかを調べるように導いた。AOM/DSS処置マウスにおける本発明者らの知見と同様に、および循環血中IgG濃度の周知の差異にもかかわらず(Roopenian et al., 2003)、定常状態でWTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔の両方のLIおよびMLN組織中に同様の量のIgGが存在していた(図5A)。これらの結果から、腫瘍発生に対するFcgrt^{-/-} マウスの感受性は、恒常的な局所IgG欠損によるものでありえないことが確認された。しかしながら、これらの同等な組織IgG量にもかかわらず、WTマウスのLI LPはFcgrt^{-/-} マウスにおいて観察されたものと比べて、さらに大量の、他のリンパ球サブセットではなく、CD8+ T細胞を含んでいた(図5B)。LI LPへのCD8+ T細胞浸潤の同様の欠損が、未処置I tgaxcreFcgrtF1/F1マウスにおいて、その同腹仔対照と比べて存在していた(図5C)。さらに、WTマウスのLI LP由来のCD8+ T細胞は、Fcgrt^{-/-} 同腹仔から得られたT細胞と比べて再刺激により、もっと多くのIFN- γ 、IL-10およびTNFを分泌し(図5D)、単離直後に評価した場合に、もっと多くの活性化および細胞傷害性に関連したサイトカインを発現した(図5E)。WTおよびFcgrt^{-/-} レシピエントへの同種CD8+ T細胞の養子移入により、移入から10日後にWTマウスのLI LPにおいていっそう多くの数の移入T細胞が蓄積していたことだけでなく、これらはまた、顕著にいっそう多くの活性化マーカーCD44を上方制御していたことも示され(図12A)、Fcgrt^{-/-} 腫瘍担持マウスにおける欠損CD8+CD44+CD62L+ T細胞に関する本発明者らの所見と一致するものであった(図9F)。対照的に、同種WTレシピエントに移入されたWTまたはFcgrt^{-/-} ドナー由来のCD8+ T細胞は、LI LPへ等しく十分に帰巢し(図12B)、それによって、FcRnの効果が、T細胞に本来備わっているのではなく局所の腫瘍微小環境の範囲内であることが確認された。

20

30

【 0 1 7 6 】

効率的なCD8+ T細胞活性化には適切なサイトカイン環境が必要になることを考慮して、本発明者らは次に、恒常性の状況下でのFcgrt^{-/-} マウスの局所組織サイトカイン環境について調べた(Gerosa et al., 1996; Zhang and Bevan, 2011)。組織片培養(図5F)および組織RNA転写産物の分析(図12C)から、FcRnの非存在下で、MLNおよびLIは細胞傷害促進性IL-12およびTNFを産生するその能力が欠損していることが示された。未処置WTおよびFcgrt^{-/-} 同腹仔のMLNから選別されたDCのサイトカインプロファイルを調べることで、本発明者らは、CD8-CD11b+ DCにおいて、IL-23p19を除き、IFN- γ 、IL-12p35、T-betおよびTNFの発現でFcRnに対する同様の依存性を観察した(図5G)。これは、組織関連DCのCD8-CD11b+ サブセット内のFcRnがCD8+ T細胞活性化につながるサイトカイン環境の確立、したがってLIにおける腫瘍免疫監視機構の促進に関与することを示唆している。同様に、未処置Fcgrt^{-/-} マウスのLI由来のCD4+ T細胞は、WTおよびFcgrt^{-/-} マウスにおいて等量で存在しているにもかかわらず、抗CD3および抗CD28再刺激によりTh1細胞関連サイトカインの分泌が欠損していた(図12D、12E)。これらのデータは、DCにおけるFcRnのIgG ICライゲーション

40

50

ンが、LIにおけるCD8+ T細胞の機能だけでなく恒常的なTh1およびT細胞傷害性-1 (Tc1)細胞の極性化の確立にも寄与することを示唆している。

【0177】

実施例7 DCにおけるFcRnの多量体IgG ICライゲーションは、IL-12の産生を誘導する

IL-12は、CD8+ T細胞媒介性免疫の強力な促進因子であることが分かっており(Gerosa et al., 1996; Trinchieri, 2003)、Fcgrt-/- 同腹仔と比べてWTの粘膜組織からの、DC、特にCD8-CD11b+ サブセットにおいていっそう大量のIL-12を常に観察していたので、本発明者らは次に、IL-12分泌に及ぼす、IgG ICまたはFcRnを結合できないIgG IC (IHH-IgG IC)によるFcRnのライゲーションの効果について調べた。FcRn非結合性のIHH-IgG ICとではなく、FcRn結合性のIgG ICとの、未処置WTマウスのMLNおよび脾臓由来のWT CD8-CD11b+ DCのインキュベーションにより、IL-12p35転写産物の直接的誘導がもたらされた(図6A)。同様に、AOM/DSS処置マウスのMLNから単離された、Fcgrt-/- CD8-CD11b+ DCではなくWTのIgG IC刺激は、IL-12分泌の増加を引き起こした(図6B)。本発明者らは、IgG ICによるFcgrt-/- DCの刺激が、WT DCにおいて見られたよりもTh1細胞関連転写因子STAT-1 (Antonios et al., 2010)のかなり低いリン酸化をもたらすことを観察した(図6C)。本発明者らは、Stat1-/- マウスから単離されたCD8-CD11b+ DCをFcRn結合性のIgG ICおよびFcRn非結合性のIHH-IgG ICで処理し、IgG ICがSTAT-1の非存在下でIL-12p35を誘導できないことを観察することにより、STAT-1活性化がFcRn誘導性のIL-12産生の重要な構成要素であることを確認した(図6D)。本発明者らはさらに、(Liu et al., 2003; Murphy et al., 1995) IgG ICによるWT CD8-CD11b+ DCの刺激がFcgrt-/- DCにおいてまたはIHH-IgG ICによる刺激によって観察されたよりも顕著に高い、核移行およびインターフェロン調節因子-1 (IRF-1)とNF- κ B p65の両方のIL-12p35プロモーター結合をもたらすことを示し(図6C、6E)、これがMYD88非依存性であることを確認した(図13A、13B)。DCにおけるFcRnのIgG ICライゲーションはしたがって、強力なTh1およびTc1細胞関連サイトカインIL-12の産生を直接誘導することができる。

【0178】

DCによるFcRn媒介性のIL-12誘導が、抗腫瘍免疫監視機構を促進するこの受容体の能力に寄与することを実証するために、本発明者らは次に、IL-12中和実験を実施したが、この実験ではWT DCを養子移入したFcgrt-/- マウスを中和抗IL-12抗体またはアイソタイプ対照の存在下でAOM/DSS処置に供した(Wysocka et al., 1995)。WT DCはFcgrt-/- レシピエントにおける結腸直腸腫瘍の発生を、WT対照マウスで見られた数にまで減少させることができたが、この防御は、マウスを抗IL-12で処置した場合に完全に無効化された(図6F)。しかしながら、インビトロ共培養アッセイ法により、FcRn依存的なCD8+ T細胞プライミングがIL-12産生には依存しないことが実証され(図13C)、FcRnの交差提示およびサイトカイン誘導機能が互いに独立していることが示唆された。まとめて、これらのデータは、FcRn駆動性のDCを介した腫瘍防御が、IgG ICにより送達された抗原のCD8+ T細胞への交差提示を促進させ、および、とりわけ、プライミングされたT細胞の細胞傷害能を増強しうるIL-12の分泌を生じさせる二重の能力から生じることを示唆している。

【0179】

実施例8 FcRn発現DCはヒトCRCの生存期間を予測し、FcRn依存性IL-12を分泌する

マウスでの本発明者らの知見がヒトCRCの発生に関連していたことを断定的に確立するため、本発明者らは、FcRnおよびCD11cに対する免疫組織化学的染色を利用して50症例のヒトCRCおよび適合させた隣接正常組織においてFcRn発現DCの存在について評定した。図7Aおよび14Aに示されるように、FcRn+CD11c+ 細胞はCRC患者の腫瘍LI (上パネル)および隣接正常LI (下パネル)の両方の間質中に明らかに存在していた。さらに、CD8+ T細胞とのFcRn+ 間質細胞の直接的な相互作用が、腫瘍LI (上パネル)およびCRC隣接正常LI (下パネル)の両方において観察された(図7Bおよび14B)。重要なことには、FcRn+CD11c+ DCの頻度は、CRCに隣接した正常間質におけるCD8+ T細胞の存在との間に正の相関が認められた(図14C)。腫瘍微小環境中のFcRn+CD11c+ 細胞の存在が患者の生存に影響を与えるかどうか判定するために、本発明者らは、これらの細胞についてヒトCRC症例183例の、十分に特徴付

けられた組織マイクロアレイを染色し、疾患の転帰に及ぼすその影響を分析した。カプラン・マイヤー生存曲線により、パンチあたり10個以上のFcRn+CD11c+ 細胞を有する患者は、10個未満のFcRn+CD11c+ 細胞を有する患者よりも70ヶ月にわたる経過観察で顕著に長い生存時間を有することが示された(図7C)。さらに、漸増数のFcRn+CD11c+ 細胞が、単変量比例ハザード分析において患者の生存にプラスの効果($p = 0.0333$)、表示の臨床パラメータに応じて調整時には多変量分析において維持された効果($p = 0.0388$)を有することが分かった(図14D)。まとめて、これらの研究は、FcRnを発現しているDCがCRCおよびCRCに関連した隣接微小環境の両方へ局在化し、腫瘍組織へのCD8+ T細胞の浸潤と相関し、CRC患者に対する予後の改善を予測することを実証するものである。

【0180】

ヒトFcRnと抗腫瘍免疫監視機構との間の直接の因果関係を実証するために、本発明者らは、放射線照射されたFcgrt^{-/-} レシピエントを、WTであるか、Fcgrt^{-/-}であるか、またはFcgrt^{-/-}の遺伝的背景でヒトFcRnおよび 2-ミクログロブリン(2M)を発現し(hFCGRT-hB2M-mFcgrt^{-/-})、したがって該受容体のヒト型のみを保有するかのいずれかのドナー由来の骨髄で再構成されたキメラマウスを作出した(Roopenian et al., 2003)。キメラをAO M/DSS処置に供した場合、Fcgrt^{-/-}の骨髄で再構成されたFcgrt^{-/-} マウスは、WTまたはhFCGRT-hB2M-mFcgrt^{-/-}の骨髄のどちらかで再構成されたFcgrt^{-/-} マウスが発生させるよりもかなり多くの数の結腸直腸腫瘍を発生させた(図7D)。さらに、腫瘍担持マウスのLI LPにおけるCD8+ T細胞浸潤は、ヒトFcRnを発現している造血細胞を保有するFcgrt^{-/-} マウスにおいてWTレベルまで回復された(図14E)。したがって、ヒトFcRnは、そのマウス相同分子種と同じように等しく抗腫瘍免疫監視機構を統合できる。

【0181】

本発明者らは最後に、本発明者らがマウスDCにおいて実証した細胞内機構が、効率的なFcRn依存性の交差プライミングに参与するマウスCD8-CD11b+ DCサブセットと表現型の上では類似している、ヒト単球由来DC (hMoDC)を用いてそのヒト同等物においても作動することを確認しようとした(図14F、14G) (Baker et al., 2011; Collin et al., 2011)。図7Eに示されるように、IgG ICによるhMoDCの刺激は、非FcRn結合性IHH-IgG ICでの刺激よりもIL-12p35およびIL-12p40の両方のさらに高い産生をもたらす。さらに、IgG ICは1時間後および3時間後の両方で、IHH-IgG ICがするよりも高いSTAT-1リン酸化およびIRF-1核移行を誘導した(図7Fおよび14H)。全体として、それらは、IL-12産生およびCD8+ T細胞活性化を調節するその能力を通して抗腫瘍免疫を可能にするうえでのDCにおけるヒトFcRn機能の重要性を支持している。

【0182】

実施例9

図15に示されるように、FcRn特異的モノクローナル抗体DVN24での遮断は、Th1サイトカインのレベルを減少させる。

【0183】

本明細書で提示される所見は、LIおよび肺においてCD8+ T細胞の恒常的活性化の駆動での、ならびにCD8+ T細胞を介した抗腫瘍免疫監視機構でのFcRnを介した交差プライミングの重要な生理的役割を特定する。本発明者らは、FcRnの遺伝的欠失がこれらの粘膜部位での発がんに対する感受性を増加させることを複数の腫瘍モデルで明らかに確立した。FcRnが十分な条件下でプライミングされたCD8+ T細胞の移入またはWT FcRn担持DCの移入は、高い腫瘍組織量および腫瘍誘導性の死亡の両方からFcRn欠損動物を救うことができた。これは、IL-12のような免疫増強性サイトカインの産生および抗原交差提示のその二重誘導を介して腫瘍抗原特異的な内因性CD8+ T細胞のプライミングを可能にした粘膜DC内でのIgG ICを介したFcRnライゲーションに依存していた。本発明者らはまた、FcRn発現性ヒトDCが細胞傷害促進性IL-12の産生によってIgG IC刺激に応答すること、FcRn+ DCがCRC微小環境に局在化し、そこで抗腫瘍免疫を誘導するその能力が患者生存の改善に寄与すること、および造血細胞中のヒトFcRnが結腸直腸がんの発生からの防御でそのマウス相同分子種の代わりとなりうることを実証することにより、本発明者らの所見のヒトへの適用可能性を

10

20

30

40

50

実証した。本発明者らの所見はさらに、粘膜DC内でのFcRnへのIgG ICの結合が、IgG ICの細胞内輸送だけではなく、細胞傷害促進性サイトカインの分泌を増強するこれまでに認識されていないシグナル伝達カスケード機構も指令するモデルと一致している。FcRn生物学のこれらの特徴は、少量の抗原しか必要とせず、腸のおよび、潜在的に、その他粘膜の組織に特有な免疫調節性の環境を克服できる、強力な抗腫瘍免疫監視機構を唯一可能にする (MacDonald et al., 2011)。さらに、FcRn欠損は組織関連IgGレベルの減少をもたらすのではなく、恒常性の状況下でCD8+ T細胞のレベルの減弱およびCD8+ T細胞機能の減少をもたらすという本発明者らの実証は、組織におけるFcRnの主な機能が、単に全身観察される異化作用からのIgGの防御ではなく細胞を介した免疫の調節にあることをさらに示唆している。

10

【 0 1 8 4 】

FcRnを介した腫瘍防御のために重要な必要条件は、腫瘍抗原を認識でき、かつ最近記述の「Cancer-Immunity Cycle」(Brichory et al., 2001; Chen and Mellman, 2013; Desmetz et al., 2011)に入れられたFcRn依存性の抗腫瘍応答のカスケードを開始できるIgGの存在である。改変されたまたは異常に発現された腫瘍抗原に反応するまたは交差反応する内因性IgG自己抗体のかなりの量の存在が、十分に裏付けられるものであり、これらはFcRnを介した腫瘍防御の開始因子として働く可能性が高い。具体的には、単独での、または腫瘍細胞死の比率の増加によって引き起こされるアポトーシス小体もしくは細胞残屑の一部としての、腫瘍関連抗原の放出の加速(Kepp et al., 2009)は、内因性の腫瘍反応性のまたはリン脂質特異的な自己抗体との免疫複合体の形成を促進する。その次に、IgG ICによるFcRnライゲーションから生じるIL-12産生の同時誘導は、IL-12それ自体が体液性免疫の強力な誘導因子であるので、局所的なFcRn依存性の抗腫瘍免疫応答をさらにもっと増幅するものと期待される(Metzger, 2010)。DC内でのFcRnに対する重要な生理的役割はそれゆえ、粘膜悪性腫瘍および、疑いようもなく、細胞内微生物感染の宿主を標的化可能な体液性および細胞性の適応免疫応答の統合であるように思われる。

20

【 0 1 8 5 】

FcRn生物学のいくつかの興味深い局面が、本発明者らの研究から浮上した。これらのうちで第一のものは、FcRn依存性の免疫調節が恒常性の状況下で作動し、ベースラインの結腸CD8+ T細胞の活性化および機能の確立に不可欠であるということである。本発明者らは、抗細菌特異性を有するIgGが腸内に豊富に存在していること(Macpherson et al., 1996)、ならびに本明細書で記述した経路がまた、急性および慢性微生物感染に対する免疫監視機構において重要な役割を果たしうること(Yoshida et al., 2006)を考慮して、そのような恒常性応答が主として微生物抗原に向けられるものと予測する。第二に、本発明者らの研究は、異なる体区画中でFcRnにより果たされる差別的役割を強調している。FcRnは循環系内でのIgG残留の維持に不可欠であるが(Roopenian et al., 2003)、本発明者らの知見は、組織内で、FcRnが局所免疫応答の調節に主として関与することを示唆している。この考えは、Fcgrt^{-/-} マウスの腸において見られた不十分な免疫活性化に加えて、Fcgrt^{-/-} マウスは組織内でIgG量が最低限欠損してただけであって、そこでは等量のIgG産生細胞がFcRn媒介性のIgG防御の欠如を補うことが可能であったという本発明者らの所見によって支持される。最後に、本発明者らは、天然IgGまたはFcRn結合の増強のために操作されたIgGとの複合体として単一の規定された腫瘍抗原を用い、FcRnを介した抗がん免疫監視機構の経路を標的化することの実現可能性および有効性を実証した。腫瘍発症後の抗原特異的CD8+ T細胞媒介性の免疫を可能とすることに加えて、そのような治療法はまた、腸のベースライン細胞傷害能を増強することにより、健全な高リスク個体において腫瘍免疫監視機構を促進する可能性を有する。FcRn-IgG相互作用の動態に関して膨大な量の知識が存在しており(Vaughn et al., 1997)、FcRnに対する親和性の増大を伴ったIgGを操作する能力を現在利用できる(Mi et al., 2008; Zalevsky et al., 2010)とはいえ、FcRnの標的化は、DC抗体ワクチンの関心の高まり(Palucka and Banchereau, 2013)にもかかわらず現在のDCに基づくワクチン戦略(Tacke et al., 2007)によっていまだ活用されていない。

30

40

【 0 1 8 6 】

50

FcRnの多面的性質および正常生理学に及ぼすその広範囲の影響は、依然として不明なところが多いままである。全身的にFcRnの主な機能は、異化作用からの単量体IgGの防御である(Roopenian et al., 2003)が、組織、特にIgGが豊富な粘膜組織における主な役割は、多量体IgG ICによるライゲーションでの免疫学的活性化の1つであることと思われる。この趣旨で、FcRnは、抗原提示カスケードの統合だけではなく、先天性のエフェクタ免疫機能に関連するシグナル伝達カスケードの統合にも関与する。本明細書で示されるように、FcRnに対するこの役割の主な結果が、抗腫瘍免疫の効率的な誘導である。これらの研究は、FcRnがCD8+ T細胞の誘導(IL-12による)および指令(交差提示による)を通じ抗腫瘍免疫において機能することを示す。樹状細胞におけるFcRnがIgGにより複合体化された抗原の免疫原性の異化作用を促進する組織レベルでは特に、FcRnにより調節される免疫活性化のニュアンスの理解をさらに深めることは、粘膜疾患に対する新たな治療法の開発にかなり有望である。

10

【 0 1 8 7 】

参考文献

1. Antonios, D., Rousseau, P., Larange, A., Kerdine-Romer, S., and Pallardy, M. (2010). Mechanisms of IL-12 Synthesis by Human Dendritic Cells Treated with the Chemical Sensitizer NiSO₄. *J. Immunol.* 185, 89-98.
2. Aoki, K., Tamai, Y., Horiike, S., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2003). Colonic polyposis caused by mTOR-mediated chromosomal instability in Apc⁺/delta716 Cdx2^{+/-} compound mutant mice. *Nat. Genet.* 35, 323-330. 20
3. Arthur, J.C., and Jobin, C. (2011). The struggle within: Microbial influences on colorectal cancer. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 396-409.
4. Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., et al. (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338, 120-123.
5. Auer, I.O., Grosch, L., Hardorfer, C., and Roder, A. (1988). Ulcerative colitis specific cytotoxic IgG-autoantibodies against colonic epithelial cancer cells. *Gut* 29, 1639-1647. 30
6. Baker, K., Qiao, S.-W., Kuo, T.T., Aveson, V.G., Platzer, B., Andersen, J.-T., Sandlie, I., Chen, Z., de Haar, C., Lencer, W.I., et al. (2011). Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) regulates cross-

- presentation of IgG immune complexes by CD8-CD11b+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 9927-9932.
7. Brichory, F., Beer, D., LeNaour, F., Giordano, T., and Hanash, S. (2001). Proteomics-based Identification of Protein Gene Product 9.5 as a Tumor Antigen That Induces a Humoral Immune Response in Lung Cancer. *Cancer Res.* *61*, 7908-7912.
 8. Chen, Daniel S., and Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* *39*, 1-10.
 9. Claypool, S.M., Dickinson, B.L., Wagner, J.S., Johansen, F.E., Venu, N., Borawski, J.A., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2004). Bidirectional transepithelial IgG transport by a strongly polarized basolateral membrane Fcγ-receptor. *Mol. Biol. Cell* *15*, 1746-1759. 10
 10. Coghill, A.E., Newcomb, P.A., Poole, E.M., Hutter, C.M., Makar, K.W., Duggan, D., Potter, J.D., and Ulrich, C.M. (2012). Genetic Variation in Inflammatory Pathways Is Related to Colorectal Cancer Survival. *Clin. Cancer Res.* *17*, 7139-7147.
 11. Collin, M., Bigley, V., Haniffa, M., and Hambleton, S. (2011). Human dendritic cell deficiency: the missing ID? *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 575-583. 20
 12. Desmetz, C., Mange, A., Maudelonde, T., and Solassol, J. (2011). Autoantibody signatures: progress and perspectives for early cancer detection. *J. Cell Mol. Med.* *15*, 2013-2024.
 13. Faló, L.D., Kovacsovics-Bankowski, M., Thompson, K., and Rock, K.L. (1995). Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nat. Med.* *1*, 649-653.
 14. Garrett, W.S., Punit, S., Gallini, C.A., Michaud, M., Zhang, D., Sigrist, K.S., Lord, G.M., Glickman, J.N., and Glimcher, L.H. (2009). Colitis-Associated Colorectal Cancer Driven by T-bet Deficiency in Dendritic Cells. *Cancer Cell* *16*, 208-219. 30
 15. Gerosa, F., Paganin, C., Peritt, D., Paiola, F., Scupoli, M.T., Aste-Amezaga, M., Frank, I., and Trinchieri, G. (1996). Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J. Exp. Med.* *183*, 2559-2569.
 16. Grivennikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.Y., Osterreicher, C.H., Hung, K.E., *et al.* (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* *491*, 254-258.
 17. Herrinton, L.J., Liu, L., Levin, T.R., Allison, J.E., Lewis, J.D., and Velayos, F. (2012). Incidence and mortality of colorectal adenocarcinoma in persons with inflammatory bowel disease from 1998 to 2010. *Gastroenterology* *143*, 382-389. 40
 18. Karamitopoulou, E., Zlobec, I., Panayiotides, I., Patsouris, E.S., Peros, G., Rallis, G., Lapas, C., Karakitsos, P., Terracciano, L.M., and Lugli, A. (2011). Systematic analysis of proteins from different signaling pathways in the tumor center and the invasive front of colorectal cancer. *Hum. Pathol.* *42*, 1888-1896.

19. Keely, S., Talley, N.J., and Hansbro, P.M. (2011). Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. *Mucosal Immunol.* 5, 7-18.
20. Kepp, O., Tesniere, A., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). The immunogenicity of tumor cell death. *Curr. Opin. Oncol.* 21, 71-76.
21. Kijanka, G., Hector, S., Kay, E.W., Murray, F., Cummins, R., Murphy, D., MacCraith, B.D., Prehn, J.H.M., and Kenny, D. (2010). Human IgG antibody profiles differentiate between symptomatic patients with and without colorectal cancer. *Gut* 59, 69-78.
22. Kobayashi, K., Qiao, S.W., Yoshida, M., Baker, K., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2009). An FcRn-dependent role for anti-flagellin immunoglobulin G in pathogenesis of colitis in mice. *Gastroenterology* 137, 1746-1756 e1741. 10
23. Kozlowski, P.A., Cu-Uvin, S., Neutra, M.R., and Flanigan, T.P. (1997). Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect. Immun.* 65, 1387-1394.
24. Le Floch, A., Jalil, A., Vergnon, I., Chansac, B.L.M., Lazar, V., Bismuth, G., Chouaib, S., and Mami-Chouaib, F. (2007). $\alpha E\beta 7$ integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis. *J. Exp. Med.* 204, 559-570. 20
25. LeibundGut-Landmann, S., Osorio, F., Brown, G.D., and Reis e Sousa, C. (2008). Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. *Blood* 112, 4971-4980.
26. Liu, J., Cao, S., Herman, L.M., and Ma, X. (2003). Differential Regulation of Interleukin (IL)-12 p35 and p40 Gene Expression and Interferon (IFN)-gamma primed IL-12 Production by IFN Regulatory Factor 1. *J. Exp. Med.* 198, 1265-1276.
27. Ma, Y., Aymeric, L., Locher, C., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2011). The dendritic cell-tumor cross-talk in cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 146-152. 30
28. MacDonald, T.T., Monteleone, I., Fantini, M.C., and Monteleone, G. (2011). Regulation of Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Gastroenterology* 140, 1768-1775.
29. Macpherson, A., Khoo, U.Y., Forgacs, I., Philpott-Howard, J., and Bjarnason, I. (1996). Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 38, 365-375.
30. MacSween, J.M., and Eastwood, S.L. (1980). Immunoglobulins associated with human tumours in vivo: igg concentrations in eluates of colonic carcinomas. *Br. J. Cancer* 42, 503-509. 40
31. Metzger, D.W. (2010). Interleukin-12 as an adjuvant for induction of protective antibody responses. *Cytokine* 52, 102-107.
32. Meunier, C., Cai, J., Fortin, A., Kwan, T., Marquis, J.F., Turbide, C., Van Der Kraak, L., Jothy, S., Beauchemin, N., and Gros, P. (2009). Characterization of a major colon cancer susceptibility locus (Ccs3) on mouse chromosome 3. *Oncogene* 29, 647-661.

33. Mi, W., Wanjie, S., Lo, S.T., Gan, Z., Pickl-Herk, B., Ober, R.J., and Ward, E.S. (2008). Targeting the neonatal Fc receptor for antigen delivery using engineered Fc fragments. *J. Immunol.* *181*, 7550-7561.
34. Montoyo, H.P., Vaccaro, C., Hafner, M., Ober, R.J., Mueller, W., and Ward, E.S. (2009). Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 2788-2793.
35. Mumm, John B., Emmerich, J., Zhang, X., Chan, I., Wu, L., Mauze, S., Blaisdell, S., Basham, B., Dai, J., Grein, J., *et al.* (2011). IL-10 Elicits IFN-gamma-Dependent Tumor Immune Surveillance. *Cancer Cell* *20*, 781-796. 10
36. Murphy, T.L., Cleveland, M.G., Kulesza, P., Magram, J., and Murphy, K.M. (1995). Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol. Cell Biol.* *15*, 5258-5267.
37. Pages, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., *et al.* (2005). Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2654-2666. 20
38. Palucka, K., and Banchereau, J. (2013). Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Immunity* *39*, 38-48.
39. Qiao, S.W., Kobayashi, K., Johansen, F.E., Sollid, L.M., Andersen, J.T., Milford, E., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2008). Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 9337-9342.
40. Revaz, V., and Nardelli-Haeffliger, D. (2005). The importance of mucosal immunity in defense against epithelial cancers. *Curr. Opin. Immunol.* *17*, 175-179.
41. Roopenian, D.C., Christianson, G.J., Sproule, T.J., Brown, A.C., Akilesh, S., Jung, N., Petkova, S., Avanesian, L., Choi, E.Y., Shaffer, D.J., *et al.* (2003). The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J. Immunol.* *170*, 3528-3533. 30
42. Saleh, M., and Trinchieri, G. (2011). Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 9-20.
43. Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* *62*, 10-29.
44. Spiekermann, G.M., Finn, P.W., Ward, E.S., Dumont, J., Dickinson, B.L., Blumberg, R.S., and Lencer, W.I. (2002). Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung. *J. Exp. Med.* *196*, 303-310. 40
45. Tacken, P.J., de Vries, I.J.M., Torensma, R., and Figdor, C.G. (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 790-802.
46. Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 133.

47. Uronis, J.M., Arthur, J.C., Keku, T., Fodor, A., Carroll, I.M., Cruz, M.L., Appleyard, C.B., and Jobin, C. (2011). Gut microbial diversity is reduced by the probiotic VSL#3 and correlates with decreased TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 289-297.
48. Vaughn, D.E., Milburn, C.M., Penny, D.M., Martin, W.L., Johnson, J.L., and Bjorkman, P.J. (1997). Identification of critical IgG binding epitopes on the neonatal Fc receptor. *J. Mol. Biol.* 274, 597-607.
49. Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., and Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9, 489-499. 10
50. Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., and Neurath, M.F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* 2, 541-546.
51. Wysocka, M., Kubin, M., Vieira, L.Q., Ozmen, L., Garotta, G., Scott, P., and Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12 is required for interferon- γ production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur. J. Immunol.* 25, 672-676.
52. Yoshida, M., Claypool, S.M., Wagner, J.S., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2004). Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 20, 769-783. 20
53. Yoshida, M., Kobayashi, K., Kuo, T.T., Bry, L., Glickman, J.N., Claypool, S.M., Kaser, A., Nagaishi, T., Higgins, D.E., Mizoguchi, E., *et al.* (2006). Neonatal Fc receptor for IgG regulates mucosal immune responses to luminal bacteria. *J. Clin. Invest.* 116, 2142-2151.
54. Zalevsky, J., Chamberlain, A.K., Horton, H.M., Karki, S., Leung, I.W.L., Sproule, T.J., Lazar, G.A., Roopenian, D.C., and Desjarlais, J.R. (2010). Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat. Biotechnol.* 28, 157-159. 30
55. Zeissig, S., Dougan, S.K., Barral, D.C., Junker, Y., Chen, Z., Kaser, A., Ho, M., Mandel, H., McIntyre, A., Kennedy, S.M., *et al.* (2010). Primary deficiency of microsomal triglyceride transfer protein in human abetalipoproteinemia is associated with loss of CD1 function. *J. Clin. Invest.* 120, 2889-2899.
56. Zhang, N., and Bevan, Michael J. (2011). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* 35, 161-168.
57. Zhu, X., Meng, G., Dickinson, B.L., Li, X., Mizoguchi, E., Miao, L., Wang, Y., Robert, C., Wu, B., Smith, P.D., *et al.* (2001). MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 3266-3276. 40
58. Arthur, J.C., Perez-Chanona, E., Muhlbauer, M., Tomkovich, S., Uronis, J.M., Fan, T.J., Campbell, B.J., Abujamel, T., Dogan, B., Rogers, A.B., *et al.* (2012). Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 338, 120-123.

59. Baker, K., Qiao, S.-W., Kuo, T.T., Aveson, V.G., Platzer, B., Andersen, J.-T., Sandlie, I., Chen, Z., de Haar, C., Lencer, W.I., *et al.* (2011). Neonatal Fc receptor for IgG (FcRn) regulates crosspresentation of IgG immune complexes by CD8-CD11b⁺ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 9927-9932.
60. Faló, L.D., Kovacsovics-Bankowski, M., Thompson, K., and Rock, K.L. (1995). Targeting antigen into the phagocytic pathway *in vivo* induces protective tumour immunity. *Nat. Med.* *1*, 649-653.
61. Grivennikov, S.I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C.A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G.Y., Osterreicher, C.H., Hung, K.E., *et al.* (2012). Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* *491*, 254-258. 10
62. Kruisbeek, A.M. (1991). *In Vivo* Depletion of CD4⁺ and CD8-Specific T Cells. *Curr. Prot. Immunol.* *1*, 4.1.1-4.1.5.
63. LeibundGut-Landmann, S., Osorio, F., Brown, G.D., and Reis e Sousa, C. (2008). Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. *Blood* *112*, 4971-4980.
64. Miyamoto, Y., Watanabe, K., Tanaka, R., and Itoh, K. (2002). Distribution Analysis of Six Predominant Bacteroides Species in Normal Human Feces Using 16S rDNA-Targeted Species-Specific Primers. *Microbial Ecology in Health and Disease* *14*, 133-136. 20
65. Montoyo, H.P., Vaccaro, C., Hafner, M., Ober, R.J., Mueller, W., and Ward, E.S. (2009). Conditional deletion of the MHC class I-related receptor FcRn reveals the sites of IgG homeostasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 2788-2793.
66. Ober, R.J., Radu, C.G., Ghetie, V., and Ward, E.S. (2001). Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int. Immunol.* *13*, 1551-1559. 30
67. Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M.P., Richter, J., Franke, A., Glickman, J.N., Siebert, R., Baron, R.M., Kasper, D.L., and Blumberg, R.S. (2012). Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* *336*, 489-493.
68. Periasamy, S., and Kolenbrander, P.E. (2009). Aggregatibacter actinomycetemcomitans Builds Mutualistic Biofilm Communities with Fusobacterium nucleatum and Veillonella Species in Saliva. *Infect. Immun.* *77*, 3542-3551.
69. Rabizadeh, S., Rhee, K.-J., Wu, S., Huso, D., Gan, C.M., Golub, J.E., Wu, X., Zhang, M., and Sears, C.L. (2007). Enterotoxigenic Bacteroides fragilis: A potential instigator of colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *13*, 1475-1483. 40
70. Roopenian, D.C., Christianson, G.J., Sproule, T.J., Brown, A.C., Akilesh, S., Jung, N., Petkova, S., Avanesian, L., Choi, E.Y., Shaffer, D.J., *et al.* (2003). The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. *J. Immunol.* *170*, 3528-3533.

71. Shames, B., Fox, J.G., Dewhirst, F., Yan, L., Shen, Z., and Taylor, N.S. (1995). Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2968-2972.
72. Uronis, J.M., Arthur, J.C., Keku, T., Fodor, A., Carroll, I.M., Cruz, M.L., Appleyard, C.B., and Jobin, C. (2011). Gut microbial diversity is reduced by the probiotic VSL#3 and correlates with decreased TNBS-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 289-297.
73. Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B., and Neurath, M.F. (2007). Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat. Protoc.* 2, 541-546. 10
74. Yoshida, M., Claypool, S.M., Wagner, J.S., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Roopenian, D.C., Lencer, W.I., and Blumberg, R.S. (2004). Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 20, 769-783.
75. Zalevsky, J., Chamberlain, A.K., Horton, H.M., Karki, S., Leung, I.W.L., Sproule, T.J., Lazar, G.A., Roopenian, D.C., and Desjarlais, J.R. (2010). Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat. Biotechnol.* 28, 157-159. 20

【 0 1 8 8 】

上記のさまざまな方法および技法は、本出願を実行するための多くの方法を提供する。もちろん、必ずしも記述される目的または利点の全てを、本明細書において記述される任意の特定の態様にしたがって達成できるわけではないことが理解されるべきである。したがって、例えば、当業者は、本明細書において教示された1つまたは1群の利点を、本明細書において教示または提示された他の目的または利点を必ずしも達成することなく達成または最適化するように、本方法を実行できることを認識するであろう。種々の代替物が、本明細書において述べられている。いくつかの好ましい態様は、具体的には、1つの、別のまたはいくつかの特徴を包含するが、一方、他の態様は、具体的には、1つの、別のまたはいくつかの特徴を除外し、一方、さらに他の態様は、1つの、別のまたはいくつかの 30 有利な特徴の包含により特定の特徴を軽減することが理解されるべきである。

【 0 1 8 9 】

さらに、当業者は、異なる態様からさまざまな特徴の適用可能性を認識するであろう。同様に、当業者は、本明細書において記述される原理にしたがって方法を実施するために、上記のさまざまな要素、特徴および段階、ならびに各々のこのような要素、特徴または段階に関する他の既知の等価物をさまざまな組み合わせで採用することができる。さまざまな要素、特徴、および段階の中で、多様な態様に特定の態様に包含されるものもあれば、特定の態様に除外されるものもある。

【 0 1 9 0 】

ある種の態様および実施例に関連して本出願を開示してきたが、本出願の態様は具体的に開示された態様を越えて他の代替的態様ならびに/またはその使用および修正および等価物にまで広がるのが当業者に理解されよう。 40

【 0 1 9 1 】

いくつかの態様において、本出願の特定の態様の記述に関して(とりわけ、特定の添付の特許請求の範囲に関して)用いられる「1つの」および「ある」および「その」という用語ならびに類似した指示対象は、単数および複数の両方を網羅するものと解釈することができる。本明細書における値の範囲の列挙は、単に、範囲内に入る別々の各値を個々にさす略記法として用いられているものと意図される。本明細書において他に示されない限り、個々の値は、各々、あたかも個々に本発明に列挙されたかのごとく、本明細書に組み入れられる。本明細書において他に示されない限り、または状況により明白に否定されない 50

限り、本明細書において記述された全ての方法は、任意の適当な順序で実施されうる。本明細書においてある種の態様に関して提供された全ての任意の例、または例示的な語(例えば、「のような」)の使用は、本出願をよりよく説明するために意図されるに過ぎず、別途主張される本出願の範囲に制限をかけるものではない。本明細書中の語は、本出願の実践にとって不可欠な任意の、主張されていない要素を示すものと解釈されるべきではない。

【0192】

本出願を実施するための、本発明者らが知る最良の形態を含む、本出願の好ましい態様が、本明細書において記述される。それらの好ましい態様の変動は、上記の記述を読み取ることにより、当業者に明白になるであろう。当業者は、適宜、そのような変動を利用することが企図され、本明細書において具体的に記述されたもの以外にも本出願が実践されることが企図される。したがって、本出願の多くの態様は、適用可能な法律により許容されるように、本明細書に添付された特許請求の範囲において列挙された主題の全ての修飾および等価物を含む。さらに、本明細書において他に示されない限り、または状況により明白に否定されない限り、全ての可能な変動における上記の要素の任意の組み合わせが、本出願に包含される。

10

【0193】

本明細書において参照される特許、特許出願、特許出願の刊行物、および他の資料、例えば論文、書物、仕様書、刊行物、文書、事柄などおよび/またはその他は全て、全ての目的のために、本参照によりその全体が本明細書に組み入れられるが、ただし、それらに関連した任意の審査履歴、本発明の文書と一致しないかまたは矛盾するそれらのいずれか、あるいは本発明の文書にここでまたは後に関連する最も広い特許請求の範囲に関して限定的影響を及ぼしうるそれらのいずれかは除外する。例として、組み入れられた資料のいずれかと関連する記述、定義、および/または用語の使用と、本発明の文書と関連するものとの間に何らかの不一致または矛盾が存在する場合、本発明の文書における記述、定義、および/または用語の使用が優先するものとする。

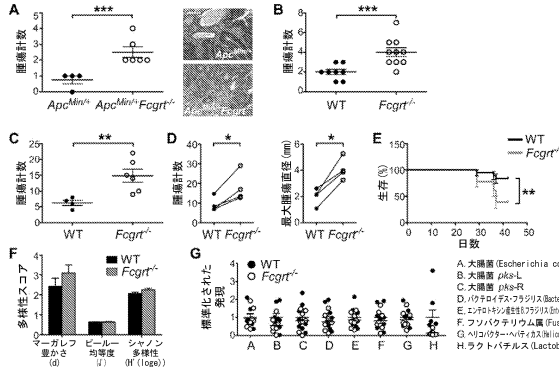
20

【0194】

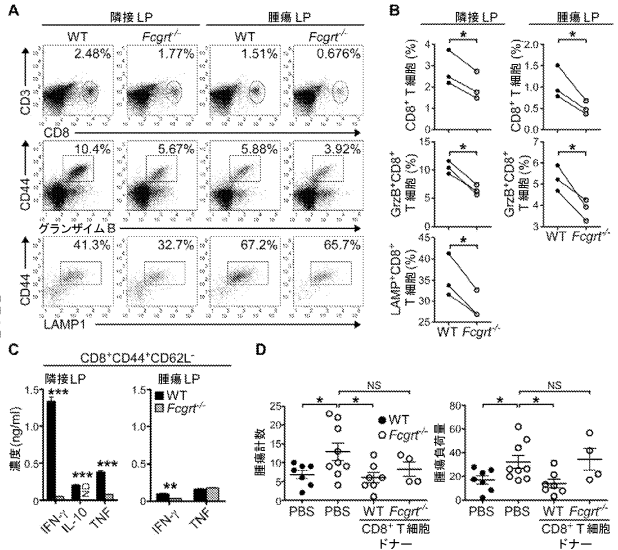
本明細書において開示される本出願の態様は、本出願の態様の原理の例示であることが理解されるべきである。採用されうる他の修正は、本出願の範囲内でありうる。かくして、例として、本出願の態様の代替的構成が本明細書中の教示にしたがって利用され得るが、しかしそれらに限定されない。したがって、本出願の態様は、明確に示され、記述されたようなものに限定されない。

30

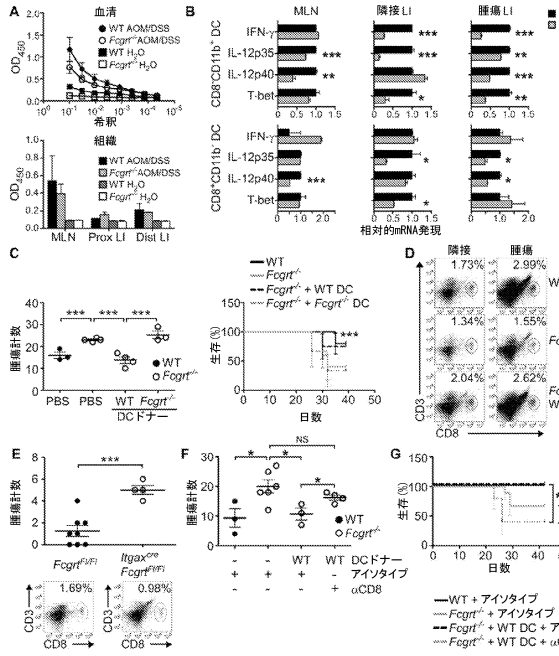
【図1】



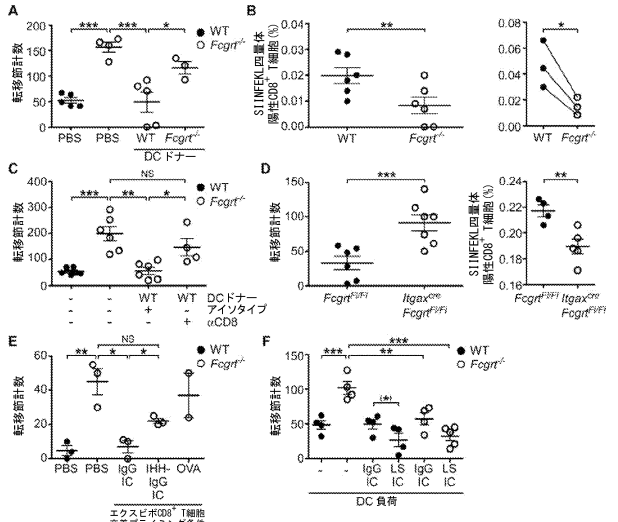
【図2】



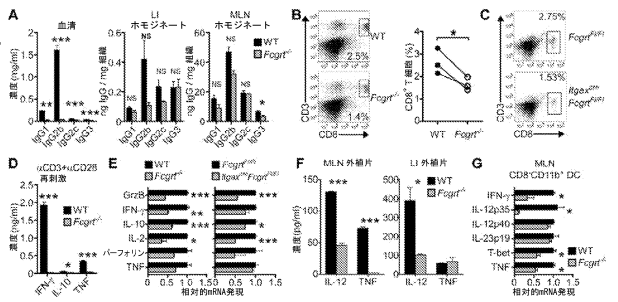
【図3】



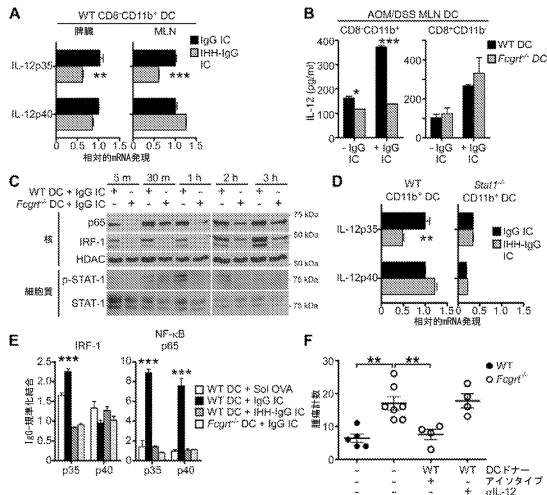
【図4】



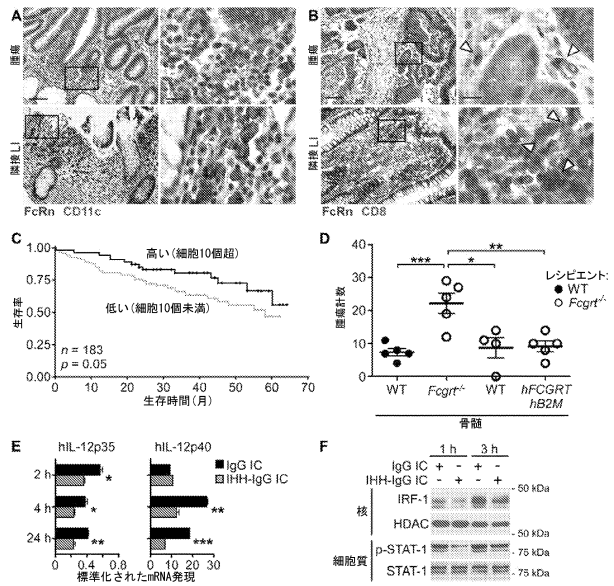
【図5】



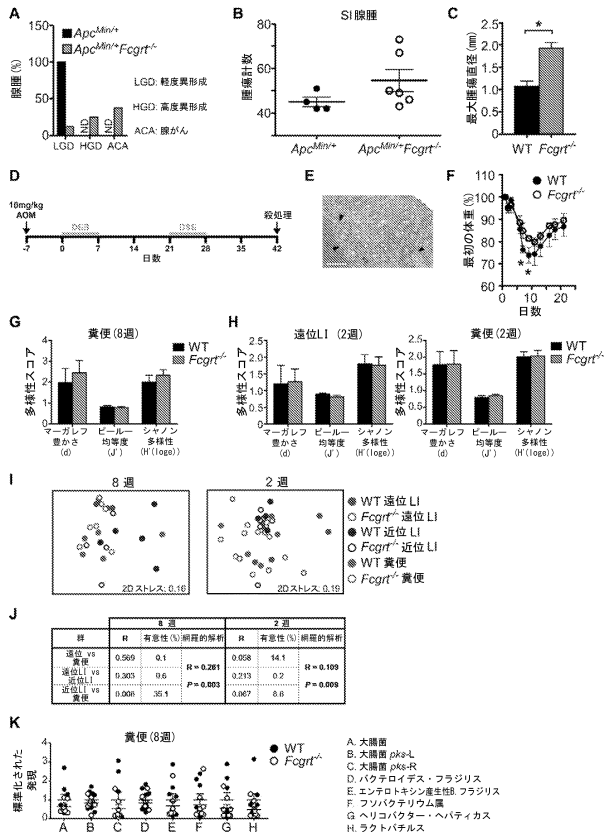
【図6】



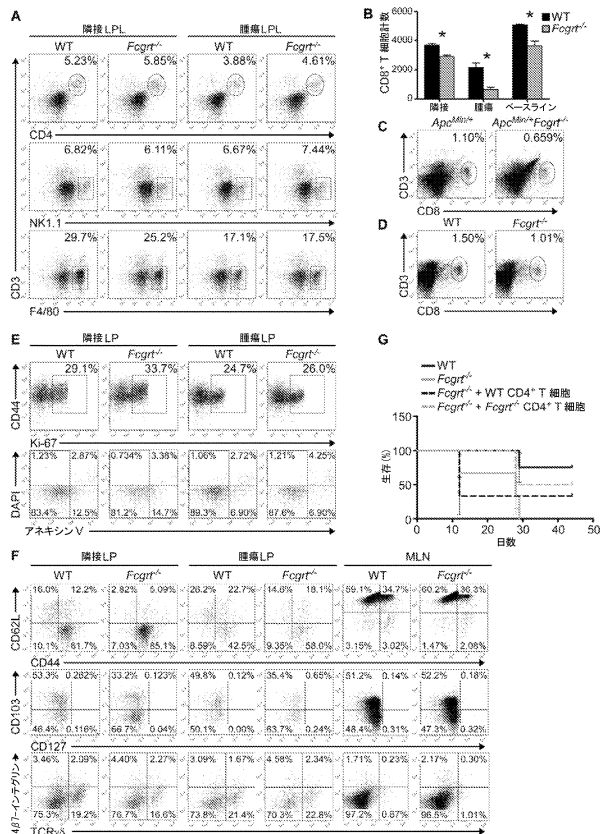
【図7】



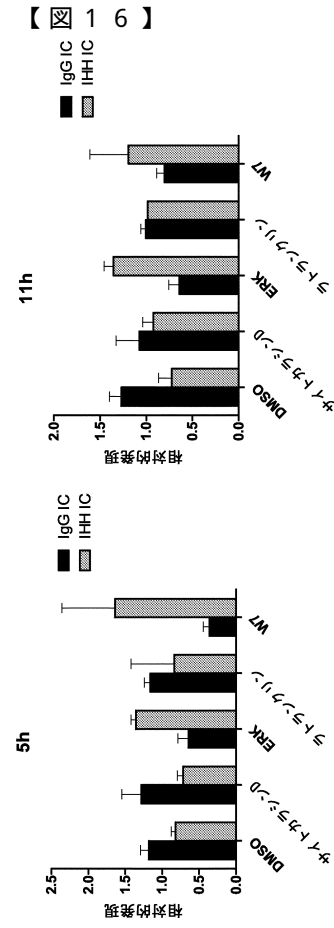
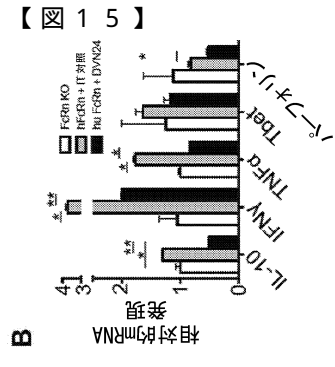
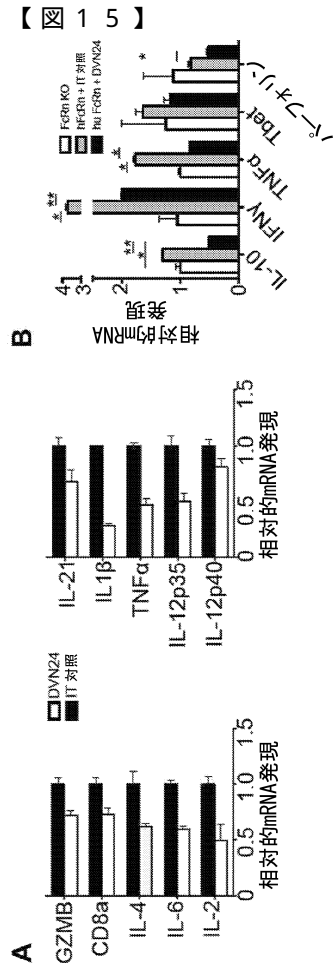
【図8】



【図9】



- A. 大腸癌
- B. 大腸癌 pks-L
- C. 大腸癌 pks-R
- D. バクテロイデス・フラジリス
- E. エンテロトキシン産生性フラジリス
- F. フノバクテリウム属
- G. ヘルコバクター・ヘパティカス
- H. ラクトバチルス



フロントページの続き

- (74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ブラムバーグ リチャード エス .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウォルサム フォックス ロード 195 ユニット 101
- (72)発明者 ベイカー クリスティ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックライン ビーコン ストリート 1063 アパートメント 8
- (72)発明者 ラス ティモ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ プレスコット ストリート 95 アパートメント 56

審査官 小堀 麻子

- (56)参考文献 J Immunotoxicol , 2011年, Vol.8, No.3, p.228-237
AAPS J , 2009年, Vol.11, No.3, p.432-434
Ann N Y Acad Sci , 2008年, Vol.1132, p.193-209
PubMed Abstract PMID:12646760 , 2003年
J Neuroimmunol , 1992年, Vol.41, No.1, p.61-70
Immunity , 2013年11月27日, Vol.39, p.1095-1107
Gastroenterology , 2009年, Vol.137, No.5, p.1746-56

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G01N 33/00

A61K 45/00

A61K 39/395

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	调节免疫应答的组合物和方法		
公开(公告)号	JP6620094B2	公开(公告)日	2019-12-11
申请号	JP2016534169	申请日	2014-11-25
[标]申请(专利权)人(译)	激光ブリガムアンドウィメンズホスピタルインコーポレイテッド 布赖汉姆妇女医院		
申请(专利权)人(译)	在布莱根妇女医院公司		
当前申请(专利权)人(译)	在布莱根妇女医院公司		
[标]发明人	ブラムバーグリチャードエス ベイカークリステイ ラスティモ		
发明人	ブラムバーグ リチャード エス. ベイカー クリステイ ラス ティモ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/15		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/507 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P37/04 A61P43/00 C07K16/244 C07K16/283 C07K2317/52 C07K2317/72 C07K2317/76 G01N33/574 G01N33/6854 G01N33/6869 G01N2333/5434 G01N2800/52 A61K39/0011 C07K16/00 C07K2317/21 C07K2317/31 C12N15/1138 C12N2310/14 G01N33/564 G01N33/6863 G01N33/6866 G01N2333/525 G01N2333/57		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/15		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/909229 2013-11-26 US		
其他公开文献	JP2016538297A5 JP2016538297A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文描述了用于增加IL-12产生的组合物，其包含IgG或其片段或其变体，以及所述组合物在治疗癌症和传染病中的用途。本文还描述了用于减少IL-12产生的组合物，其包含抑制由FcRn和IgG之间的相互作用介导的信号传导的试剂，以及所述组合物在治疗自身免疫疾病中的用途。本文进一步描述了通过监测受试者中各种细胞因子的水平来评估治疗功效的方法。

(45) 発行日 令和1年12月11日(2019.12.11)

(24) 登録日 令和1年11月22日(2019.11.22)

(5) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)
GO 1 N 33/15 (2006.01)

GO 1 N 33/53 N
GO 1 N 33/15

請求項の数 2 (全 66 頁)

(21) 出願番号	特願2016-534169 (P2016-534169)	(73) 特許権者	503146324
(86) (22) 出願日	平成26年11月25日 (2014.11.25)		
(65) 公表番号	特表2016-538297 (P2016-538297A)		ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス ピタル インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成28年12月8日 (2016.12.8)		The Brigham and Wom en's Hospital, Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/067332		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2115 ホストン フランシス ストリ ート 75
(87) 国際公開番号	W02015/081073		
(87) 国際公開日	平成27年6月4日 (2015.6.4)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成29年11月24日 (2017.11.24)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	61/909,229	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成25年11月26日 (2013.11.26)		弁理士 香名 雅夫
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫応答を調節するための組成物および方法