

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5474009号
(P5474009)

(45) 発行日 平成26年4月16日(2014.4.16)

(24) 登録日 平成26年2月14日(2014.2.14)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z

請求項の数 14 外国語出願 (全 92 頁)

(21) 出願番号	特願2011-177551 (P2011-177551)	(73) 特許権者	503146324
(22) 出願日	平成23年8月15日(2011.8.15)		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
(62) 分割の表示	特願2006-534252 (P2006-534252) の分割		The Brigham and Wom en's Hospital, Inc.
原出願日	平成16年10月4日(2004.10.4)		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
(65) 公開番号	特開2012-6959 (P2012-6959A)	(73) 特許権者	305049506
(43) 公開日	平成24年1月12日(2012.1.12)		ベス イスラエル デアコネス メディカ ル センター, インコーポレイテッド
審査請求日	平成23年8月24日(2011.8.24)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 2 1 5, ポストン, ブルックリン ア ベニュー 3 3 0
(31) 優先権主張番号	60/508, 319		
(32) 優先日	平成15年10月3日(2003.10.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TIM-3ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号13に示される配列を包含するtim-3ポリペプチドと配列番号10または配列番号19に示される配列を包含するガレクチン-9ポリペプチドとの間の結合を調節する因子を同定する方法であって、以下:

(a) 試験因子の存在下で配列番号13に示される配列を包含するtim-3ポリペプチドと配列番号10または配列番号19に示される配列を包含するガレクチン-9ポリペプチドとを接触させる工程;および、

(b) 該tim-3ポリペプチドと該ガレクチン-9ポリペプチドとの結合に対する該試験因子の効果を決定する工程;

を包含し、それにより、tim-3ポリペプチドとガレクチン-9ポリペプチドとの間の結合を調節する因子を同定する、方法。

【請求項2】

免疫応答を調節する因子を同定する方法であって、以下:

(a) 試験因子の存在下で配列番号13に示される配列を包含するtim-3ポリペプチドと配列番号10または配列番号19に示される配列を包含するガレクチン-9ポリペプチドとを接触させる工程;および

(b) 該tim-3ポリペプチドと該ガレクチン-9ポリペプチドとの結合に対する該試験因子の効果を決定する工程;

を包含し、それにより、免疫応答を調節する因子を同定する、方法。

10

20

【請求項 3】

工程(b)が、試験因子の存在下でのtim-3/ガレクチン-9複合体の形成を、適切なコントロールと比較する工程を包含する、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記適切なコントロールが、前記試験因子の非存在下での第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの間の複合体の形成を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記因子が、tim-3とガレクチン-9との間の結合を増加させる、請求項2に記載の方法。

【請求項 6】

前記因子が、tim-3とガレクチン-9との間の結合を減少させる、請求項2に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記因子が、低分子化合物、抗体、またはポリペプチドである、請求項2に記載の方法。

【請求項 8】

前記tim-3ポリペプチド、前記ガレクチン-9ポリペプチド、またはその両方が細胞内で発現する、請求項2に記載の方法。

【請求項 9】

前記複合体の形成を検出する工程が、レポーター遺伝子の発現を検出する工程を包含し、該レポーター遺伝子の発現が該複合体の形成に依存する、請求項8に記載の方法。

【請求項 10】

20

前記tim-3ポリペプチド、前記ガレクチン-9ポリペプチド、またはその両方が、蛍光分子で標識されている、請求項2に記載の方法。

【請求項 11】

前記ガレクチン-9ポリペプチドが、

(i) 配列番号10のアミノ酸1～323、

(ii) 配列番号19のアミノ酸1～355、

(iii) 配列番号10のアミノ酸1～323と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列、または

(iii) 配列番号19のアミノ酸1～355と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列、

を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 12】

30

前記tim-3ポリペプチドが、

(i) 配列番号13のアミノ酸30～128、または

(ii) 配列番号13のアミノ酸30～128と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列、

を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 13】

前記免疫応答が、Th1免疫応答である、請求項2に記載の方法。

【請求項 14】

前記免疫応答が、Th2免疫応答である、請求項2に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

(関連出願)

本出願は、「TIM-3 LIGANDS AND METHODS」と題された、2003年10月3日に提出された米国特許出願番号60/508,319の出願日の利益を主張する。参照した出願のその全体の教示は、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(政府支援)

本明細書中に記載の研究は、国立衛生研究所の助成金番号1RO1NS045937-01、2R01NS35685-06、2R37NS30843-11、1RO1AI44880-03、2P01AI39671-07、1P01NS38037-04、およ

50

び1F31GM20927-01によって資金提供を受けた。したがって、合衆国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

抗原による刺激の際、ナイーブCD4⁺Tヘルパー細胞は、そのサイトカインプロファイルによって定義される1つの主なエフェクター経路(T_h1およびT_h2細胞)に達する(非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3)。

【0004】

T_h1細胞は、細胞内病原体に対する細胞性免疫応答に最も頻繁に関連するサイトカイン(インターフェロン(IFN- γ 、インターロイキン(IL)-2、腫瘍壊死因子TNF- α 、およびリンホトキシン)を産生する。不適切なT_h1応答の病理学的結果は、遅延型過敏症(DTH)反応(非特許文献4)、臓器特異的自己免疫疾患の誘導(非特許文献5)、関節リウマチ、炎症性腸疾患(IBD)、I型糖尿病、多発性硬化症、および同種移植片拒絶である。

10

【0005】

T_h2細胞は細胞外蠕虫感染の除去に必要なサイトカイン(IL-4、IL-10、およびIL-13)を産生し、適切なT_h2細胞の活性化によりアトピー性疾患およびアレルギー性喘息などのアレルギー性疾患の発症が促進される(非特許文献3、非特許文献4)。

20

【0006】

疾患におけるその異なる役割に加えて、2つのTヘルパーサブセットはまた、相互の拡大および機能を相互制御する。したがって、T_h2細胞の優先的誘導により自己免疫疾患が阻害され(非特許文献6、非特許文献7)、T_h1細胞の支配的誘導により喘息、アトピー、およびアレルギーを制御することができる(非特許文献8；非特許文献9)。

【0007】

出願人は、最近、T_h1上で発現するが、T_h2細胞上では発現されない新規の細胞表面タンパク質Tim-3を同定した。Tim-3(T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有分子)は、その細胞外ドメインがIgV様ドメインおよびその後にはムチン様領域から構成される281個のアミノ酸のI型膜タンパク質である。Tim-3のヒトオルソログは、マウスTim-3と63%のアミノ酸が同一である。Tim-3は多型であり、他のTimファミリーと共に、マウス喘息に関連している(非特許文献10)。さらに、Tim-3遺伝子ファミリー領域は、ヒトにおける主な喘息感受性遺伝子座とシンテニーである(非特許文献10)。これらの研究は、免疫媒介性疾患の制御におけるTim-3およびTim遺伝子ファミリーの重要性を過小評価している。

30

免疫応答の継続中におけるインビボでの抗Tim-3抗体の投与により、マクロファージの活性化および拡大が増加した(非特許文献11)。抗Tim-3抗体治療はまた、自己免疫疾患である実験的自己免疫性能脊髄炎(EAE)も悪化させ、死亡率を有意に増加させ、脱髄および活性化マクロファージの中枢神経系(CNS)への浸潤を増加化させる。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Mosmannら、J Immunol、1986年、136巻、p. 2348-2357

【非特許文献2】Mosmannら、Immunol Today、1996年、19巻、p. 138-146

【非特許文献3】Abbasら、Nature、1996年、383巻、p. 787-793

【非特許文献4】Sherら、Annu Rev Immunol、1992年、10巻

50

、 p . 3 8 5 - 4 0 9

【非特許文献5】 Liblauer, Immunol Today, 1995年、16巻、
p . 3 4 - 3 8

【非特許文献6】 Nicholson, L., Immunol 1995年、3巻、
、 p . 3 9 7 - 4 0 5

【非特許文献7】 Kuchroo, Immunol, 1995年、80巻、 p . 7 0 7 - 7
1 8

【非特許文献8】 Lack, J Immunol, 1994年、152巻、 p . 2 5
4 6 - 2 5 5 4

【非特許文献9】 Hofstra, J Immunol, 1998年、161巻、 p 10
. 5 0 5 4 - 5 0 6 0

【非特許文献10】 McIntire, J. Immunol, 2001年、
2巻、 p . 1 1 0 9 - 1 1 1 6

【非特許文献11】 Monney, L., Nature, 2002年、415巻、 p .
5 3 6 - 5 4 1

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、tim-3機能を調整し、それによって免疫応答を調整する薬剤を同定することが依然として必要とされている。本発明のいくつかの態様は、このような薬剤、この
20
のような薬剤の同定方法、およびこのような薬剤を使用した免疫応答の調整方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要旨)

本発明は、新規のポリペプチド、核酸、および組成物を提供し、免疫応答の調整で有用なものが含まれる。本発明は、必要とする被験体の免疫応答の調整方法および免疫応答を調整するために使用することができる薬剤の同定方法をさらに提供する。

【0011】

本発明は、tim-3 IgVドメインおよびtim-3細胞内ドメインを含む単離ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、tim-3ムチンドメインまたはtim-3膜貫通ドメインを含まない、単離ポリペプチドを提供する。本発明はまた、このようなポリペプチドをコードする核酸を提供する。
30

【0012】

本発明はまた、高ストリンジェンシー条件下で可溶性tim-3をコードする核酸とハイブリダイズするが、高ストリンジェンシー条件下で全長tim-3をコードする核酸とハイブリダイズしない単離核酸を提供する。このような核酸は、特に、免疫応答の調整に有利である。

【0013】

さらに、本発明は、(i)tim-3のIgVドメインを含むポリペプチドと、(ii)増殖性状態の治療のための被験体への組成物の投与についての説明書とを含む薬学的パッケージを提供する。
40

【0014】

本発明は、さらに、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合するが、配列番号13に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合しない単離抗体またはそのフラグメントを提供する。同様に、本発明は、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合するが、配列番号14に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合しない単離抗体またはそのフラグメントを提供する。

【0015】

本発明は、被験体に治療有効量のtim-3活性を調整する薬剤を投与する工程を含む
50

、被験体の免疫寛容などの被験体の免疫応答を調整する方法を提供する。本発明はまた、被験体のTh1応答およびTh2応答などの免疫応答の調整方法を提供する。

【0016】

本発明は、さらに、免疫応答を調整する薬剤の同定方法およびtim-3とガレクチン-9などのそのリガンドとの間の結合相互作用を調整する薬剤の同定方法を提供する。

本発明は、さらに、本明細書中に記載の任意の障害の治療薬の製造のための薬剤を提供する。被験体への薬剤の投与による障害の治療または防止のための本明細書中に開示の任意の方法を、これらの障害の治療薬の製造における薬剤の使用に適用することができる。例えば、1つの特定の実施形態では、Th2媒介性障害の治療薬の製造にtim-3 IgV-HSA融合タンパク質を使用することができるのに対して、Th2媒介性障害の治療薬の製造にペグ化ガレクチン-9ポリペプチドを使用することができる。

10

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】図1は、Tim-3の選択的スプライシングを行った可溶性形態の同定を示す。(a) Tim-3の全長形態および選択的スプライシングを行った形態を、コンカナバリンA刺激脾細胞から生成したcDNAから増幅させた。プライマーをTim-3遺伝子の5'UTRおよび3'UTR中にデザインし、RT-PCRに供した。産物を1.2%アガロースゲルで分離し、臭化エチジウムを使用して視覚化した(レーン1)。800bpおよび1kbのアンプリコンをpEFベクターにクローン化した(レーン2および3)。クローニングを確認するために、プラスミドDNAをSmaI制限エンドヌクレアーゼ(New England Biolabs)で消化した。ローディング色素で反応を終了させ、1.2%アガロースゲルで泳動し、臭化エチジウムで視覚化した(レーン2および3)。1kbまたは800bpのインサートを含むクローンを配列決定した。レーン1: Tim-3-FプライマーおよびTim-3-Rプライマーを使用したPCRによって増幅したcon-A活性化脾細胞cDNA; レーン2: 1kbのクローン化産物(fl-Tim-3); レーン3: 800bpのクローン化産物(s-Tim-3)。

20

【図1B】図1は、Tim-3の選択的スプライシングを行った可溶性形態の同定を示す。(b) シグナルペプチド、IgV、ムチン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインからなるTim-3(fl-Tim-3)の全長形態に一致する1kbアンプリコン由来のヌクレオチド配列の推定アミノ酸翻訳。800bpのアンプリコン由来のヌクレオチド配列のアミノ酸翻訳とfl-Tim-3とのアラインメントにより、シグナルペプチド、IgV、および細胞質ドメインのみを含む新規のイソ型(s-Tim-3)が証明された。

30

【図1C】図1は、Tim-3の選択的スプライシングを行った可溶性形態の同定を示す。(c) Tim-3遺伝子構造ならびにfl-Tim-3およびs-Tim-3に対応する選択的スプライシングを行った転写物の略図。マウスTim-3遺伝子は、7つのエクソンからなる。fl-Tim-3転写物は、全7エクソンから構成される。対照的に、s-Tim-3転写物は、エクソン1、エクソン2、エクソン6、およびエクソン7から構成される。転写物のコード領域シグナルペプチド、IgV、ムチン、膜貫通(tm)、および細胞質ドメインを示す。

【図2A】図2は、CD4⁺T細胞上でTim-3-リガンドが発現されることを示す。(a) C57BL/6マウス由来の全脾細胞をCD4⁺カラムで精製し、CD4発現について染色およびゲーティングし、種々の細胞表面マーカー(CD25、CD62L、CD44、CD45RB、およびCD54)について同時染色した。細胞を、ビオチン化ex-Tim-3-Igまたはs-Tim-3-Igを使用してTim-3-Igについて同時染色し、その後検出用二次試薬としてストレプトアビジン-PEで染色した。細胞をCD4⁺および表面マーカー陽性または陰性集団に対してゲーティングした。説明:(破線)hIgG;(太い実線)s-Tim-3; および(点線)ex-Tim-3-Ig。

40

【図2B】図2は、CD4⁺T細胞上でTim-3-リガンドが発現されることを示す。(b) Th1(AE7)およびTh2(LR1F1)クローンを、ビオチン化s-Tim-3-IgまたはhIgGで染色し、その後ストレプトアビジン-PEで染色した。細胞

50

を、静止細胞(0日目)、活性化から4日後の活性化細胞(4日目)、および活性化から10日後の静止細胞(10日目)として染色した。説明:(破線)hIgG;(太い実線)s-Tim-3。

【図3A】図3は、Tim-3-Igの投与によってTh1サイトカインの過剰増殖および自発的産生が誘導されることを示す。(a)SjL/Jマウスを、PLP 139-151/CFaで免疫化し、0~8日目まで100 μ gのex-Tim-3-Igもしくはs-Tim-3-Ig、またはコントロールとしてhIgG(100 μ g)もしくはPBS(100 μ l)を1日おきに腹腔内注射した。10日目にマウスを屠殺し、脾臓を取り出し、ペプチドで再刺激することなくインビトロで48時間培養した。48時間後に³H-チミジン組み込みによって3連のウェルにおける増殖を測定した。48時間後に上清を採取し、サイトカインELISAで使用した;IL-2およびIFN- γ 産生を示す;IL-4、IL-10、またはTNF- α は検出されなかった。各マウスの増殖についての10実験の代表およびサイトカインについての5実験の代表についてのデータを示す。

10

【図3B】図3は、Tim-3-Igの投与によってTh1サイトカインの過剰増殖および自発的産生が誘導されることを示す。(b)10日目の免疫化融合タンパク質処置マウスから採取した脾細胞を、0~100 μ gのPLP 131-151ペプチドにてインビトロで刺激した。48時間後に³H-チミジン組み込みによって3連のウェルにおける増殖を測定した。48時間後にPLP 139-151ペプチドで再刺激した全脾細胞のインビトロ培養物から上清を採取し、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、およびIFN- γ についてのサイトカインELISAを行った。IL-2およびIFN- γ 産生を示す;IL-4、IL-10、またはTNF- α は検出されなかった。説明:○、PBS処置;□、hIgG処置;△、ex-Tim-3-Ig処置;および◇、s-Tim-3-Ig処置。各マウスの増殖についての10実験の代表およびサイトカインについての5実験の代表についてのデータを示す。

20

【図4A】図4は、同時過剰増殖およびサイトカイン放出がT細胞によって媒介されることを示す。(a)SjL/Jマウスを、PLP 139-151/CFaで免疫化し、100 μ gのex-Tim-3-IgまたはコントロールとしてのhIgGにて腹腔内で処置し(0~8日間1日おき)、10日目に屠殺した。T細胞、B細胞、およびCD11b⁺細胞を、脾臓から精製した。全脾細胞(5 \times 10⁵個)またはT細胞(10⁵個)のいずれかを、2 \times 10⁵個のB細胞、2 \times 10⁵個のCD11b⁺細胞、またはその両方のいずれかの存在下または非存在下でインキュベートし、増殖応答を測定した(3連のウェルにおける³H-チミジン組み込み)。結果を、4匹のマウスの組み合わせ(3つの各実験)の平均として示す。

30

【図4B】図4は、同時過剰増殖およびサイトカイン放出がT細胞によって媒介されることを示す。(b)48時間後に(a)に記載のインビトロ培養物から上清を採取し、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、およびIFN- γ についてのサイトカインELISAを行った。IL-2およびIFN- γ 産生を示す;IL-4、IL-10、またはTNF- α は検出されなかった。結果を、4匹のマウスの組み合わせの平均として示す。

【図4C】図4は、同時過剰増殖およびサイトカイン放出がT細胞によって媒介されることを示す。(c)SjL/JマウスをPLP 139-151/CFaで免疫化し、100 μ gのex-Tim-3-Ig、s-Tim-3-Ig、またはコントロールとしてのhIgGで0~8日間1日おきに腹腔内に投与し、10日目に脾細胞を採取した。全脾細胞(5 \times 10⁵~10⁶細胞)を、10 μ M BrdUと共にインビトロで培養した。48時間後、細胞をCD3、CD25、CD69、およびBrdUに対するmAbで染色した。ドットプロット(対数目盛)は、細胞集団およびBrdU取り込みを示す。結果は、各マウスの4実験の代表である。

40

【図5】図5は、インビボでのTim-3-Ig処置によって寛容の誘導が阻害されることを示す。SjL/Jマウスを、PLP 139-151/CFaで免疫化し、同時に寛容を誘導するために500mgの可溶性PLP 139-151(またはコントロール賦

50

形剤としてのPBS)を腹腔内注射した。マウスを、0~8日目まで100mgのex-Tim-3-IgまたはコントロールとしてのhIgGを1日おきに腹腔内注射した。10日目にマウスを屠殺し、リンパ節を採取し、細胞(2×10^5 /ウェル)を漸増濃度のPLP 139-151ペプチド(データは100mg/mlのPLP 139-151を示す。)と共にインビトロで培養した。48時間後に ^3H -チミジン組み込みによって3連のウェルにおける増殖を測定した。48時間後にインビトロ培養物から上清を採取し、IL-2、IL-4、IL-10、およびINF-gについてのサイトカインELISAを行った。スチューデントt検定によってP値を得た。説明：† 非寛容化(PBS)hIgG群を寛容化(PLP)hIgG群と比較した場合、 $P < 0.01$ 。¥ 寛容化(PLP)hIgG群を寛容化(PLP)Tim-3-Ig群と比較した場合、 $P < 0.01$ 。‡ 非寛容化(PBS)hIgG群を寛容化(PLP)hIgG群と比較した場合、 $P < 0.01$ 。寛容化(PLP)hIgG群を寛容化(PLP)Tim-3-Ig群と比較した場合、 $P < 0.05$ 。§ 非寛容化(PBS)hIgG群を寛容化(PLP)hIgG群と比較した場合、 $P < 0.5$ 。寛容化(PLP)hIgG群を寛容化(PLP)Tim-3-Ig群と比較した場合、 $P < 0.1$ 。

10

【図6A】図6は、Tim-3-Igの投与によって寛容の誘導が防止されることを示す。(a)SJJL/Jマウスを、PLP 139-151/CFAで免疫化し、同時に寛容を誘導するために500 μg の可溶性PLP 139-151(またはコントロール賦形剤としてのPBS)を腹腔内注射した。マウスを、0~8日目まで100 μg のex-Tim-3-IgまたはコントロールとしてのPBS(100 μl)もしくはhIgG(100 μg)を1日おきに腹腔内注射した。10日目にマウスを屠殺し、脾臓を採取し、細胞(5×10^5 /ウェル)を漸増濃度のPLP 139-151ペプチドと共にインビトロで培養した。48時間後に ^3H -チミジン組み込みによって3連のウェルにおける増殖を測定した。マウスに寛容原としてPBSを投与し、:PBS、:hIgG、および:ex-Tim-3-Igで処置した。マウスに寛容原としてPLPを投与し、:PBS、:hIgG、および:ex-Tim-3-Igで処置した。2つのマウス/処置群の平均を示す。

20

【図6B】図6は、Tim-3-Igの投与によって寛容の誘導が防止されることを示す。(b)48時間後に(a)に記載のインビトロ培養物から上清を採取し、IL-2、IL-4、IL-10、TNF-、およびINF-についてのサイトカインELISAを行った。記号は、(a)と同様である。2つのマウス/処置群の平均を示す。

30

【図7】図7は、TIM-3およびTIM-3Lの発現を示す。(a)ex-Tim-3-Ig、より有意には短縮s-Tim-3-Ig融合タンパク質は、静止CD4+T細胞およびCD11c+の一部に結合するが、CD11b+、B220+、またはCD8+T細胞に結合しない。アイソタイプコントロール染色を黒塗りのヒストグラムで示し、白抜きのヒストグラムはex-TIM-3-Fc(点線)およびs-TIM-3-Ig(実線)との結合を示す。(b)インビトロ刺激後にCD4+CD25-T細胞はTIM-3Lを下方制御するが、調節CD4+CD25+T細胞は下方制御しない。CD4+CD25-T細胞およびCD4+CD25+T細胞は共に、静止状態でs-TIM-3-Igに結合する(上のパネル)。抗CD3、抗CD28、およびrIL-2でのインビトロ刺激から24時間後にTIM-3L発現の変化は認められない一方で(中央のパネル)、48時間後のCD4+CD25+T細胞においてのみTIM-3Lが検出される。アイソタイプコントロール染色を黒塗りのヒストグラムで示し、白抜きのヒストグラムは、s-TIM-3-Igとの結合を示す。この図中に示すデータは、3つの独立した実験の代表である。

40

【図8A】図8は、TIM-3がMHC不適合島同種移植片モデルにおけるDST+抗CD154処置の寛容化効果に寄与することを示す。(a)TIM-3およびIFN-遺伝子転写物は拒絶において上方制御されるが、長期生存島同種移植片においては上方制御されない。データを、標的サンプルと標準物質(単離島)との間の相対相違の倍率として示す。プロットした値は、4つの独立した実験から得た平均+/-SEを示す。

50

【図8B】図8は、TIM-3がMHC不適合島同種移植片モデルにおけるDST+抗CD154処置の寛容化効果に寄与することを示す。(b) ex-Tim-3-IgのDST+抗CD154との同時投与により、島同種移植片に対する移植免疫寛容の誘導が防止される。

【図8C】図8は、TIM-3がMHC不適合島同種移植片モデルにおけるDST+抗CD154処置の寛容化効果に寄与することを示す。(c) ex-Tim-3-Igの投与により、CTLA4Igの寛容促進能力が有意に減少する。

【図9A】図9は、TIM-3がCD4+CD25+調節T細胞に対するDST+抗CD154処置の同種抗原特異的効果を調整することを示す。(a) DST+抗CD154投与前のCD4+CD25+T細胞の枯渇により、島同種移植が急速に拒絶される。MST = 生存期間の中央値(日)。

10

【図9B】図9は、TIM-3がCD4+CD25+調節T細胞に対するDST+抗CD154処置の同種抗原特異的効果を調整することを示す。(b) ex-Tim-3-Igは、移植時に投与した場合に、養子免疫伝達皮膚同種移植片モデルにおけるCD4+CD25-T細胞を抑制するCD4+CD25+調節T細胞の能力を妨害しない。

【図9C】図9は、TIM-3がCD4+CD25+調節T細胞に対するDST+抗CD154処置の同種抗原特異的効果を調整することを示す。(c) ナイーブまたはDST+抗CD154処置マウス由来の 1×10^5 個のCD4+CD25-T細胞により、皮膚同種移植片拒絶が急速に誘導される(左のパネル)。ナイーブ宿主から採取したCD4+CD25+T細胞およびDST+抗CD154処置マウスから得たCD4+CD25+T細胞は共に、高い調節T細胞:エフェクターT細胞比で養子免疫伝達された場合に、皮膚同種移植片拒絶を防止することができる($4 \times 10^5 : 1 \times 10^5$; 中央のパネル)。処置マウスから採取されたCD4+CD25+T細胞のみが、同数のCD4+CD25-T細胞と共に伝達された場合に有意な移植片保護効果を発揮する($4 \times 10^5 : 4 \times 10^5$; 右のパネル)。中央および右のパネルでは、CD4+CD25-T細胞は、ナイーブ未処置マウスのみ由来する。

20

【図9D】図9は、TIM-3がCD4+CD25+調節T細胞に対するDST+抗CD154処置の同種抗原特異的効果を調整することを示す。(d) ex-Tim-3-IgのDST+抗CD154抗体との同時投与により、DST+抗CD154処置によってCD4+CD25+T細胞に付与された増強免疫抑制効果が消失する(ナイーブCD4+CD25+T細胞群を、統計的比較のためのベースラインとして使用する)。MST = 生存期間の中央値(日)。

30

【図10A】図10は、TIM-3結合タンパク質としてのガレクチン-9の同定を示す。(a) TK-1細胞は、最も高レベルのTIM-3リガンドを発現する。3つのT細胞株であるTK-1、S49.1G.3PHA 100/0、およびBW1547.G.1.4を、20倍希釈および50倍希釈のビオチン化sTIM-3-Ig(0.4 mg/ml)で染色し、抗ヒトIgG-Fc-PEによってTIM-3リガンド発現を検出した。全T細胞株がTIM-3融合FACS分析によって陽性染色され、同時に90%までのTK-1がflTIM-3-IgおよびsTIM-3-Igの両方によって陽性染色された。

40

【図10B】図10は、TIM-3結合タンパク質としてのガレクチン-9の同定を示す。(b) 破壊(pull-down)アッセイによる35kDタンパク質とTIM-3との間の特異的相互作用の証明。生きたTK-1細胞上の細胞外膜結合タンパク質を、NH₂-LC-ビオチンを含むPBS(pH7.9)緩衝液によって室温でビオチン化した。1時間のインキュベーション後、DMEM培地によって反応を停止させた。ビオチン化TK-1細胞由来の細胞溶解物を、4での各 $5 \mu\text{g}$ flTIM-3-Ig、sTIM-3-Ig、TIM-2-Ig、およびhIgG+プロテインG-アガロースビーズとのインキュベーションによる破壊実験で使用した。ビーズから溶離されたタンパク質サンプルを、PNGアゼFで処置するか処置せずにN結合糖鎖を除去し、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットに提供した。ビオチン化膜結合タンパク質由来のシグナルのみがア

50

ビジン抱合ペルオキシダーゼに結合し、化学発光シグナルによって検出された。

【図11A】図11は、ガレクチン-9とTIM-3との間の特異的相互作用を示す。(a)ガレクチン-9の標準的イソ型および長いイソ型(それぞれガレクチン-9およびガレクチン-9-L)は共にTIM-3に結合することができる。2つのガレクチン-9イソ型間のタンパク質配列は、ガレクチン-9-Lのヒンジ領域中の31アミノ酸ペプチドインサート以外は同一である。TK-1細胞由来のガレクチン-9のイソ型についてのマウスcDNAを、真核生物バシストロン性発現ベクターpIRES2-EGFPにサブクローン化した。プラスミドを、それぞれCHO細胞に一過性にトランスフェクトした。細胞を、f1TIM-3-Ig、sTIM-3-Ig、およびhIgGでの細胞内染色のために固定し、トランスフェクションから48時間後に抗ヒトIgG-Fc-PEによって検出した。FACS分析におけるEGFP陽性シグナルは、トランスフェクトされた細胞を示した。抗ヒトIgG-Fc-PEを使用して、Ig融合またはhIgG由来の結合を検出した。

10

【図11B】図11は、ガレクチン-9とTIM-3との間の特異的相互作用を示す。(b)ガレクチン-9、-4、-3、および-1のマウスcDNAを、pIRES2-EGFPにサブクローン化した。各s-TIM-3-Igによる細胞内染色のために、プラスミドおよびEGFPのみを産生する空のベクターを、CHOに一過性にトランスフェクトした。抗ヒトIgG-Fc-PEを使用して、sTIM-3-Ig結合を検出した。

【図11C】図11は、ガレクチン-9とTIM-3との間の特異的相互作用を示す。(c)ガレクチン-9cDNAを、原核生物発現ベクターpTrcHis2Bにサブクローン化した。BL21E.coli株中で組換えガレクチン-9(r-ガレクチン-9)が発現し、ラクトースアガロースカラムによって精製した。破壊実験のために、2μgの精製ガレクチン-9を使用して、Ig融合タンパク質と共にインキュベートした。プロテインGビーズ由来の溶離物をSDS-PAGEに適用し、クマシーブルーによって染色した。レーン1~3は、それぞれsTIM-3-Ig、TIM-2-Ig、およびTIM-4-Ig、ならびにその捕捉タンパク質由来の溶離物を示す。レーン4~6は、Ig融合タンパク質のみを示す。r-ガレクチン-9の分子量は38kDである。

20

【図12A】図12は、ガレクチン-9がTIM-3のオリゴサッカリド鎖中の-ガラクトシド結合を認識することを示す。(a)ガレクチン-9発現プラスミドを、CHO細胞に一過性にトランスフェクトし、sTIM-3-Igによる細胞内染色のために固定した。0~100mMの異なる濃度の-ラクトースを含むインキュベーション緩衝液を実験で使用した。ヒストグラム中のバーは、異なる濃度の-ラクトースの存在下でのEGFPおよびsTIM-3-Ig染色についての二重陽性細胞集団の比率を示す。

30

【図12B】図12は、ガレクチン-9がTIM-3のオリゴサッカリド鎖中の-ガラクトシド結合を認識することを示す。(b)破壊実験において、0~100mMの異なる濃度の-ラクトースの存在下で、2μgのr-ガレクチン-9を4μgのsTIM-3-Igと混合した。プロテインGビーズ由来の溶離物をSDS-PAGEに適用し、クマシーブルーによって染色した。50kDのバンドはsTIM-3-Igを示し、38kDのバンドはr-ガレクチン-9を示す。

【図12C】図12は、ガレクチン-9がTIM-3のオリゴサッカリド鎖中の-ガラクトシド結合を認識することを示す。(c)ガレクチン-9中のCRDドメインは、TIM-3との相互作用が必要である。N末端CRDドメイン中のR64A変異、C末端CRDドメイン中のR238A変異、またはその両方を有する構築物を生成し、発現ベクターpIRES2-EGFPにサブクローン化した。sTIM-3-Igによる細胞内染色のために、CHO細胞を、wtおよび変異ガレクチン-9発現プラスミドによって一過性にトランスフェクトした。ガレクチン-9とsTIM-3-Igとの間の相互作用についてのEGFPおよび抗ヒトIgG-Fc-PE二重陽性標準。

40

【図13A】図13は、ガレクチン-9が活性化マウスTh1細胞のアポトーシスを誘導し、そのアポトーシス効果はTIM-3とのその相互作用に機能的に関連することを示す。(a)DO11.10トランスジェニックマウス由来の脾臓CD4+CD62L+T細胞

50

胞は、少なくとも3ラウンドでインビトロでTh1細胞およびTh2細胞に二分された。VOAペプチドおよびAPCによる刺激から3日後のTh1細胞およびTh2細胞を、PBS、ガレクチン-3、および異なる用量のガレクチン-9で処置した。8時間後、アポトーシス細胞の検出のために、細胞を、PIおよびアネキシンV-FITCで染色した。PI陽性集団(PI+アネキシンV+およびPI+アネキシンV-の両方)は死細胞または後期アポトーシス細胞である。PI+アネキシンV+集団は初期アポトーシス細胞であり、二重陰性集団はライフセル(life cell)である。

【図13B】図13は、ガレクチン-9が活性化マウスTh1細胞のアポトーシスを誘導し、そのアポトーシス効果はTIM-3とのその相互作用に機能的に関連することを示す。(b)Th1細胞およびTh2細胞をPBS、0.75mMガレクチン-9、0.75mMガレクチン-9で0、2、4、8、および12時間処置した。ヌクレオソーム富化アッセイのために細胞を採取した。細胞溶解物の上清に放出された断片化ヌクレオソーム構造をアポトーシス手順によって誘導し、ELISAアッセイにおけるヒストンに対する抗体およびゲノムDNAによって検出し、OD405nmで読み取った。(a)と同様に、Th2細胞は、ガレクチン-9由来のアポトーシス効果に耐性を示した。

【図14A】図14は、マウスへのガレクチン-9の投与によってIFN-gおよびIL-2産生細胞が下方制御されてIFN- およびIL-2産生が減少することを示す。しかし、この減少は、全脾細胞増殖に影響を与えない。C57BL/6Jマウスを、100mg MOG35-55ペプチド+200ml CFAで免疫化した。r-ガレクチン-9を3日目から9日目まで毎日マウスに腹腔内注射した。マウスを屠殺し、細胞増殖アッセイ、ELISA、およびELISPOTのために脾細胞を採取した。

【図14B】図14は、マウスへのガレクチン-9の投与によってIFN-gおよびIL-2産生細胞が下方制御されてIFN- およびIL-2産生が減少することを示す。しかし、この減少は、全脾細胞増殖に影響を与えない。C57BL/6Jマウスを、100mg MOG35-55ペプチド+200ml CFAで免疫化した。r-ガレクチン-9を3日目から9日目まで毎日マウスに腹腔内注射した。マウスを屠殺し、細胞増殖アッセイ、ELISA、およびELISPOTのために脾細胞を採取した。

【発明を実施するための形態】

【0018】

(発明の詳細な説明)

(i)概説

本発明は、Th1細胞活性の調整および免疫応答(免疫寛容および移植免疫寛容が含まれるが、これらに限定されない)の調整のための試薬、組成物、および方法に関する。

【0019】

本発明は、マウスおよびヒトにおけるtim-3のIgVドメインおよび細胞内ドメインを含むムチンおよび膜貫通ドメインを欠くtim-3の可溶性をコードするtim-3の新規のプライズイソ型の発見に一部由来する。本発明は、tim-3可溶性イソ型またはそのフラグメントをコードする単離核酸を提供する。本発明は、さらに、可溶性tim-3および免疫グロブリンのIgFcなどの他のポリペプチドを含む融合タンパク質を提供する。さらに、本発明は、可溶性tim-3タンパク質の発現および/または機能を調整するが全長tim-3の発現および/または機能を調整しない試薬を提供する。

【0020】

本発明はまた、リガンドによるtim-3の活性化の遮断によってTh1細胞の活性化(1細胞の増殖が含まれるが、これらに限定されない)ならびにサイトカインIL-2およびIFN-の産生が増加するという発見に一部由来する。さらに、本発明は、マウスモデルで免疫寛容および移植免疫寛容を確立するためにリガンドとのtim-3相互作用などのtim-3活性が必要であるという発見に由来する。さらに、本発明はまた、ガレクチン-9がtim-3リガンドであるという発見に由来する。ガレクチン-9は、種々の細胞型上の至るところに発現し、且つ-ガラクトシドに結合するガレクチンファミリーのメンバーである。2つのガレクチン-9形態(長鎖(long)型および単鎖(sh

10

20

30

40

50

o r t) 型) がヒトで説明されている。ヒト単鎖イソ型は、長鎖イソ型中の N 末端炭水化物結合ドメインと連結ペプチドとの間に存在する 31 アミノ酸 (ヒト長鎖イソ型の残基 149 ~ 180) を欠く。ヒトおよびマウスの単鎖ガレクチン - 9 アミノ酸配列をそれぞれ配列番号 10 および 17 に列挙し、その対応する DNA コード配列を配列番号 9 および 16 に列挙する。マウスおよびヒトの長鎖ガレクチン - 9 アミノ酸配列を、それぞれ配列番号 18 および 19 に列挙する。

【0021】

ヒト単鎖ガレクチン - 9 イソ型では、N 末端および C 末端炭水化物認識ドメイン (CRD) は、それぞれ 16 ~ 146 および 195 ~ 322 にわたる。これらは、149 ~ 174 にわたるリンカーペプチド (Genbank アクセション番号 NP_002299 を参照のこと) によって連結されている。ヒト長鎖イソ型中の 2 つの CDR は、それぞれ残基 16 ~ 146 および 227 ~ 354 にわたる。

10

【0022】

ガレクチン - 9 アミノ酸および DNA コード配列は、米国特許第 6,468,768 号および同第 6,027,916 号 (本明細書中で参考として援用される) にも記載されている。したがって、本発明は、Th1 および / または Th2 応答の増加または減少などの免疫応答の調整方法を提供し、免疫寛容および移植免疫寛容の増加または減少方法も提供する。

【0023】

本発明の 1 つの態様は、tim-3 IgV ドメインおよび tim-3 細胞内ドメインを含み、tim-3 ムチンドメインまたは tim-3 膜貫通度面を含まない単離ポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、ポリペプチドは、ヒトまたはマウスポリペプチドなどの哺乳動物ポリペプチドである。1 つの実施形態では、tim-3 IgV ドメインは、配列番号 13 のアミノ酸 22 ~ 131 または配列番号 14 のアミノ酸 22 ~ 132 を含む。1 つの実施形態では、tim-3 細胞内ドメインは、配列番号 13 のアミノ酸 226 ~ 301 または配列番号 14 のアミノ酸 217 ~ 281 を含む。いくつかの実施形態では、単離ポリペプチドは、免疫グロブリンまたは他のキャリアタンパク質の Fc ドメインをさらに含む。

20

【0024】

本発明は、さらに、本明細書中に記載の単離ポリペプチドを含む組成物を提供する。1 つの実施形態では、組成物は、薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む。本発明はまた、本明細書中に記載のポリペプチドをコードする核酸を提供する。本発明はまた、高ストリンジェンシー条件下で可溶性 tim-3 をコードする核酸とハイブリダイズするが、高ストリンジェンシー条件下で全長 tim-3 をコードする核酸とハイブリダイズしない単離核酸 (配列番号 5 に記載の配列を含む核酸など) を提供する。

30

【0025】

本発明の別の態様は、薬学的パッケージを提供する。特定の態様は、(i) tim-3 の IgV ドメインを含むポリペプチドと、(ii) 増殖性状態の治療または Th2 媒介病態の治療のための被験体への組成物の投与についての説明書とを含む薬学的パッケージを提供する。特定の実施形態では、増殖性状態は、腎細胞癌、カポジ肉腫、慢性白血病、前立腺癌、乳癌、肉腫、膵臓癌、白血病、卵巣癌、直腸癌、咽頭癌、黒色腫、結腸癌、膀胱癌、リンパ腫、肥満細胞腫、肺癌、乳腺癌、咽頭扁平上皮細胞癌、精巣癌、ホジキンリンパ腫、消化管癌、または胃癌である。

40

【0026】

特定の実施形態では、(i) ガレクチン - 9 ポリペプチドを含むポリペプチドと、(ii) 自己免疫障害の治療のための被験体への組成物の投与についての説明書とを含む薬学的パッケージを提供する。

【0027】

本発明は、さらに、免疫試薬を提供する。特定の態様では、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合するが、配列番号 13 に記載のアミノ酸配列を有する

50

ポリペプチドに結合しないか、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合するが、配列番号 14 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合しない単離抗体またはそのフラグメント（配列番号 6 または 8 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合する抗体など）を提供する。好ましい実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。本発明は、さらに、前記モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞株を提供する。

【0028】

本発明の 1 つの態様は、被験体の免疫応答の調整方法を提供する。本発明の 1 つの態様は、被験体に治療有効量の *t i m - 3* 活性を調整する薬剤を投与する工程を含む、必要とする被験体の免疫応答を調整する方法を提供する。1 つの好ましい実施形態では、免疫応答の調整は、*T h 1* 応答を増加させるか *T h 2* 応答を減少させる工程を含み、薬剤は *t i m - 3* 活性を減少させる。

10

【0029】

t i m - 3 活性の減少によって *T h 1* 応答を増加させるか *T h 2* 応答を減少させる本明細書中に記載の方法の 1 つの実施形態では、被験体は、増殖性状態または喘息、アレルギー、アレルギー性鼻炎、消化管アレルギー、食物アレルギー、好酸球増加症、結膜炎、もしくは糸球体腎炎などの *T h 2* 媒介性障害を罹患している。別の特定の実施形態では、薬剤は可溶性 *t i m - 3* の発現を阻害する。*t i m - 3* 活性を減少させる薬剤は、*t i m - 3* に結合する抗体、*t i m - 3* の細胞外ドメインに結合する抗体、配列番号 13 のアミノ酸 30 ~ 128 に結合する抗体などの抗体またはそのフラグメントであり得る。

20

【0030】

t i m - 3 活性の減少によって *T h 1* 応答を増加させるか *T h 2* 応答を減少させる本明細書中に記載の方法の 1 つの実施形態では、薬剤は、*t i m - 3* へのガレクチン - 9 の結合を減少させる。特定の実施形態では、薬剤は、(i) 配列番号 13 のアミノ酸 30 ~ 128 ; または (i i) 配列番号 13 のアミノ酸 30 ~ 128 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド薬は、ペグ化またはヒト血清アルブミンもしくは免疫グロブリンの F c ドメインなどの血漿タンパク質への融合などによってそのインピボでの安定性を増加させるように修飾されている。特定の実施形態では、薬剤は、*t i m - 3* の I g V ドメイン、*t i m - 3* の細胞内ドメイン、および免疫グロブリンの F c ドメインを含むが、*t i m - 3* の μ チンドメインまたは *t i m - 3* の膜貫通ドメインを含まないポリペプチドを含む。特定の実施形態では、薬剤は、*t i m - 3* ポリペプチドまたはガレクチン - 9 ポリペプチドの発現レベルを減少させる。特定の実施形態では、薬剤は、二本鎖 RNA アンチセンスオリゴヌクレオチドである。特定の実施形態では、薬剤は、ガレクチン - 9 への全長 *t i m - 3* の結合を阻害する ((i) 配列番号 13 のアミノ酸 30 ~ 128 を含むポリペプチドの (i i) ガレクチン - 9 (配列番号 10 または配列番号 19 中など) への結合を阻害する薬剤など) 。別の実施形態では、*t i m - 3* / ガレクチン - 9 結合を減少させる薬剤は、炭水化物 (ラクトース、 α - ガラクトシドなど) 、グリコシル化ポリペプチド、ペクチン、または修飾ペクチンを含む。

30

【0031】

被験体の免疫応答を調整する方法の 1 つの好ましい実施形態では、免疫応答の調整は *T h 1* 応答を増加させるか *T h 2* 応答を減少させる工程を含み、薬剤は *t i m - 3* 活性を減少させる。特定の実施形態では、被験体は、自己免疫障害、移植片対宿主病 (H V G D) を罹患しているか、被験体は器官移植レシピエントである。

40

【0032】

t i m - 3 活性の増加によって *T h 1* 応答を減少させるか *T h 2* 応答を増加させる本明細書中に記載の方法の 1 つの実施形態では、薬剤は、抗体、抗体フラグメント、またはポリペプチドである。特定の実施形態では、抗体は、*t i m - 3* およびガレクチン - 9 に特異的な二重特異性抗体である。別の特定の実施形態では、*t i m - 3* への薬剤の結合により、*t i m - 3* の細胞内ドメインのリン酸化が増加する。別の特定の実施形態では、薬剤

50

は、天然に存在するリガンドの組換えバージョンなどの *t i m - 3* リガンドである。別の特定の実施形態では、全長 *t i m - 3* への *t i m - 3* リガンドの結合により、*t i m - 3* の細胞内ドメインのリン酸化が増加する。別の特定の実施形態では、*t i m - 3* リガンドはガレクチン - 9 ポリペプチドを含む。別の特定の実施形態では、薬剤は、ガレクチン - 9 の2つの炭水化物認識ドメイン (CRD) の少なくとも1つを含む。別の特定の実施形態では、ポリペプチドはガレクチン - 9 の2つのCRDドメインを含む。別の特定の実施形態では、薬剤は、配列番号10または配列番号18に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、または95%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0033】

本発明の1つの態様は、*t i m - 3* ポリペプチドとガレクチン - 9 ポリペプチドとの間の結合を調整する薬剤の同定方法を提供する。1つの特定の態様は、(a) 試験薬 (*t e s t a g e n t*) の存在下で *t i m - 3* ポリペプチドとガレクチン - 9 ポリペプチドとを接触させる工程と、(b) *t i m - 3* ポリペプチドとガレクチン - 9 ポリペプチドとの結合に対する試験薬の効果を決定する工程と、それにより、*t i m - 3* ポリペプチドとガレクチン - 9 ポリペプチドとの間の結合を調整する薬剤が同定されることを含む、*t i m - 3* ポリペプチドとガレクチン - 9 ポリペプチドとの間の結合を調整する薬剤の同定方法を提供する。

【0034】

別の態様は、(a) 試験薬の存在下で *t i m - 3* ポリペプチドとガレクチン - 9 ポリペプチドとを接触させる工程と、(b) *t i m - 3* ポリペプチドとガレクチン - 9 ポリペプチドとの結合に対する試験薬の効果を決定する工程とを含む、免疫応答を調整する薬剤の同定方法を提供する。いくつかの実施形態では、工程(b)が、試験薬の存在下での *t i m - 3* / ガレクチン - 9 複合体の形成を適切なコントロールと比較することを含む。適切なコントロールが、試験薬の非存在下での第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの間の複合体の形成を含む。免疫応答を調整する薬剤の同定方法のいくつかの実施形態では、免疫応答は、*T h 1* 免疫応答または *T h 2* 免疫応答である。

【0035】

免疫応答を調整する薬剤または *t i m - 3* ポリペプチドとガレクチン - 9 ポリペプチドとの間の結合を調整する薬剤を同定する方法を、インビトロまたはインビボで行うことができる。特定の実施形態では、*t i m - 3* ポリペプチド、ガレクチン - 9 ポリペプチド、またはその両方が細胞内で発現する。特定の実施形態では、複合体形成の検出がレポーター遺伝子発現の検出を含み、レポーター遺伝子の発現が前記複合体の形成に依存する。別の特定の実施形態では、*t i m - 3* ポリペプチド、ガレクチン - 9 ポリペプチド、またはその両方が蛍光分子で標識されている。別の特定の実施形態では、上記方法におけるガレクチン - 9 ポリペプチドが、(i) 配列番号10のアミノ酸1~323、(ii) 配列番号19のアミノ酸1~355、(iii) 配列番号10のアミノ酸1~323と少なくとも90%同一のアミノ酸配列、(iii) 配列番号19のアミノ酸1~355と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む。別の特定の実施形態では、上記方法の *t i m - 3* ポリペプチドが、(i) 配列番号13のアミノ酸30~128、または(ii) 配列番号13のアミノ酸30~128と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む。

【0036】

本発明は、さらに、(a) *t i m - 3* とガレクチン - 9 との間の結合に影響を及ぼす化合物を同定する工程と、(b) 動物における有効性および毒性について工程(a)で同定された化合物またはそのさらなるアナログの治療プロファイリング (*t h e r a p e u t i c p r o f i l i n g*) を行う工程と、(c) 許容可能な治療プロフィールを有すると工程(b)で同定された1つまたは複数の化合物を含む薬学的調製物を処方する工程とを含む、薬物発見ビジネスの実施方法を提供する。本発明は、さらに、(a) *t i m - 3* とガレクチン - 9 との間の結合に影響を及ぼす化合物を同定する工程と、(b) 任意選択的に動物における有効性および毒性について工程(a)で同定された化合物またはそのさらなるアナログの治療プロファイリングを行う工程と、(c) 工程(a)で同定された化

10

20

30

40

50

合物またはそのアナログに関する薬物の開発および/または販売権利を第三者に供与する工程とを含む、薬物発見ビジネスの実施方法を提供する。特定の実施形態は、工程(a)で同定された化合物またはそのアナログの販売に基づいて特許権使用料を徴収する工程をさらに含む。

【0037】

本発明は、さらに、可溶性tim-3を発現する細胞を可溶性tim-3の発現を減少させるのに十分な量の二本鎖RNAを接触させる工程と、前記二本鎖RNAが細胞中の全長tim-3の発現を阻害せず、それによりtim-3活性が増加することを含む、tim-3活性を増加させる方法を提供する。特定の実施形態では、二本鎖RNAが高ストリンジエンシー条件下で配列番号1を含む核酸とハイブリダイズするが、高ストリンジエンシー条件下で配列番号11を含む核酸とハイブリダイズしない。別の特定の実施形態では、二本鎖RNAは、配列番号15に記載の核酸配列を含む。別の特定の実施形態では、二本鎖RNAはsiRNAまたはヘアピンRNAである。別の特定の実施形態では、被験体への二本鎖RNAの投与によって接触させる。

10

【0038】

本発明は、さらに、可溶性tim-3をコードする核酸の存在を検出する工程と、前記可溶性tim-3をコードする核酸の検出が可溶性tim-3遺伝子発現を示すことを含む、可溶性tim-3遺伝子発現の検出方法を提供する。

【0039】

本発明の実施は、他で示さない限り、当業者の範囲内の細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を使用する。このような技術は、文献に記載されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D.N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gaited., 1984); Mullis et al. U.S. Patent No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds., 1984); Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds., 1984); Culture Of Animal Cells (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照のこと。これらの引例の内容全体が本明細書中で参考として援用される。

20

30

40

【0040】

50

((2) 定義)

便宜上、明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用される一定の用語をここに集めている。他で定義しない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されている意味を有する。

【 0 0 4 1 】

冠詞「 a 」および「 a n 」は、本明細書中で、1つまたは1つを超える冠詞の文法上の対照物をいうために使用される。例として、「 a n e l e m e n t 」は、1つのエレメントまたは1つを超えるエレメントを意味する。

【 0 0 4 2 】

用語「 ~が含まれる」は、句「 ~が含まれるが、これらに限定されない」を意味するように使用され、これと交換可能に使用される。

【 0 0 4 3 】

用語「または」は、本明細書中で、他で明確に示されない限り、用語「および/または」を意味するように使用され、これと交換可能に使用される。

【 0 0 4 4 】

用語「 ~など」は、本明細書中で、句「 ~などであるが、これらに限定されない」を意味する用に使用され、これと交換可能に使用される。

【 0 0 4 5 】

用語「核酸」は、デオキシリボ核酸 (D N A) などのポリヌクレオチド、適切な場合には、リボ核酸 (R N A) をいう。この用語はまた、等価物として、ヌクレオチドアナログから作製された R N A または D N A のアナログ、記載の実施形態に適用可能な場合、一本鎖 (センスまたはアンチセンス) および二本鎖ポリヌクレオチドが含まれると理解すべきである。

【 0 0 4 6 】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本明細書中で交換可能に使用される。用語「防止する」は、当該分野で認識されており、局所再発 (例えば、痛み) などの病態、癌などの疾患、心不全などの症候群の合併症 (s y n d r o m e c o m p l e x) 、または任意の他の病状に関して使用される場合、当該分野で十分に理解されており、疾患発症前に、組成物を投与していない被験体と比較して被験体の病状の頻度を減少させるか、重症度を軽減させるか、症状の発症を遅延させる組成物を投与する工程を含む。したがって、癌の防止には、例えば、未処置コントロール集団と比較した予防的治療を受けた患者集団における検出可能な癌成長の減少および/または未処置コントロール集団と比較した処置集団で検出可能な癌成長の出現の遅延 (例えば、統計的および/または臨床的に有意な量) が含まれる。感染の防止には、例えば、未処置コントロール集団と比較した処置集団での感染症の診断数の減少および/または未処置コントロール集団と比較した処置集団での感染症の症状の発症の遅延が含まれる。痛みの防止には、例えば、未処置コントロール集団と比較した処置集団での被験体が経験した痛みの頻度の減少、重症度の軽減、または遅延が含まれる。

【 0 0 4 7 】

本明細書中で使用される、用語「有効量」は、所望の結果を得るために必要な投薬量および期間で有効な量を定義する。本発明の化合物の有効量は、動物の病状、年齢、性別、および体重などの要因によって変化し得る。最適な治療応答を得るために投薬計画を調整することができる。例えば、いくつかに分割した用量を毎日投与することができるか、治療状況の要件で示されるように、用量を比例的に減少させることができる。

【 0 0 4 8 】

本明細書中で使用される、「被験体」は、任意の脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトをいう。被験体の例には、非ヒト霊長類、げっ歯類、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、トリ、および魚類が含まれる。

【 0 0 4 9 】

本明細書中で使用される、目的のタンパク質の「変異型」は、1つまたは複数のアミノ

10

20

30

40

50

酸が変化したアミノ酸配列をいう。変異型は、置換されたアミノ酸が類似の構造または化学的性質を有する「保存的」変化（例えば、ロイシンのイソロイシンへの置換）を有し得る。より稀には、変異型は、「非保存的」変化（例えば、グリシンのトリプトファンへの置換）を有し得る。類似のわずかな変異には、アミノ酸の欠失、挿入、またはその両方も含まれ得る。生物学的または免疫学的活性を消失することなくアミノ酸残基を置換、挿入、または欠失することができるかどうかの決定のガイダンスを、当該分野で周知のコンピュータプログラム（例えば、DNA STARソフトウェア）を使用して見出すことができる。

【0050】

本明細書中で使用される、「Th1関連障害」は、基準（例えば、正常なコントロール）と比較して、例えば、異常な、例えば、Th1細胞の活性（例えば、Th1細胞応答）またはTh1細胞数の増加に関連する疾患または病態である。Th1関連障害の例には、例えば、自己免疫障害（多発性硬化症、関節リウマチ、I型糖尿病、およびクローン病）が含まれる。

10

【0051】

本明細書中で使用される、「Th2関連障害」は、基準（例えば、正常なコントロール）と比較して、例えば、異常な、例えば、Th2細胞の活性（例えば、Th2細胞応答）またはTh2細胞数の増加に関連する疾患または病態である。Th2関連障害の例には、例えば、喘息、アレルギー、および抗体成分に関連する障害（例えば、関節リウマチ）が含まれる。

20

【0052】

本明細書中で使用される、用語「アナログ」には、基準配列に対して1つまたは複数のアミノ酸の置換、挿入、および/または欠失を含むアミノ酸が含まれるが、これらに限定されない。アミノ酸置換は、保存的または非保存的性質を示し得る。保存アミノ酸置換は、本発明のタンパク質の1つまたは複数のアミノ酸の類似の電荷、サイズ、および/または疎水性のアミノ酸への置換を含む。保存的置換のみが行われた場合、得られたアナログは機能的に等価なはずである。非保存的置換は、アミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸の異なる電荷、サイズ、および/または疎水性を有する1つまたは複数のアミノ酸への置換を含む。アミノ酸挿入は、1アミノ酸残基または2～15アミノ酸長の範囲の連続的アミノ酸からなり得る。欠失は、アミノ酸配列からの1つまたは複数のアミノ酸または不連続部分の除去からなり得る。欠失アミノ酸は、連続していても連続していなくてもよい。

30

【0053】

用語「組換え」は、天然に隣接しない配列を含む任意の核酸を意味するために本明細書中で使用される。組換え核酸を、例えば、分子生物学的方法の使用によってインビトロで生成するか、相同組換えまたは非相同組換えによる新規の染色体位置での核酸の挿入によってインビボで生成することができる。

【0054】

用語「アゴニスト」は、タンパク質（例えば、ポリペプチドX）の生物活性を模倣または上方制御する（例えば、増強または捕捉する）薬剤をいう。アゴニストは、野生型タンパク質または野生型タンパク質の少なくとも1つの生物活性を有するその誘導体であり得る。アゴニストは、遺伝子発現を上方制御するかタンパク質の少なくとも1つの生物活性を増加させる化合物であり得る。アゴニストはまた、ポリペプチドの別の分子（例えば、標的ペプチドまたは核酸）との相互作用を増加させる化合物であり得る。

40

【0055】

用語「アンタゴニスト」は、タンパク質の少なくとも1つの生物活性を下方制御する（例えば、抑制または阻害する）薬剤をいう。アンタゴニストは、タンパク質と別の分子（例えば、標的ペプチドまたは酵素基質）との間の相互作用を阻害または減少させる化合物であり得る。アンタゴニストはまた、遺伝子発現を下方制御するかタンパク質発現の存在量を減少させる化合物であり得る。

50

【0056】

用語「治療効果」は、薬理的に活性な物質によって生じる、動物、詳細には哺乳動物、より詳細にはヒトにおける局所的または全身的效果をいう。したがって、この用語は、動物またはヒトにおける疾患の診断、治療、緩和、治療、もしくは防止、または所望の身体的もしくは精神的発達および状態の強化における使用を意図する任意の物質を意味する。句「治療有効量」は、任意の治療に適用可能な妥当な利益/リスク比でいくつかの所望の局所的または全身的效果が得られるような物質の量を意味する。一定の実施形態では、化合物の治療有効量は、その治療指標および溶解性などに依存する。例えば、本発明の方法によって発見された一定の化合物を、このような治療に適用可能な妥当な利益/リスク比を得るのに十分な量で投与することができる。

10

【0057】

用語「障害の治療を必要とする被験体」は、このような障害を有すると診断されたかこのような障害を有する疑いのある被験体である。

【0058】

本明細書中で使用される他の技術用語は、これらが使用される分野で通常の意味を有し、McGraw-Hill Dictionary of Chemical TermsおよびStedman's Medical Dictionaryなどの種々の技術用語辞典によって例示されている。

【0059】

((3) 核酸)

一定の態様では、本発明は、ヒト可溶性tim-3ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする単離および/または組換え核酸(例えば、配列番号1および5など)を提供する。本発明の1つの態様は、配列番号1に記載のヌクレオチド配列を含む単離核酸を提供する。配列番号1は、ヒト可溶性tim-3イソ型のDNAコード配列である。ヒト可溶性tim-3は、ヒト全長tim-3の細胞内ドメイン(配列番号13の残基226~301)に融合したIgVドメイン(配列番号13の残基22~131)を含む。1つの実施形態では、本発明によって提供された可溶性ヒトtim-3核酸は、さらに、翻訳ポリペプチドのN末端で全長tim-3のシグナル配列(配列番号13のアミノ酸残基1~21)をコードする。本発明の別の態様は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むヒト可溶性tim-3ポリペプチドをコードする単離核酸を提供する。

20

30

【0060】

同様に、本発明の別の態様は、マウス可溶性tim-3ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする単離および/または組換え核酸(例えば、配列番号3および7など)を提供する。本発明の1つの態様は、配列番号3に記載のヌクレオチド配列を含む単離核酸を提供する。配列番号3は、マウス可溶性tim-3イソ型のDNAコード配列である。マウス可溶性tim-3は、マウス全長tim-3の細胞内ドメイン(配列番号14の残基217~281)に融合したIgVドメイン(配列番号14の残基22~132)を含む。1つの実施形態では、本発明によって提供されたマウス可溶性tim-3核酸は、さらに、翻訳ポリペプチドのN末端で全長tim-3のシグナル配列(配列番号14のアミノ酸残基1~21)をコードする。本発明の別の態様は、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含むマウス可溶性tim-3ポリペプチドをコードする単離核酸を提供する。

40

【0061】

本発明の核酸は、配列番号1、3、5、および7の変異型を含む核酸を含むとさらに理解される。変異ヌクレオチド配列には、置換、付加、または欠失などによって1つまたは複数のヌクレオチドが異なる配列(対立遺伝子変異型など)が含まれ、したがって、(例えば、遺伝コードの縮重によって)配列番号1、3、5、および7に示すコード配列のヌクレオチド配列と異なるコード配列が含まれる。例えば、可溶性tim-3ポリペプチドをコードする核酸は、配列番号1および3の配列または配列番号2および4のポリペプチドをコードする配列と少なくとも90%、95%、99%、または100%同一の配列を含む核酸であり得る。

50

【0062】

2配列の間の配列の比較および同一率および類似率の決定を、数学アルゴリズムを使用して行うことができる。(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。

10

【0063】

1つの好ましい実施形態では、2つのアミノ酸配列間の同一率を、Blossom62行列またはPAM250行列のいずれかを使用してGCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>で利用可能)のGAPプログラムに組み込まれたNeedleman and Wunsch(J Mol. Biol. (48): 444-453 (1970))アルゴリズムを使用して決定する。

20

【0064】

さらに別の実施形態では、2つのヌクレオチド配列間の同一率を、NWSgapdna-CMP行列を使用したGCGソフトウェアパッケージ(Devereux, J., et al., Nucleic Acids Res. 12(1): 387 (1984))(<http://www.gcg.com>で利用可能)のGAPプログラムを使用して決定する。別の実施形態では、2つのアミノ酸配列間またはヌクレオチド配列間の同一率を、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれたE. Myers and W. Miller(CABIOS, 4: 11-17 (1989))のアルゴリズムを使用して決定する。

30

【0065】

他の実施形態では、変異型はまた、高ストリンジェンシー条件下で配列番号1および3に示す核酸配列のコード配列とハイブリダイズする配列が含まれる。1つの実施形態では、変異ヌクレオチド配列は、ムチンおよび膜貫通ドメインを欠く可溶性tim-3ポリペプチドをコードする。別の実施形態では、変異ヌクレオチド配列は、tim-3リガンド(例えば、ガレクチン-9)に結合することができる可溶性tim-3ポリペプチドをコードする。

【0066】

当業者は、DNAハイブリッド形成を促進する適切なストリンジェンシー条件を変更することができることを容易に理解する。例えば、約45での6.0x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)でのハイブリッド形成およびその後の50での2.0x SSCの洗浄を行うことができる。例えば、洗浄工程中の塩濃度を、50で約2.0x SSCの低ストリンジェンシーから50で約0.2x SSCの高ストリンジェンシーまで選択することができる。さらに、洗浄工程の温度を、室温(約22)の低ストリンジェンシー条件から約65の高ストリンジェンシー条件まで増加させることができる。温度および塩の両方を変化させるか、温度または塩濃度を一定に保持して他の変数を変更することができる。1つの実施形態では、本発明は、室温で6x SSCおよびその後の室温での2x SSCの洗浄を行う低ストリンジェンシー条件でハイブリダイズする核酸を提供する。

40

【0067】

遺伝コードの縮重のために配列番号1および3と異なる単離核酸も本発明の範囲内であ

50

る。例えば、1つを超えるトリプレットによって多数のアミノ酸が指定される。同一アミノ酸を特定するコドン(すなわち、同義語(例えば、CAUおよびCACはヒスチジンの同義語である))により、タンパク質のアミノ酸配列に影響を与えない「サイレント」変異が起こり得る。当業者は、特定のタンパク質をコードする核酸の1つまたは複数ヌクレオチドのこれらの変動が天然の対立遺伝子の変動によって所与の種の個体間で存在し得ることを認識する。任意および全てのこのようなヌクレオチドの変動および得られたアミノ酸多型は本発明の範囲内である。

【0068】

本発明はまた、高ストリンジェンシー条件下で可溶性tim-3をコードする核酸とハイブリダイズするが、tim-3膜貫通ドメインまたはtim-3ミチンドメインをコードしない核酸を提供する。1つの実施形態では、これらの核酸は、少なくともtim-3のIgVドメインをコードする。これらの核酸は、IgVまたは細胞内ドメイン内に変異、欠失、または挿入を有する可溶性tim-3タンパク質をコードし得る。1つの実施形態では、核酸は、ガレクチン-9などのtim-3リガンドに結合することができるポリペプチドをコードする。1つの実施形態では、これらの核酸は、変異しているか変異していない可溶性tim-3および血清アルブミンまたは免疫グロブリンのFcドメインなどの別のタンパク質由来の1つまたは複数のドメインを含む融合タンパク質をコードする。

【0069】

本発明はまた、高ストリンジェンシー条件下または生理学的条件下で可溶性tim-3をコードする核酸とハイブリダイズするが、高ストリンジェンシー条件下または生理学的条件下で全長tim-3をコードする核酸とハイブリダイズしない核酸を提供する。1つの実施形態では、本発明は、高ストリンジェンシー条件下で配列番号1に記載の核酸(ヒト可溶性tim-3をコードする)とハイブリダイズするが、配列番号11に記載の核酸(全長ヒトtim-3をコードする)とハイブリダイズしない単離核酸を提供する。別の実施形態では、本発明は、高ストリンジェンシー条件下で配列番号3に記載の核酸(マウス可溶性tim-3をコードする)とハイブリダイズするが、配列番号12に記載の核酸(全長マウスtim-3をコードする)とハイブリダイズしない単離核酸を提供する。好ましい実施形態では、このような単離核酸は、ヒトおよびマウスtim-3のIgVおよび細胞内ドメインコード配列を連結する可溶性tim-3cDNA中に見出される新規のサプライズ部位にわたる。別の好ましい実施形態では、核酸は、配列番号5および7に記載のヌクレオチド配列を有する。これらの核酸を、可溶性tim-3をコードする核酸を検出するために(Th1細胞中のtim-3をコードする核酸の存在の検出)、本明細書中に記載の方法で使用することができる。

【0070】

一定の態様では、可溶性tim-3ポリペプチドをコードする核酸およびその変異型を使用して、直接送達などの核酸送達によって生物または細胞中の可溶性tim-3発現を増加させることができる。本発明の核酸治療構築物を、例えば、細胞中で転写された場合に可溶性tim-3ポリペプチドをコードするRNAを産生する発現プラスミドとして送達することができる。

【0071】

本発明はまた、可溶性tim-3をコードする核酸の存在を検出する工程と、前記可溶性tim-3をコードする核酸の検出が可溶性tim-3遺伝子発現を示すことを含む、可溶性tim-3遺伝子発現の検出方法を提供する。好ましい実施形態では、核酸はmRNAである。可溶性tim-3をコードするmRNAの検出を、当該分野で一般的に公知のmRNA分子検出方法(ノーザンブロット、逆転写mRNAのPCR増幅、DNAマイクロアレイが含まれる)を使用して行うことができる。別の実施形態では、可溶性tim-3遺伝子発現を、抗体、好ましくは、可溶性tim-3に結合するが全長tim-3に結合しない抗体を使用して検出する。

【0072】

((4)RNA干渉、リボザイム、およびアンチセンス)

10

20

30

40

50

一定の態様では、本発明は、全長 *t i m - 3*、可溶性 *t i m - 3*、または *t i m - 3* リガンドの操作（典型的には、遺伝子発現の減少）のための *R N A i*、リボザイム、アンチセンス、および他の核酸に関連する方法および組成物に関する。本発明の1つの態様では、方法および組成物は、*t i m - 3* のたった1つの形態（全長または可溶性形態のいずれか）に特異的である。本発明の別の態様では、操作される *t i m - 3* リガンドはガレクチン-9である。

【0073】

本発明の一定の実施形態は、*R N A* 干渉 (*R N A i*) によって *t i m - 3* またはガレクチン-9などのそのリガンドの1つの形態のノックダウンのための材料および方法を使用する。*R N A i* は、真核生物中で起こり得る配列特異的転写後遺伝子発現の過程である。一般に、この過程は、特定の配列に相同な二本鎖 *R N A* (*d s R N A*) によって誘導される特定の配列の *m R N A* の分解を含む。例えば、特定の一本鎖 *m R N A* (*s s m R N A*) の配列に対応する長い *d s R N A* の発現がそのメッセージを不安定にし、それによって対応する遺伝子の発現を「干渉する」。したがって、任意の選択された遺伝子を、その遺伝子の *m R N A* の全部または実質的部分に対応する *d s R N A* の移入によって抑制することができる。長い *d s R N A* が発現される場合、最初に、リボヌクレアーゼ *I I I* によっていくつかの例では21~22塩基対長ほどのより短い *d s R N A* オリゴヌクレオチドにプロセシングされるようである。さらに、比較的短い相同 *d s R N A* の移入または発現によって *R N A i* を行うことができる。実際、比較的短い相同 *d s R N A* の使用は、以下に考察する一定の利点を有し得る。

【0074】

哺乳動物細胞は、二本鎖 *R N A* (*d s R N A*) によって影響を受ける少なくとも2つの経路を有する。*R N A i* (配列特異的) 経路では、上記のように、最初の *d s R N A* が短い干渉 (*s i*) *R N A* に分解される。*s i R N A* は、各3'末端に2ヌクレオチドのオーバーハングを有する約19ヌクレオチドの *s i R N A* を形成する約21個のヌクレオチドのセンス鎖およびアンチセンス鎖を有する。短い干渉 *R N A* は、分解のために特定の伝令 *R N A* をターゲティングすることが可能な配列情報を提供すると考えられている。対照的に、非特異的経路は、少なくとも30塩基対長である限り、任意の配列の *d s R N A* によって誘発される。*d s R N A* は2つの酵素 (*P K R* (その活性形態で翻訳開始因子 *e I F 2* のリン酸塩を形成して全てのタンパク質合成を遮断する) および *R N A* アーゼ *L* (全 *m R N A* をターゲティングする非特異的酵素) を合成する2', 5'オリゴアデニル酸合成酵素 (2', 5' - *A S*)) を活性化するので、非特異的効果が生じ得る。非特異的経路は、ストレスまたはウイルス感染に対する宿主応答を示すことができ、一般に、本発明の好ましい方法において非特異的経路の効果を最小にすることが好ましい。注目すべきなのは、より長い *d s R N A* は、非特異的経路の誘導に必要なようであり、したがって、*R N A i* による遺伝子抑制を行うためには約30塩基対より短い *d s R N A* が好ましい (Hunter et al. (1975) *J Biol Chem* 250:409-17; Manche et al. (1992) *Mol Cell Biol* 12:5239-48; Minks et al. (1979) *J Biol Chem* 254:10180-3; および Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-8を参照のこと)。

【0075】

R N A i は、多数の異なる生物 (エレガンス線虫 (例えば、Fire et al. (1998) *Nature* 391:806-11)、マウスの卵および胚 (Wianny et al. (2000) *Nature Cell Biol* 2:70-5; Svoboda et al. (2000) *Development* 127:4147-56)、ならびに培養 *R A T - 1* 線維芽細胞 (Bahramina et al. (1999) *Mol Cell Biol* 19:274-83) が含まれる) における遺伝子発現の減少または消失で有効であることが示されており、真核植物および動物で利用可能な古代に進化した経路のようである (Sharp (2001) *Genes Dev.* 15:485-

10

20

30

40

50

90)。RNAiは、種々の細胞型（HeLa細胞、NIH/3T3細胞、COS細胞、293細胞、およびBHK-21細胞が含まれる）における遺伝子発現の有効な減少手段であることが証明されており、典型的には、アンチセンス技術を使用して達成されるレベルよりも低いレベルに遺伝子発現を減少させ、実際はしばしば発現全体が消失する（Bass（2001）Nature 411：428-9を参照のこと）。哺乳動物細胞では、siRNAは、アンチセンス実験で典型的に使用される濃度よりもはるかに低い濃度で有効である（Elbashir et al.（2001）Nature 411：494-8）。

【0076】

RNAiを行うために使用される二本鎖オリゴヌクレオチドは、好ましくは30塩基対未満であり、より好ましくは、約25、24、23、22、21、20、19、18、または17塩基対のリボ核酸を含む。任意選択的に、本発明のdsRNAオリゴヌクレオチドは、3'オーバーハング末端を含み得る。例示的2-ヌクレオチドの3'オーバーハングは、任意の型のリボヌクレオチド残基から構成され、細胞培養培地中およびトランスフェクトされた細胞内でsiRNAのヌクラーゼ耐性を増強することができる（Elbashir et al.（2001）Nature 411：494-8を参照のこと）。50、75、100、またはさらに500塩基対またはそれ以上のより長いdsRNAを、本発明の一定の実施形態で使用することもできる。RNAi実施のための例示的なdsRNA濃度は、約0.05nM、0.1nM、0.5nM、1.0nM、1.5nM、25nM、または100nMであるが、処置される細胞、遺伝子標的、および当業者が容易に識別可能な他の因子の性質に依存して他の濃度を使用することができる。例示的dsRNAを、化学合成するか、適切な発現ベクターを使用してインビトロまたはインビボで産生することができる。例示的合成RNAには、当該分野で公知の方法（例えば、Expedite RNAホスホアミダイトおよびチミジンホスホアミダイト（Proligo, Germany））を使用して化学合成された21ヌクレオチドのRNAが含まれる。当該分野で公知の方法を使用して合成オリゴヌクレオチドを脱保護し、ゲル精製することが好ましい（Elbashir et al.（2001）Genes Dev. 15：188-200を参照のこと）。より長いRNAを、当該分野で公知のT7 RNAポリメラーゼプロモーターなどのプロモーターから転写することができる。インビトロプロモーター下流の可能な両方向で存在する1つのRNA標的が標的の両鎖を転写して、所望の標的配列のdsRNAオリゴヌクレオチドが作製される。

【0077】

tim-3またはガレクチン-9が二本鎖RNAの標的である場合、tim-3核酸またはガレクチン-9核酸中に示される核酸配列の一部（ストリンジェントな条件下および/または生理学的条件下で配列番号1、3、9、10、11、もしくは12またはその相補物のいずれかとハイブリダイズする核酸など）を含むように上記RNA種のいずれかをデザインする。目的が全長tim-3の活性を減少させることである場合、全長tim-3の発現を下方制御することができるが、可溶性tim-3の発現を下方制御することができない二本鎖RNA試薬が好ましい。したがって、RNA試薬は全長tim-3レベルを減少させることができる一方で、可溶性tim-3はガレクチン-9などのtim-3リガンドを漸増して（titrate）全長tim-3との相互作用を防止することができる。この実施形態では、RNA種を、全長tim-3中に存在するが可溶性tim-3に存在しないムチンドメインまたは膜貫通ドメインをコードするmRNA領域を含むようにデザインすることができる。

【0078】

本発明の関連する態様は、可溶性tim-3を発現する細胞を可溶性tim-3発現の阻害に十分な量の二本鎖RNAと接触させる工程と、二本鎖RNAが全長tim-3発現を阻害しないこととを含む、可溶性tim-3の発現の阻害によるtim-3活性を増加させる方法を提供する。1つの実施形態では、二本鎖RNAは、高ストリンジェンシー条件下で配列番号1を含む核酸とハイブリダイズするが、同一条件下で配列番号11を含む

10

20

30

40

50

核酸とハイブリダイズしない。別の実施形態では、二本鎖RNAは、生理学的条件下で配列番号1を含む核酸とハイブリダイズするが、同一条件下で配列番号11を含む核酸とハイブリダイズしない。好ましい実施形態では、二本鎖RNAの一方の鎖は、配列番号15に記載の核酸配列を含む。tim-3を発現する単離細胞または被験体、好ましくはヒトで本発明の方法を行うことができる。

【0079】

標的がガレクチン-9である場合、RNA種は、ガレクチン-9核酸中に示される核酸配列の一部（例えば、ストリンジェントな条件下および/または生理学的条件下で配列番号9またはその相補物とハイブリダイズする核酸など）を含み得る。

【0080】

オリゴヌクレオチドデザインで使用される特定の配列は、標的の発現された遺伝子メッセージ内に含まれるヌクレオチドの任意の連続配列であり得る。当該分野で公知のプログラムおよびアルゴリズムを使用して、適切な標的配列を選択することができる。さらに、特定された一本鎖核酸配列の二次構造を予想するためにデザインされたプログラムを使用し、折り畳まれたmRNAの曝露された一本鎖領域中に生じる可能性が高い配列の選択によって最適な配列を選択することができる。適切なオリゴヌクレオチドデザインのための方法および組成物を、例えば、米国特許第6,251,588号（その内容が本明細書中で参考として援用される）で見出すことができる。伝令RNA(mRNA)は、一般に、リボヌクレオチド配列内でのタンパク質合成を指示するための情報を含む線状分子と考えられているが、研究により、ほとんどのmRNA中に存在する多数の二次構造および三次構造が明らかとなっている。RNA中の二次構造エレメントは、同一RNA分子の異なる領域間のWatson-Crick型相互作用によって大部分が形成される。重要な二次構造エレメントには、分子内二本鎖領域、ヘアピンループ、二重鎖RNA中のバルジ、および内部ループが含まれる。二次構造が互いに接触した場合に三次構造エレメントが形成され、一本鎖領域と接触した場合により複雑な三次元構造が産生される。多数の研究者が多数のRNA二重鎖構造の結合エネルギーを測定しており、RNAの二次構造を予想するために使用することができる規則が導かれている（例えば、Jaeger et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7706 (1989); and Turner et al. (1988) Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 17:167を参照のこと）。規則は、RNA構造エレメントの同定、特に、スプライシングRNAi、リボザイム、またはアンチセンス技術のために標的にmRNAの好ましいセグメントを授与することができる一本鎖RNA領域の同定で有用である。したがって、mRNA標的の好ましいセグメントを、RNAi媒介dsRNAオリゴヌクレオチドのデザインならびに本発明の適切なリボザイムおよびハンマーヘッドリボザイムのデザインのために同定することができる。

【0081】

dsRNAオリゴヌクレオチドを、当該分野で公知のリポソームなどのキャリア組成物（例えば、異常な細胞株の製造によって記載されたリポフェクタミン2000(Life Technologies))を使用した異種標的遺伝子でのトランスフェクションによって細胞に移入することができる。内因性遺伝子のターゲティングのためのdsRNAオリゴヌクレオチドのトランスフェクションを、オリゴフェクタミン(Life Technologies)を使用して行うことができる。蛍光顕微鏡を使用してhGFPCo-dpAD3の同時トランスフェクション後の哺乳動物細胞株のトランスフェクション効率をチェックすることができる(Kehlenback et al. (1998) J Cell Biol 141:863-74)。RNAiの有効性を、dsRNA移入後の多数のアッセイのいずれかによって評価することができる。これらには、新規のタンパク質合成が抑制された後の内因性プールの代謝回転のための十分な時間を経た後のtim-3ポリペプチド（可溶性形態および/または全長形態が含まれる）またはtim-3リガンド（ガレクチン-9など）を認識する抗体を使用したウェスタンブロット分析、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応、既存の標的mRNA（全長tim-3、可溶性tim-3、

10

20

30

40

50

またはガレクチン - 9 の mRNA など) のレベルを決定するためのノーザンブロット分析が含まれる。

【0082】

さらなる組成物、方法、およびRNAiテクノロジーの適用は、米国特許第6,278,039号、同第5,723,750号、および同第5,244,805号(本明細書中で参考として援用される)に記載されている。

【0083】

tim-3およびガレクチン-9のmRNA転写物を触媒的に切断するようにデザインしたリボザイム分子を使用して、本tim-3またはガレクチン-9のmRNAの翻訳を防止することもできる(例えば、1990年10月14日公開のPCT国際公開WO90/11364; sarver et al. (1990) Science 247:1222-1225、および米国特許第5,093,246号を参照のこと)。リボザイムは、特定のRNA切断を触媒することができる酵素RNA分子である(概説については、Rossi (1994) Current Biology 4:469-471を参照のこと)。リボザイムの作用機構は、リボジム分子の相補標的RNAへの配列特異的ハイブリッド形成およびその後のエンドヌクレアーゼ的切断事象を含む。リボザイム分子の組成物は、好ましくは、tim-3またはガレクチン-9に相補的な1つまたは複数の配列およびmRNA切断または機能的な等価な配列を担う周知の触媒配列を含む(例えば、米国特許第5,093,246号(その全体が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと)。

【0084】

部位特異的認識配列でmRNAを切断するリボザイムを使用して標的mRNAを破壊することができる一方で、ハンマーヘッドリボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッドリボザイムは、標的mRNAと相補的塩基対を形成する隣接領域によって予想される位置でmRNAを切断する。好ましくは、標的mRNAは、以下の2つの塩基配列を有する: 5'-UG-3'。ハンマーヘッドリボザイムの構築および産生は、当該分野で周知であり、Haseloff and Gerlach (1988) Nature 334:585-591により完全に記載されている: PCT出願番号WO89/05852号(その内容が本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。ハンマーヘッドリボザイム配列を、インピボでの切断効率を増加させるために運搬RNA(tRNA)などの安定なRNAに埋め込むことができる(Perriman et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6175-79; de Feyter, and Gaudron, Methods in Molecular Biology, Vol. 74, Chapter 43, "Expressing Ribozymes in Plants", Edited by Turner, P. C, Humana Press Inc., Totowa, N. J)。特に、tRNA融合リボザイムのRNAポリメラーゼIII媒介発現は、当該分野で周知である(Kawasaki et al. (1998) Nature 393:284-9; Kuwabara et al. (1998) Nature Biotechnol. 16:961-5; and Kuwabara et al. (1998) Mol. Cell 2:617-27; Koseki et al. (1999) J. Virol 73:1868-77; Kuwabara et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:1886-91; Tanabe et al. (2000) Nature 406:473-4を参照のこと)。典型的には、所与の標的cDNA配列内に多数の潜在的なハンマーヘッドリボザイム切断部位が存在する。好ましくは、非機能的mRNA転写物の有効性を増大させて細胞内蓄積を最小にするために、切断認識部位が標的mRNAの5'末端付近に存在するようにリボザイムを操作する。さらに、例えば、標的の長鎖形態および単鎖形態のC末端アミノ酸ドメインの異なる部分をコードする標的配列中に存在する任意の切断認識部位の使用により、一方または他方の標的形態の選択的ターゲティングが可能であり、したがって、標的遺伝子産物の一方の形態に対して選択的効果を有する。

10

20

30

40

50

【0085】

遺伝子ターゲティングリボザイムは、必ず2つの領域（それぞれ少なくとも5個、好ましくはそれぞれ6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の連続ヌクレオチド長の標的mRNA）に相補的なハイブリッド形成領域を含む。tim-3標的mRNAは、配列番号1、3、5、または7のいずれかを含む。ガレクチンmRNA配列は、配列番号9を含む。

【0086】

さらに、リボザイムは、標的センスmRNAを自己触媒的に切断する高度に特異的なエンドリボヌクレアーゼ活性を有する。本発明は、治療薬標的候補遺伝子などのtim-3またはガレクチン-9タンパク質をコードするセンスmRNAとハイブリッド形成し、それによりもはや機能的ポリペプチド産物を合成するために翻訳されることができないようにセンスmRNAとハイブリッド形成してこれを切断するリボザイムにまで及ぶ。

【0087】

本発明のリボザイムには、RNAエンドリボヌクレアーゼ（以後「Cech型リボザイム」）（テトラヒメナ中に天然に存在するもの（IVS RNAまたはL-19 IVS RNA）およびThomas Cech and collaborators（Zaug, et al. (1984) Science 224:574-578; Zaug, et al. (1986) Science 231:470-475; Zaug, et al. (1986) Nature 324:429-433 University Patents Inc.による国際公開特許出願番号WO88/04300; Been, et al. (1986) Cell 47:207-216によって詳細に記載のものなど）も含まれる。Cech型リボザイムは、標的RNAの切断後に標的RNA配列とハイブリダイズする8塩基の活性部位を有する。本発明は、標的遺伝子または核酸配列中に存在する8塩基対の活性部位配列をターゲティングするCech型リボザイムを含む。

【0088】

リボザイムは、修飾オリゴヌクレオチド（例えば、安定性、ターゲティングなどの改良のため）から構成され得るが、インビボで標的遺伝子を発現する細胞に送達されるべきである。好ましい送達方法は、トランスフェクトされた細胞が内因性標的メッセージを破壊して翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを産生するような強力構成性polIIIまたはpolIIプロモーターの調節下でのリボザイムを「コードする」DNA構築物の使用を含む。アンチセンス分子と異なり、リボザイムは触媒性を示すので、より低い細胞内濃度で有効である。

【0089】

一定の実施形態では、RNAiによる有効なノックダウンに十分な配列部分を最初に同定することによってリボザイムをデザインすることができる。次いで、同一の配列部分を、リボザイムに組み込むことができる。本発明のこの態様では、リボザイムまたはRNAiの遺伝子ターゲティング部分は、少なくとも5個、好ましくはそれぞれ6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個またはそれ以上のtim-3核酸またはガレクチン-9核酸の連続ヌクレオチドの実質的に同一の配列である。

【0090】

長鎖標的RNA鎖では、二次構造または三次構造内に隠れるので、有意な数の標的部位がリボザイムに接近することができない（Birikh et al. (1997) Eur J Biochem 245:1-16）。標的RNAの接近可能性の問題を克服するために、典型的には、コンピュータで作製した二次構造の予想を使用して、一本鎖であるか「開いた」立体配値である可能性が最も高い標的を同定する（Jaeger et al. (1989) Methods Enzymol 183:281-306を参照のこと）。他のアプローチは、非常に多数の候補ハイブリッド形成オリゴヌクレオチド分子の評価を含む二次構造を予想するための体系的アプローチを使用する（Milner et al. (1997) Nat Biotechnol 15:537-41; およびP

10

20

30

40

50

atzel and Szczakiel (1998) Nat Biotechnol 16: 64-8を参照のこと)。さらに、米国特許第6,251,588号(その内容が本明細書中で参考として援用される)は、標的核酸配列へのハイブリッド形成の潜在性を予想するためのオリゴヌクレオチドプローブ配列の評価方法を記載している。本発明の方法は、一本鎖であると予想される標的mRNA配列の好ましいセグメントを選択する方法の使用、さらに、本発明のRNAiオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの両方のデザインにおける標的mRNAの約10~20個の連続ヌクレオチドを含むことが好ましい同一または実質的に同一の標的mRNA配列の便宜的使用を提供する。

【0091】

(5) ポリペプチド

一定の態様では、本開示により、通常はタンパク質と会合し得る他のタンパク質またはタンパク質を含む特定の複合体から単離されているか実質的に含まない可溶性tim-3ポリペプチドの単離および/または精製形態が利用可能になる。一定の実施形態では、可溶性tim-3ポリペプチドは、配列番号2、4、6、または8のアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、97%、99%、または100%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。2つのポリペプチド間のアミノ酸同一性を、PAM250行列に基づいたアラインメントアルゴリズムなどのアラインメントアルゴリズムを使用した2つのポリペプチド配列の最初のアラインメントによって決定することができる。

【0092】

一定の実施形態では、可溶性tim-3ポリペプチドは、配列番号2、4、6、および8のいずれかと少なくとも90%、95%、97%、99%、または100%同一のアミノ酸配列の一部を含むポリペプチドであり、好ましくは、前記一部は、Th1細胞の活性化の調整に十分であるかtim-3リガンドに結合することができる部分などの機能的部分である。1つの実施形態では、一部は、tim-3のIgVドメインを含む。いくつかの実施形態では、可溶性tim-3ポリペプチドは、保存的アミノ酸置換を含む。一定の実施形態では、可溶性tim-3ポリペプチドは、配列番号1、3、5、および7の核酸配列と少なくとも90%、95%、97%、99%、または100%同一の核酸配列を含む核酸が細胞中に発現される場合に得られるポリペプチドである。一定の実施形態では、可溶性tim-3ポリペプチドは、精製されているか部分精製されている。

【0093】

いくつかの実施形態では、可溶性tim-3のIgVドメインは、配列番号13のアミノ酸22~131を含む。他の実施形態では、配列番号14のアミノ酸22~132を含む。1つの実施形態では、本発明によって提供された可溶性tim-3ポリペプチドの細胞内ドメインは配列番号13のアミノ酸226~301を含む一方で、別の実施形態では、配列番号14のアミノ酸217~281を含む。

【0094】

本発明は、さらに、可溶性tim-3ポリペプチドおよび異種タンパク質を含む融合タンパク質を含む。1つの実施形態では、可溶性tim-3タンパク質は、IgVドメインを含むが、ムチンドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを欠く。一定の実施形態では、可溶性tim-3ポリペプチドおよび免疫グロブリンエレメントを含む融合タンパク質を提供する。1つの実施形態では、本発明は、タンパク質がtim-3のムチンドメインまたはtim-3の膜貫通ドメインを含まない、tim-3のIgVドメイン、tim-3の細胞内ドメイン、および免疫グロブリンのFcドメインを含むポリペプチドを提供する。tim-3ポリペプチドは、マウスまたはヒトであり得る。例示的免疫グロブリンエレメントは、ヒトIgG1重鎖のFcドメインのような定常領域である(Browning et al., J. Immunol., 154, pp. 33-46 (1995))。可溶性受容体-IgG融合タンパク質は、一般的な免疫試薬であり、その構築方法は当該分野で公知である(例えば、米国特許第5,225,538号、同第5,766,883号、および同第5,876,969号(その全てが本明細書中で参考として援用される))を参照のこと)。いくつかの実施形態では、本発明の可溶性ペプチドをFc変異

10

20

30

40

50

型に融合する。

【0095】

関連する実施形態では、本発明の修飾タンパク質は、免疫グロブリンのFc領域とのtim-3およびガレクチン-9融合タンパク質を含む。公知のように、各免疫グロブリン重鎖定常領域は、4つまたは5つのドメインを含む。ドメインを、連続的に、以下のように命名されている：CH1-ヒンジ-CH2-CH3(-CH4)。重鎖ドメインのDNA配列は、免疫グロブリンクラス間で交差相同性(cross-homology)を有し、例えば、IgGのCH2ドメインは、IgAおよびIgDのCH2ドメインと相同であり、IgMおよびIgEのCH3ドメインと相同である。本明細書中で使用される、用語「免疫グロブリンFc領域」は、免疫グロブリン鎖定常領域、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常領域のカルボキシル末端部分またはその一部を意味すると理解される。例えば、免疫グロブリンFc領域は、1)CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、2)CH1ドメインおよびCH2ドメイン、3)CH1ドメインおよびCH3ドメイン、4)CH2ドメインおよびCH3ドメイン、または5)2つまたはそれ以上のドメインと免疫グロブリンヒンジ領域との組み合わせを含み得る。好ましい実施形態では、免疫グロブリンFc領域は、少なくとも免疫グロブリンヒンジ領域、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含み、好ましくはCH1ドメインを欠く。

10

【0096】

1つの実施形態では、重鎖定常領域が由来する免疫グロブリンクラスはIgG(Ig)(サブクラス1、2、3、または4)である。他の免疫グロブリンクラスであるIgA(Ig)、IgD(Ig)、IgE(Ig)、およびIgM(Igμ)を使用することができる。適切な免疫グロブリン重鎖定常領域の選択は、米国特許第5,541,087号および同第5,726,044号で考察されている。特定の結果を得るための一定の免疫グロブリンクラスおよびサブクラスからの特定の免疫グロブリン重鎖定常領域配列の選択は、当業者のレベルの範囲内であると見なされる。免疫グロブリンFc領域をコードするDNA構築物の一部は、好ましくは、ヒンジドメインの少なくとも一部、好ましくはFcのCH₃ドメインまたはIgA、IgD、IgE、もしくはIgM中の相同ドメインの少なくとも一部を含む。

20

【0097】

さらに、免疫グロブリン重鎖定常領域内のアミノ酸の置換または欠失は本発明の実施で有用であり得ることが意図される。1つの例は、Fc受容体に対する親和性が減少したFc変異型を作製するために上部CH2領域にアミノ酸置換を導入することであろう(Cole et al. (1997) J. IMMUNOL. 159:3613)。当業者は、周知の分子生物学技術を使用してこのような構築物を調製することができる。

30

【0098】

さらなる実施形態では、融合タンパク質は、融合タンパク質のインビボ安定性を増大させるためか、その生物活性もしくは局在化を調整するためか、融合タンパク質の精製を容易にするための可溶性tim-3ポリペプチドおよび第2の異種ポリペプチドを含む。tim-3可溶性融合タンパク質を生成するために使用することができる他の例示的異種タンパク質には、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、アルカリホスファターゼ(AP)などの酵素活性、または血球凝集素(HA)などのエピトープタグが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0099】

好ましくは、典型的には循環時に20時間を超える半減期を有する安定な血漿タンパク質を使用して、tim-3またはガレクチン-9との融合タンパク質を構築する。このような血漿タンパク質には、免疫グロブリン、血清アルブミン、リポタンパク質、アポリタンパク質、およびトランスフェリンが含まれるが、これらに限定されない。可溶性tim-3またはガレクチン-9分子を特定の細胞型または組織型にターゲティングすることができる配列を可溶性tim-3に結合させて特異的に局在化した可溶性tim-3融合タンパク質を作製することもできる。

50

【0100】

1つの好ましい実施形態では、本発明は、アルブミンへの *t i m - 3* またはガレクチン - 9 の融合物を提供する。本明細書中で使用される、「アルブミン」は、集合的に、アルブミンタンパク質もしくはアミノ酸配列または1つまたは複数のアルブミンの機能活性（例えば、生物活性）を有するアルブミンフラグメントもしくは変異型をいう。特に、「アルブミン」は、ヒトアルブミンもしくはそのフラグメント（欧州特許第201 239号、同第322 094号、WO97/24445、WO95/23857号を参照のこと）、特に、ヒトアルブミンの成熟形態または他の脊椎動物由来のアルブミンをいう。特に、本発明のアルブミン融合タンパク質には、ヒトアルブミンの天然に存在する多型性変異型およびヒトアルブミンのフラグメント（WO95/23857を参照のこと）（例えば、欧州特許第322 094号に開示のフラグメント（すなわち、HA（P_n）（nは369~419である））が含まれ得る。アルブミンは、任意の脊椎動物、特に、任意の哺乳動物（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ）に由来し得る。非哺乳動物アルブミンには、ニワトリおよびサケが含まれるが、これらに限定されない。アルブミン融合タンパク質のアルブミン部分は、*t i m - 3* またはガレクチン - 9 タンパク質と異なる動物に由来し得る。

10

【0101】

いくつかの実施形態では、アルブミン融合タンパク質のアルブミンタンパク質部分は、血清アルブミンのフラグメントに対応する。血清アルブミンポリペプチドのフラグメントには、アミノ末端またはC末端から1つまたは複数の残基が欠失したポリペプチドが含まれる。一般的に言えば、HAフラグメントまたはHA変異型は、少なくとも100アミノ酸長、好ましくは少なくとも150アミノ酸長である。HA変異型は、少なくとも1つのHAの全ドメインからなるかこれを含み得る。ヒトアルブミンのドメインは、米国特許出願番号2004/0171123号に記載されている。

20

【0102】

一定の実施形態では、本発明は、可溶性 *t i m - 3* ポリペプチドをコードする核酸を含む。さらなる実施形態では、本発明はまた、可溶性 *t i m - 3* ポリペプチドおよび関連誘導体を含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であり得る。例えば、本発明のポリペプチドを、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞（例えば、バキュロウイルス発現系を使用）、酵母、または哺乳動物細胞で発現することができる。1つの実施形態では、可溶性 *t i m - 3* ポリペプチドを作製して哺乳動物細胞によって分泌させ、可溶性 *t i m - 3* ポリペプチドを培養培地から精製する。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、可溶性 *t i m - 3* ポリペプチドの産生方法に関する。

30

【0103】

治療有効性もしくは予防有効性または安定性（例えば、*e x v i v o* 有効期間およびインビボでのタンパク質分解耐性）の強化などの目的のために本 *t i m - 3* ポリペプチドの構造を調整することも可能である。このような修飾ポリペプチドは、天然に存在するタンパク質形態の少なくとも1つの活性を保持するようにデザインされた場合、本明細書中により詳細に記載されている *t i m - 3* ポリペプチドの機能的等価物と見なされる。このような修飾ポリペプチドを、例えば、アミノ酸の置換、欠失、または付加によって産生することができる。

40

【0104】

例えば、ロイシンからイソロイシンもしくはバリン、アスパラギン酸からグルタミン酸、トレオニンからセリンへの孤立置換（*i s o l a t e d r e p l a c e m e n t*）またはアミノ酸から構造的に関連するアミノ酸への類似の置換（すなわち、保存的変異体）が得られた分子の生物活性に大きな影響を与えないと予想することが妥当である。保存的置換は、その側鎖中で関連するアミノ酸ファミリー内で起こるものである。一般に、遺伝的にコードされたアミノ酸を、以下の4つのファミリーに分類することができる：（1）酸性 = アスパラギン酸、グルタミン酸、（2）塩基性 = リジン、アルギニン、ヒスチジン

50

、(3)非極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、および(4)非荷電性で極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、時折、共に芳香族アミノ酸として分類される。類似の様式では、アミノ酸レパートリーを、以下のようにグループ化することができる：(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸、(2)塩基性=リジン、アルギニン、ヒスチジン、(3)脂肪族=グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン(セリンおよびトレオニンは、任意選択的に、脂肪族ヒドロキシルとして個別に分類される)、(4)芳香族=フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、(5)アミド=アスパラギン、グルタミン、ならびに(6)硫黄含有=システインおよびメチオニン。 (例えば、Biochemistry, 2nd ed., Ed. by L. Stryer, W. H. Freeman and Co., 1981を参照のこと)。ポリペプチドのアミノ酸配列変化によって機能的ホモログが得られるかどうかを、変異ポリペプチドが野生型タンパク質に類似の様式で細胞中で応答する能力の評価によって容易に決定することができる。例えば、tim-3ポリペプチドのこのような変異形態を、例えば、Th1細胞によるサイトカイン分泌を調整する能力またはガレクチン-9などのtim-3リガンドに結合する能力について評価することができる。1つを超える置換が起こるポリペプチドを、同一の様式で容易に試験することができる。

10

【0105】

一定の態様では、本可溶性tim-3およびガレクチン-9ポリペプチドの機能的変異型または修飾形態には、可溶性ポリペプチドの少なくとも一部および1つまたは複数の融合ドメインを有する融合タンパク質が含まれる。このような融合ドメインの周知の例には、アフィニティークロマトグラフィによる融合タンパク質の単離に特に有用なポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、および免疫グロブリン重鎖定常領域(Fc)、マルトース結合タンパク質(MBP)が含まれるが、これらに限定されない。アフィニティ精製の目的のために、グルタチオン樹脂、アミラーゼ樹脂、およびニッケルまたはコバルト結合樹脂などのアフィニティークロマトグラフィ用の関連マトリクスを使用する。当該分野で周知の別の融合ドメインは、緑色蛍光タンパク質(GFP)である。融合ドメインには、特定の抗体が利用可能な通常は短いペプチド配列である「ペプチドタグ」も含まれる。特定のモノクローナル抗体が容易に利用可能な周知のエピトープタグには、FLAG、インフルエンザウイルス血球凝集素(HA)、およびc-mycタグが含まれる。いくつかの場合、融合ドメインは、関連プロテアーゼが融合タンパク質を部分的に消化し、それによって組換えタンパク質が遊離する第Xa因子またはトロンピンなどのプロテアーゼ結合部位を有する。次いで、その後のクロマトグラフィによる単離によって遊離タンパク質を融合ドメインから単離することができる。

20

30

【0106】

本発明によって提供されるか本発明の方法で使用されるtim-3およびガレクチン-9ポリペプチドのいくつかは、翻訳後修飾をさらに含み得る。例示的翻訳後タンパク質修飾には、リン酸化、アセチル化、メチル化、ADP-リボシル化、ユビキチン化、グリコシル化、カルボニル化、スモイル化(sumoylation)、ビオチン化、またはポリペプチド側鎖もしくは疎水性基の付加が含まれる。結果として、修飾可溶性ポリペプチドは、脂質、ポリサッカリドもしくはモノサッカリド、およびリン酸塩などの非アミノ酸エレメントを含み得る。

40

【0107】

本発明の1つの特定の形態では、本tim-3およびガレクチン-9可溶性ポリペプチドの修飾形態は、本可溶性ポリペプチドの非タンパク質性ポリマーへの連結を含む。1つの特定の形態では、ポリマーは、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192、または同第4,179,337号に記載の様式のポリエチレングリコール(

50

「PEG」)、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンである。

【0108】

PEGは、市販されているか当該分野で周知の方法によるエチレングリコールの開環重合によって調製することができる周知の水溶性ポリマーである (Sandler and Karo, *Polymer Synthesis*, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138 - 161)。用語「PEG」は、PEGのサイズまたは末端修飾と無関係に任意のポリエチレングリコール分子を含むように広範に使用され、式： $X - O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH(1)$ (式中、 n は20~2300であり、 X はHまたは末端修飾基(例えば、 C_{1-4} アルキル)である)で示すことができる。1つの実施形態では、本発明のPEGは、片端が水酸基またはメトキシである(すなわち、 X はHまたは CH_3 である(「メトキシPEG」))。PEGは、結合反応に必要であるか、分子の化学合成に起因するか、分子の一部と最適な距離を得るためのスペーサーである化学基をさらに含むことができる。さらに、このようなPEGは、互いに連結した1つまたは複数のPEG側鎖からなり得る。1つを超えるPEG鎖を有するPEGを、多分岐PEG (multiarmed PEG) または分岐PEGと呼ぶ。分岐PEGを、例えば、種々のポリオール(グリセロール、ペンタエリスリオール、およびソルビトールが含まれる)へのポリエチレンオキシドの付加によって調製することができる。例えば、四分岐 (four-armed branched) PEGを、ペンタエリスリオールおよびエチレンオキシドから調製することができる。分岐PEGは、例えば、欧州特許第0 473 084号および米国特許第5,932,462号に記載されている。PEGの一形態には、リジンの第1級アミノ基を介して連結した2PEG側鎖 (PEG2) が含まれる (Monfardini, C., et al., *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 62 - 69)。

10

20

【0109】

ペプチドまたはタンパク質へのPEG抱合は、一般に、PEGの活性化および活性化PEG-中間体の標的タンパク質/ペプチドへの直接的カップリングを含むか、リンカーに結合させ、その後の活性化して標的タンパク質/ペプチドにカップリングする (Abuchowski, A. et al., *J. Biol. Chem.*, 252, 3571 (1977) and *J. Biol. Chem.*, 252, 3582 (1977), Zalipsky, et al., and Harris et al., in: *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*; (J.M. Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Chap. 21 and 22)。

30

【0110】

当業者は、例えば、ペグ化tim-3またはガレクチン-9ポリペプチドをどのようにして治療で使用するか、所望の投薬量、循環時間、タンパク質分解耐性、免疫原性、および他の検討材料に基づいてPEGの適切な分子量を選択することができる。PEGおよびタンパク質特性を増強するためのその使用についての考察については、N.V. Katre, *Advanced Drug Delivery Reviews* 10: 91 - 114 (1993) を参照のこと。

40

【0111】

本発明の1つの実施形態では、リジンなどのtim-3またはガレクチン-9ポリペプチド上のアミノ基と反応させるために、PEG分子を活性化することができる (Benciam C.O. et al., *Anal. Biochem.*, 131, 25 (1983); Veronese, F.M. et al., *Appl. Biochem.*, 11, 141 (1985); Zalipsky, S. et al., *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, adrs 9 - 110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky, S. et al., *Europ. Polym. J.*, 19, 1177 - 1183 (19

50

83); Delgado, C. et al., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12, 119-128 (1990)。別の実施形態では、PEG分子を、tim-3またはガレクチン-9上のスルフヒドリル基にカップリングすることができる (Sartore, L., et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 45 (1991); Morpurgo et al., *Biocon. Chem.*, 7, 363-368 (1996); Goodson et al., *Bio/Technology* (1990) 8, 343; 米国特許第5,766,897号)。米国特許第6,610,281号および同第5,766,897号は、スルフヒドリル基にカップリングすることができる例示的反応性PEG種を記載している。いくつかの実施形態では、ペグ化tim-3またはガレクチン-9タンパク質は、N末端アミノ酸のアミノ基に共有結合したPEG分子を含む。部位特異的N末端還元アミノ化は、Pepinsky et al., (2001) *JPET*, 297, 1059および米国特許第5,824,784号に記載されている。他の利用可能な求核アミノ基を使用したタンパク質の還元的アミノ化のためのPEG-アルデヒドの使用は、米国特許第4,002,531号、Wieder et al., (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12579、およびChamow et al., (1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 133に記載されている。

【0112】

(6) 免疫試薬)

本発明は、さらに、tim-3ポリペプチド(マウスおよびヒトポリペプチドが含まれる)に結合することができる免疫試薬、好ましい実施形態では、可溶性tim-3に結合するが全長tim-3に結合しない免疫試薬を提供する。

【0113】

本発明の1つの態様は、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合するが、配列番号13に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合しない単離抗体またはそのフラグメントを提供する。配列番号2はヒト可溶性tim-3タンパク質であり、配列番号13はヒト全長tim-3タンパク質である。したがって、このような抗体は可溶性ヒトtim-3に結合するが、全長ヒトtim-3に結合しない。

【0114】

本発明の別の態様は、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合するが、配列番号14に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合しない単離抗体またはそのフラグメントを提供する。配列番号4はマウス可溶性tim-3タンパク質であり、配列番号14はマウス全長tim-3タンパク質である。したがって、このような抗体は可溶性マウスtim-3に結合するが、全長マウスtim-3に結合しない。

【0115】

可溶性tim-3に結合するが全長tim-3に結合しない特定の抗血清を、例えば、可溶性tim-3タンパク質中に含まれるが全長タンパク質に含まれないアミノ酸配列を有するペプチドに対する免疫原の生成によって生成することができる。このようなペプチドは、可溶性tim-3のIgVドメインと細胞内ドメインとの間の連結部をつなぐことができる。この連結部は、全長tim-3配列中に存在せず、IgVと細胞内ドメインとの間にムチンおよび膜貫通ドメインが挿入されている。1つの実施形態では、配列番号6の16アミノ酸のヒト可溶性tim-3ペプチドを、このような抗体を生成するための免疫原として使用する。マウスtim-3と等価な抗体を生成するために、配列番号8のペプチドを使用することができる。当業者は、C末端、N末端、またはその両方のさらなる残基での伸長または免疫原性もしくは可溶性を増強するための所望の短縮によってこのペプチドを操作することができる。さらに、キャリアに抱合するかさらなる所望の性質を付与するために、システイン基または他の残基をペプチドに付加することができる。

【0116】

同様に、全長tim-3に結合するが可溶性tim-3に結合しないペプチドを、その配列がtim-3の全長形態で見出されるが可溶性形態で見出されないペプチドを使用し

10

20

30

40

50

て生成することができる。例えば、このようなペプチドは、*t i m - 3* 膜貫通ドメインの配列、より好ましくは *t i m - 3* ムチンドメインの配列に対応することができる。あるいは、これらのペプチドは、全長 *t i m - 3* の *I g V* ドメインとムチンドメインとの間または全長 *t i m - 3* の膜貫通ドメインと細胞内ドメインとの間の連結部をつなぐ配列を含み得る。

【 0 1 1 7 】

ニワトリ、哺乳動物（マウス、ハムスター、ヤギ、モルモット、またはウサギなど）を、記載のペプチド変異型のいずれかの免疫原性形態（例えば、抗体応答を誘発することができる免疫原性フラグメント）で免疫化することができる。タンパク質またはペプチドに免疫原性を付与する技術には、キャリアへの抱合または当該分野で周知の他の技術が含まれる。例えば、1つの本タンパク質のペプチジル部分を、アジュバントの存在下で投与することができる。免疫化の進行を、血漿または血清中の抗体力価の検出によってモニタリングすることができる。標準的な *E L I S A* または免疫アッセイを抗原としての免疫原と共に使用して、抗体レベルを評価することができる。

10

【 0 1 1 8 】

免疫化後に抗血清を得ることができ、所望ならば、標的タンパク質に対するポリクローナル抗体を血清からさらに単離することができる。モノクローナル抗体を産生するために、免疫化動物から抗体産生細胞（リンパ球）を採取し、標準的な体細胞融合手順によって骨髓腫細胞などの不死化細胞と融合してハイブリドーマ細胞を得ることができる。このような技術は当該分野で周知であり、例えば、ハイブリドーマ技術（*K o h l e r a n d M i l s t e i n , N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 - 4 9 7 , 1 9 7 5* によって最初に開発された）並びにヒトB細胞ハイブリドーマ技術（*K o z b a r e t a l . , I m m u n o l o g y T o d a y , 4 : 7 2 , 1 9 8 3*）、およびヒトモノクローナル抗体を産生するための *E B V* - ハイブリドーマ技術（*C o l e e t a l . , M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d C a n c e r T h e r a p y , A l a n R . L i s s , I n c . p p . 7 7 - 9 6 , 1 9 8 5*）が含まれる。ハイブリドーマ細胞を、*t i m - 3* ペプチドに特異的に反応性を示す抗体および単離されたモノクローナル抗体の産生について免疫化学的にスクリーニングすることができる。したがって、本発明の別の態様は、本明細書中に記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を提供する。

20

【 0 1 1 9 】

次いで、抗体を、全長 *t i m - 3* および可溶性 *t i m - 3* に対する結合特異性について試験することができる。例えば、ヒト可溶性 *t i m - 3* の *I g V* 細胞内ドメイン連結部に対応する配列番号6のペプチドに対して生成された抗体を膜への *t i m - 3* ポリペプチドの固定および抗体を使用したウェスタンブロットの実施によって *t i m - 3* のいずれかの形態に結合する能力について試験することができる。当業者は、抗体がタンパク質に結合するかどうかを決定する任意の日常的方法を使用することができる。

30

【 0 1 2 0 】

他の実施形態では、全 *t i m - 3* 可溶性タンパク質に対するモノクローナル抗体を生成し、その後、可溶性 *t i m - 3* のみに特異的な抗体を同定するためにこれらが全長 *t i m - 3* タンパク質に結合するかどうかについてスクリーニングすることができる。

40

【 0 1 2 1 】

本明細書中で使用される、用語「抗体」は、本明細書中に記載のタンパク質またはこのようなタンパク質を含む複合体とも特異的に反応するフラグメントが含まれることを意図する。従来技術を使用して抗体を断片化し、フラグメントを全抗体について上記と同一の様式でスクリーニングすることができる。例えば、 $F(a b')_2$ フラグメントを、ペプシンでの抗体の処理によって生成することができる。得られた $F(a b')_2$ フラグメントを、ジスルフィド結合を還元するように処理して $F a b'$ フラグメントを産生することができる。本発明の抗体は、二重特異性分子およびキメラ分子ならびに一本鎖 (*s c F v*) 抗体が含まれることがさらに意図される。

【 0 1 2 2 】

50

本抗体には、例えば、米国特許第5,585,098号に記載のように調製することができる三量体抗体およびヒト化抗体が含まれる。単鎖抗体も本発明の範囲内である。全てのこれらの抗体の修飾形態および抗体のフラグメントは、用語「抗体」に含まれることが意図される。

【0123】

((7) Tim-3 / ガレクチン - 9 免疫調整薬の同定)

本発明の別の態様は、免疫調整応答を調整する薬剤の同定方法（例えば、Tim-3 とガレクチン - 9 との間の相互作用を調整する薬剤の同定方法など）を提供する。1つの態様では、本発明は、ガレクチン - 9 などの tim-3 リガンドへの tim-3 の結合を遮断する薬剤の同定方法を提供する。この相互作用を遮断する薬剤は、tim-3 の活性化を防止して Th1 応答を増加させ、そして / または Th2 応答を減少させると予想されるであろう。別の態様では、本発明は、ガレクチン - 9 などの tim-3 リガンドへの tim-3 の結合を促進するか、tim-3 へのリガンド結合を模倣する薬剤の同定方法を提供する。このような薬剤は、tim-3 の活性化を促進して Th1 応答を減少させ、そして / または Th2 応答を増加させると予想されるであろう。したがって、本明細書中に記載の方法を使用して同定した薬剤を使用して、必要とする被験体の T_H1 および T_H2 応答を調整することができる。

【0124】

1つの態様では、本発明の tim-3 / ガレクチン - 9 の同定により、X線結晶学、ニューロン回折、核磁気共鳴分光分析、および他の技術を使用して同定することができる tim-3 およびガレクチン - 9 の構造の特徴に基づいたアゴニストおよびアンタゴニストの合理的デザインが容易になる。合理的薬物デザイン方法は、当該分野で周知である (Chemical and Structural Approaches to Rational Drug Design, David B Weiner, William V. Williams, CRC Press (1994); Rational Drug Design: Novel Methodology and Practical Applications, Vol. 719, Abby L. Parrill (Editor), American Chemical Society (1999); Structure-based Ligand Design, Klaus Gubernator, Wiley, John & Sons, Incorporated (1998) を参照のこと)。本発明の関連する態様は、tim-3 ポリペプチドおよび / またはガレクチン - 9 ポリペプチドを含む再構成タンパク質調製物を提供する。特定の実施形態では、再構成組成物中の少なくとも1%のタンパク質が tim-3 ポリペプチドおよびガレクチン - 9 ポリペプチドであり、少なくとも2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、または50%がより好ましい。1つの実施形態では、再構成組成物中のタンパク質は、組換えタンパク質である。

【0125】

本発明の別の態様は、tim-3 とガレクチン - 9 との間の複合体の形成を促進または遮断する薬剤のスクリーニング方法を提供する。このような方法をインビトロまたは細胞中で行うことができ、タンパク質の一方および両方の全長タンパク質または可溶性フラグメント（すなわち、膜貫通ドメインを欠くフラグメント）などのそのフラグメントを使用して実施することができる。本明細書中に記載の方法のいくつかの実施形態では、tim-3 の IgV および任意選択的にムチンドメインを含む可溶性タンパク質を使用する。種々の他の試薬を、スクリーニングアッセイに含めることができる。これらには、最適なタンパク質 - タンパク質結合を容易にし、そして / または非特異的もしくはバックグラウンド相互作用を減少させるために使用される塩、中性タンパク質（例えば、アルブミン）、界面活性剤などが含まれる。プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、抗菌薬などのアッセイ効率を改善する試薬を使用することもできる。必要な結合を得るために、成分の混合物を任意の順序で添加する。任意の適切な温度（典型的には、4 と 40 との間）でインキュベーションを行う。最適な活性が得られるインキュベーション期間

を選択するが、高処理スクリーニングが容易になるように最適化することもできる。典型的には、インビトロアッセイには0.1時間と1時間との間で十分である。

【0126】

本発明の薬剤の同定方法は、各ウェル中での異なる試験化合物または試験化合物群を使用したマルチウェルプレート（例えば、96ウェルプレート）での化合物ライブラリーのスクリーニングに十分に適切である。特に、組み合わせライブラリーと共に本方法を使用することができる。これらの方法を、任意の許容可能な縮小方法によるアッセイ系（24、48、96、または384ウェル/プレートなどのマルチウェルプレート、マイクロチップ、またはスライドが含まれるが、これらに限定されない）に「縮小」することができる。有利にはより少量の試薬および他の材料を含むマイクロチップ支持体上で実施するためにアッセイサイズを減少させることができる。高処理スクリーニングの一助となるプロセスの任意の縮小は、本発明の範囲内である。

10

【0127】

本発明の1つの特定の態様は、Th1機能を調整する治療薬の同定方法を提供する。したがって、本発明の1つの態様は、1) 薬剤の非存在下でtim-3とガレクチン-9ポリペプチドが物理的に相互作用する条件下で、tim-3ポリペプチドまたはそのフラグメント、ガレクチン-9ポリペプチドまたはそのフラグメント、および薬剤を組み合わせる工程と、2) 薬剤が相互作用を妨害するかどうかを決定する工程と、任意選択的に、3) 相互作用を妨害する薬剤について、Th1細胞の活性化を促進する能力をさらに評価する工程とを含む、薬剤のTh1活性かを調整する能力を評価する方法を提供する。

20

【0128】

本発明の別の特定の態様は、(a) 試験薬の存在下でtim-3ポリペプチドとガレクチン-9ポリペプチドとを接触させる工程と、(b) tim-3ポリペプチドとガレクチン-9ポリペプチドとの結合に対する試験薬の効果を決定する工程と、それにより、tim-3ポリペプチドとガレクチン-9ポリペプチドとの間の結合を調整する薬剤が同定されることとを含む、tim-3ポリペプチドとガレクチン-9ポリペプチドとの間の結合を調整する薬剤の同定方法を提供する。

【0129】

本発明の関連する特定の態様は、(a) 試験薬の存在下でtim-3ポリペプチドとガレクチン-9ポリペプチドとを接触させる工程と、(b) tim-3ポリペプチドとガレクチン-9ポリペプチドとの結合に対する試験薬の効果を決定する工程と、それにより、免疫応答を調整する薬剤が同定されることとを含む、免疫応答を調整する薬剤の同定方法を提供する。

30

【0130】

本明細書中に記載のtim-3ポリペプチドとガレクチン-9ポリペプチドとの間の相互作用の検出方法の1つの実施形態では、ガレクチン-9ポリペプチドは、(i) 配列番号10のアミノ酸1~323、(ii) 配列番号19のアミノ酸1~355、(iii) 配列番号10のアミノ酸1~323と少なくとも90%同一のアミノ酸配列、または(iii) 配列番号19のアミノ酸1~355と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、tim-3ポリペプチドは、(i) 配列番号13のアミノ酸30~128、または(iii) 配列番号13のアミノ酸30~128と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む。

40

【0131】

本発明のいくつかの態様では、インビトロアッセイによって薬剤を同定する。種々のアッセイ形式が十分であり、本開示に照らして、本明細書中に明確に記載されていないアッセイ形式でさえも当業者に把握されている。タンパク質複合体の形成などの条件に近いアッセイ形式（酵素活性）を多数の異なる形式から得ることができ、無細胞系（例えば、精製タンパク質または細胞溶解物）に基づいたアッセイおよびインタクトな細胞を使用する細胞ベースのアッセイが含まれる。簡潔な結合アッセイを使用して、tim-3またはガレクチン-9に結合する薬剤を検出することもできる。このような結合アッセイは、ti

50

m - 3 ポリペプチドとガレクチン - 9 ポリペプチドとの間の相互作用の破壊によって作用する薬剤を同定することもできる。

【 0 1 3 2 】

試験すべき薬剤を、例えば、細菌、酵母、または他の生物（例えば、天然産物）によって産生することができるか、化学的に産生することができるか（例えば、ペプチド模倣物がふくまれる小分子）、組換えによって産生することができる。t i m - 3 およびガレクチン - 9 は膜貫通タンパク質であるので、t i m - 3 とガレクチン - 9 との間の複合体形成を調整する薬剤を同定するために記載されたアッセイおよび方法の好ましい実施形態は、全長タンパク質よりもむしろこれらのタンパク質の可溶性形態を使用する。可溶性形態には、膜貫通ドメインを欠くものおよび / または I g V ドメインまたは同族結合パートナーに結合する能力を保持するそのフラグメントを含むものが含まれる。

10

【 0 1 3 3 】

化合物および天然抽出物のライブラリーを試験する多数の薬物スクリーニングプログラムでは、所与の期間で調査される化合物数を最大にするための高処理アッセイが望ましい。無細胞系で実施され、精製もしくは半精製タンパク質または溶解物を使用して開発することができるアッセイを、しばしば、迅速に開発され、且つ試験化合物によって媒介される分子標的の変化を検出することが可能なように作製することができるという点で、「一次」スクリーニングとして好ましい。さらに、試験化合物の細胞毒性および / または生物学的利用能の影響を、一般に、インビトロ系で無視することができ、その代わりに、アッセイは、主に、他のタンパク質との結合親和性の変化または分子標的の酵素的特性の変化として現れ得る分子標的に対する薬物の効果が注目される。

20

【 0 1 3 4 】

本発明のアッセイの好ましいインビトロ実施形態では、再構成 t i m - 3 / ガレクチン - 9 複合体は、少なくとも半精製タンパク質の再構成混合物を含む。半精製は、再構成混合物で使用されたタンパク質が以前に他の細胞またはウイルスタンパク質から分離されていることを意味する。例えば、細胞溶解物と対照的に、t i m - 3 / ガレクチン - 9 複合体形成に参与するタンパク質は、混合物中の他の全てのタンパク質と比較して少なくとも純度 5 0 % で存在し、より好ましくは、純度 9 0 ~ 9 5 % で存在する。本方法の一定の実施形態では、再構成タンパク質混合物は、再構成混合物が t i m - 3 / ガレクチン - 9 複合体のアセンブリおよび / または分解を測定する能力を妨害するか変化させる可能性がある他のタンパク質（細胞起源またはウイルス起源など）を実質的に欠くような高度に精製されたタンパク質の混合によって誘導される。

30

【 0 1 3 5 】

候補薬剤の存在下または非存在下における t i m - 3 / ガレクチン - 9 複合体のアッセイを、反応物質の含有に適切な任意の容器中で行うことができる。例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微量遠沈管が含まれる。スクリーニングアッセイでは、試験薬の効果を、例えば、速度、定常状態、および / または反応終点に対する試験薬の効果によって評価することができる。

【 0 1 3 6 】

本発明の 1 つの実施形態では、t i m - 3 / ガレクチン - 9 複合体のアセンブリまたは安定性を妨害する能力に基づいて阻害剤を検出する薬物スクリーニングアッセイを得ることができる。例示的結合アッセイでは、目的の化合物を、t i m - 3 / ガレクチン - 9 複合体を含む混合物と接触させる。t i m - 3 / ガレクチン - 9 複合体の検出および定量により、2 つのポリペプチド間の相互作用の阻害（または増強）に対する化合物の有効性を決定する手段が得られる。化合物の有効性を、種々の濃度の試験化合物を使用して得られたデータからの用量応答曲線の作成によって評価することができる。さらに、比較のためのベースラインを得るためのコントロールアッセイも行うことができる。コントロールアッセイでは、複合体形成を、試験化合物の非存在下で定量する。

40

【 0 1 3 7 】

種々の技術によって複合体形成を検出することができる。例えば、複合体形成の調整を

50

、例えば、検出可能に標識されたタンパク質（例えば、放射性標識、蛍光標識、または酵素標識されたタンパク質）、免疫アッセイ、またはクロマトグラフィ検出を使用して、定量することができる。表面プラズモン共鳴システム（Biacore(c) International AB (Uppsala, Sweden) から市販されているものなど）を使用して、タンパク質 - タンパク質相互作用を検出することもできる。

【0138】

本明細書中に記載のタンパク質およびペプチドを固定することができる。しばしば、タンパク質の1つの非複合体化形態からの複合体の分離を容易にし、アッセイの自動化に適応するようにペプチドおよびポリペプチドを固定することが望ましい。ペプチドおよびポリペプチドを、プレート、ビーズ、またはフィルターなどの任意の固体マトリクスに固定することができる。ペプチドまたはタンパク質を、ポリペプチドに結合する反応基を含むマトリクス上に固定することができる。あるいはまたは組み合わせて、タンパク質中のシステインなどの反応基は、マトリクスと反応して結合することができる。別の実施形態では、ポリペプチドは、高い親和性でピオチンと結合するストレプトアビジンとの融合タンパク質などのマトリクスに対する結合親和性が高い別のポリペプチドとの融合タンパク質として発現することができる。

【0139】

例示的实施形態では、タンパク質が不溶性マトリクスと結合するドメインが付加された融合タンパク質を得ることができる。例えば、グルタチオントランスフェラーゼと融合した tim - 3 の Ig V ドメインを含む GST - TIM - 3 - Ig V ドメイン融合タンパク質を、グルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, St. Louis, MO) またはグルタチオン誘導マイクロタイタープレート上に吸着させ、その後、ガレクチン - 9 もしくはそのフラグメント（例えば、³⁵S 標識ポリペプチド）および試験化合物と組み合わせ、複合体が形成される条件下でインキュベートすることができる。インキュベーション後、ビーズを洗浄して任意の非結合相互作用タンパク質を除去し、直接または複合体の解離後の上清中（例えば、マイクロタイタープレートを使用する場合）のマトリクスビーズ結合放射性標識を測定した。あるいは、非結合タンパク質の洗い流した後、複合体をマトリクスから分離し、SDS - PAGE ゲルによって分離し、マトリクス結合画分中に見出された相互作用ポリペプチドレベルを、標準的な電気泳動技術を使用してゲルから定量することができる。

【0140】

上記アッセイの種々の修正形態が本発明の範囲内に含まれると理解される。例えば、タンパク質の役割を切り替えることができる - すなわち、ガレクチン - 9 タンパク質を固体支持体に固定し、tim - 3 タンパク質を含む溶液を結合したガレクチン - 9 タンパク質と接触させることができる。さらに、固定タンパク質または遊離タンパク質を、結合アッセイ前に試験化合物に曝露し、この前曝露効果をコントロールと比較して評価することができる。この様式で同定された化合物は、ガレクチン - 9 への tim - 3 の結合またはその逆も阻害する。あるいは、tim - 3 およびガレクチン - 9 の混合後に試験化合物を添加することができる。このようなアッセイにおいて結合レベルを減少させるのに有効な化合物は、ガレクチン - 9 タンパク質から tim - 3 を分離するか、その逆を分離する。

【0141】

ウェスタンブロットに加えて、マルチウェル ELISA 型アプローチなどの他のより迅速な検出スキームを使用することができる。例えば、部分的に精製された（例えば、上記の GST 法）tim - 3 タンパク質を、プレートへのタンパク質を含む溶液の導入およびプラスチックへのタンパク質の結合によってマルチウェルプレート（例えば、96 ウェルプレート）中のウェルの下部に付着させることができる。次いで、過剰なタンパク質含有溶液を洗い流し、非特異的結合部位をブロッキングするためにブロッキング溶液（例えば、ウシ血清アルブミン (BSA) を含む）を導入する。次いで、プレートを数回以上洗浄し、ガレクチン - 9 タンパク質を含む溶液、実験（コントロールに対する）ウェルの場合は試験化合物を添加する。異なるウェルは、異なる試験化合物、異なる濃度の同一の試験

10

20

30

40

50

物質、異なる *t i m* - 3 タンパク質もしくはガレクチン - 9 タンパク質、または異なる濃度の *t i m* - 3 タンパク質もしくはガレクチン - 9 タンパク質を含み得る。さらに、この検出スキームに対する種々の修正形態を得ることができると理解される。例えば、マルチウェルプレートのウェルを *t i m* - 3 タンパク質よりもむしろガレクチン - 9 タンパク質を含むポリペプチドでコーティングし、遊離 *t i m* - 3 タンパク質の添加時の結合相互作用をアッセイすることができる。ウェルを、固定すべきタンパク質の付着を増強し、そして / または非特異的結合レベルを減少させる化合物で予備コーティングすることもできる。例えば、ウェルを、グルタチオンを含むように誘導体化し、曝露された結合部位との既知の方向での固定化タンパク質の付着を促進するために B S A で予備コーティングすることができる。

10

【 0 1 4 2 】

このようなアッセイで有用な検出方法には、抗体ベースの方法（すなわち、「遊離」タンパク質に指向する抗体）、「遊離」タンパク質に組み込まれたレポーター部分（蛍光標識など）の直接検出、および近位（*p r o x i m i t y*）エネルギー移動法（固定化タンパク質または固体支持体に組み込まれた分子の蛍光またはシンチレーションが得られる放射性「遊離」タンパク質などなど）が含まれる。

【 0 1 4 3 】

本発明のガレクチン - 9 タンパク質への *t i m* - 3 タンパク質の結合に影響を与えることができる化合物の同定方法のさらに別のバリエーションは、アフィニティバイオセンサー法の使用である。このような方法は、圧電効果、電気化学、または光学的方法（偏光解析法、導光板、および表面プラズモン共鳴（*S P R*）など）に基づき得る。*S P R* は、実時間の分子相互作用のモニタリングに特に有利であり、上記考察の方法よりも 2 タンパク質間の結合相互作用に対する試験化合物の効果の高感度且つ総合的な分析が可能である。しかし、この利点は、（マルチウェルプレートベースの方法と比較して）技術の処理速度の低さによって幾らか打ち消される。

20

【 0 1 4 4 】

上記のように、試験化合物は、化合物がガレクチン - 9 タンパク質への *t i m* - 3 タンパク質の結合に対して任意の効果を有し（すなわち、化合物が結合を増減させる場合）、効果が閾値を超える場合（上記の本発明の実施者によって所望のレベルに設定されている；例えば、結合の数倍の増加または数倍の減少）、*t i m* - 3 タンパク質とガレクチン - 9 タンパク質の間の結合に効果を有するということができる。好ましくは、結合に対する効果は有意な効果である。本明細書中で使用される、用語「有意な」、詳細には、「有意な効果」は、標準的な統計的検定を使用して統計的に有意な比較される 2 群間の定量可能なパラメータの相違をいう。本明細書中に記載の方法のいくつかの実施形態では、工程（*b*）は、試験薬の存在下での *t i m* - 3 / ガレクチン - 9 複合体の形成の適切なコントロールとの比較を含む。いくつかの実施形態では、適切なコントロールは、試験薬の非存在下での第 1 のポリペプチドと第 2 のポリペプチドとの間の複合体の形成を含む。

30

【 0 1 4 5 】

したがって、本発明の 1 つの実施形態では、（*a*）試験化合物の存在下で *t i m* - 3 タンパク質をガレクチン - 9 タンパク質と接触させる工程と、（*b*）*t i m* - 3 タンパク質およびガレクチン - 9 タンパク質の結合に対する試験化合物の効果を決定する工程と、（*c*）結合範囲に対するその測定された効果が閾値レベルを超える場合に化合物が有効であると同定する工程とを含む、*t i m* - 3 タンパク質とガレクチン - 9 タンパク質との間の結合に影響を与える化合物のスクリーニング方法を提供する。

40

【 0 1 4 6 】

用語「*t i m* - 3 タンパク質とガレクチン - 9 タンパク質との間の結合に影響を与える」は、試験化合物により、その非存在下での *t i m* - 3 タンパク質とガレクチン - 9 タンパク質との間の結合（コントロール）と比較してその存在下での *t i m* - 3 タンパク質とガレクチン - 9 タンパク質との間の結合に相違が生じることを意味する。好ましくは、この結合の相違は、有意な相違である。特定の実施形態では、有意な相違は、少なくとも 1

50

0%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、200%、または500%の結合の増加または減少を含む。化合物は、結合を阻害または増強することができるか、tim-3に対する影響の点からみて、アンタゴニスト、アゴニストとして作用することができるか、他のアゴニストまたはアンタゴニストの効果を増強する化合物として作用することができる。tim-3タンパク質とガレクチン-9タンパク質との間の結合に対する試験化合物の効果を定量するために使用される測定型は、アッセイおよび検出方法の型に依存し、当業者はこれを容易に決定することができる。例えば、検出手段としてウェスタンブロットティングを使用する生物学的スクリーニングを使用する場合、デンシトメトリーを使用して結合を測定することができる。デンシトメトリー値を正規化し、一連のコントロールサンプル（すなわち、試験化合物を含まない）の間のシグナルの変化量に基づいて閾値レベルを設定することができる。変化が小さいほど、正確に検出することができる試験化合物の影響が小さくなる。

10

【0147】

本発明のアッセイのなおさらなる実施形態では、本アッセイを補助する細胞培養技術を活用して、tim-3/ガレクチン-9複合体をホールセルで生成する。例えば、下記のように、哺乳動物細胞または酵母細胞などの真核細胞培養系でtim-3/ガレクチン-9複合体を構成することができる。当業者に公知の他の細胞を使用することができる。ホールセル中での本アッセイの利点には、インヒビターの治療的使用が必要であることにより密接に近い環境で機能的なインヒビターを検出する能力（薬剤の細胞への侵入を増大させる能力が含まれる）が含まれる。さらに、以下の例などのアッセイの一定のインビボでの実施形態は、試験薬を高処理で分析することができる。tim-3/ガレクチン-9複合体の成分は、アッセイを補助するために選択された細胞に対して内因性であり得る。あるいは、いくつかまたは全ての成分は、外因性供給源に由来し得る。例えば、組換え技術（発現ベクターの使用などによる）および融合タンパク質自体または融合タンパク質をコードするmRNAの微量注入によって、融合タンパク質を細胞に移入することができる。

20

【0148】

さらに別の実施形態では、一方および他方へのタンパク質の結合を破壊する薬剤のその後の検出のために、tim-3およびガレクチン-9ポリペプチドを使用して、捕捉アッセイを得ることができる（米国特許第5,283,317号；Zervos et al. (1993) Cell 72:223-232；Madura et al. (1993) J Biol Chem 268:12046-12054；Bartel et al. (1993) Biotechniques 14:920-924；and Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8:1693-1696も参照のこと）。

30

【0149】

酵母2ハイブリッドタンパク質相互作用アッセイを使用して、ガレクチン-9タンパク質へのtim-3タンパク質の結合に影響を与える化合物を同定することもできる。アッセイは、ほとんどの真核生物転写アクチベーターがモジュラーである（すなわち、アクチベーターが、典型的には、転写を活性化する活性化ドメインおよびアクチベーターをDNA分子の適切な領域に局在化するDNA結合ドメインを含む）という所見に基づく。

40

【0150】

2ハイブリッド系では、第1の融合タンパク質は、DNA結合ドメインに融合した相互作用タンパク質対の一方を含み、第2の融合タンパク質は転写活性化ドメインに融合した相互作用タンパク質対の他方を含む。2つの融合タンパク質は、同一細胞中で独立して発現し、融合物の「相互作用タンパク質」部分の間の相互作用は、レポーター遺伝子転写の活性化によって検出される転写活性化因子の融合を再構成する。少なくとも2つの異なる細胞ベースの2ハイブリッドタンパク質-タンパク質相互作用アッセイ系を使用して、結合相互作用が評価され、そして/または相互作用タンパク質が同定されている。これらの両方は、融合ハイブリッドタンパク質対を使用し、対の一方が転写活性化因子の転写活性化ドメインに融合した2つの「相互作用」タンパク質の一方を含み、対の他方が転写活性

50

化因子のDNA結合ドメインに融合した2つの「相互作用」タンパク質の他方を含む。

【0151】

別の実施形態では、一方のタンパク質は、細胞表面などの細胞上で発現するのに対し、他方のタンパク質は、複合体を形成するなどのために精製または部分精製して細胞と接触させた天然または組換えタンパク質である。

【0152】

いくつかの実施形態では、tim-3とガレクチン-9との間の結合相互作用を調整すると同定された薬剤を、実験の項に記載のアッセイなどの使用によってインビトロまたはインビボでのT細胞によるTh1/Th2応答の誘導に対するその効果などの機能的効果についてさらに評価することができる。いくつかの実施形態では、病態の動物モデルをさらに使用して、本明細書中に記載の方法（自己免疫性脳脊髄炎実験モデル、2型真性糖尿病モデルとしてのKKAYマウス、およびファブリー病モデル（GALノックアウト）など）を使用して同定した薬剤を特徴づける。使用することができるヒト疾患のさらなるマウスモデルについては、Bedell et al., Genes Dev. 1997 Jan 1; 11(1): 11-43も参照のこと。

10

【0153】

試験薬または試験化合物は、試験されることが望まれる任意の薬剤または化合物であってよく、タンパク質（抗体が含まれる）、ペプチド、核酸（RNA、DNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド核酸が含まれる）、炭水化物、有機化合物、無機化合物、天然産物、ライブラリー抽出物、体液、およびtim-3とガレクチン-9ポリペプチドとの間の結合への影響について試験することが望ましい他のサンプルが含まれるが、これらに限定されない。特に、試験化合物は、tim-3タンパク質のペプチド模倣物またはそのフラグメントであり得る。いくつかの実施形態では、試験薬は精製または部分精製した薬剤であるのに対し、他の実施形態では、精製されていない。

20

【0154】

試験薬は、多数の化学的クラスを含むが、典型的には有機分子、好ましくは、分子量が50ダルトン以上で約2,500ダルトン未満の小有機化合物である。試験薬は、タンパク質との構造的相互作用（水素結合が含まれる）に必要な官能基を含み、典型的には、少なくとも1つのアミノ基、カルボニル基、水酸基、またはカルボキシル基、好ましくは少なくとも2つの化学的官能基が含まれる。試験薬は、しばしば、1つまたは複数の上記官能基に置換された環式炭素構造もしくは複素環式構造および/または芳香族もしくは多環芳香族構造を含む。試験薬は、生体分子（ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導體、構造アナログ、またはその組み合わせが含まれるが、これらに限定されない）中に見出される。

30

【0155】

試験薬は、広範な種々の供給源（合成化合物または天然化合物のライブラリーが含まれる）から得られる。例えば、広範な種々の有機化合物および生体分子の無作為および直接的な合成に多数の手段（無作為化オリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチド発現が含まれる）が利用可能である。小有機物/ペプチドのライブラリーを、Bondelle et al. (1995) Trends Anal. Chem. 14: 83; the Affymax U.S. Patents 5,359,115 and 5,362,899; Ellmanの米国特許第5,288,514号; Still et al.のPCT公開WO94/08051号; Chen et al. (1994) JACS 116: 2661; Kerr et al. (1993) JACS 115: 252; PCT公開WO92/10092号、WO93/09668号、およびWO91/0787号; ならびにLeaner et al.のPCT公開WO93/20242号などに記載の組み合わせ技術を使用して生成することができる。

40

【0156】

あるいは、細菌、真菌、植物、および動物の抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが利用可能であるか、容易に産生される。あるいは、天然または化学的に産生されたライ

50

ブラリーおよび化合物を、従来の化学的、物理的、および生化学的手段によって容易に修飾し、これを使用して、組み合わせライブラリーを生成することができる。公知の薬物を、直接または無作為な化学修飾（アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化など）に供して、例えば、構造アナログを生成することができる。

【0157】

他の実施形態では、試験薬は、tim-3、ガレクチン-9、またはそのフラグメントのペプチド模倣物である。ペプチド模倣物は、ペプチドおよびタンパク質に基づくかこれらに由来する化合物である。本発明で使用することができるペプチド模倣物を、非天然アミノ酸、高次構造の制限、等比体積置換などを使用した公知のアナログペプチド配列の構造修飾によって得ることができる。本ペプチド模倣物は、ペプチド合成構造と非ペプチド合成構造との間の構造上の空間の連続体（continuum）を構成する。したがって、アナログペプチド模倣物は、薬理作用団の描写および親アナログペプチド活性を有する非ペプチド化合物へのペプチドの翻訳の補助で有用であり得る。

10

【0158】

さらに、本開示から明らかなように、本tim-3配列およびガレクチン-9配列のミメトープ（mimotope）を提供することができる。このようなペプチド模倣物は、非加水分解性（例えば、プロテアーゼまたは対応するペプチドを分解する他の生理学的条件に対する安定性の増加）、特異性および/または潜在性の増加、ならびにペプチド模倣物の細胞内局在化のための細胞透過性の増加などの特性を有し得る。例示を目的として、本発明のペプチドアナログを、例えば、ベンゾジアゼピン（例えば、Freidinger et al. in *Peptides: Chemistry and Biology*, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988を参照のこと）、置換ラクタム環（Garvey et al. in *Peptides: Chemistry and Biology*, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p. 123）、C-7模倣物（Huffman et al. in *Peptides: Chemistry and Biology*, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p. 105）、ケト-メチレン偽ペプチド（Ewenson et al. (1986) *J Med Chem* 29: 295; and Ewenson et al. in *Peptides: Structure and Function* (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985)、ターンジペプチドコア（Nagai et al. (1985) *Tetrahedron Lett* 26: 647; and Sato et al. (1986) *J Chem Soc Perkin Trans 1*: 1231）、-アミノアルコール（Gordon et al. (1985) *Biochem Biophys Res Commun* 126: 419; and Dann et al. (1986) *Biochem Biophys Res Commun* 134: 71）、ジアミノケトン（Natarajan et al. (1984) *Biochem Biophys Res Commun* 124: 141）、およびメチレンアミノ修飾（Roark et al. in *Peptides: Chemistry and Biology*, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p. 134）を使用して生成することができる。また、一般に、Session III: Analytic and synthetic methods, in *Peptides: Chemistry and Biology*, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)を参照のこと。

20

30

40

【0159】

本アナログペプチド模倣物を生成するために実施することができる種々の側鎖置換に加

50

えて、本発明は、詳細には、ペプチド二次構造の高次構造が制限された模倣物の使用を意図する。ペプチドのアミド結合の多数の代理物が開発されている。頻繁に使用されているアミド結合の代理物には、以下の基が含まれる：(i) trans-オレフィン、(ii) フルオロアルケン、(iii) メチレンアミノ、(iv) ホスホンアミド、および(v) スルホンアミド。

【0160】

いくつかの実施形態では、試験薬がtim-3またはガレクチン-9ポリペプチドの間の結合に影響を与えることができるかどうかを決定する前にtim-3またはガレクチン-9タンパク質に結合する能力について試験薬を予備選択する。1つの実施形態では、試験薬を、tim-3またはガレクチン-9ポリペプチドに結合する能力について最初に選択

10

【0161】

((8) 組成物、処方物、およびパッケージング)

本発明のさらなる態様は、本明細書中に記載の核酸、ポリペプチド、または薬剤を含む組成物を提供する。1つの実施形態では、組成物は、薬学的組成物である。本発明で使用される薬学的組成物を1つまたは複数の生理学的に許容可能なキャリアまたは賦形剤を使用した従来の様式で処方することができる。したがって、化合物およびその生理学的に許容可能な塩および溶媒和物を、例えば、エアゾール、静脈内、経口、または局所経路による投与のために処方することができる。投与は、病変内、腹腔内、皮下、筋肉内、または静脈内への注射、注入、リポソーム媒介送達、局所、髄腔内、歯内嚢、直腸、気管支内、鼻腔内、経粘膜、腸内、経口、眼内、または耳内送達を含み得る。

20

【0162】

本発明の例示的組成物は、任意選択的に許容可能な賦形剤を含むリポソーム系などの送達系と混合したRNAiを含む。好ましい実施形態では、注射のために組成物を処方する。

【0163】

技術および処方を、一般に、Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PAで見出すことができる。全身投与のために、注射(筋肉内、静脈内、腹腔内、および皮下が含まれる)が好ましい。注射のために、本発明の化合物を、溶液、好ましくは、ハングス液またはリンゲル液などの生理学的に適合する緩衝液中に処方することができる。さらに、化合物を固体形態で処方し、使用直前に再溶解するか再懸濁することができる。

30

【0164】

経口投与のために、薬学的組成物は、例えば、結合剤(例えば、化(pregelatinised)トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース)、充填剤(例えば、ラクトース、微結晶性セルロース、またはリン酸水素カルシウム)、潤滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、またはシリカ)、崩壊剤(例えば、ジャガイモデンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム)、湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)などの薬学的に受容可能な賦形剤を使用した従来の手段によって調製された錠剤またはカプセルの形態を取ることができる。錠剤をコーティングすることができる。経口投与のための液体調製物は、例えば、溶液、シロップ、または懸濁液の形態を取ることができるか、使用前に水または他の適切な賦形剤で構成するための乾燥生成物として提供することができる。このような液体調製物を、懸濁剤(例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素化食用脂)、乳化剤(例えば、レシチンまたはアカシア)、非水性賦形剤(例えば、atmondオイル、油性エステル、エチルアルコール、または分留植物油)、および防腐剤(例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエート、またはソルビン酸)などの薬学的に受容可能な添加剤を使用した従来の手段によって調製することができる。調製物はまた、必要に

40

50

じて、緩衝塩、香味物質、着色料、および甘味料を含み得る。

【0165】

活性化化合物を制御放出するための経口投与用調製物を適切に処方することができる。口腔投与のために、組成物は、従来の様式で処方した錠剤またはロゼンジの形態を取ることができる。吸入による投与のために、本発明の化合物を、適切な高圧ガス（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切なガス）を使用した圧縮パックまたはネブライザーからのエアゾールスプレーの形態で都合良く送達させる。圧縮エアゾールの場合、一定量を送達させるバルブを準備することによって投薬単位を決定することができる。例えば、吸入器または注入器で使用するための化合物およびラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤の粉末混合物を含むゼラチンのカプセルおよびカートリッジを処方することができる。

10

【0166】

注射（例えば、ボラス注射または持続注入）による非経口投与のための化合物を処方することができる。注射用処方物を、防腐剤を添加した単位投与形態（例えば、アンプルまたは複数回投与用コンテナ（multi-dose container））で示すことができる。組成物は、油性または水性賦形剤中の懸濁液、溶液、乳濁液などの形態を取ることができ、懸濁剤、安定剤、および/または分散剤などの処方剤を含み得る。あるいは、有効成分は、使用前に適切な賦形剤（例えば、滅菌無発熱物質水）で構成するための粉末形態であり得る。

【0167】

20

例えば、ココアバターまたは他のグリセリドなどの従来の座剤の基剤を含む座剤または保持浣腸剤などの直腸組成物に化合物を処方することもできる。

【0168】

前記の処方物に加えて、デポ調製物として化合物を処方することもできる。このような長期作用処方物を、移植（例えば、皮下または筋肉内）または筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、化合物を、適切な高分子もしくは疎水性材料（例えば、許容可能なオイル中の乳濁液）、イオン交換樹脂、やや溶けにくい誘導体（例えば、やや溶けにくい塩）を使用して処方することができる。

【0169】

経粘膜手段または経皮手段によって全身投与を行うこともできる。経粘膜投与または経皮投与のために、処方において透過すべきバリアに適切な浸透剤を使用する。このような浸透剤は当該分野で一般に公知であり、例えば、経粘膜投与のための胆汁塩およびフシジン酸誘導体が含まれる。さらに、界面活性剤を使用して、透過を容易にすることができる。経粘膜投与を、鼻内噴霧または座剤によって行うことができる。局所投与のために、本発明のオリゴマーを、当該分野で一般的に公知の軟膏、蠟膏、ゲル、またはクリームに処方する。治癒を促進するために、洗浄液を局所的に使用して損傷または炎症を治療することができる。

30

【0170】

組成物を、所望ならば、有効成分を含む1つまたは複数の単位投薬形態を含み得るパックまたは分注デバイス中に提供することができる。パックは、例えば、プリスター包装などの金属ホイルまたはプラスチックホイルを含み得る。パックまたは分注デバイスに投与説明書を同封することができる。

40

【0171】

核酸投与を含む治療のために、本発明のオリゴマーを、種々の投与様式（全身および局所もしくは局部投与が含まれる）のために処方することができる。技術および処方を、一般に、Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PAに見出すことができる。全身投与のために、注射（筋肉内、静脈内、腹腔内、節内（intranodal）、および皮下への注射が含まれる）が好ましく、本発明のオリゴマーを、溶液、好ましくは、ハンス液またはリンゲル液などの生理学的に適合する緩衝液中に処方することができ

50

る。さらに、オリゴマーを固体形態に処方し、使用直前に再溶解または再懸濁することができる。凍結乾燥形態も含まれる。

【0172】

経粘膜手段または経皮手段によって全身投与を行うこともできるか、化合物を経口投与することができる。経粘膜投与または経皮投与のために、処方において透過すべきバリアに適切な浸透剤を使用する。このような浸透剤は当該分野で一般に公知であり、例えば、経粘膜投与のための胆汁塩およびフシジン酸誘導体が含まれる。さらに、界面活性剤を使用して、透過を容易にすることができる。経粘膜投与を、鼻内噴霧または座剤によって行うことができる。経口投与のために、オリゴマーを、カプセル、錠剤、およびトニックなどの従来の経口投与形態に処方する。局所投与のために、本発明のオリゴマーを、当該分野で一般的に公知の軟膏、蝟膏、ゲル、またはクリームに処方する。

10

【0173】

本発明の薬剤および組成物の毒性および治療有効性を、例えば、LD50（50%の集団が死滅する用量）およびED50（50%の集団で治療的に有効な用量）の決定のための細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手段によって決定することができる。毒性と治療効果との間の用量比が治療指数であり、LD50/ED50比として示すことができる。治療指数の高い化合物が好ましい。有毒な副作用を示す化合物を使用することができるが、非感染細胞への潜在的損害を最小にし、それにより副作用を軽減するための罹患組織部位にこのような化合物をターゲティングする送達系をデザインするように注意すべきである。

20

【0174】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータを、ヒトで使用するための投薬量範囲の処方で使用することができる。このような化合物の投薬量は、ED50を含む循環濃度の範囲内であり、ほとんど毒性がないか全く毒性がないことが好ましい。投薬量は、使用される投薬形態および使用される投与経路に依存して、この範囲内で変化し得る。本発明の方法で使用される任意の化合物について、細胞培養アッセイから治療有効用量を最初に評価することができる。細胞培養において決定されたIC50（すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルにて用量を決定することができる。このような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿レベルを、例えば、高速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。

30

【0175】

本明細書中に記載の方法の1つの実施形態では、薬剤の有効量は、約1mg/kg被験体体重と約50mg/kg被験体体重との間である。1つの実施形態では、薬剤の有効量は、約2mg/kg被験体体重と約40mg/kg被験体体重との間である。1つの実施形態では、薬剤の有効量は、約3mg/kg被験体体重と約30mg/kg被験体体重との間である。1つの実施形態では、薬剤の有効量は、約4mg/kg被験体体重と約20mg/kg被験体体重との間である。1つの実施形態では、薬剤の有効量は、約5mg/kg被験体体重と約10mg/kg被験体体重との間である。

【0176】

本明細書中に記載の方法の1つの実施形態では、薬剤を1日に少なくとも1回投与する。1つの実施形態では、薬剤を毎日投与する。1つの実施形態では、薬剤を1日おきに投与する。1つの実施形態では、薬剤を6～8日毎に投与する。1つの実施形態では、薬剤を毎週投与する。

40

【0177】

化合物および/または薬剤の被験体への投与量に関して、当業者は、適量の決定方法を理解している。本明細書中で使用される、「用量」または「量」は、障害を抑制するか、障害を治療するか、被験体を治療するか、被験体が障害を罹患するのを防止するのに十分な量であろう。この量を有効量とみなすことができる。当業者は、被験体治療のための必要量を決定するために簡潔な適定実験を行うことができる。本発明の組成物の用量は、被

50

験体および使用される特定の投与経路に依存して変化する。1つの実施形態では、投薬量は、約 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 被験体体重 ~ 約 $100,000 \mu\text{g} / \text{kg}$ 被験体体重の範囲であり得る。組成物に基づいて、連続ポンプなどによって連続的に送達させるか定期的に送達させることができる。例えば、1つまたは複数の個別の事象で送達させることができる。当業者は、過度に実験することなく特定の複数回投与の所望の間隔を決定することができる。

【0178】

有効量は、特に、化合物のサイズ、化合物の生分解性、化合物の生体活性、および化合物の生物学的利用能に基づき得る。化合物が迅速に分解されない場合、生物的に利用できる場合、および活性が高い場合、少量で有効である。有効量は当業者に公知であり、化合物の形態、化合物のサイズ、および化合物の生体活性にも依存する。当業者は、バイオアッセイにおいて生体活性を決定し、それにより、有効量を決定するために、化合物に対して経験的活性試験を日常的に行うことができる。上記方法の1つの実施形態では、化合物の有効量は、約 $1.0 \text{ng} / \text{kg}$ 被験体体重 ~ 約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ 被験体体重である。上記方法の別の実施形態では、化合物の有効量は、約 $100 \text{ng} / \text{kg}$ 被験体体重 ~ 約 $50 \text{mg} / \text{kg}$ 被験体体重である。上記方法の別の実施形態では、化合物の有効量は、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 被験体体重 ~ 約 $10 \text{mg} / \text{kg}$ 被験体体重である。上記方法の別の実施形態では、化合物の有効量は、約 $100 \mu\text{g} / \text{kg}$ 被験体体重 ~ 約 $1 \text{mg} / \text{kg}$ 被験体体重である。

【0179】

化合物、組成物、および/または薬剤の投与時期に関して、当業者は、このような化合物および/または薬剤をいつ投与するのかを決定することができる。投与は、一定期間連続的であるか、周期的および特定の期間投与することができる。化合物を、1時間毎、毎日、毎週、毎月、毎年（例えば、徐放形態）送達させるか、一度に送達させることができる。送達は、一定期間の連続的送達（例えば、静脈内送達）であり得る。本明細書中に記載の方法の1つの実施形態では、薬剤を、1日に少なくとも1回投与する。本明細書中に記載の方法の1つの実施形態では、薬剤を、毎日投与する。本明細書中に記載の方法の1つの実施形態では、薬剤を、1日おきに投与する。本明細書中に記載の方法の1つの実施形態では、薬剤を、6~8日毎に投与する。本明細書中に記載の方法の1つの実施形態では、薬剤を、毎週投与する。

【0180】

本発明の別の態様は、(i) *t i m - 3* の I g V ドメインを含むポリペプチドと、(ii) 腎細胞癌、カポジ肉腫、慢性白血病、前立腺癌、乳癌、肉腫、膵臓癌、白血病、卵巣癌、直腸癌、咽頭癌、黒色腫、結腸癌、膀胱癌、リンパ腫、肥満細胞腫、肺癌、乳腺癌、咽頭扁平上皮細胞癌、精巣癌、消化管癌、および胃癌からなる群から選択される増殖性状態に罹患した被験体への組成物の投与についての説明書とを含む薬学的パッケージを提供する。

【0181】

((9) 免疫応答の制御方法)

本発明の1つの態様は、免疫応答の調整方法 (*T h 1* または *T h 2* 応答、免疫寛容、および移植免疫寛容の調整方法などであるが、これらに限定されない) を提供する。本明細書中で使用される、用語「調整」は、増加または減少をいう。本出願の免疫応答の制御方法は、可溶性 *t i m - 3* を含む融合タンパク質を使用した *t i m - 3* リガンドの判定により、*T h 1* 応答が増強され、末梢性寛容の確立が取り消され、移植免疫寛容が減少するという発見に一部基づく。それに反して、*t i m - 3* リガンドとして出願人によって発見された哺乳動物へのガレクチン - 9 の投与により、*T h 1* 応答が減少する。

【0182】

本発明の別の態様は、治療有効量の *t i m - 3*、ガレクチン - 9、またはその両方の発現または活性を減少させる薬剤（すなわち、*t i m - 3* またはガレクチン - 9 のアゴニスト）またはガレクチン - 9 への *t i m - 3* の結合を増加させる薬剤を被験体に投与する工

10

20

30

40

50

程を含む、必要とする被験体の免疫寛容を減少させ、T h 1 媒介免疫応答を減少させ、そして/またはT h 2 媒介免疫応答を減少させる方法を提供する。

【 0 1 8 3 】

t i m - 3 活性の減少による免疫応答の減少およびT h 1 媒介応答の増加は、癌免疫療法で有利である。免疫系は、腫瘍抗原を寛容し得るので、腫瘍が免疫監視を回避することができる。本発明の1つの態様では、t i m - 3 活性を減少させる薬剤を、増殖性状態を罹患した被験体に投与する。

【 0 1 8 4 】

用語「癌」および「腫瘍」は交換可能に使用され、両用語は増殖性状態をいう。1つの実施形態では、癌は、カポジ肉腫、慢性白血病、前立腺癌、乳癌、肉腫、膵臓癌、白血病、卵巣癌、直腸癌、咽頭癌、黒色腫、結腸癌、膀胱癌、リンパ腫、肥満細胞腫、肺癌、乳腺癌、咽頭扁平上皮細胞癌、および消化管癌または胃癌からなる群から選択される。別の実施形態では、癌は、基底細胞癌、胆道癌；膀胱癌；骨の癌；脳腫瘍およびC N S 癌；乳癌；子宮頸癌；絨毛癌；結腸直腸癌；結合組織癌；消化器管癌；子宮内膜癌；食道癌；眼球の癌；頭頸部癌；胃癌；上皮内新生物；腎臓癌；喉頭癌；白血病；肝臓癌；肺癌（例えば、小細胞および非小細胞）；リンパ腫（ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫が含まれる）；黒色腫；骨髄腫；神経芽細胞腫；口腔癌（例えば、唇、舌、口、および咽頭）；卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸癌；気管支癌；肉腫；皮膚癌；胃癌；精巣癌；甲状腺癌；子宮癌；泌尿器系の癌、並びに他の癌腫および肉腫からなる群から選択される。

【 0 1 8 5 】

別の実施形態では、t i m - 3 活性の阻害によってT h 1 活性化を増加させるために使用される薬剤を使用して、被験体のワクチンに対する免疫応答を増強する。1つの特定の実施形態では、ワクチンに対する免疫応答を増強するために、t i m - 3 活性を阻害する薬剤（t i m - 3 I g V ドメインを含むポリペプチドまたは全長t i m - 3 とt i m - 3 リガンドとの間の複合体形成を阻害する抗体など）をワクチンと共に投与する。ワクチンには、ウイルス感染または細菌感染の防止を意図するワクチンが含まれるが、これらに限定されない。他の実施形態では、ワクチン接種前に薬剤を投与し、他の実施形態では、ワクチンを被験体に投与した後に薬剤を投与する。

【 0 1 8 6 】

さらに別の態様では、本発明は、t i m - 3、ガレクチン - 9、またはその両方の発現または活性を減少させる薬剤（すなわち、t i m - 3 アンタゴニストまたはガレクチン - 9 アンタゴニストの投与）またはt i m - 3 へのガレクチン - 9 の結合を減少させる薬剤を被験体に投与する工程を含む、必要とする被験体のT h 2 関連応答（例えば、アレルギー反応または喘息反応）を減少させるか、阻害するか、抑制するか、改善するか、遅延させる方法の特徴とする。

【 0 1 8 7 】

本明細書中で使用される、「T h 2 媒介障害」は、T h 2 免疫応答の発生に関連する疾患をいう。本明細書中で使用される、「T h 2 免疫応答」は、少なくとも1つのT h 2 - サイトカインまたはT h 2 - 抗体の誘導をいう。好ましい実施形態では、1つを超えるT h 2 - サイトカインまたはT h 2 - 抗体が誘導される。したがって、T h 2 媒介疾患は、T h 2 応答の誘導に関連する疾患であり、少なくとも1つのT h 2 - サイトカインもしくはT h 2 - 抗体の部分的もしくは完全な誘導または少なくとも1つのT h 2 - サイトカインもしくはT h 2 - 抗体レベルの増加をいう。これらの障害は当該分野で公知であり、例えば、喘息およびアレルギー（アレルギー性鼻炎、消化管アレルギー（食物アレルギーが含まれる）が含まれる）などのアトピー性病態、好酸球増加症、結膜炎、糸球体腎炎、一定の病原体感受性（蠕虫感染症（例えば、リーシュマニア症）など）および一定のウイルス感染症（ヒト免疫不全ウイルス（H I V）が含まれる）、一定の細菌感染症（結核および結節性らいが含まれる））が含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、T h 2 関連応答は、喘息またはアレルギーである。

【0188】

本明細書中で定義される、「喘息」は、長期間にわたる個体の可逆的気流の制限である。喘息は、気道壁中の好酸球、肥満細胞、好塩基球、およびCD25⁺Tリンパ球などの細胞の存在によって特徴づけられる。種々の伝達および生物学的エフェクター特性を有するサイトカイン活性のために、これらの細胞は密接に相互作用する。ケモカインは、細胞を炎症部位に誘引し、サイトカインはケモカインを活性化し、粘膜の炎症および損傷が起こる。この過程の慢性化により、基底膜の肥厚および線維形成などの二次的变化が起こる。この疾患は、種々の刺激に対する気道の過剰な反応性の増加および気道炎症によって特徴づけられる。喘息と診断された患者は、一般に、長期間複数の徴候（喘鳴、喘息性発作、およびメタコリン攻撃誘発に対する陽性反応（すなわち、約4mg/ml未満のメタコリン攻撃誘発に対するPC20）が含まれる）を示す。診断ガイドラインは、例えば、National Asthma Education Program Expert Panel Guidelines for Diagnosis and Management of Asthma, National Institutes of Health, 1991, Pub. No. 91-3042に見出すことができる。

10

【0189】

本明細書中で使用される、用語「アレルギー」は、物質（アレルゲン）に対して獲得された過敏症をいう。アレルギー性病態には、湿疹、アレルギー性鼻炎または鼻感冒、枯草熱、気管支喘息、皮膚の掻痒（蕁麻疹）、および食物アレルギー、ならびに他のアトピー性病態が含まれる。「アレルギーを有する被験体」は、アレルゲンに反応してアレルギー反応を示すか示すリスクのある被験体である。「アレルゲン」は、疑いのある被験体にアレルギー反応または喘息反応を誘導することができる物質をいう。アレルゲンのリストは多数存在し、花粉、昆虫毒、動物の鱗屑、埃、真菌の孢子、および薬物（例えば、ペニシリン）が含まれ得る。

20

【0190】

目的のアレルゲンには、苺、ピーナッツ、乳タンパク質、卵白などの食品中に見出される抗原が含まれる。目的の他のアレルゲンには、花粉、動物の鱗屑、家ダニのフンなどの種々の大気中アレルゲンが含まれる。分子クローニングされたアレルゲンには、ヤケヒョウダニ（Der p1）；ホソムギ花粉由来のLol p1-V；多数の昆虫毒（キバハリアリおよびミルメシア・ピロスラ由来の毒；セイヨウミツバチのハチ毒ホスホリパーゼA2（PLA₂）および抗原5S；スズメバチであるベスブラ・マクリフロンスおよびホワイトフェースドホーネット（white faced hornet）であるドリコベスプラ・マクラタが含まれる）；多数の花タンパク質（カバノキ花粉、ブタクサ花粉、パロール（Parol）（ヒカゲミズの主なアレルゲン）、および交差反応アレルゲンParj1（パリエタリア・ジュダイカ由来）が含まれる）、および他の大気花粉（オリーブ、アルテミシア属、イネ科など）が含まれる。目的の他のアレルゲンは、吸血節足動物（例えば、双翅目（蚊（ハマダラカ属、ヤブカ属、ハボシカ属、イエカ属）；ハエ（サシチョウバエ属、ヌカカ属）（特に、ブヨ、メクラアブ、およびヌカカ）が含まれる）；ダニ（カクマダニ属、カズキダニ属、オトビウス属）；ノミ（例えば、ノミ目）（ネズミノミ属、ヒトノミ属、およびネコノミが含まれる））に起因するアレルギー性皮膚炎を担うアレルゲンである。特定のアレルゲンは、多糖類、脂肪酸部分、タンパク質であり得る。

30

40

【0191】

本発明の1つの特定の態様は、治療有効量のポリペプチドを被験体に投与する工程と、前記ポリペプチドが、(i)配列番号10、(ii)配列番号18、(iii)配列番号10と少なくとも90%同一であるか類似するアミノ酸配列、(iv)配列番号18と少なくとも90%同一であるか類似するアミノ酸配列を含むこととを含む、被験体のアトピー性疾患を予防するか罹患する可能性を減少させる方法を提供する。

【0192】

本発明によれば、tim-3またはガレクチン-9活性を調整するか、tim-3とガレクチン-9との間の複合体形成を調整する薬剤を、免疫応答の調整または障害または病

50

態の治療のための他の組成物および手順と組み合わせて使用することができる。例えば、腫瘍を、手術、照射、または化学療法を使用して従来のように治療することができる。その後、微小転移の休止を延長して任意の残存する原発性腫瘍を安定化するために、可溶性 t i m - 3 - I g F c 融合タンパク質などの t i m - 3 活性を減少させる薬剤を被験体に投与することができる。

【 0 1 9 3 】

いくつかの実施形態では、t i m - 3 活性を減少させる薬剤は、全長 t i m - 3 の発現と比較して可溶性 t i m - 3 の発現を優先的に阻害する。いくつかの実施形態では、ガレクチン - 9 への t i m - 3 の結合を遮断する薬剤は、抗体またはその抗原に対する高い結合親和性を保持した抗体フラグメントなどの抗体フラグメントである。このような抗体は、ガレクチン - 9 または t i m - 3 のいずれか、特に t i m - 3 の細胞外ドメインへの結合によって t i m - 3 / ガレクチン - 9 結合を遮断することができる。特定の実施形態では、薬剤は、配列番号 1 3 のアミノ酸 3 0 ~ 1 2 8 を含むポリペプチドに結合する抗体または抗体フラグメントである。

10

【 0 1 9 4 】

当業者は、t i m - 3 細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体を生成することができ、この抗体を、本発明によって提供された方法を使用して、全長 t i m - 3 への t i m - 3 リガンド (ガレクチン - 9 など) の結合を遮断する能力についてさらに試験することができる。好ましい抗体は、抗体自体が全長 t i m - 3 活性のアクチベーターとして作用せずに全長 t i m - 3 とそのリガンドとの間の結合相互作用を遮断するであろう。実験手順に記載のアッセイを使用して、当業者は、免疫化マウスへの抗体の投与およびマウスの脾臓から単離した T h 1 細胞によるインビトロ増殖およびサイトカイン産生についての試験などによって候補抗体が t i m - 3 活性のアクチベーターであるかどうかを決定することができる。免疫寛容を減少させるための好ましい抗体は、t i m - 3 への t i m - 3 リガンドの結合を遮断するが、t i m - 3 の活性化を誘導しない (すなわち、T h 1 細胞増殖およびサイトカイン放出を抑制しない) であろう。

20

【 0 1 9 5 】

1 つの実施形態では、t i m - 3 機能を阻害するために使用される薬剤は、抗体を含む。1 つの実施形態では、抗体は、t i m - 3 の I g V ドメイン (配列番号 1 3 のアミノ酸 3 0 ~ 1 2 8) に結合して全長 t i m - 3 への t i m - 3 リガンドの結合を遮断する。1 つの実施形態では、t i m - 3 リガンドはガレクチン - 9 である。したがって、別の実施形態では、抗体はガレクチン - 9 に結合する。結合時、抗体は、ガレクチン - 9 と全長 t i m - 3 との間の物理的相互作用を防止することができる。

30

【 0 1 9 6 】

別の実施形態では、被験体におけるガレクチン - 9 への全長 t i m - 3 の結合を遮断する薬剤は、内因性 t i m - 3 とガレクチン - 9 への結合を競合する組換え t i m - 3 ポリペプチドを含む。特定の実施形態では、薬剤は、(i) 配列番号 1 3 のアミノ酸 3 0 ~ 1 2 8 または (i i) 配列番号 1 3 のアミノ酸 3 0 ~ 1 2 8 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。特定の実施形態では、ポリペプチド薬は、ペグ化され、そして / またはヒト血清アルブミンまたは免疫グロブリンの F c ドメインとの融合タンパク質である。別の実施形態では、被験体において T h 1 細胞を活性化するか免疫寛容を減少させる方法で使用される薬剤は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する可溶性 t i m - 3 ポリペプチドを含む。好ましい実施形態では、薬剤は、t i m - 3 の I g V ドメイン (配列番号 1 1 のアミノ酸 3 0 ~ 1 2 8) を含む。さらに別の実施形態では、可溶性 t i m - 3 ポリペプチドは、t i m - 3 の I g V ドメイン、任意選択的に t i m - 3 の細胞内ドメイン、および免疫グロブリンの F c ドメインを含むが、t i m - 3 の ムチンドメインや t i m - 3 の膜貫通ドメインを含まない。好ましい実施形態では、これらのポリペプチドはガレクチン - 9 に結合する。これらのポリペプチドの変異型 (t i m - 3 リガンドの結合を増加させる変異型など) を使用することもできる。

40

【 0 1 9 7 】

50

いくつかの実施形態では、t i m - 3 活性を減少させる薬剤は、(i) 配列番号 1 3 のアミノ酸 3 0 ~ 1 2 8 を含むポリペプチドの (i i) ガレクチン - 9 (ガレクチン - 9 の長鎖形態または単鎖形態など) への結合を阻害する。

【 0 1 9 8 】

出願人は、ラクトースが t i m - 3 へのガレクチン - 9 の結合を阻害することを発見した。したがって、1 つの実施形態では、ガレクチン - 9 への全長 t i m - 3 の結合を阻害する薬剤は、ラクトースまたはペクチン / 修飾ペクチンなどの炭水化物を含む。修飾ペクチンは、米国特許公開公報 2 0 0 3 / 0 0 0 4 1 3 2 号および同第 2 0 0 2 / 0 1 8 7 9 5 9 号に記載されている。

【 0 1 9 9 】

別の実施形態では、T h 1 応答を促進し、そして / または T h 2 応答を阻害するように活性化するための本明細書中に記載の方法で使用される薬剤は、全長 t i m - 3 ポリペプチドまたはガレクチン - 9 などの t i m - 3 リガンドの発現レベルを減少させる。1 つの実施形態では、薬剤は、本発明によって提供された二本鎖 R N A 種であり、全長 t i m - 3 または t i m - 3 リガンド (ガレクチン - 9 など) を指示するものが含まれる。

【 0 2 0 0 】

好ましい実施形態では、T h 1 応答を促進し、そして / または T h 2 応答を阻害するように活性化するための本明細書中に記載の方法で使用される薬剤または t i m - 3 機能を阻害するために使用される薬剤は、例えば、分子量が約 2 , 0 0 0 ダルトン未満であり、t i m - 3 のガレクチン - 9 などのそのリガンドへの結合を遮断するペプチドまたはオリゴヌクレオチド以外の有機小分子である。このような薬剤を、例えば、本発明によって提供された方法を使用して同定することができる。別の実施形態では、t i m - 3 機能を阻害する薬剤は、t i m - 3 に結合するガレクチン - 9 の一部の構造を模倣したペプチドまたはペプチド誘導体である。このようなペプチドは、t i m - 3 とそのリガンドとの間の機能的相互作用の防止によって拮抗競合物として作用することができる。1 つの実施形態では、リガンドはガレクチン - 9 である。

【 0 2 0 1 】

本発明によれば、その発現レベルの減少または t i m - 3 / リガンド複合体の形成の減少などによって t i m - 3 活性を減少させる薬剤を、増殖性状態の治療のための他の組成物および手順と組み合わせて使用することができる。例えば、腫瘍を、手術、照射、または化学療法を使用して従来のように治療することができ、その後、微小転移の休止を延長して任意の残存する原発性腫瘍を安定化するために、t i m - 3 またはガレクチン - 9 などの t i m - 3 リガンドに対する二本鎖 R N A 、抗体、または小分子インヒビターを投与することができる。

【 0 2 0 2 】

本発明の別の態様は、t i m - 3 、ガレクチン - 9 、またはその両方の発現または活性を増加させるか、ガレクチン - 9 への t i m - 3 の結合を増加させる有効量の薬剤を被験体に投与する工程を含む、このような治療を必要とする被験体における T h 1 媒介障害を治療または予防するか、罹患する可能性を減少させる方法を提供する。

【 0 2 0 3 】

本発明はまた、被験体の T h 1 媒介免疫応答を減少させるか、阻害するか、抑制するか、改善するか、遅延させるのに十分な量で t i m - 3 またはガレクチン - 9 アゴニスト (本明細書中に記載の t i m - 3 またはガレクチン - 9 アゴニスト) を被験体に投与する工程を含む、必要とする被験体の T h 1 関連応答を減少させるか、阻害するか、抑制するか、改善するか、遅延させる方法の特徴とする。

【 0 2 0 4 】

T h 2 媒介障害と対照的に、本明細書中で使用される、「T h 1 媒介障害」は、T h 1 免疫応答の発生に関連する疾患をいう。本明細書中で使用される、「T h 1 免疫応答」は、少なくとも 1 つの T h 1 - サイトカインまたは T h 1 の誘導をいう。好ましい実施形態では、T h 1 サイトカインまたは T h 1 - 抗体を誘導する。したがって、T h 1 媒介疾患

10

20

30

40

50

は、T h 1 応答の誘導に関連する疾患であり、少なくとも1つのT h 1 - サイトカインまたはT h 1 - 抗体の部分的もしくは完全な誘導または少なくとも1つのT h 1 - サイトカインまたはT h 1 - 抗体レベルの増加をいう。これらの障害は当該分野で公知であり、例えば、自己免疫（特に、臓器特異的）疾患、乾癬、T h 1 炎症障害、細胞外寄生虫感染症（例えば、蠕虫に対する応答）、固形臓器同種移植片拒絶（例えば、急性腎臓同種移植片拒絶）、B型肝炎（H B V）感染に関する症状（例えば、H B V急性期または回復期）、慢性C型肝炎（H C V）感染、インスリン依存性糖尿病（I D D M）、多発性硬化症（M S）、亜急性リンパ球性甲状腺炎（「無痛性甲状腺炎」）、クローン病、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、急性移植片対宿主病（G v H D）、糸球体腎炎、抗糸球体基底膜病、ウェゲナー病、炎症性筋障害、シェーグレン症候群、ベーゲット症候群、関節リウマチ、ライム関節炎、および原因不明の再発性流産が含まれるが、これらに限定されない。

10

いくつかの実施形態では、T h 1 関連障害は、アテローム性動脈硬化症、細胞外寄生虫感染症、B型肝炎（H B V）感染に関する症状（例えば、H B V急性期または回復期）、慢性C型肝炎（H C V）感染、無痛性甲状腺炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、糸球体腎炎、抗糸球体基底膜病、ウェゲナー病、炎症性筋障害、シェーグレン症候群、ベーゲット症候群、関節リウマチ、および原因不明の再発性流産からなる群から選択される。

【0205】

本明細書中に記載のT h 1 媒介免疫応答を減少させる方法は、被験体の自己免疫疾患を治療するのに特に有利であり得る。1つの実施形態では、本発明の被験体のT h 1 応答を減少させる方法は、自己免疫疾患を罹患しているか発症リスクが高い被験体に適用する。「自己免疫疾患」は、被験体自身の抗体が宿主組織と反応するか免疫エフェクターT細胞が内因性自己ペプチドと自己反応して組織を破壊する疾患クラスである。したがって、自己抗原と呼ばれる被験体自身の抗原に対して免疫応答が開始される。

20

【0206】

本明細書中で使用される、「自己抗原」は、正常な宿主組織の抗原をいう。正常な宿主組織は、癌細胞を含まない。したがって、自己免疫疾患という状況において、自己抗原に対して開始された免疫応答は望ましくない免疫応答であり、正常組織の破壊および損傷に寄与するのに対して、癌抗原に対して開始される免疫応答は望ましい免疫応答であり、腫瘍または癌の破壊に寄与する。

30

【0207】

自己免疫疾患には、関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス（S L E）、自己免疫性脳脊髄炎、重症筋無力症（M G）、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）、グレーブス病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑、抗コラーゲン抗体を伴う強皮症、混合性結合組織病、多発性筋炎、悪性貧血、特発性アジソン病、自己免疫関連不妊症、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、および自己免疫性真性糖尿病（1型真性糖尿病；インスリン依存性真性糖尿病）が含まれるが、これらに限定されない。最近、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含むと認識されている。1つの特定の実施形態では、自己免疫疾患は、多発性硬化症、I型糖尿病、橋本甲状腺炎、クローン病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、胃炎、自己免疫性肝炎、溶血性貧血、自己免疫性血友病、自己免疫性リンパ増殖性症候群（A L P S）、自己免疫性ブドウ膜網膜塩、糸球体腎炎、ギャン - パレー症候群、乾癬、および重症筋無力症からなる群から選択される。別の実施形態では、T h 1 媒介障害は、移植片対宿主病（H V G D）である。関連する実施形態では、被験体は、臓器または組織移植レシピエントである。

40

【0208】

本発明のさらに別の態様は、t i m - 3もしくはガレクチン - 9の機能、発現、またはガレクチン - 9へのt i m - 3の結合を増加させる治療有効量の薬剤を被験体に投与する

50

工程を含む、被験体の移植免疫寛容を増加させる方法を提供する。1つの特定の実施形態では、被験体は、同種移植片のレシピエントである。移植片は、任意の臓器または組織移植片（心臓、腎臓、肝臓、皮膚、膵臓、骨髄、皮膚、または軟骨が含まれるが、これらに限定されない）であり得る。本明細書中で使用される、「移植免疫寛容」は、レシピエントの免疫系によるドナー臓器拒絶の欠如をいう。さらに、組織または細胞移植片を拒絶する可能性を抑制または減少するための薬剤を使用することができる。

【0209】

本明細書中で使用される、用語「薬剤」および「化合物」には、タンパク質および非タンパク質部分の両方が含まれる。薬剤は、合成されたか、組換え技術によって作製されたか、天然供給源から単離した任意の化学物質（元素、分子、化合物、薬物）であり得る。例えば、薬剤は、ペプチド、ポリペプチド、抗体もしくは抗体フラグメント、ペプチド、糖類、ホルモン、または核酸分子（アンチセンスまたはRNAi核酸分子など）であり得る。さらに、薬剤は、コンビナトリアルケミストリーによって作製され、例えば、ライブラリーに集められる小分子またはより複雑な分子であり得る。これらのライブラリーは、例えば、アルコール、アルキルハライド、アミン、アミド、エステル、アルデヒド、エーテル、および有機溶媒の他のクラスを含み得る。薬剤はまた、細胞（細菌、動物、または植物）の溶解物または成長培地から単離した天然産物または遺伝子操作された産物であり得る。

10

【0210】

1つの実施形態では、tim-3活性を増加させる薬剤（Th2応答の促進および/またはTh1応答の阻害に使用される薬剤など）は、全長tim-3のリガンドへの結合を促進する。好ましい実施形態では、tim-3リガンドはガレクチン-9である。薬剤は、それ自体がtim-3に結合するか、それ自体がガレクチン-9などのtim-3リガンドに結合することができ、tim-3とリガンドとの間の結合相互作用を増加させるポリペプチドであり得る。

20

【0211】

本明細書中に記載の方法の1つの実施形態では、tim-3活性を増加させる薬剤はtim-3リガンドである。このようなリガンドの例はガレクチン-9である。したがって、いくつかの実施形態では、薬剤はガレクチン-9ポリペプチドを含む。別の実施形態では、薬剤は、ガレクチン-9の2つの炭水化物認識ドメイン（CRD）の少なくとも1つ（すなわち、少なくともN末端、C末端、またはその両方）を含むポリペプチドを含む。

30

【0212】

別の実施形態では、tim-3活性を増加させる薬剤は、配列番号10または配列番号18に記載のアミノ酸配列と少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含むペプチドを含む。別の実施形態では、配列は、配列番号10または配列番号18に記載のアミノ酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である。特定の実施形態では、ポリペプチドは、ヒトガレクチン-9の少なくとも1つのCRDのアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、または95%同一である。

【0213】

別の実施形態では、tim-3活性を増加させる薬剤は、tim-3受容体の活性化においてガレクチン-9として機能することができるペプチド模倣物または小分子である。ペプチドまたは小分子はtim-3に結合するガレクチン-9の表面と構造が類似し得るので、ペプチドまたは小分子は結合時にtim-3を活性化してtim-3の活性化およびTh1細胞の活性化を増加させることができる（細胞増殖およびサイトカインの分泌の増加が含まれる）。特定の実施形態では、tim-3活性を増加させる薬剤は、tim-3の細胞内ドメインのチロシンリン酸化を促進する。

40

【0214】

別の実施形態では、本明細書中に記載の方法においてtim-3活性を増加させる薬剤は、抗体またはそのフラグメントである。tim-3に結合してリガンド結合を模倣し、それにより細胞内シグナル伝達が行われる抗体を生成することができる。tim-3の細

50

胞外ドメインに結合する抗体の生成の際、当業者は、抗体が *t i m - 3* を活性化して *T h 1* 細胞増殖を抑制し、サイトカイン放出を減少させ、寛容を増加させるかどうかを試験することができる。実験手順に記載の方法を使用して、抗体結合により全長 *t i m - 3* が活性化されるかどうかを決定することができる。特定の実施形態では、*t i m - 3* 活性を増加させる抗体は、*t i m - 3* およびガレクチン - 9 に特異的な二重特異性抗体である。

【 0 2 1 5 】

さらに別の実施形態では、*t i m - 3* 活性を増加させる薬剤は、可溶性 *t i m - 3* の発現または機能を減少させるが、全長 *t i m - 3* の発現または機能には直接影響を与えない。1つの実施形態では、薬剤は、可溶性 *t i m - 3* の発現を特異的に阻害する二本鎖 *R N A* 種（配列番号 15 のヌクレオチド配列を含むものなど）である。このような二本鎖 *R N A* を、二本鎖へアピン *R N A* として投与することができる。別の実施形態では、*t i m - 3* 活性を増加させる薬剤は、可溶性 *t i m - 3* に特異的に結合するが全長 *t i m - 3* に結合しない抗体（本発明によって提供される抗体など）である。

10

【 0 2 1 6 】

（配列表の説明）

配列番号 1 は、ヒト可溶性 *t i m - 3* イソ型のコード配列である。

配列番号 2 は、ヒト可溶性 *t i m - 3* タンパク質である。

配列番号 3 は、マウス可溶性 *t i m - 3* イソ型のコード配列である。

配列番号 4 は、マウス可溶性 *t i m - 3* タンパク質である。

配列番号 5 は、ヒト可溶性 *t i m - 3* *c D N A* の新規のスプライス部位と同一の 16 ヌクレオチドの *D N A* フラグメントである。

20

配列番号 6 は、ヒト可溶性 *t i m - 3* タンパク質の新規の *I g V* ドメイン / 細胞内ドメイン連結部と同一の 16 アミノ酸のペプチドである。

配列番号 7 は、マウス可溶性 *t i m - 3* *c D N A* の新規のスプライス部位と同一の 16 *b p* の *D N A* フラグメントである。

配列番号 8 は、マウス可溶性 *t i m - 3* タンパク質の新規の *I g V* ドメイン / 細胞内ドメイン連結部と同一の 16 アミノ酸のペプチドである。

配列番号 9 は、ヒトガレクチン - 9 のコード配列（単鎖形態）である。

配列番号 10 は、ヒトガレクチン - 9 のアミノ酸配列（単鎖形態）である。

配列番号 11 は、全長ヒト *t i m - 3* のコード配列である。

30

配列番号 12 は、全長マウス *t i m - 3* のコード配列である。

配列番号 13 は、全長ヒト *t i m - 3* のアミノ酸配列である。

配列番号 14 は、全長マウス *t i m - 3* のアミノ酸配列である。

配列番号 15 は、ヒト可溶性 *t i m - 3* の新規のスプライス部位に対応する 16 ヌクレオチドの *R N A* 配列である。

配列番号 16 は、マウスガレクチン - 9 のコード配列である。

配列番号 17 は、マウスガレクチン - 9 のアミノ酸配列である。

配列番号 18 は、マウスガレクチン - 9 のアミノ酸配列（長鎖形態）である（*G e n b a n k* アクセッション番号 *N P _ 0 3 4 8 3 8* も参照のこと）。

配列番号 19 は、ヒトガレクチン - 9 のアミノ酸配列（長鎖形態）である（*G e n b a n k* アクセッション番号 *N P _ 0 3 3 6 6 5* も参照のこと）。

40

【実施例】

【 0 2 1 7 】

本発明を一般的に記載し、以下の実施例を参照することによって本発明はより深く理解される。実施例は本発明の一定の態様および実施形態の例示のみを目的として含まれ、本発明を制限することを意図しない。

【 0 2 1 8 】

実施例は、2つの部に分けられ、それぞれ実施例で使用した方法の説明のみを含む。

【 0 2 1 9 】

（第1実験）

50

(A. 方法)

(s - Tim - 3のクローニング)

脾細胞を、1 μ g/mLのコンカナバリンA (Sigma, St. Louis, MO) で活性化した。活性化の48時間後、細胞を回収し、製造者の説明書に従って、TRIzol試薬 (Invitrogen) を使用してRNAを抽出した。Superscript II逆転写キット (Invitrogen, Los Angeles, CA) を使用して、RNAを逆転写した。fl - Tim - 3およびs - Tim - 3の両方の増幅のために、SmaI制限オーバーハングを有するTim - 3プライマーを、Tim - 3遺伝子の5' (TIM - 3 - F: 5' GCCCGGGAGGAGCTAAAGCTATCCCTACACA3') および3' (TIM3 - R: 5' GCCCGGGCCAATGAGGGTTGCCAAGTGACATA3') UTR中にデザインした。DNAサーマルサイクラー (Perkin - Elmer, Chicago, IL) にて、95 で1分間の変性、55 で30秒間のアニーリング、および72 で90秒間の伸長を1サイクルとして35サイクルの反応を行った。反応を、72 で10分間の最後の伸長で完了した。全産物を、1.2%アガロースゲルで分離し、臭化エチジウムで視覚化した。

10

【0220】

(T細胞の分子およびTim - 3 - リガンド染色)

全脾細胞およびリンパ節細胞を、ナイーブC57BL/6マウス (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) から採取し、CD4⁺T細胞をカラムで精製した (R&D Systems, Minneapolis, MN)。CD4⁺T細胞を、CD25、CD62L、CD45RB、CD44、およびCD54に対するmAb (PharMingen, San Diego, CA) で染色した。細胞をビオチン化ex - Tim - 3 - Ig、s - Tim - 3 - Ig、またはhIgGで染色し、ストレプトアビジン - PEを、フローサイトメトリーでの検出のための二次検出試薬として使用した。

20

【0221】

AE7 (ハトシトクロムc特異的I - E^k制限Th1クローン^{34, 45}) およびLR1F1 (PLP 139~151が変化したペプチドQ144 (HSLGKQLGHPDKF) 特異的I - A^s制限Th2クローン³⁶) を、0.1M非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム (1mM)、L - グルタミン (2mM)、MEM必須ビタミン混合物 (1x)、ペニシリン (100U/ml)、ストレプトマイシン (100U/ml)、ゲンタマイシン (0.1mg/ml)、10%熱不活化ウシ胎児血清 (BioWhittaker, Incorporated, Walkersville, MD)、アスパラギン (0.1mM)、葉酸 (0.1mg/ml)、および2 - メルカプトエタノール (5 x 10⁻⁵ M) (Sigma, St. Louis, MO)、0.6% T細胞成長因子 (T - Stim, Collaborative Biomedical Research, Bedford, MA)、および0.06%組換えIL - 2を補足したDMEM中に維持した。細胞を、6、34に記載のように静止/刺激プロトコール (刺激培地は、T - Stimおよびr - IL - 2を含まない完全培地である) で維持し、s - Tim - 3 - Ig結合について染色した。

30

40

【0222】

(増殖アッセイ)

雌SJL/Jマウス (6~12週齢) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) の各側腹部に、フロイント完全アジュバント (CFA) (Difco, Kansas City, MO) で乳化した50 μ gのPLP 139~151ペプチド (HSLGKWLGHHPDKF) (Quality Controlled Biochemicals, Boston, MA) を皮下 (s.c.) 注射した。マウスに、100 μ g ex - Tim - 3 - Igもしくはs - Tim - 3 - Igまたは100 μ g コントロールhIgGもしくは100 μ l PBSのいずれかを1日おきに腹腔内注射した (免疫化日から開始し (0日目)、8日目まで係属する)。10日目にマウスを屠殺

50

し、脾臓を取り出した。5 × 10⁵ 細胞/ウェルの細胞を丸底96ウェルプレート (Falcon, Becton Dickinson, Los Angeles, CA) にプレートし、0 ~ 100 μg/ml PLP 139 ~ 151 を48時間添加し、プレートに1 μCi³ [H] - チミジン/ウェルで16 ~ 18時間パルスした。組み込まれた放射性標識チミジンを、Beta Plate シンチレーションカウンター (Perkin Elmer Wallac Inc, Atlanta, GA) を使用して測定した。データを、三連のウェルの平均cpmとして示す。

【0223】

細胞分離実験のために、CD11b⁺ 細胞およびB220⁺ 細胞を、MACS Sort 磁性ビーズ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) によるポジティブ選択によって精製し、CD3⁺ T細胞を、CD11b⁺ 細胞およびB220⁺ 細胞の枯渇後にネガティブ選択カラム (R&D Systems, Minneapolis, MN) によって精製した。10⁵ 細胞/ウェルのCD3⁺ T細胞をプレートし、2 × 10⁵ 細胞/ウェルのCD11b⁺ 細胞およびB220⁺ 細胞をプレートした。

【0224】

寛容誘導実験のために、S J Lマウスを、50 μg PLP 139 ~ 151 / CFA を使用してs.c. で免疫化すると同時に、寛容を誘導するために500 μgの可溶性PLP 139 ~ 151 を腹腔内注射した。5 × 10⁵ 細胞/ウェルの脾細胞および2 × 10⁵ 細胞/ウェルのリンパ節細胞をプレートした。

【0225】

(サイトカインELISA)

定量的捕捉ELISAによって、IL-2、IL-4、IL-10、IFN- γ 、およびTNF- α についてサイトカイン産生を測定した。簡単に述べれば、マウスIL-2 (クローンJES-1A12)、IL-4 (クローンBVD4-1D11)、IL-10 (クローンJES5-2A5)、IFN- γ (クローンR4-6A2)、およびTNF- α (クローンG281-2626) に対する精製ラットmAbを、Pharmingen (San Diego, CA) から入手し、これを使用してELISAプレート (Immulon4, Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) をコーティングした。Pharmingenの組換えマウスサイトカインを使用して、検量線を構築し、マウスIL-2 (クローンJES6-5H4)、IL-4 (クローンBVD6-24G2)、IL-10 (クローンSXC-1)、IFN- γ (クローンXMG1.2)、およびTNF- α (クローンMP6-XT3) に対するビオチン化ラットmAbを二次抗体として使用した。プレートを、TMBマイクロウェルペルオキシダーゼ基質 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を使用して発色させ、停止液の添加後にBenchmarkマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を使用して450 nmの値を読んだ。

【0226】

(BrdU組み込み)

10日目にPLP 139 - 151 / CFA免疫化したTim-3 - IgまたはhIgG 処置マウスから脾臓を取り出し、5 × 10⁵ ~ 1 × 10⁶ 個の全脾臓細胞 (96ウェルの丸底プレート) を、5 ~ 10 μM 5 - プロモデオキシウリジン (Sigma, St. Louis, MO) と共に37 °C、10% CO₂ 中で48時間インキュベートした。48時間後、細胞を、CD3 - CyC、CD25 - PE、およびCD69 - PEに対するmAb (Pharmingen, San Diego, CA) で染色した。次いで、細胞を固定し、透過処理し (Cytoperm, Pharmingen, San Diego, CA)、DNアーゼI (Sigma, St. Louis, MO) で処置した。次いで、細胞をBrdUに対するFITC抱合mAb (またはアイソタイプコントロールとしてのマウスIgG1) で染色し、FACS (Becton Dickinson, Los Angeles, CA) によって分析した。

10

20

30

40

50

【0227】

(B. 第1実験の例)

(実施例1: 細胞外免疫グロブリンドメインを含むが、全長Tim-3のムチンドメインを欠く可溶性Tim-3の同定)

マウスTim-3遺伝子の5'および3'非翻訳領域(UTR)中にプライマーをデザインし、これを使用してPCRによってコンカナバリンA(con-A)活性化脾細胞から生成したcDNAからTim-3を増幅した。約1kbのTim-3の全長形態に加えて、サイズが800bpの別のアンプリコンを同定した(図1A、レーン1)。1kbアンプリコンの推定アミノ酸翻訳により、シグナルペプチドドメイン、IgVドメイン、ムチンドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含むTim-3の全長膜固定形態(fl-Tim-3)と一致する読み取り枠(ORF)が証明された(図1B)。800bpの産物由来のORFの分析により、シグナルペプチドドメイン、IgVドメイン、および細胞質ドメインのみを含み、ムチンドメインおよび膜貫通領域を欠くTim-3の新規のイソ型の存在が証明された(図1B、1C)。ムチンドメインおよび膜貫通ドメインの非存在は、ムチンTim-3遺伝子からのエクソン3、4、および5のスプライシングと一致する(図1C)。これらのデータにより、800bpアンプリコンによってコードされる産物は、細胞質ドメインに融合したマウスTIM-3の細胞外ドメインのIGV部分を含むTim-3の選択的にスプライシングされた可溶性形態(s-Tim-3)であることが示唆される。

10

【0228】

(実施例2. 可溶性Tim-3-Ig融合タンパク質の構築)

潜在的Tim-3-リガンドおよびTIM-3とのその機能的インビボ相互作用を同定するために、Tim-3の全長形態および可溶性形態の両方のための可溶性融合タンパク質をデザインした(21)。マウスTim-3の全細胞外部分をコードするが膜貫通および細胞質テールを含まないcDNAを、ヒトIgG1FcテールをコードするcDNAと融合して、全長Tim-3-Ig融合タンパク質(ex-Tim-3-Ig)を形成した。細胞外ドメイン(図1A、1B)のIgV部分のみを含むTim-3の分泌形態の存在に照らして、可溶性Tim-3-Ig融合タンパク質(s-Tim-3-Ig)を形成するために、ヒトIgG1FcテールをコードするcDNAと融合したマウスTim-3のIgV部分をコードするcDNAからなる第2の融合タンパク質を構築した。これらの構築物を、NS-1B細胞に安定にトランスフェクトし、上清からタンパク質を精製した(21)。

20

30

【0229】

(実施例3. CD4⁺T細胞はTim-3-リガンドを発現する)

細胞がTim-3-リガンドを発現するかどうかを決定するために、ナイーブ非免疫系SJL/J、NOD、C57BL/6、およびBALB/cマウス由来の全脾細胞を、ex-Tim-3-Igまたはs-Tim-3-Igで染色し、種々の細胞表面マーカーについて同時染色した。フローサイトメトリーで分析した場合、各株から得たCD4⁺T細胞は、s-Tim-3-Igまたはex-Tim-3-Ig融合タンパク質のいずれかで染色した場合にTim-3-リガンド発現について陽性であった。精製CD4⁺T細胞を細胞表面活性化マーカーのパネルについて同時染色した場合、ex-Tim-3-Igおよびs-Tim-3-Ig染色の両方によって評価したところ、ナイーブ(CD25⁻、CD62L⁺、CD44^{lo}、CD45RB^{hi}、CD54⁻)および活性化記憶/調節(CD25⁺、CD62L⁻、CD44^{hi}、CD45RB^{lo}、CD54⁺)集団は共にTim-3-リガンドを発現することが見出された(図2A)。CD4⁺T細胞を精製してCD25発現について分取した場合、CD4⁺25⁺集団およびCD4⁺25⁻集団は共にTim-3-リガンドを発現した。しかし、分取した細胞をインビトロで48時間漸増濃度の抗CD3/抗CD28およびIL-2で活性化した場合、CD4⁺CD25⁺T細胞はTim-3-リガンドの発現を保持するのに対して、CD4⁺CD25⁻細胞は下方制御された。全脾臓由来のCD11c⁺樹状細胞およびCD11b⁺マクロファージ

40

50

の小画分も Tim-3-Ig 融合タンパク質によって染色されたが、全脾臓由来の B 細胞 (B220⁺、CD19⁺) は Tim-3-リガンドについていずれの融合タンパク質でも染色されなかった。

【0230】

CD4⁺T細胞は Tim-3-Ig 融合タンパク質で陽性染色されるので、長期 Th2 および Th2 クローンのパネルを、Tim-3-リガンドの発現について試験して Th1 細胞または Th2 細胞における Tim-3-リガンドの選択的発現が存在するかどうかを決定した。興味深いことに、Th1 細胞および Th2 細胞は、静止状態の s-Tim-3-Ig での染色について陽性である一方で (0 日目、図 2 B)、これらの細胞株の活性化により Tim-3-リガンド発現が下方制御された (4 日目、図 2 b)。活性化から 7 ~ 10 日目に、その時点で静止している T 細胞クローンにおける Tim-3-リガンド発現が下方制御された (10 日目、図 2 b)。したがって、静止 Th1 細胞および Th2 細胞の両方で Tim-3-リガンドが発現し、活性化時に発現が下方制御するようである。これらのデータは、CD4⁺CD25⁻T 細胞 (エフェクター T 細胞を含む) が活性化時に Tim-3-リガンド発現が下方制御されることを証明する第 2 実験由来のデータと一致する。

10

【0231】

(実施例 4. Tim-3-Ig のインビボ投与によって過剰増殖が誘導される)

一連の Th1 免疫応答の間の Tim-3 / Tim-3-リガンド相互作用のインビボでの役割を決定するために、S J L / J マウスを、ミエリンプロテオリピドタンパク質 PLP 139-151 を含むフロイント完全アジュバント (CFA) で免疫化し、ex-Tim-3-Ig または s-Tim-3-Ig およびヒト IgG (hIgG) またはコントロールとして PBS で処置した。10 日目に処置したマウスを屠殺し、脾臓をインビトロで再刺激して増殖およびサイトカイン産生を決定した。コントロール hIgG または PBS 処置マウス由来の全脾細胞は、抗原再刺激を行わない場合に低いバックグラウンド (基底) 応答を示し (図 3 A)、PLP 139-151 ペプチドの添加によって増殖の用量依存性増加が証明された (図 3 B)。逆に、ex-Tim-3-Ig または ex-Tim-3-Ig で処置したマウス由来の脾細胞は抗原再刺激を行わない場合に基底増殖が非常に高く、いくつかの実験では、120,000 cpm にもなった (図 3 A)。しかし、特定の抗原 (PLP 139-151) を ex-Tim-3-Ig または s-Tim-3-Ig 処置マウス由来の細胞培養中で増加させた場合、増殖応答の大きな増加は認められなかった (図 3 B)。まとめると、これらのデータにより、いずれかの融合タンパク質で処置した免疫化マウス由来の脾臓細胞がインビボで増殖し、それによりさらなる抗原刺激を行うことなくインビトロで増幅し続けることが示唆される (図 3 A、3 B)。

20

30

【0232】

(実施例 5. Tim-3 のインビボ投与によって増幅された Th1 サイトカイン産生が誘導される)

増幅細胞もサイトカインを産生するかどうかを決定するために、48 時間後にインビトロ培養物から上清を採取し、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、および INF- γ についてのサイトカイン ELISA を行った。分析により、抗原再刺激を行わない場合に ex-Tim-3-Ig または s-Tim-3-Ig で処置した免疫化 S J L / J マウス由来の脾細胞が大量の Th1 サイトカイン、IL-2、および INF- γ を産生することが明らかとなった (図 3 A)。対照的に、コントロール PBS または hIgG で処置したマウス由来の脾細胞は、抗原再刺激を行わない場合に IL-2 または INF- γ のいずれも産生しなかった (図 3 A)。ex-Tim-3-Ig または s-Tim-3-Ig で処置したマウス由来の脾細胞は、PLP 139-151 ペプチド再刺激後にインビトロで大量の IL-2 および INF- γ も分泌した (図 3 B)。コントロール PBS または hIgG で処置したマウス由来の脾細胞は、INF- γ をほとんどまたは全く産生せず、PLP 139-151 ペプチドの再刺激時に IL-2 を産生しただけであった (図 3 B)。まとめると、これらのデータにより、ex-Tim-3-Ig または s-Tim-

40

50

3 - I gでのインビボ処置によって *ex vivo*でのTh1細胞の過剰増殖およびTh1サイトカインの放出が誘導されることが明らかとなった。

【0233】

(実施例6. 過剰増殖およびTh1サイトカイン産生はTim-3-Ig処置マウス中のT細胞によって媒介される)

免疫化されたTim-3-Ig処置マウスで増殖する細胞型の表現型を決定するために、CD3⁺T細胞、CD11b⁺マクロファージ、およびB220⁺B細胞の細胞集団を、免疫化マウスの脾臓から精製した。精製後、細胞集団を個別に培養し、インビトロで再度組み合わせ、³[H]-チミジン組み込みによって検出される増殖能力について評価した。全ての細胞型のうち、*ex-Tim-3-Ig*で処置したマウス由来の精製CD3⁺T細胞はペプチド再刺激を行わずに非常に増殖するのに対して、コントロールhIgG処置マウス由来のCD3⁺T細胞は低いバックグラウンド増殖レベルしか示さなかった(図4A)。コントロールhIgG処置マウス由来のB220⁺B細胞またはCD11b⁺細胞の各集団は、低い増殖を示した(約10,000cpm;図4A)。*ex-Tim-3-Ig*処置マウス由来のB細胞およびCD11b⁺細胞がhIgG処置コントロールマウス由来のB細胞およびCD11b⁺細胞の2倍の増殖を示す一方で(約20,000cpm;図4A)、この増殖は*ex-Tim-3-Ig*処置マウス由来のCD3⁺T細胞の増殖と比較して最小であった。これにより、*ex-Tim-3-Ig*処置マウスから採取されたT細胞は過剰増殖するが、B220⁺B細胞やCD11b⁺マクロファージは過剰増殖しないことが示唆された。これは、活性化および拡大の大部分がCD11b⁺/F4-80⁺マクロファージ集団で認められるが、T細胞区画やB細胞区画では認められないという抗TIM-3抗体処置マウスにおける所見と対照的である(20)。Tim-3-Ig処置マウスにおける過剰増殖表現型についてのリンパ球に対する依存性は、免疫化RAG-2^{-/-}マウスへのTim-3-Igの投与から得たデータによってさらに支持される。SJL-RAG-2^{-/-}マウスをPLP₁₃₉₋₁₅₁を含むCFAで免疫化して*ex-Tim-3-Ig*または*s-Tim-3-Ig*で処置した場合、抗原再刺激に対する増殖バックグラウンドや応答が認められず、免疫化融合タンパク質処置マウスから採取した脾細胞で認められたバックグラウンド応答がT細胞および/またはB細胞の存在に依存することが示唆される。非免疫化マウスへの*ex-Tim-3-Ig*または*s-Tim-3-Ig*の投与もバックグラウンド増殖応答を増加させたが、T細胞応答をヒトIgまたはTim-3-Ig融合タンパク質のいずれかで再現することができなかったので、これは融合タンパク質中に存在するヒトFcテールに対するポリクローナル応答に起因しなかった。さらに、非免疫化マウスにおけるヒトIgの投与によって基底増殖応答は誘導されなかった(図3A)。これにより、非免疫化マウスにおけるわずかに継続している免疫応答をTim-3-Ig投与によって明らかにすることもできることが示唆される。

【0234】

hIgG処置マウス由来のCD3⁺T細胞をhIgG処置マウス由来のB220⁺B細胞またはCD11b⁺細胞と混合した場合、増殖は低いままであり(約20,000cpm)、*ex-Tim-3-Ig*処置マウス由来のB220⁺B細胞またはCD11b⁺細胞の添加によってわずかに増加するだけであった(約30~40,000cpm)(図4A)。*ex-Tim-3-Ig*処置マウス由来のCD3⁺T細胞をhIgGまたは*ex-Tim-3-Ig*処置マウスのいずれか由来のB220⁺B細胞と培養した場合、最も高い増殖が認められた(~約150,000cpm)(図4A)。興味深いことに、*ex-Tim-3-Ig*処置マウス由来のCD3⁺T細胞をhIgGまたは*ex-Tim-3-Ig*処置マウス由来のCD11b⁺細胞と混合した場合、Tim-3-Ig処置マウス由来のCD3⁺T細胞で認められた自発的増殖が顕著に減少した(精製CD3⁺T細胞のみについては、90,000cpmから30~38,000cpmに低下)(図4A)。まとめると、これらのデータにより、免疫応答の継続中の*ex-Tim-3-Ig*の投与によってCD3⁺T細胞の過剰増殖が誘導され、APCの増殖への影響はより少ないことが示唆される。B220⁺B細胞は、その供給源に関係なく、*ex-Tim-3-Ig*処置

マウス由来のT細胞増殖を増強するのに対し、CD11b⁺マクロファージはex-Tim-3-Ig処置マウス由来のCD3⁺T細胞の自発的過剰増殖を阻害した。

【0235】

これらの各細胞集団のサイトカイン分泌パターンを決定するために、48時間後に上清を採取し、ELISAによってIL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、およびINF- γ 産生について分析した。ex-Tim-3-Ig処置マウス由来の各細胞集団でIL-2の産生が見出された一方で、ex-Tim-3-Igで処置したマウス由来のCD3⁺T細胞は大部分のINF- γ 産生を担った(図4B)。B220⁺B細胞またはCD11b⁺マクロファージ(ex-Tim-3-IgまたはhIgG処置マウスのいずれか由来)の添加により、CD3⁺T細胞によってex-Tim-3-Ig処置マウスからIL-2が分泌された。逆に、ex-Tim-3-Ig処置マウス由来のCD3⁺T細胞へのB220⁺B細胞またはCD11b⁺マクロファージの添加により、これらのCD3⁺T細胞由来のINF- γ 産生が減少した(図4B)。要するに、これらのデータは、ex-Tim-3-Ig処置マウス由来のCD3⁺T細胞の過剰増殖によってINF- γ が大量に産生されたが、IL-2の産生にAPCは必要ないことを証明する。

【0236】

ex-Tim-3-Igでのインビボ処置に応答して過剰増殖する細胞をさらに特徴づけるために、5-ブロモデオキシウリジン(BrdU)(循環細胞によって組み込まれるチミジンアナログ)を組み込んだ細胞の表現型を決定した。Tim-3-Ig処置群における活性化CD3⁺CD25⁺細胞の比率は、hIgG処置コントロール群の2~3倍であった。このデータから(図4C)、hIgG処置コントロールと比較した場合にBrdUが組み込まれたTim-3-Ig処置マウス由来のCD3⁺T細胞の比率が増加することも明らかであった。このデータは、コントロールhIgG処置マウス由来の細胞と比較してTim-3-Ig処置マウス由来の全脾細胞で認められたCD3⁺CD25⁺細胞およびCD3⁺CD69⁺細胞の比率の増加と一致した。この所見はインビトロ増殖およびサイトカインデータを支持し(図4A、4B)、Tim-3-Ig処置免疫化マウス由来のT細胞が高度に活性化された急速に増殖する細胞であることが確認された(図4C)。

【0237】

(実施例7. マウスへのTim-3-Igの投与によって寛容の誘導が無効にする)

インビボでのTim-3-Igの投与によってIL-2産生の増幅を伴ってTh1細胞が過剰に活性化されるので、出願人は、Tim-3-Igの投与によって末梢性寛容の誘導を防止するか無効にすることができるかと仮定した。SJL/Jマウスを高用量の可溶性PLP₁₃₉₋₁₅₁ペプチドで寛容化し、同時にCFA中に乳化したPLP₁₃₉₋₁₅₁で免疫化した。この寛容化プロトコールによってPLP₁₃₉₋₁₅₁特異的T細胞がその後の活性化に寛容性を示すようになり、細胞増殖が低下してIL-2を産生しない(24)。寛容誘導に対するex-Tim-3-Igの効果を試験するために、寛容化マウスを、Tim-3-IgまたはコントロールPBSまたはhIgGで8日間1日おきに処置し、10日目にリンパ節および脾臓を取り出し、増殖およびサイトカイン産生によるPLP₁₃₉₋₁₅₁に対するインビトロリコール(recall)応答について試験した。

【0238】

流入領域リンパ節でT細胞が誘導されて最初に活性化されるので、脾臓に加えて、流入領域リンパ節における寛容の誘導を試験した。図5に示すように、可溶性PLPで寛容化した免疫化マウス由来のリンパ節細胞は、コントロール(PBS寛容化hIgG処置群)と比較して、PLP₁₃₉₋₁₅₁での再刺激に対する増殖が有意に増加した。Tim-3-Igを寛容誘発用量のPLP₁₃₉₋₁₅₁と同時投与した場合、コントロール非寛容化マウスと比較して類似するかさらに高い有意な増殖応答が認められ、寛容誘導に伴ってTim-3-Igが消失または妨害されることが証明された(図5)。コントロールhIgG処置群においてPLP₁₃₉₋₁₅₁での寛容化によってIL-2およびINF- γ 産生が完全に喪失する一方で、Tim-3-Igで処置したマウスは、インビトロ

10

20

30

40

50

にて同族抗原で再刺激した場合にTh1サイトカインを産生し続けた(図5)。

【0239】

マウスの脾臓における寛容誘導の効果を決定した。図5Aに示すように、PLP免疫化マウスにおける可溶性PLP 139-151の同時インビボ投与によってPLP 139-151ペプチドに対する増殖応答が劇的に増加し、可溶性139-151のインビボでT細胞寛容を誘導する能力が確認された。hIgGまたはPBSの可溶性PLP 139-151との投与によって寛容誘導は変化しなかった(図6A)。しかし、ex-Tim-3-Igを寛容誘発用量のPLP 139-151と共に投与した場合、ex-Tim-3-Ig処置マウス由来の脾細胞の増殖は、非寛容化コントロール動物由来の脾細胞で得られた増殖と等価であった(図6A)。したがって、Tim-3-Igの投与により、寛容の誘導を克服するか消失させ、T細胞が拡大する。

10

【0240】

高用量の可溶性抗体はTh1細胞の寛容を支配的に誘導し、特にIL-2産生を阻害することが知られているので、出願人は、次に、寛容化マウスの脾臓におけるサイトカインの産生を調査した。48時間後にインビトロ培養物から上清を採取し、寛容化してTim-3-Ig処置したマウス由来の脾細胞がサイトカインを産生するかどうかを決定するために、IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 、およびINF- γ についてのサイトカインELISAを行った。予想どおり、PLP免疫化マウスへの可溶性PLPの投与によってIL-2産生が阻害された(図6B)。ex-Tim-3-Igの同時投与により、IL-2産生が劇的に増加し、非寛容化PLP免疫化マウスと比較した場合に、ex-Tim-3-Ig処置マウスにおいてより低い抗原濃度でIL-2が産生された(図6B)。PLP免疫化マウスがいかなる有意なINF- γ またはINF- γ 産生を示さないのに対し、寛容化マウスのTim-3-Ig処置により、インビトロでの再刺激時に脾臓培養物からINF- γ およびINF- γ が劇的に産生された(図6B)。最も高い用量の特異的抗原でのインビトロ再刺激においてのみ、寛容化されたex-Tim-3-Ig処置マウス由来の上清で低レベルのIL-4およびIL-10が認められた(図6B)。

20

【0241】

(C. 第1実験の考察)

Th1特異的膜貫通タンパク質としてのTim-3の発見により、Th1細胞とTh2細胞を表現型で区別する新規の手段が得られる。完全に分化した(committed)Th1上で発現したこの細胞表面タンパク質の機能的役割の調査を開始する。最初の研究は、一連の免疫応答中の抗Tim-3抗体の投与によって自己免疫疾患EAEが悪化し、マクロファージの活性化および拡大が起こることを示した(20)。本明細書中に記載のデータで可溶性Tim-3融合タンパク質の使用によるTim-3/Tim-3-リガンド相互作用のインビボ効果の調査を開始する。免疫応答の継続中におけるインビボでのex-Tim-3-Igまたはs-Tim-3-Ig融合タンパク質の投与により、抗原再刺激を行わない場合でさえもTh1サイトカイン(INF- γ およびIL-2)の自発的産生を伴ってT細胞が過剰増殖した。さらに、Tim-3-Igは、高用量の可溶性抗原の投与によって媒介された寛容の誘導を消失または妨害した。

30

【0242】

ナイーブマウスから採取してTim-3-Igで染色したリンパ性細胞のフローサイトメトリー分析により、Tim-3のリガンドがCD4⁺T細胞上で発現することが明らかとなった。さらに、T細胞クローン(Th1表現型またはTh2表現型のいずれか)がTim-3-Igに結合する。少数のCD11c⁺樹状細胞およびCD11b⁺マクロファージもTim-3-Igで染色されるようであるが、CD4⁺T細胞はTim-3-リガンドを発現する主要な細胞型であった。Tim-3に関する本発明者らの最初の所見が、抗Tim-3抗体での免疫化SJL/Jマウスの処置によってマクロファージとTh1細胞との間の細胞間相互作用を介して全脾細胞の基底増殖が増加することを示したので、このデータは一見驚くべきものであった(20)。これにより、Tim-3のリガンドがマクロファージ上で潜在的に発現することおよび抗Tim-3抗体がそのリガンドを介して

40

50

マクロファージを活性化するためにTh1細胞上でTim-3を同時キャッピングするか、負のシグナルを遮断してマクロファージを活性化することが示唆された。考えられる解釈の1つは、Tim-3のリガンドを有し得る小さいが潜在的に重要なマクロファージ集団が抗体投与によってこの様式で活性化されたということである。別の可能性は、インビボでの抗Tim-3抗体処置の際に認められるマクロファージ活性化は他のT細胞上に発現したTim-3-リガンドとのTim-3の相互作用破壊の二次的結果であり得るということである(25)。

【0243】

最終的に分化したTh1細胞上でTim-3-リガンドが発現し、且つCD4⁺T細胞上で潜在的なTim-3-リガンドが発現することを知ることにより、これらのパートナーがどのようにしてインビボで相互作用するのかという問題が提起される。Tim-3融合タンパク質がTim-3-リガンドとインビボで相互作用することができる少なくとも2つの潜在的機構が存在する。第1に、Tim-3-Igは、一連の免疫化中にインビボでCD4⁺T細胞に結合し、このリガンドを介してシグナルを発し得る。このシグナルは、優先的にナイーブCD4⁺T細胞をTh1細胞に分化するか、これらのCD4⁺T細胞の活性化状態を増加させることができる。CFA中のPLP 139-151での免疫化によって得られたTh1環境を仮定すると、これらの活性化細胞は優先的にTh1表現型に二分(polarize)されるので、有意に増加したT細胞増殖およびTh1サイトカインであるIFN- γ およびIL-2の産生が説明される。しかし、プレート結合抗体によるCD3架橋を使用するか使用しないT細胞に対するTim-3-リガンドの直接架橋により、Th1細胞の過剰増殖やTh1サイトカインの産生は誘導されない。これにより、Tim-3-リガンドのTim-3-Igライゲーションによって実際は活性化することができないか、Th1二分化条件下にてインビボで固有に起こり得ることが示唆される。第2の可能性は、Tim-3-Igがリガンド保有細胞(T細胞、マクロファージ、および/または樹状細胞)上でTim-3-リガンドに結合し、それにより、二分化Th1細胞上でTim-3と相互作用する能力を遮断することができることである。Tim-3とTim-3-リガンドとの間の相互作用の正常な生理学的機能がTh1応答を下方制御することである場合、Tim-3-Igの投与によるリガンドの遮断により、認められたTh1細胞増殖の増加およびTh1サイトカイン産生が説明される。

【0244】

本明細書中に記載のデータおよび第2の実験のデータは、Tim-3とそのリガンドとの相互作用が阻害的相互作用であり、且つTim-3-Ig投与によりこの負の相互作用が遮断されてTh1細胞が発現するという仮説を支持する。この可能な機構は、Tim-3-Igの投与によって末梢性寛容の誘導が無効にするというデータによってさらに支持され、Tim-3とTim-3-リガンドとの間の生理学的相互作用がTh1細胞の発現を制限するのに役立ち、エフェクターTh1細胞の寛容の誘導に寄与することが示唆される。Tim-3-Igが寛容誘導を無効にすることができる少なくとも2つの可能な機構が存在する。Tim-3-IgはエフェクターTh1細胞を過剰に活性化することができ、それによって産生されたIL-2は高用量可溶性抗原によるアネルギーの誘導を防止することができる。しかし、別の可能性は、Tim-3-Igが(低親和性TCR/MHC-ペプチド相互作用によって)通常増殖することができない非寛容化T細胞中で増殖およびエフェクター機能を誘導することができ、正味の結果が非応答よりもむしろT細胞拡大であることである。高用量寛容がしばしばTh1細胞を寛容化する一方で、Th2細胞が節約(sparing)または拡大することが知られている(26)。Tim-3-Igの投与によりTh1細胞のこの寛容誘導が無効になるので、Th2細胞は影響を受けないままであり、インビトロでの脾細胞の再刺激の際に認められたTh2サイトカインであるIL-4およびIL-10が産生される(図5B)。

【0245】

本発明者らの結果により、Tim-3/Tim-3-リガンド経路が寛容誘導に重要であり得ることが示唆される。興味深いことに、寛容誘導にCTLA-4が必要であること

10

20

30

40

50

も示された(27)。寛容誘導におけるTim-3およびTim-3-リガンドの重要性を考慮すると、Tim-3/Tim-3-リガンド経路がCTLA-4と類似の形式であるがエフェクターTh1細胞に特異的に免疫応答の負のレギュレーターとして機能することができることが可能である。

【0246】

Tim-3の可溶性のIgドメインのみの形態の発見により、Th1応答の制御における可溶性Tim-3の役割が問題として提起される。このTim-3の可溶性スプライス変異型は、T細胞によって可溶性分子として作製された他の免疫調節/阻害受容体(例えば、CTLA-4)に類似し、受容体のこれらの可溶性の選択的スプライシング形態は自己免疫疾患に対する感受性および耐性で重要な役割を果たすことが示されている(23)。しかし、この段階では、Th1細胞分化のどの時点でs-Tim-3が作製されるかおよびどのように機能するのかは明らかでない。本データによって示唆されるように、Tim-3/Tim-3-リガンド相互作用が阻害相互作用である場合、s-Tim-3-Igの産生により、この阻害効果を遮断し、Th1細胞の拡大および分化を促進するように作用することができる。Tim-3-リガンドへのTim-3の結合がTim-3-リガンドへの膜結合ex-Tim-3の阻害的結合と競合する場合にこれが起り得る。この競合は、Tim-3-リガンドへのex-Tim-3のライゲーションを減少または防止することができ、その後、Th1応答の下方制御を減少させるか無効にする。mRNAおよびタンパク質レベルでのs-Tim-3に対するex-Tim-3の産生の潜在的調節により、エフェクターTh1細胞の免疫機能の動的調節手段を得ることができる。

【0247】

s-Tim-3はIgVドメインのみを含むがムチンドメインを欠くので、このデータにより、Tim-3の免疫調節活性の大部分をそのIgドメインによって媒介することができることがさらに示唆される。予備データにより、s-Tim-3-IgがCD4⁺T細胞への高親和性/アビディティ結合を示し、インビボでより強力な免疫調節効果も媒介することが示唆される。ピコルナウイルス科のメンバー(ポリオウイルスおよびライノウイルスなど)およびヒト免疫不全ウイルス(HIV)は後続の機能ドメインよりもむしろ受容体のIgドメインに結合することが以前に示されている(28~31)。さらに、havcr-1(ピコルナウイルス科のメンバーであるA型肝炎ウイルス(HAV)の受容体)は、havcr-1のN末端システイン(Cys)リッチ領域(受容体のIgドメインの一部である)を介してHAVに結合することが示されている(28、29)。havcr-1がマウスTim-1のヒトホモログ(Tim遺伝子ファミリーのメンバー)であると仮定すると(19)、Tim-3が類似の様式でそのIgドメインを介してそのリガンドと相互作用することができることは理にかなっている。

【0248】

Tim-3の全長膜固定形態の一部であるムチンドメインの潜在的な機能的役割は不明確である。havcr-1のトレオニン/セリン/プロリン(TSP)リッチなムチン様領域がHAVへの結合を容易にするために細胞表面上にCysリッチ領域を広げるのに役立つと主張されている(28、32)。Tim-3のムチンドメインは、機能的結合様式よりもむしろ類似の構造で機能することができる。別の可能性は、Tim-3のムチンドメインがセクレチンと相互作用することができる炭水化物部分を提示することができるので、エフェクターTh1細胞の輸送を容易にすることができることである。リンパ球ホーミング促進におけるこのような役割は、構造的に類似の多ドメイン受容体MAdCAM-1のムチン領域のためであると主張されている(33)。

【0249】

まとめると、これらのデータにより、Tim-3のそのリガンドとの相互作用によって正常なT細胞免疫応答中にTh1細胞の発現および機能を調節する阻害経路が得られることが示唆される。この経路はまた、エフェクターTh1細胞の末梢性寛容の調節で重要な役割を果たし得る。

【0250】

10

20

30

40

50

(D . 参考文献)

【 0 2 5 1 】

【 化 1 】

1. Mosmann, T., Cherwinski, H., Bond, M., Giedlin, M. & Coffman, R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357 (1986).
2. Mosmann, T. & Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 19, 138-146 (1996).
3. Abbas, A., Murphy, K. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793 (1996).
4. Sher, A. & Coffman, R. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol.* 10, 385-409 (1992).
5. Liblau, R., Singer, S. & McDevitt, H. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16, 34-38 (1995).

【 0 2 5 2 】

【化2】

6. Nicholson, L., Greer, J., Sobel, R., Lees, M. & Kuchroo, V. An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 3, 397-405 (1995).
7. Kuchroo, V. et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80, 707-718 (1995).
8. Lack, G. et al. Nebulized but not parenteral IFN-gamma decreases IgE production and normalizes airways function in a murine model of allergen sensitization. *J Immunol* 152, 2546-2554 (1994). 10
9. Hofstra, C. et al. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. *J Immunol* 161, 5054-5060 (1998).
10. Syrbe, U., Siveke, J. & Hamann, A. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin Immunopathol* 21, 263-285 (1999). 20
11. Loetscher, P. et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391, 344-345 (1998).
12. Bonecchi, R. et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187, 129-134 (1998).
13. Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. & Lanzavecchia, A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187, 875-883 (1998). 30
14. Venkataraman, C., Schaefer, G. & Schindler, U. Cutting edge: Chandra, a novel four-transmembrane domain protein differentially expressed in helper type 1 lymphocytes. *J Immunol* 165, 632-636 (2000).
15. Jourdan, P. et al. IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells. *J Immunol* 160, 4153-4157 (1998).
16. Lohning, M. et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6930-6935 (1998). 40

【0253】

【化3】

17. McAdam, A. et al. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J Immunol* 165, 5035-5040 (2000).
18. Zingoni, A. et al. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol* 161, 547-551 (1998).
19. McIntire, J. et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2, 1109-1116 (2001). 10
20. Monney, L. et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415, 536-541 (2002).
21. Zheng, X. et al. Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J Immunol* 154, 5590-5600 (1995).
22. Sanchez-Fueyo, A. et al. The Ig superfamily member Tim-3 inhibits Th1-mediated auto- and allo-immune response and promotes immunological tolerance. (submitted). 20
23. Ueda, H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423, 506-511 (2003).
24. Perez, V. et al. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6, 411-417 (1997).
25. Kuchroo, V., Umetsu, D., DeKruyff, R. & Freeman, G. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 3, 454-462 (2003).
26. Burstein, H. & Abbas, A. In vivo role of interleukin 4 in T cell tolerance induced by aqueous protein antigen. *J Exp Med* 177, 457-463 (1993). 30
27. Greenwald, R., Boussiotis, V., Liorbach, R., Abbas, A. & Sharpe, A. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14, 145-155 (2001).
28. Thompson, P., Lu, J. & Kaplan, G. The Cys-rich region of hepatitis A virus cellular receptor 1 is required for binding of hepatitis A virus and protective monoclonal antibody 190/4. *J Virol* 72, 3751-3761 (1998).

【0254】

【化4】

29. Silberstein, E., Dveksler, G. & Kaplan, G. Neutralization of hepatitis A virus (HAV) by an immunoadhesin containing the cysteine-rich region of HAV cellular receptor-1. *J Virol* 75, 717-725 (2001).
30. Xing, L. et al. Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *EMBO J* 19, 1207-1216 (2000).
31. Kaplan, G. et al. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J* 15, 4282-4296 (1996). 10
32. Jentoft, N. Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* 15, 291-294 (1990).
33. Briskin, M., McEvoy, L. & Butcher, E. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* 363, 461-464 (1993).
34. Kovac, Z. & Schwartz, R. The molecular basis of the requirement for antigen processing of pigeon cytochrome c prior to T cell activation. *J Immunol* 134, 3233-3240 (1985). 20
35. Matis, L. et al. Clonal analysis of the major histocompatibility complex restriction and the fine specificity of antigen recognition in the T cell proliferative response to cytochrome C. *J Immunol* 130, 1527-1535 (1983).
36. Nicholson, L., Murtaza, A., Hafler, B., Sette, A. & Kuchroo, V. A T cell receptor antagonist peptide induces T cells that mediate bystander suppression and prevent autoimmune encephalomyelitis induced with multiple myelin antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9279-9284 (1997). 30

(第2の実験)

(A. 序論)

Tヘルパー(T_h)前駆細胞のTエフェクター集団への分化およびクローン性増殖は、適応免疫応答において重要な役割を果たし、細胞内のウイルスおよび病原菌に対して防御する。しかし、T_hエフェクター細胞の非拘束活性化も多数の炎症性障害の根底にあることが示されている。この文脈では、T_h1エフェクター細胞は、関節リウマチ、炎症性腸疾患(IBD)、および他の自己免疫障害(I型糖尿病および多発性硬化症(1、2)ならびに同種移植片拒絶(3、4)が含まれる)の病理発生に関与する。対照的に、T_h2細胞の活性化は、アレルギー性喘息(5)の病理発生において重要な役割を果たし、移植片寛容の獲得に関与している(3、4)。T細胞活性化および分化様式の範囲を、主にT細胞受容体(TCR)媒介刺激の持続時間および強度によって決定する(6)。さらに、多数の同時刺激分子および補助分子(TNF受容体(7)および免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーメンバー(8)ならびにIL-2などのサイトカインが含まれる)は、クローン性増殖、欠失、および/またはアネルギー誘導の範囲を調節する(9)。しかし、出願人はナイーブT細胞の活性化を調製する多数の細胞機構および分子機構を認識している一方で、エフェクターT細胞の小集団の運命を決定する分子は依然として解明されていない。

【0255】

IgスーパーファミリーメンバーTIM-3(T細胞免疫グロブリンドメイン、ムチンドメイン)は、Monney et al.(10)によって分化したT_h1細胞上で優

先に発現される膜貫通タンパク質として最初に記載された。実験的アレルギー性能脊髄炎 (EAE) (Th1 媒介自己免疫疾患) のモデルでは、抗 TIM-3 モノクローナル抗体 (mAb) のインビボ投与により、脳内により重篤な炎症性事象およびより重篤な疾患を発症する。これらの所見に基づいて、TIM-3 は、EAE における組織破壊性免疫応答の負のレギュレーターとして提案された (10)。しかし、これらのデータが TIM-3 によって得られる負のシグナルの阻害を反映しているかどうかまたはインビボでの mAb の TIM-3 架橋が T 細胞活性化および疾患の悪化を誘導するための正のシグナルを発するかどうかについては不確かなままである。本明細書中に報告した結果に基づいて、出願人は、TIM-3 のその推定リガンドへの固定により、インビボでの炎症反応を抑制するための阻害シグナルが得られると結論づけた。Tim-3-Ig 融合タンパク質処置を介した TIM-3 経路の遮断は、NOD (非肥満性糖尿病) モデルにおける糖尿病の発症が促進し、CTLA4 およびドナー特異的輸液 (DST) + 抗 CD154 (CD40L) 処置 (強力な同時刺激遮断ベースの寛容促進移植プロトコル (11~13)) の組み合わせの MHC 適合同種移植片の寛容を誘導する能力を無効にする。関連する正確な機構が依然としてほとんど解明されていないが、出願人は、調節 T 細胞の免疫応答を抑制する能力の調整によって、TIM-3 が少なくとも一部の自己免疫応答および同種免疫応答の結果を調節すると提案する。

10

【0256】

(B. 方法)

(マウス)

20

全マウスを、The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) から入手し、関連機関および州のガイドラインにしたがって、Millenium Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, MA, USA)、Beth Israel Deaconess Medical Center (Boston, MA, USA)、または DRFZ (Berlin, Germany) の従来の動物施設にて特定の無病原体条件下で維持した。

【0257】

(マウス TIM-3 の同定およびクローニング)

Th1 特異的ライブラリーを、Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech, Palo Alto, CA) を使用して生成した。活性化 Th1 クローン由来の RNA を「テスター」として使用し、活性化 Th2 クローン由来の RNA を「ドライバー」として使用した。各クローン由来のプラスミド DNA を、ナイロンフィルターにスポットし、Th1 および Th2 RNA 由来の一本鎖プローブとハイブリッド形成させた。Th1 ライブラリー中のクローンのうちの 1 つは 857 bp の cDNA からなり、これを使用し、マウス Th1 細胞由来の cDNA ライブラリーを使用して全長クローンを得た。その後ヒトホモログを同定し、ヒト脾臓 cDNA ライブラリーから配列決定した。マウス抗原特異的 Th1 (AE7 and Dorris) および Th2 (D10.G4、DAX、CDC25) クローンを、10~14 日毎にペプチド、マイトマイシン C 処理 APC、および IL-2 (100 U/ml) で刺激した。細胞を抗 CD3 mAb (2C11, Pharmingen) で活性化し、RNA を単離した。次いで、TIM-3 cDNA の差分発現を、静止および抗 CD3 活性化クローン由来のノーザンプロットによって確認した。

30

40

【0258】

(TIM-3 mAb および TIM-3 融合タンパク質の生成)

TIM-3 の細胞外ドメインを含む DNA 配列を PCR 増幅し、CD5 シグナル配列およびヒト IgG 定常領域を含むベクターにクローン化した。COS 細胞をトランスフェクトし、組換えタンパク質をプロテイン A カラムで精製した。Wky ラットを、精製マウス TIM-3 融合タンパク質 (100 µg) を含む CFA で免疫化し、i.p. および皮下に追加免疫した。脾細胞を SP/2 骨髄腫細胞と融合し、得られたクローンを Tim-3 トランスフェクト CHO 細胞への結合についてスクリーニングした。これらのクローンの

50

うちの1つ(8H7)を、ICOSトランスファクタントではなくTIM-3への特異的結合に基づいて選択した。抗TIM-3 8H7 mAbを、特異的抗体(BD Pharmingen, San Diego, CA)を使用してラットIgG1としてアイソタイプ分類を行った。第1の実験に記載用に、ex-Tim-3-Igおよびs-Tim-3-Igを、ヒトIgG1 Fcテール融合タンパク質として構築し、NS.1中で発現させた。TIM-3L染色実験のために、ビオチン化TIM-3関連融合タンパク質またはヒトIgG1を蛍光色素抱合streptavidin(BD Pharmingen)と共に使用した。

【0259】

(島移植)

以前に記載のように島移植を行った(51)。約700 DBA/2(H-2^d)の島を、streptozotocin誘導性糖尿病C57BL/6(H-2^b)の腎被膜下に移植した。同種移植片の機能を、連続的血糖測定によってモニタリングした。使用した寛容化プロトコールは、移植28日前(-28日目)の10⁷ DBA/2脾細胞のi.v.投与および-28日目、-26日目、-24日目の250μgのハムスターmAb抗マウスCD154(MR1, IgG2a, ATCCHB11048, American Type Culture Collection, Rockville, MD)のi.p.投与からなる。ex-Tim-3-IgコントロールhIgG1を、250μgの用量で-28日目、-26日目、-24日目にi.p.投与した。選択されたレシピエントでは、200μgのラット抗マウスCD25 mAb(PC61, 5.3, IgG1, ATCCTB222)も-40日目、-38日目、-36日目i.p.投与した。出願人は、以前に、このような用量で投与した抗CD25 mAbが二次リンパ器官および末梢血の両方で80%を超えるCD4+CD25+T細胞を消失すると判断している。いくつかの実験では、移植から0、2、4、6、8日後の0.1μgのCTLA4 Igの投与によって寛容が誘導された。

【0260】

(リアルタイムPCR実験)

トリゾール(trizol)を使用して島移植片から総RNAを抽出し、Multiscripted Reverse Transcriptase Enzyme(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して逆転写を行った。ABI7700配列検出システム(PE Applied Biosystems)を使用して、リアルタイムPCRを行った。mRNAレベルを定量するために、標的遺伝子の発現を、ハウスキーピング遺伝子GAPDHに対して正規化し、データを、研究サンプルと校正サンプルとの間のcDNA相違の相対倍率として示した。TIM-3プライマー/プローブ配列は以下である：プローブ、5'-ACAGCTGCCTGCC CAGTGCCC-3'；正方向プライマー、5'-GCCGGTGGACCTCAGTTTC-3'；逆方向プライマー5'-TGGGAGCCAGCACAGATCA-3'。GAPDH、IFN-、IL-4、およびIL-10プライマー/プローブ組を、Applied Biosystemsから購入した。

【0261】

(皮膚同種移植片レシピエントへの細胞養子免疫伝達)

リンパ節細胞の単一細胞懸濁液を、ナイーブC3H/Heマウス(H-2^k)または10⁷ DBA/2脾細胞(28日前；-28)および抗CD154(-28日目、-26日目、および-24日目に250μg)または抗CD154+ex-Tim-3-Ig(-28日目、-26日目、および-24日目にそれぞれ250μg)のいずれかのi.v.注射で処置したC3H/Heマウスから得た。細胞を、蛍光色素抱合抗CD25および抗CD4(全てBD Pharmingen)で染色し、MoFlo(登録商標)高処理細胞分取器(Cytomation; Fort Collins, CO)で分取した。CD4+CD25-およびCD4+CD25+調製物の純度は、一貫して90%超であった。種々の数のCD4+CD25+T制御因子(regs)およびCD4+CD25-エフェク

10

20

30

40

50

ターT細胞を、24時間後に同種DBA/2皮膚移植を受けたC3H/HeScidマウス宿主の尾静脈に注射した。いくつかの実験では、3回分の250 μ gのex-Tim-3-Igを、皮膚移植から0、2、および4日後に投与した。全層DBA/2の尾皮膚同種移植を以前に記載のように行い(52)、移植片の生存を毎日モニタリングした。拒絶を、皮膚移植片の完全な壊死と定義する。T細胞集団のドナーとしての野生型C57BL/6マウスおよびDBA/2皮膚同種移植片のレシピエントとしてのC57BL/6Rag^{-/-}を使用して、類似の実験を行った。

【0262】

(インビトロ増殖アッセイ)

CD4+T細胞小集団の増殖を評価するために、CD4+CD25+およびCD4+CD25-T細胞を以前に記載のように分取し、丸底96ウェルマイクロタイタープレート中にて5 \times 10⁵/mLの細胞密度で2 μ g/mL抗CD3mAb、5 μ g/mL抗CD28mAb、および100U/mLのrIL-2(全てPharMingen)と共に培養した。細胞を回収し、ビオチン化s-Tim-3-IgまたはコントロールヒトIgG1およびその後のストレプトアビジン-シトクロムで24時間および48時間染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

【0263】

(C.第2の実験の例)

(実施例11.TIM-3リガンドはCD4+T細胞上に発現する)

TIM-3の構造は、粘膜アドレシン細胞接着分子1(MAdCAM-1)をいくらか連想させ、2つのIgドメインおよびムチンリッチ領域を含む(10)。推定TIM-3リガンド(TIM-3L)の分布を評価するために、マウスTIM-3(全長またはex-Tim-3-Ig)の細胞外ドメインまたは短縮した可溶性Igドメインのみ(s-TIM-3-Ig)(16)を組み込んだヒトIgG1由来Fc融合タンパク質を生成した。ex-Tim-3-Igおよびs-TIM-3-Igは共に静止CD4+T細胞に結合するがCD8+、B220+、CD11b+細胞に結合せず(図8C)、s-TIM-3-Ig結合がより強力であった。脾臓CD11c+樹状細胞(図7A)へのいくつかの結合も認められたが、染色パターンはCD4+T細胞よりもはるかに一貫性が低かった。ex-Tim-3-Igと比較したs-TIM-3-Igを用いて認められた増幅染色パターンに基づいて、TIM-3のIgドメインは、TIM-3Lとの相互作用を担うようである。

【0264】

(実施例12.活性化後にCD4+CD25-T細胞はTIM-3L発現を下方制御するが、CD4+CD25+調節T細胞は下方制御しない)

静止条件では、TIM-3関連融合タンパク質は、エフェクターCD4+CD25-T細胞および調節CD4+CD25+T細胞小集団の両方を同様に結合する(図7B、上のパネル)。TIM-3が調節またはエフェクターCD4+T細胞のいずれかの機能を選択的にターゲティングすることができる潜在的機構を同定するために、s-TIM-3-Igの結合によって評価した、インビトロ活性化後のCD4+CD25-およびCD4+CD25+T細胞上でのTIM-3Lの発現速度を研究した。抗CD3および抗CD28mAbでの刺激により、培養の最初の24時間ではTIM-3L発現は変化しなかった(図7B、中央のパネル)。対照的に、培養48時間後の活性化CD4+CD25-T細胞に対するTIM-3L発現は下方制御される一方で、CD4+CD25+調節T細胞に対するTIM-3L発現は残存した(図7Bの下のパネル)。CD4+CD25-T細胞に対するTIM-3L発現の下方制御は、コンカナバリンAまたはLPSでのインビトロ活性化時にも認められた。活性化調節T細胞における推定TIM-3Lの優先的発現を、活性化Th1細胞上のTIM-3の発現によってモニタリングする。したがって、出願人は、TIM-3/TIM-3L相互作用がTh1媒介免疫応答における免疫調節および寛容の獲得および/または維持に重要であるという仮説を調査した。

【0265】

10

20

30

40

50

(実施例16. TIM-3経路の遮断は同種移植片モデルの寛容の獲得を防止する)
 移植免疫寛容をTh1およびTh2二分化条件下で行うことができる一方で(4、25、26)、Th2に対するTh1の免疫偏向(immunodeviation)により、寛容の発生が容易になる(4、27)。実際、多数の寛容化免疫抑制投薬計画の結果は、Th2型同種移植片応答への免疫偏向に関連する(4)。同種移植片寛容の獲得におけるTh1特異的TIM-3細胞表面タンパク質の役割を解明するために、CD40-CD154同時刺激遮断を達成するためにレシピエントをドナー特異的注入(DST)と抗CD154(CD40L)との組み合わせで処置した島同種移植片モデルを使用した(11、12、28)。このモデルでは、移植1ヶ月前に投与した単回用量のDSTおよび抗CD154により、MHC適合島同種移植片の不確実な生存が確実になる。さらに、処置した長期生存移植レシピエントは同ドナー由来の第2の移植片を容易に受け入れる一方で、第三者の移植片を容易に拒絶し、処置がドナー特異的同種移植片拒絶を誘導することを示す(12、28)。対照的に、未処置コントロールレシピエントでは、島浸潤性リンパ球浸潤物が移植から7日後に認められ、ほとんどの同種移植片が移植から20日目までに完全に破壊される(12、28)。

10

【0266】

TIM-3発現がこのモデルに関連するかどうかを決定するために、リアルタイムPCR実験を実施して、処置レシピエントおよびコントロールレシピエントにおける移植片内遺伝子発現を比較した。移植7日後に処置宿主およびコントロール宿主の両方で高い移植片内INFおよびTIM-3遺伝子発現がみとめられる一方で(図8A)、長期生存寛容レシピエントにおける同種移植片応答(移植120日目)を、平滑末端化TIM-3およびINF移植片内遺伝子発現によって特徴づける(図8A)。IL-2の移植片内発現は、7日目の処置および未処置宿主の両方においてTIM-3およびINFの移植片内発現と密接に関連する。対照的に、7日目および120日目で拒絶された移植片と比較したところ、DST+抗CD154処置宿主においてIL-4およびIL-10の移植片内発現の2~3倍の増加が認められる。したがって、処置はTh2型遺伝子発現の上方制御に関連する一方で、Th1応答は移植免疫寛容の維持期(120日目)に起こるが、誘導期(7日目)に起こらない。

20

【0267】

次に、完全なTIM-3経路には移植免疫寛容の達成が必要であるかどうかを評価した。DST+抗CD154とのex-Tim-3-Igの投与により、島同種移植片寛容の獲得が防止されて、急速に拒絶される(図8B)。さらに、ex-Tim-3-Ig投与により、高用量の抗CD154での単剤療法によって媒介される寛容の誘導も無効になる。

30

【0268】

TIM-3経路が抗CD154+/DST処置で寛容化される機能のみにおいて重要であるかどうかを決定するために、CTLA4Ig投与によって寛容化される移植モデルにおけるTIM-3遮断の効果を試験した。インビボでのCTLA4Igの作用機構は、抗原反応性T細胞増殖の阻害ならびに免疫調節および末梢性寛容の誘導の両方に関連する(30~32)。CTLA4Ig処置によって9つの処置したレシピエントのうちの7つで島同種移植片が不正確に生着する一方で、ex-Tim-3-Igの同時投与によって同種移植片の大部分が拒絶された(図8C)。第1の実験の結果をまとめると、これらのデータは、TIM-3が免疫寛容の重要なレギュレーターであることを明らかに示す。

40

【0269】

(実施例16. TIM-3遮断はCD4+CD25-T細胞が同種移植片を拒絶する能力を抑制するナイーブCD4+CD25+調節T細胞の能力を排除しない)

出願人は、以前に、CD4+CD25+調節T細胞がDST+抗CD154で誘導された寛容状態の維持に重要に関連すると判断している(12)。出願人は、本発明で、この調節T細胞サブセットも移植免疫寛容の誘導期に必要であるかどうかを試験した。興味深いことに、CD4+CD25+T細胞サブセットの枯渇の結果がex-Tim-3-Ig

50

投与によって誘導された効果と類似し、島同種移植片の急速な拒絶が抗CD25mAb処置宿主で認められた(図9A)。

【0270】

これらの結果に基づいて、ナイーブ宿主中に存在するCD4+CD25+調節T細胞を保有するTIM-3LによるTh1エフェクター細胞上で発現したTIM-3の関与がその免疫抑制機能の必要条件であり得ると仮定した。ナイーブマウスから採取した調節T細胞がTIM-3が関与しないでその免疫抑制機能を発揮することができるかどうかを決定するために、TIM-3遮断の非存在下でCD4+CD25-T細胞によって媒介される同種移植片拒絶を防止するナイーブCD4+CD25+T細胞の能力を評価する養子免疫伝達実験を行った。このモデルでは、わずか 1×10^5 個のCD4+CD25-またはCD8+T細胞の免疫不全MHC不適合皮膚同種移植片レシピエントへの導入によって急速な皮膚同種移植片拒絶が起こる一方で、導入されたナイーブCD4+CD25+T細胞は拒絶を誘導してCD4+CD25-エフェクターT細胞集団が移植片を破壊するのを防止する(33、34)。DBA/2皮膚同種移植片のC3H/He Scidレシピエントへのex-Tim-3-Igの投与により、導入されたナイーブCD4+CD25+T細胞の同時導入CD4+CD25-T細胞が同種移植片拒絶するのを防止する能力を阻害しなかった(図9B)。ナイーブCD4+CD25+T細胞をナイーブCD4+CD25-T細胞またはTh1二分化CD4+T細胞のいずれかと同時培養し、ex-Tim-3-Igの非存在下で可溶性抗CD3で刺激した場合、インビトロで同様の結果が認められた。さらに、 1×10^5 個のCD4+CD25-T細胞のみの導入により、ex-Tim-3-IgまたはコントロールhIgGを投与したかと無関係に等しい急速な皮膚移植片拒絶が生じた。まとめると、これらの結果は、ナイーブ同種抗原未経験マウスから採取したCD4+CD25+調節T細胞がTIM-3と関与せずにTh1依存性細胞変性応答を抑制することができることを示す。したがって、TIM-3遮断は抗原未経験CD4+CD25+T細胞の免疫調節エフェクター機能を消失せず、CD4+CD25-T細胞が皮膚同種移植片を拒絶する能力を顕著に増強しない。

【0271】

(実施例17. TIM-3は同種抗原特異的CD4+CD25+調節T細胞集団の有効性の強化を調節する)

移植免疫寛容を引き起こすいくつかの治療計画は、抗原特異的CD4+CD25+調節T細胞の有効性を強化することが知られている(33~35)。同種抗原特異的CD4+CD25+T細胞の生成に対するDST+抗CD154処置の影響を決定するために、ナイーブ宿主またはDST+抗CD154で処置したマウスから採取したCD4+CD25+T細胞の免疫抑制能力を比較するためのさらなる養子免疫伝達実験を行った。処置または未処置のナイーブマウスから採取したCD4+CD25-またはCD8+T細胞は急性皮膚同種移植片拒絶を促進する能力を変更せず(CD4+CD25-T細胞のデータを図9Cに示す)、このモデルでは、DST+抗CD154処置はエフェクターT細胞集団に大きな影響を与えないことを示す。対照的に、DST+抗CD154処置宿主から分取したCD4+CD25+T細胞は、ナイーブマウスから採取したCD4+CD25+T細胞よりもナイーブCD4+CD25-T細胞に対する免疫抑制効果はるかに高かった。したがって、高いCD4+CD25+:CD4+CD25-比(4:1)で導入した場合にナイーブCD4+CD25+T細胞はCD4+CD25-T細胞が皮膚同種移植片を拒絶するのを防止することができる一方で(図9C、中央のパネル)、DST+抗CD154処置宿主から採取したCD4+CD25+T細胞のみでは1:1の調節T細胞:エフェクターT細胞比で有効な免疫抑制を媒介することができる(図9C、右のパネル)。顕著には、DST+抗CD154処置後に認められたこの増強された免疫抑制表現型は非常にドナー特異的であり、これは、DST+抗CD154を使用して異なるドナー株(C57BL/6)に対して寛容化された宿主から採取したCD4+CD25+T細胞が、ドナーDBA/2皮膚同種移植片に反応してナイーブCD4+CD25+T細胞よりも高い移植片防御効果を媒介しなかったからである(皮膚同種移植片生存時間の中央値は、それぞれ1

10

20

30

40

50

4日および12日、n = 5および7)。さらに、DSTおよび抗CD154は共に免疫調節効果の増強に必要であり、これは、CD40 - CD154同時刺激遮断を使用しない同種抗原の供給がインビボでのCD4 + CD25 + T細胞の免疫抑制機能に対して検出可能な効果を示さなかったからである。

【0272】

これらの所見により、DST + 抗CD154が、ドナー特異的CD4 + CD25 + 調節T細胞の免疫抑制機能の増強によって寛容化効果を大いに発揮することが示唆される。次いで、出願人は、TIM-3経路がこの治療効果に重要であるかどうかという問題に取り組んだ。CD4 + CD25 + T細胞をDST + 抗CD154処置マウスから採取し、その免疫抑制機能を、DST、抗CD154、およびex-Tim-3-Igで処置した宿主から得た調節T細胞の免疫抑制機能とインビボで比較した。DST + 抗CD154処置によって付与された増強された同種抗原特異的抑制表現型は、ex-Tim-3-Igの同時投与によって消失し(図9D)、これは、ex-Tim-3-Igを投与した処置宿主から採取したCD4 + CD25 + T細胞がナイーブ調節細胞よりも高い抑制効果を発揮しなかったからである(図9D)。これらの実験では、ex-Tim-3-IgをCD4 + CD25 + T細胞ドナーにのみ投与し、皮膚移植片レシピエントを全く処置しないので、ex-Tim-3-Ig処置によりCD4 + CD25 + T細胞とCD4 + CD25 - T細胞との間の相互作用を妨害される可能性が最小になる。実際、本発明者らの養子免疫伝達モデルでは、出願人は、移植後のex-Tim-3-Igの投与により、前に生成されたドナー特異的CD4 + CD25 + T細胞の防御効果を無効にしないことに気づいた。まとめると、本発明者らのデータにより、i) TIM-3経路が寛容誘導の間にCD4 + CD25 + T細胞によってドナー特異的免疫調節特性の獲得を容易にし、ii) TIM-3 / TIM-3L相互作用がドナー特異的CD4 + CD25 + 免疫調節T細胞の生成に重要であるが、免疫抑制エフェクター機能に重要ではないことが示唆される。

【0273】

(実施例18: TIM-3リガンドとしてのガレクチン-9の同定)

推定TIM-3リガンドの発現の分布を分析するために、TIM-3-Ig融合タンパク質による細胞表面染色を使用して、TIM-3リガンド発現細胞型をスクリーニングした。flTIM-3-IgおよびsTIM-3-Igは共に静止CD4 + T細胞ならびに脾臓CD11c + 樹状細胞およびCD11b + マクロファージの小集団に結合するが、CD8 + またはB220 + 細胞に結合しないことが示され(Sabatoss et al. Nat Immunol 4:1102-1110, Sanchez-Fueyo et al. Nat Immunol 4:1093-1101)、これは、TIM-3リガンドが主に静止CD4 + T細胞上で発現することを示す。したがって、多数のT細胞株/T細胞リンパ腫をスクリーニングした。FACSの結果は、試験した3つのT細胞株はこれまでのところsTim-3-Igに結合するがヒトIgG1コントロールに結合せず、そのうちのTK-1(T細胞リンパ腫)がsTim-3-Igに最も結合することを証明した(図10A)。flTIM-3-Igによる染色は類似の結果を示した(図10A)。

【0274】

特異的細胞外膜結合TIM-3結合タンパク質を同定するために、生きたTK-1細胞をビオチン標識し、ホールセル溶解物を、TIM-3-Ig融合タンパク質とのインキュベーションによる破壊アッセイに供した。SDS-PAGE-ウェスタンブロットの結果は、flTim-3-IgおよびsTim-3-Igが共に分子量範囲が40 ~ 60 kDのタンパク質またはタンパク質複合体を沈殿させることができることを証明した(図1b、レーン1、2)。TIM-2-IgまたはhIgG破壊タンパク質由来のコントロール群と比較して(図10b、レーン3、4)、40 ~ 60 kDのバンドは、flTIM-3-IgおよびsTIM-3-Igに特異的である。PNGアーゼFによってN結合オリゴ糖鎖を除去した場合、分子量が40 ~ 60 kDのバンドは35 kDに減少した。³⁵S-Met代謝標識TK-1細胞由来の細胞溶解物を使用した同一の実験により、この35 k

Dのバンドの汚染可能性がさらに排除された。銀染色SDS-PAGEゲルから抽出した35kDバンドの質量分析により、タンパク質がガレクチン-9(リンパ球および他の細胞型上で発現する多数のガレクチンファミリー)と同定された。

【0275】

(実施例19. ガレクチン-9とTIM-3との間の特異的相互作用)

ガレクチンは、細胞表面上の糖部分に結合するための炭水化物認識ドメイン(CRD)を含む - ガラクトシド結合レクチン群であり、レクチンは、免疫細胞のホメオスタシスの主なレギュレーターである(Rabinovich et al. Trends Immunol 23:313-320; Rabinovich et al. Biochim Biophys Acta 1572:274-284)。ガレクチンは、ER-ゴルジ経路分泌のためのシグナルペプチドを含まない。IL-1のように、ガレクチンは別経路を介して細胞外に分泌される。TK-1細胞由来の総RNAを、ガレクチン-9cDNAをクローン化するためのRT-PCRのために調製した。2つのガレクチン-9コード配列をクローン化し、その後標準ガレクチン-9cDNAとして見出され、ガレクチン-9の2つのCRDドメインのヒンジ領域中に31個のアミノ酸が挿入されているその長鎖イソ型は腸上皮で主に発現されると報告されている。

【0276】

ガレクチン-9とTIM-3との間の相互作用を確認するために、両ガレクチン-9イソ型cDNAを、EGFPタンパク質をバイシストロン性に発現する発現ベクターにサブクローン化した。ガレクチン-9発現プラスミドがCHO細胞に一過性にトランスフェクトされた場合、EGFPを発現する細胞はガレクチン-9を同時に発現する。一過性トランスフェクションでは、ガレクチン-9の発現は、細胞表面上で検出されなかった。一過性にトランスフェクトされたCHO細胞におけるガレクチン-9の発現を別の輸送機構から分離することが可能である。したがって、タンパク質産物が細胞質中に蓄積され得る。細胞内染色によってEGFP陽性のトランスフェクトされたCHO細胞由来のsTim-3-IgおよびflTIM-3-Igによる同一の陽性染色パターンが明らかとなること確かであり、TIM-3融合物と相互作用する場合に標準的なガレクチン-9とその長鎖イソ型との間の相違が示唆されない。しかし、これらはいずれもhIgGコントロールに結合することができない(図11A)。

【0277】

ガレクチン-9とTIM-3との間の結合特異性を証明するために、ガレクチン-9を一過性にトランスフェクトしたCHO細胞を、細胞内染色に供した。flTIM-3-IgおよびsTIM-3-Igは、ガレクチン-9発現細胞中で全ての陽性染色を有する唯一の融合タンパク質である。それに反して、TIM-2-Ig、TIM-4-Ig、およびhIgGは同一のトランスフェクトされたCHO細胞に結合することができず、TIM-3は、他のTIMファミリーメンバーと比較してガレクチン-9に対する親和性が最も高いと示唆される。別のアプローチとして、精製組換えガレクチン-9をsTIM-3-Igによって特異的に破壊することができるが、TIM-2およびTIM-4 Ig融合物ではできない(図11C)。他方では、flTIM-3-IgおよびsTIM-3-Igのみが共にガレクチン-9発現細胞への陽性結合を示すのに対して、細胞が非常に高いレベルのこれらのタンパク質を発現しない限り、これらはガレクチン-1、3、および4に結合せず、TIM-3とこれらのガレクチンとの間の一定レベルの非特異的相互作用が示唆される(図11C)。

【0278】

要するに、ガレクチン-9は、TIM-3細胞外部分に特異的に結合するタンパク質である。flTIM-3-IgおよびsTIM-3-Igは共にガレクチン-9に結合することができるので、TIM-3上のIgVドメインは、ガレクチン-9との相互作用を担い得る。インキュベーション緩衝液にラクトースを添加した場合、ガレクチン-9とTIM-3との間の相互作用は、用量依存性様式で細胞内染色および破壊アッセイの両方で弱まった(図12A)。さらに、N末端CRDまたはC末端CRDのいずれかを破壊する変

10

20

30

40

50

異ガレクチン - 9 構築物は T I M - 3 に対する相互作用を部分的に喪失するのに対して、両 C R D ドメインの二重変異によって T I M - 3 への結合が完全に無効になった (図 1 2 B) 。したがって、ガレクチン - 9 と T I M - 3 との間の相互作用は、ガレクチン - 9 中の C R D ドメインに依存する。

【 0 2 7 9 】

(実施例 2 0 . エフェクター T h 1 細胞の調節における T I M - 3 - ガレクチン - 9 の役割)

出願人は、アポトーシス機構による T h 1 細胞増殖の調節およびホメオスタシスにおけるガレクチン - 9 - T I M - 3 経路の機能的役割を仮定した。エフェクター T 細胞中のガレクチン - 9 のアポトーシス効果を試験するために、D O 1 1 . 1 0 トランスジェニックマウス由来のナイーブ脾臓 C D 4 + T 細胞を、C D 4 T 細胞ネガティブ選択カラムによって精製し、C D 4 + C D 6 2 L + 細胞について分取した。細胞を V O A ペプチドおよび照射 A P C にてインビトロで刺激し、インビトロで少なくとも 3 ラウンド T h 1 細胞および T h 2 細胞に二分した。活性 T h 1 細胞を組換えガレクチン - 9 で処置した場合、大部分の細胞で細胞死が誘導された。それに反して、活性化 T h 2 細胞は、ガレクチン - 9 誘導細胞死に耐性を示した (図 1 3) 。 A E 7 (T h 1 細胞株) および D 1 0 G 4 (T h 2 細胞株) に対して行ったさらなる実験は、インビボでの組換えガレクチン - 9 によって誘導された類似の細胞死効果を証明した。

【 0 2 8 0 】

(実施例 2 1 . 組換えガレクチン - 9 は T h 1 細胞活性化を弱める)

T h 1 免疫応答中のガレクチン - 9 と T I M - 3 との相互作用のインビボ効果を決定するために、C 5 7 B L / 6 J マウスを、M O G 3 5 - 5 5 を含むフロイント完全アジュバント (C F A) で免疫化した。組換えガレクチン - 9 (1 0 0 μ g) を、3 日目から 9 日目まで免疫化マウスに i . p . 注射した。細胞増殖およびサイトカイン産生アッセイのために、脾細胞を採取した。しかし、P B S 処置コントロール群と比較して、ガレクチン - 9 投与は ³ H チミジン組み込みによって脾細胞増殖を変化させないが、E L I S A の結果は、5 0 % を超える I F N - 産生の減少を示した。E L I S P O T は、ガレクチン - 9 処置脾臓由来のより少ない細胞が I F N - および I L - 2 を産生することをさらに証明した。興味深いことに、P B S 処置マウスと比較して、I L - 4 および I L - 5 産生は変化しなかった (図 1 4) 。

【 0 2 8 1 】

(実施例 2 2 . E A E 処置におけるガレクチン - 9 - T I M - 3 の治療効果)

T I M - 3 は、T h 1 細胞応答および末梢性寛容の調節において重要な機能を有することが証明されている。その発現は、E A E およびヒト多発性硬化症 (M S) の病理学と相関する。興味深いことに、星状細胞におけるガレクチン - 9 の発現は、I L - 1 によって誘導され、このタンパク質が C N S における炎症の制限に関与し得ることを示す (Y o s h i d a e t a l . N e u r o r e p o r t 1 2 : 3 7 5 5 - 3 7 5 8) 。T I M 3 - T I M - 3 リガンド相互作用が T h 1 応答を調節して免疫寛容を促進することができるので、これらの機能が T I M - 3 - ガレクチン - 9 の相互作用によって媒介されることが可能である。この可能性に取り組むために、組換えガレクチン - 9 を、M O G ペプチド 3 5 - 5 5 / C F A 免疫化 C 5 7 B L / 6 J マウスに免疫化した日から 1 日おきに投与する。疾患をモニタリングし、脳および脊髄を組織病理学的に試験する。T I M - 3 の機能的リガンドとして、ガレクチン - 9 投与は、E A E の重症度を減少させるか、そして / または E A E に対する寛容を誘導すると予想される。コントロールとして、出願人は、C 5 7 B L / 6 J バックグラウンドにおける T i m - 3 - / - マウスも試験する。T i m - 3 欠損マウスはガレクチン - 9 投与の影響を受けないと予想される。

【 0 2 8 2 】

(D . 第 2 の実験の考察)

T h 1 または T h 2 経路への T h 前駆体の拡大および分化は、細菌、ウイルス、自己抗原、および同種抗原の結果を調節する。これらの T 細胞応答の範囲は、サイトカインおよ

10

20

30

40

50

び補助分子群（TNF受容体（7）およびIgスーパーファミリー（8）が含まれる）の影響を受ける。TIM-3は、Monney et al.（10）によってEAEにおける組織破壊免疫応答の負のレギュレーターとして最近同定された新規のTh1特異的Igスーパーファミリーメンバーである。このモデルでは、抗TIM-3 mAb処置によってマクロファージの数および活性レベルならびに脳内組織の損傷の重症度を増加させた。これらの結果に基づいて、抗TIM-3はTh1細胞の脳への移動の強化またはTIM-3と推定阻害TIM-3Lとの間の相互作用の遮断によってマクロファージを活性化することができることを提案した。

【0283】

出願人は、活性化Th1およびTh2クローンの遺伝子発現プロファイルの比較によってTIM-3を同定し、出願人は、自己免疫モデルおよび同種免疫モデルにおいてTIM-3がTh1媒介応答の制限で重要な役割を果たすこと、およびこれらの効果がCD4+CD25+調節T細胞集団の免疫抑制機能の調整によって少なくとも一部が媒介されるようであるということ報告する。

【0284】

CD4+CD25+調節T細胞は、自己寛容の維持（36～38）および同種移植片の長期許容（12、34、35）で中心的役割を果たす。その正確な作用機構は依然として定義されていないが、細胞-細胞接触相互作用および可溶性因子がその免疫抑制機能に関与する（39、40）。本発明者らの結果は、TIM-3はこれらのCD4+CD25+T細胞が免疫抑制効果を送達する分子経路ではないことを示し、これは、ナイーブまたは寛容宿主由来のCD4+CD25+T細胞はインビボおよびインビトロの両方におけるTIM-3の有効な発現を欠くCD4+CD25+T細胞を強く抑制することができる（図9B）。しかし、TIM-3/TIM-3L感受性経路は、DST+抗CD154処置などの寛容治療薬の投与後に出現するドナー特異的CD4+CD25+調節T細胞の機能的生成を担う（図9D）。したがって、TIM-3依存性経路および非依存性経路は共にCD4+CD25+T細胞依存性免疫調節に関与する。

【0285】

TIM-3およびそのリガンドを含む正確な細胞および分子の相互作用は依然として完全に解明されていないにもかかわらず、TIM-3およびTIM-3Lで認められる発現パターン（図8A～D）により、TIM-3陽性Th1エフェクター細胞とTIM-3L陽性調節T細胞との間の直接相互作用は、CD4+CD25+T細胞が増強された免疫抑制機能を獲得する機構を構成し得ることが示唆される。あるいは、TIM-3L発現がいくつかの樹状細胞でも認められると仮定すると、調節T細胞に対するTIM-3の効果を、APCの介入によって直接発揮することができる。この最後の解釈は、CD4+CD25+T細胞媒介免疫調節の調整における樹状細胞表現型の役割に関する所見と一致するであろう（41、42）。最後に、TIM-3がライゲーション時にsrcキナーゼを漸増することができる、それによって下流シグナル伝達事象に影響を与えることができるという事実は、TIM-3ライゲーションはTh1細胞自体に対して直接阻害シグナルも発揮することができることを示す。それにもかかわらず、ex-Tim-3-Ig処置移植レシピエントの脾臓におけるIL-2およびIFN産生エフェクターT細胞の頻度が有意に増加しないことにより、移植においてTIM-3がエフェクターT細胞集団よりも調節に対して強力な効果を示すことが示唆される。

【0286】

本発明者らの所見は、DST+抗CD154が移植における寛容の誘導を促進する機構に新規の洞察をもたらす。抗CD154誘導免疫抑制環境における宿主T細胞への同種抗原の提供により、アネルギーおよび/またはアポトーシスによって同種反応性CD4+およびCD8+Tリンパ球が直接不活化され、その後寛容状態を自己永続することができる調節T細胞の発現を促進すると現在理解されている（11～13、28、43）。出願人は、ポリクローナル系においてDST+抗CD154が主に同種抗原特異的様式でCD4+CD25+T細胞の免疫抑制機能の増加によって作用する一方で、エフェクターT細胞

10

20

30

40

50

集団の同種移植片を拒絶する能力に対する処置の効果はあまり強力ではないことを示す証拠を提供する。

【0287】

CD40 - CD154 同時刺激を行わない同種抗原を使用した以前の偶然によってこれらのTIM-3 感受性免疫調節網が誘導される機構が推定される。同種ペプチドを認識することができる調節T細胞クローンは選択的増殖を受け(44、45)、そして/またはより有効な免疫抑制機能を獲得し、それにより、ドナー特異的免疫調節回路強化される。実際、本発明者らのモデルにおけるDST単剤療法の効果の欠如により、エフェクターT細胞のアポトーシスおよびアネルギーを促進することが公知のCD154遮断(13、43)が調節T細胞の機能および生存を許容するかさらに増強することが示唆される。あるいは、CD40 - CD154 同時刺激遮断は常在APCの表現型を調整し、それにより活性化されたナイーブドナー反応性T細胞の免疫調節区画に漸増させることができる。興味深いことに、APC上のCD40発現の欠如は、いくつかの場合、CD4+調節T細胞の生成(49)によって抗原特異的寛容を促進すると報告されている(46~49)。したがって、本発明者らの所見に基づいて、出願人は、CD40およびTIM-3は拮抗作用を有し、そのバランスは寛容と免疫の決定のチェックポイントとして役立つと推測する。免疫寛容を促進するTIM-3/TIM-3L経路の重要性は、DST+抗CD154が移植免疫寛容を達成する機構に排他的に制限されない。実際、ex-Tim-3-IgがCTLA4Ig処置後に寛容誘導を無効にするという本発明者らの所見に基づいて(図9D)、出願人は、TIM-3はTh1媒介免疫応答の調節および免疫寛容の発生の促進で基本的役割を果たすと結論づけることができる。

10

20

【0288】

要するに、出願人は、IgスーパーファミリーメンバーであるTIM-3が積極的なTh1媒介自己免疫応答および同種免疫応答を阻害するように機能することを記載している。これらの効果は、少なくとも一部が、CD4+CD25+調節T細胞の免疫抑制効力の調節を媒介するようである。したがって、Th1細胞上のTIM-3発現は、炎症性Th1依存性T細胞応答を弱めて関連組織損傷を制限する働きをする重要なチェックポイントを提供する。

【0289】

(E. 参考文献)

30

【0290】

【化5】

1. Romagnani, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12, 227-57 (1994).
2. Kamradt, T. & Mitchison, N.A. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 344, 655-64 (2001).
3. Strom, T.B. et al. The Th1/Th2 paradigm and the allograft response. *Curr Opin Immunol* 8, 688-93 (1996).
4. Li, X.C., Zand, M.S., Li, Y., Zheng, X.X. & Strom, T.B. On histocompatibility barriers, Th1 to Th2 immune deviation, and the nature of the allograft responses. *J Immunol* 161, 2241-7 (1998). 10
5. Anderson, G.P. & Coyle, A.J. TH2 and 'TH2-like' cells in allergy and asthma: pharmacological perspectives. *Trends Pharmacol Sci* 15, 324-32. (1994).
6. Kundig, T.M. et al. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 5, 41-52. (1996).
7. Locksley, R.M., Killeen, N. & Lenardo, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501. (2001). 20
8. Salomon, B. & Bluestone, J.A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19, 225-52 (2001).
9. Refaeli, Y., Van Parijs, L., London, C.A., Tschopp, J. & Abbas, A.K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity* 8, 615-23. (1998).
10. Monney, L. et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415, 536-41. (2002). 30
11. Parker, D.C. et al. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9560-4. (1995).
12. Sanchez-Fueyo, A., Weber, M., Domenig, C., Strom, T.B. & Zheng, X.X. Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance. *J Immunol* 168, 2274-81. (2002).
13. Quezada, S.A. et al. Mechanisms of donor specific transfusion tolerance: pre-emptive induction of clonal T cell exhaustion via indirect presentation. *Blood* (2003). 40

【0291】

【化6】

14. Coyle, A.J. et al. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13, 95-105 (2000).
15. Wells, A.D., Gudmundsdottir, H. & Turka, L.A. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* 100, 3173-83. (1997).
16. Sabatos, C.A. et al. Tim-3/Tim-3-Ligand interaction regulates Th1 responses and induction of peripheral tolerance. *Submitted*. 10
17. Delovitch, T.L. & Singh, B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7, 727-38. (1997).
18. Christianson, S.W., Shultz, L.D. & Leiter, E.H. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* 42, 44-55. (1993). 20
19. Rudd, C.E. et al. Two-step TCR zeta/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol Today* 15, 225-34 (1994).
20. Prasad, K.V. et al. T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2834-8 (1994).
21. Schneider, H., Cai, Y.C., Prasad, K.V., Shoelson, S.E. & Rudd, C.E. T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras. *Eur J Immunol* 25, 1044-50 (1995). 30
22. Rudd, C.E. Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* 4, 527-34 (1996).
23. McIntire, J.J. et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* 2, 1109-16 (2001).
24. Kuchroo, V.K., Umetsu, D.T., DeKruyff, R.H. & Freeman, G.J. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 3, 454-62 (2003). 40

【0292】

【化7】

25. Li, X.C. et al. IL-2 and IL-4 double knockout mice reject islet allografts: a role for novel T cell growth factors in allograft rejection. *J Immunol* 161, 890-6 (1998).
26. Kishimoto, K. et al. The role of CD154-CD40 versus CD28-B7 costimulatory pathways in regulating allogeneic Th1 and Th2 responses in vivo. *J Clin Invest* 106, 63-72. (2000).
27. Sho, M. et al. Physiological Mechanisms of Regulating Alloimmunity: Cytokines, CTLA-4, CD25(+) Cells, and the Alloreactive T Cell Clone Size. *J Immunol* 169, 3744-51. (2002). 10
28. Zheng, X.X. et al. CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment. *J Immunol* 162, 4983-90. (1999).
29. DeKruyff, R.H., Fang, Y. & Umetsu, D.T. IL-4 synthesis by *in vivo* primed keyhole limpet hemocyanin specific CD4+ T cells. I. Influence of antigen concentration and antigen presenting cell type. *J Immunol* 149, 3468-3476 (1992). 20
30. Judge, T.A. et al. The *in vivo* mechanism of action of CTLA4Ig. *J Immunol* 156, 2294-9 (1996).
31. Waaga, A.M. et al. Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopeptide-specific Th2 clones in vivo. *J Clin Invest* 107, 909-16 (2001).
32. Lee, R.S. et al. CTLA4Ig-induced linked regulation of allogeneic T cell responses. *J Immunol* 166, 1572-82 (2001).
33. Maurik Av, A., Herber, M., Wood, K.J. & Jones, N.D. Cutting Edge: CD4(+)CD25(+) Alloantigen-Specific Immunoregulatory Cells That Can Prevent CD8(+) T Cell-Mediated Graft Rejection: Implications for Anti-CD154 Immunotherapy. *J Immunol* 169, 5401-4. (2002). 30
34. Kingsley, C.I., Karim, M., Bushell, A.R. & Wood, K.J. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10- dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168, 1080-6. (2002).
35. Graca, L. et al. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* 168, 5558-65. (2002).

【0293】

40

【化8】

36. Sakaguchi, S. & Sakaguchi, N. Thymus and autoimmunity: capacity of the normal thymus to produce pathogenic self-reactive T cells and conditions required for their induction of autoimmune disease. *J Exp Med* 172, 537-45. (1990).
37. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-64. (1995). 10
38. Salomon, B. et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431-40. (2000).
39. Wood, K.J. & Sakaguchi, S. Regulatory Lymphocytes: Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 199-210 (2003).
40. Shevach, E.M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2, 389-400 (2002).
41. Caramalho, I. et al. Regulatory T Cells Selectively Express Toll-like Receptors and Are Activated by Lipopolysaccharide. *J Exp Med* 197, 403-11 (2003). 20
42. Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll Pathway-Dependent Blockade of CD4+CD25+ T Cell-Mediated Suppression by Dendritic Cells. *Science* 299, 1033-6 (2003).
43. Iwakoshi, N.N. et al. Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner. *J Immunol* 164, 512-21. (2000).
44. Yamazaki, S. et al. Direct Expansion of Functional CD25+ CD4+ Regulatory T Cells by Antigen-processing Dendritic Cells. *J Exp Med* 198, 235-47 (2003). 30
45. Walker, L.S., Chodos, A., Eggena, M., Dooks, H. & Abbas, A.K. Antigen-dependent Proliferation of CD4+ CD25+ Regulatory T Cells In Vivo. *J Exp Med* 198, 249-58 (2003).
46. Buhmann, J.E. et al. In the absence of a CD40 signal, B cells are tolerogenic. *Immunity* 2, 645-53 (1995).
47. Foy, T.M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhmann, J.E. & Noelle, R.J. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* 14, 591-617 (1996). 40

【0294】

【化9】

48. Hollander, G.A. et al. Induction of alloantigen-specific tolerance by B cells from CD40-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4994-8 (1996).
49. Martin, E., O'Sullivan, B., Low, P. & Thomas, R. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 18, 155-67 (2003).
50. Yoon, J.W. et al. Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science* 284, 1183-7 (1999).
51. Steiger, J., Nickerson, P.W., Steurer, W., Moscovitch-Lopatin, M. & Strom, T.B. IL-2 knockout recipient mice reject islet cell allografts. *J Immunol* 155, 489-98 (1995).
52. Li, Y. et al. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med* 5, 1298-302 (1999).

10

(等価物)

当業者は、日常的な実験のみを使用して、本明細書中に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を理解し、または確認し得る。このような等価物は、特許請求の範囲により包含されることが意図される。種々の出版物が、本出願を通して引用される。これらの出版物の内容は、本明細書により参考として本出願に援用される。

20

【0295】

(配列表)

【0296】

【化10】

配列番号1

ATGTTTTCACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCTGCTACTA
 CTTACAAGGTCCCTCAGAAGTGGAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAGAATG
 CCTATCTGCCCTGCTTCTACACCCAGCCGCCAGGGAAACCTCGTGCCC
 GTCTGCTGGGGCAAAGGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGG
 TGCTCAGGACTGATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTG
 GCTAAATGGGGATTTCCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAAT
 GTGACTCTAGCAGACAGTGGGATCTACTGCTGCCGATCCAAATCCCAG
 GCATAATGAATGATGAAAAATTTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGG
 GTATTCTCATAGCAAAGAGAAGATACAGAATTTAAGCCTCATCTCTTTGG
 CCAACCTCCCTCCCTCAGGATTGGCAAATGCAGTAGCAGAGGGAAATTCG
 CTCAGAAGAAAACATCTATAACCATTGAAGAGAACGTATATGAAGTGGAG
 GAGCCCAATGAGTATTATTGCTATGTCAGCAGGCAGGCAACCCTCAC
 AACCTTTGGGTTGTCGCTTTGCAATGCCATAG

30

【0297】

【化 1 1】

配列番号2

MFSHLPFDCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVBGQNAAYLPCFYTPAAPGNLVPVC
WGKGACPFVECGNVVLRDTERDVNYWTSRYWLNGDFRKGDVSLTIENVTL
ADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIKPGYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGL
ANAVAEGIRSEENIYTIENNVYEVEEPNEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP

配列番号3

ATGTTTTCAGGTCTTACCCTCAACTGTGTCCTGCTGCTGCTGCAACTACTA
CTTGCAAGGTCATTGGAAGATGGTTATAAGGTTGAGGTTGGTAAAAATG
CCTATCTGCCCTGCAGTTACACTCTACCTACATCTGGGACACTTGTGCCT
ATGTGCTGGGGCAAGGGATTCTGTCTTGGTCCAGTGTACCAATGAGTT
GCTCAGAACTGATGAAAGAAATGTGACATATCAGAAATCCAGCAGATAC
CAGCTAAAGGGCGATCTCAACAAAGGAGATGTGTCTCTGATCATAAAGA
ATGTGACTCTGGATGACCATGGGACCTACTGCTGCAGGATACAGTTCCT
GGTCTTATGAATGATAAAAAATTAGAACTGAAATTAGACATCAAAGCAG
GGTATTCTGTAAGAAAAAGAAGTTATCGAGTTTGAGCCTTATTACTG
GCCAACTTGCTCCAGGAGGGTTGGCAAATGCAGGAGCAGTCAGGATTC
GCTCTGAGGAAAATATCTACACCATCGAGGAGAACGTATATGAAGTGGA
GAATTCAAATGAGTACTACTGCTACGTCAACAGCCAGCAGCCATCCTGA

10

配列番号4

MFSGLTLNCVLLLLLQLLARSLEDGYKVEVGKNAYLPCSYTLPTSGTLVPM
CWGKGFCPWSQCTNELLRTDERNVTYQKSSRYQLKGDNLKGDVSLIKNVT
LDDHGTYCCRIQFPGLMNDKKLELKLKLDIKAGYSCKKKLSSLITLANLPP
GGLANAGAVRIRSEENIYTIENNVYEVENSNYCYVNSQQPS

20

配列番号5

CAAACCAG GGTATTCT

配列番号6

NLKLVIKP GYSHSKEK

配列番号7

CAAAGCAG GGTATTCC

30

配列番号8

ELKLDIKA GYSCKKKK

配列番号9

ATGGCCTTCAGCGGTTCCCAGGCTCCCTACCTGAGTCCAGCTGTCCCCTT
TTCTGGGACTATTCAAGGAGGTCTCCAGGACGGACTTCAGATCACTGTCA
ATGGGACCGTTCTCAGCTCCAGTGGAACCAGGTTTGCTGTGAACTTTCAG
ACTGGCTTCAGTGAAATGACATTGCCTTCCACTTCAACCCTCGGTTTGA
AGATGGAGGGTACGTGGTGTGCAACACGAGGCAGAACGGAAGCTGGGG
GCCCGAGGAGAGGAGGACACACATGCCTTTCAGAAAGGGGATGCCCTT
GACCTCTGCTTCTGCTGAGGCTCAGATTCAAGGTGATGGTGAACG
GGATCCTCTTCGTGCAGTACTTCCACCGCGTGCCTTCCACCGTGTGGAC
ACCATCTTCGTCAATGGCTCTGTGCAGCTGTCTACATCAGCTTCCAGCC

40

【 0 2 9 8 】

【化 1 2】

TCCCGGCGTGTGGCCTGCCAACCCGGCTCCCATTACCCAGACAGTCATCC
 ACACAGTGCAGAGCGCCCCTGGACAGATGTTCTCTACTCCCGCCATCCCA
 CCTATGATGTACCCCCACCCCGCCTATCCGATGCCTTTCATCACCACCAT
 TCTGGGAGGGCTGTACCCATCCAAGTCCATCCTCCTGTCAGGCACTGTCC
 TGCCCAGTGTCTCAGAGGTTCCACATCAACCTGTGCTCTGGGAACACATC
 GCCTTCCACCTGAACCTCCGTTTTGATGAGAATGCTGTGGTCCGCAACAC
 CCAGATCGACAACCTCTGGGGGTCTGAGGAGCGAAGTCTGCCCCGAAAA
 ATGCCCTTCGTCCGTGGCCAGAGCTTCTCAGTGTGGATCTTGTGTGGAGC
 TCACTGCCTCAAGGTGGCCGTGGATGGTCAGCACCTGTTTGAATACTACC
 ATCGCCTGAGGAACCTGCCACCATCAACAGACTGGAAGTGGGGGGCGA
 CATCCAGCTGACCCATGTGCAGACATAG

10

配列番号 10

MAFSGSQAPYLSPAVPSFTIQGGLQDGLQITVNGTVLSSSGTRFAVNFQTG
 FSGNDIAFHFNPRFEDGGYVVCNTRQNGSWGPEERRTHMPFQKGMFPDLCF
 LVQSSDFKVMVNGILFVQYFHRVPHRVDITFVNGSVQLSYISFQPPGVWPA
 NPAPITQTVIHTVQSAPGQMFSTPAIPPMYPHPA YPMPFITLGGLYPSKSI
 LLSGTVLPSAQRFHINLCSGNHIAFHLNLRFDENAVVRNTQIDNSWGSEERS
 LPRKMPFVRGQFSVWILCGAHCLKVAVDGQHLFEYYHRLRNLPINRLEV
 GGDIQLTHVQT

配列番号 11

ATGTTTTACATCTTCCCTTTGACTGTGTCCCTGCTGCTGCTGCTGCTACTA
 CTTACAAGGTCCTCAGAAGTGGAAATACAGAGCGGAGGTCGGTCAGAATG
 CCTATCTGCCCTGCTTCTACACCCAGCCGCCCCAGGGAACCTCGTGCCC
 GTCTGCTGGGGCAAAGGAGCCTGTCTGTGTTTGAATGTGGCAACGTGG
 TGCTCAGGACTGATGAAAGGGATGTGAATTATTGGACATCCAGATACTG
 GCTAAATGGGGATTTCCGCAAAGGAGATGTGTCCCTGACCATAGAGAAT
 GTGACTCTAGCAGACAGTGGGATCTACTGCTGCCGGATCCAAATCCCAG
 GCATAATGAATGATGAAAAATTTAACCTGAAGTTGGTCATCAAACCAGC
 CAAGGTCACCCCTGCACCGACTCTGCAGAGAGACTTCACTGCAGCCTTTC
 CAAGGATGCTTACCACCAGGGGACATGGCCCAGCAGAGACACAGACACT
 GGGGAGCCTCCCTGATATAAATCTAACACAAATATCCACATTGGCCAAT
 GAGTTACGGGACTCTAGATTGGCCAATGACTTACGGGACTCTGGAGCAA
 CCATCAGAATAGGCATCTACATCGGAGCAGGGATCTGTGCTGGGCTGGC
 TCTGGCTCTTATCTTCGGCGCTTTAATTTTCAAATGGTATTCTCATAGCAA
 AGAGAAGATACAGAATTTAAGCCTCATCTCTTTGGCCAACCTCCCTCCCT
 CAGGATTGGCAAATGCAGTAGCAGAGGGAATTCGCTCAGAAGAAAACA
 TCTATAACCATTGAAGAGAACGTATATGAAGTGGAGGAGCCCAATGAGTA
 TTATTGCTATGTCAGCAGCAGGCAGCAACCCTCACAACCTTTGGGTGTG
 GCTTTGCAATGCCATAG

20

30

配列番号 12

ATGTTTTAGGTCCTTACCCTCAACTGTGTCCCTGCTGCTGCTGCAACTACTA
 CTTGCAAGGTCATTGGAAGATGGTTATAAGGTTGAGGTTGGTAAAAATG
 CCTATCTGCCCTGCAGTTACACTCTACCTACATCTGGGACACTTGTGCCT
 ATGTGCTGGGGCAAGGGATTCTGTCCCTTGGTCACAGTGTACCAATGAGTT
 GCTCAGAACTGATGAAAGAAATGTGACATATCAGAAATCCAGCAGATAC

40

【 0 2 9 9 】

【化 1 3】

CAGCTAAAGGGCGATCTCAACAAAGGAGATGTGTCTCTGATCATAAAGA
 ATGTGACTCTGGATGACCATGGGACCTACTGCTGCAGGATACAGTTCCCT
 GGTCTTATGAATGATAAAAAATTAGAACTGAAATTAGACATCAAAGCAG
 CCAAGGTCACTCCAGCTCAGACTGCCCATGGGGACTCTACTACAGCTTCT
 CCAAGAACCCTAACCACGGAGAGAAAATGGTTCAGAGACACAGACTG
 GTGACCCTCCATAATAACAATGGAACAAAAATTTCCACATGGGCTGATG
 AAATTAAGGACTCTGGAGAAACGATCAGAACTGCTATCCACATTGGAGT
 GGGAGTCTCTGCTGGGTTGACCCTGGCACTTATCATTGGTGTCTTAATCC
 TAAATGGTATTCTGTAAAGAAAAAGAAGTTATCGAGTTTGAGCCTTATT
 AACTGGCCAACCTTGCTCCAGGAGGGTTGGCAAATGCAGGAGCAGTCA
 GGATTTCGCTCTGAGGAAAATATCTACACCATCGAGGAGAACGTATATGA
 AGTGGAGAATTCAAATGAGTACTACTGCTACGTCAACAGCCAGCAGCCA
 TCCTGA

10

配列番号13

MFSHLPDFCVLLLLLLLLLRSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVC
 WKGKACPVFECGNVLRDTERDVNYWTSRYWLNDFRKGDVSLTIENVTL
 ADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFNLKLVIKPAKVTPAPTLQRDFTAAPFRMLTTR
 GHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLRDSGATIRIGIYIGAGI
 CAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGIRSEE
 NIYTIENVYEEVPEYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP

20

配列番号14

MFSGLTLNCVLLLLQLLLARSLEDGYKVEVGKNAYLPCSITLPTSGTLVPM
 CWGKGFCPWSQCTNELLRTDERNVTYQKSSRYQLKGDNLKGDVSLIKNVT
 LDDHGTCCRIQFPGLMNDKKLELKLDIKAAKVTPAQTAHGDSTTASPRTL
 TTERNGETQTLVTLHNNNGTKISTWADEIKDSGETIRTAIHIGVGVSAGLTL
 ALIIGVLILKWYSCKKKKLSLITLANLPPGGLANAGAVRIRSEENIYTIIE
 NVYEVENSNEYCYVNSQQPS

配列番号15

CAAACCAGGGUAUUCU

配列番号16

ATGGCTCTCTCAGTGCCAGTCTCCATACATTAACCCGATCATCCCCTTT
 ACTGGACCAATCCAAGGAGGGCTGCAGGAGGGACTTCAGGTGACCCTCC
 AGGGGACTACCAAGAGTTTTGCACAAAGGTTTGTGGTGAACCTTCAGAA
 CAGCTTCAATGGAAATGACATTGCCCTTCACTTCAACCCCGGTTTGAGG
 AAGGAGGGTATGTGGTTTGCAACACGAAGCAGAACGGACAGTGGGGGC
 CTGAGGAGAGAAAGATGCAGATGCCCTTCCAGAAGGGGATGCCCTTTGA
 GCTTTGCTTCCCTGGTGCAGAGGTCAGAGTTCAAGGTGATGGTGAACAAG
 AAATTCCTTGTGCAGTACCAACACCGCGTACCCTACCACCTCGTGGACAC
 CATCGCTGTCTCCGGCTGCTTGAAGCTGTCCTTTATCACCTTCCAGACTC
 AGGACTTTCGTCTGCCACCAGGCACCCATGGCTCAAACCTACCATCCAT
 ATGGTTACAGCACCCCTGGACAGATGTTCTTACTCCTGGAATCCCTCC
 TGTGGTGTACCCACCCAGCCTATACCATACCTTTCTACACCCCATTC
 CAAATGGGCTTTACCCGTCCAAGTCCATCATGATATCAGGCAATGTCTTG

30

40

【 0 3 0 0 】

【化 1 4】

CCAGATGCTACGAGGTTCCATATCAACCTTCGCTGTGGAGGTGACATTGC
 TTTCCACCTGAACCCCGTTTCAATGAGAATGCTGTTGTCCGAAACACTC
 AGATCAACAACCTCCTGGGGGCAGGAAGAGCGAAGTCTGCTTGGGAGGAT
 GCCCTTCAGTCGAGGCCAGAGCTTCTCGGTGTGGATCATATGCGAAGGT
 CACTGCTTCAAGGTGGCTGTGAATGGTCAACACATGTGTGAATATTACCA
 CCGCCTGAAGAACTTGCAGGATATCAACACTCTAGAAGTGGCGGGTGAT
 ATCCAGCTGACCCACGTGCAGACATAG

配列番号17

MALFSAQSPYINPIIPFTGPIQGGLOEGLQVTLQGTTKSFAQRFVVNFQNSFN
 GNDIAFHFNPRFEEGGYVVCNTKQNGQWGPEERKMQMPFQKGMPELFCFL
 VQRSEFKVMVNKKFFVQYQHRVPYHLVDTIAVSGCLKLSFITFQTQDFRPA
 HQAPMAQTTIHMVHSTPGQMFSTPGIPPVVYPTPAYTIPFYTPIPNGLYPSKSI
 MISGNVLPDATTRFHINLRCGGDIAFHNLNPRFNENAVVRNTQINNSWGQEERS
 LLGRMPFSRGQSFSVWIICEGHCFKVAVNGQHMCEYYHRLKNLQDINTLEV
 AGDIQLTHVQT

10

配列番号18

MALFSAQSPYINPIIPFTGPIQGGLOEGLQVTLQGTTKSFAQRFVVNFQNSFN
 GNDIAFHFNPRFEEGGYVVCNTKQNGQWGPEERKMQMPFQKGMPELFCFL
 VQRSEFKVMVNKKFFVQYQHRVPYHLVDTIAVSGCLKLSFITFQNSAAPVQ
 HVFSTLQFSQPVQFPRTPKGRKQKTQNFRAHQAPMAQTTIHMVHSTPGQM
 FSTPGIPPVVYPTPAYTIPFYTPIPNGLYPSKSIMISGNVLPDATTRFHINLRCGG
 DIAFHNLNPRFNENAVVRNTQINNSWGQEERSLLGRMPFSRGQSFSVWIICEG
 HCFKVAVNGQHMCEYYHRLKNLQDINTLEVAGDIQLTHVQT

20

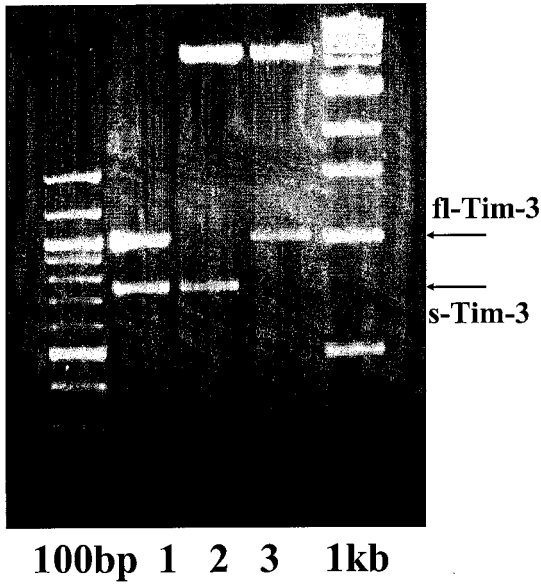
配列番号19

MAFSGSQAPYLSPAVPFSGTIQGGLODGLQITVNGTVLSSSGTRFAVNFQTG
 FSGNDIAFHFNPRFEDGGYVVCNTRQNGSWGPEERKTHMPFQKGMPELFCFL
 LVQSSDFKVMVNGILFVQYFHRVPPHVRVDTISVNGSVQLSYISFQNPRTPVP
 QPAFSTVPFSQPVCFFPRPRGRRQKPPGVWPANPAPITQTVIHTVQSAPGQMF
 STPAIPPMYPHPAYPMPFITLGLYPSKILLSGTVLPSAQRFHINLCSGN
 HIAFHNLNPRFDENAVVRNTQIDNSWGSEERSLPRKMPFVRGQSFSVWILCEA
 HCLKVAVDGQHLFEYYHRLRNLPTINRLEVGGDIQLTHVQT

30

【 図 1 A 】

Fig. 1A



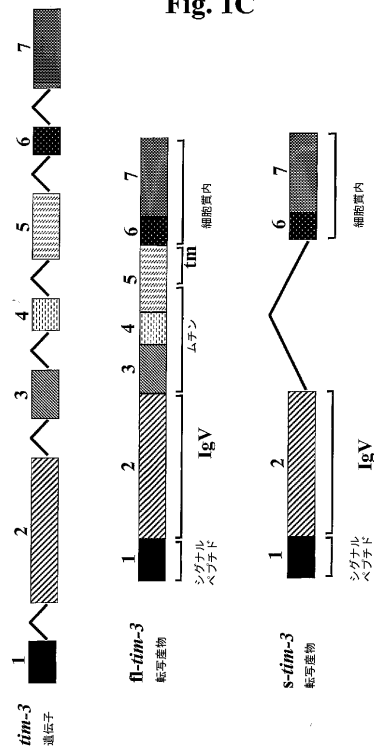
【 図 1 B 】

Fig. 1B

シグナルペプチド	
fl-TIM-3	MPSGLTINCVLILLQLLLARSLEDGYKVEVGKNAYLPCSYTLPTSG
s-TIM-3	MPSGLTINCVLILLQLLLARSLEDGYKVEVGKNAYLPCSYTLPTSG
IgVドメイン	
fl-TIM-3	TLVPMCWGKGPWPWSQCTNELLRITDERNVITYOKSSRYQLKGDLNKG
s-TIM-3	TLVPMCWGKGPWPWSQCTNELLRITDERNVITYOKSSRYQLKGDLNKG
ムチンドメイン	
fl-TIM-3	DVSLIIKNVTLDDHGYCCRIQFPGLMNDKLEKLDIKAAKVTPA
s-TIM-3	DVSLIIKNVTLDDHGYCCRIQFPGLMNDKLEKLDIKAA-----
膜貫通ドメイン	
fl-TIM-3	QTAHGDSSTASPRTLTTERNGSETQLVLEHNNNGTKLSTWADEIK
s-TIM-3	-----GYSCKKKLSSLSL
細胞質ドメイン	
fl-TIM-3	ITLANLPFGLANAGAVRIRSEENIYTIENNVYEVENSNYYCYVN
s-TIM-3	ITLANLPFGLANAGAVRIRSEENIYTIENNVYEVENSNYYCYVN
C-テール	
fl-TIM-3	SQQPS
s-TIM-3	SQQPS

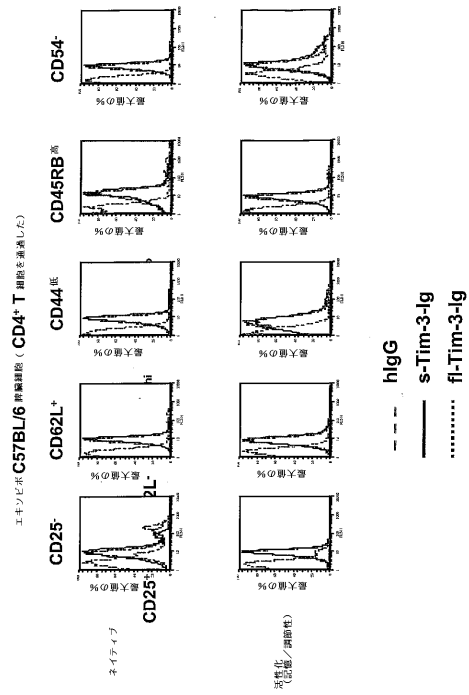
【 図 1 C 】

Fig. 1C



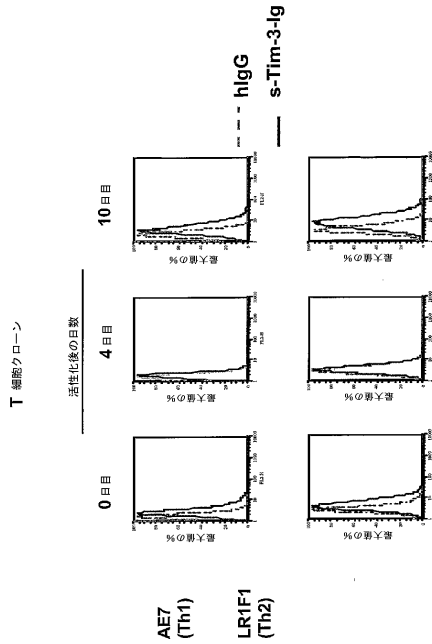
【 図 2 A 】

Fig. 2A



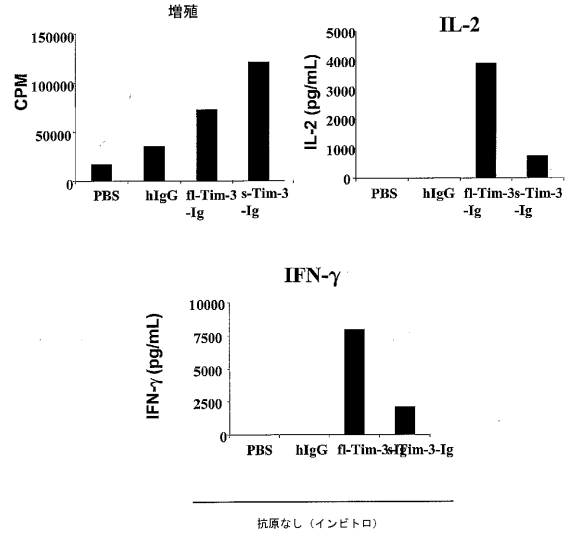
【 図 2 B 】

Fig. 2B



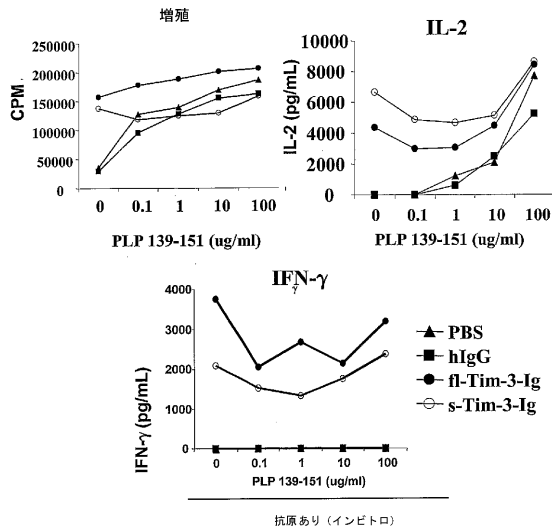
【 図 3 A 】

Fig. 3A



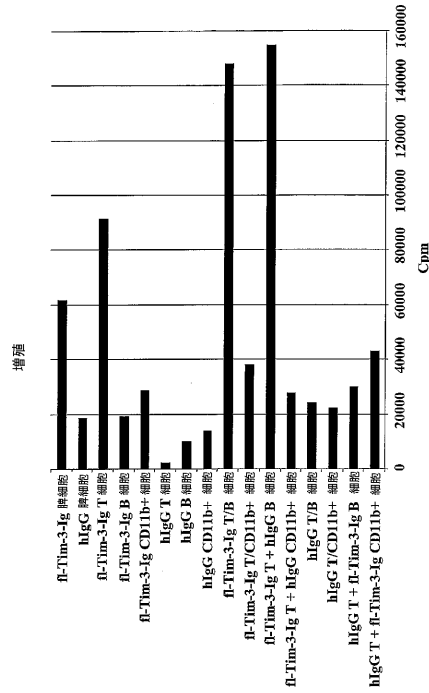
【 図 3 B 】

Fig. 3B



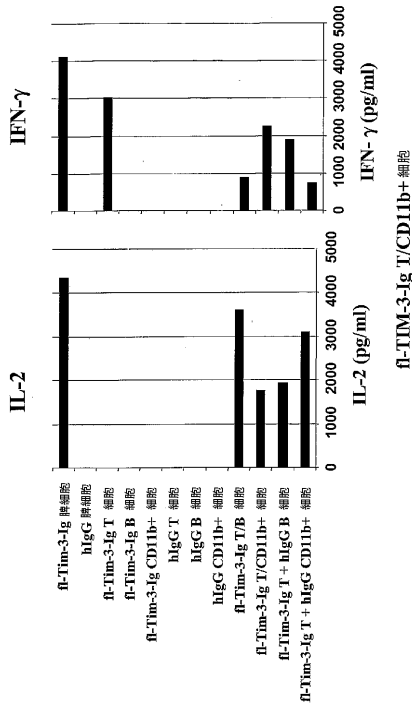
【 図 4 A 】

Fig. 4A



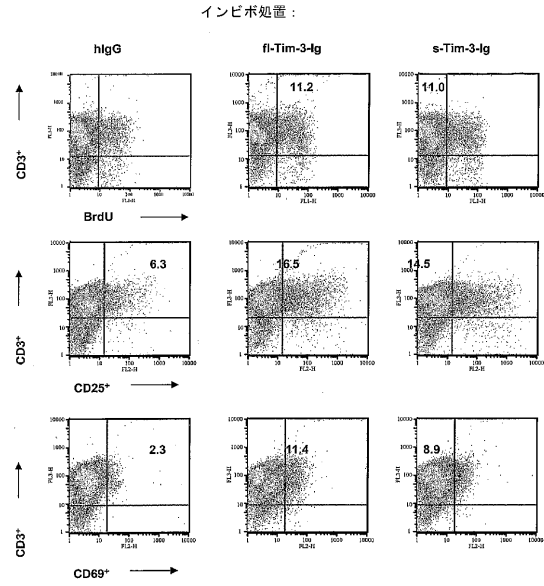
【 図 4 B 】

Fig. 4B



【 図 4 C 】

Fig. 4C



【 図 5 】

Fig. 5

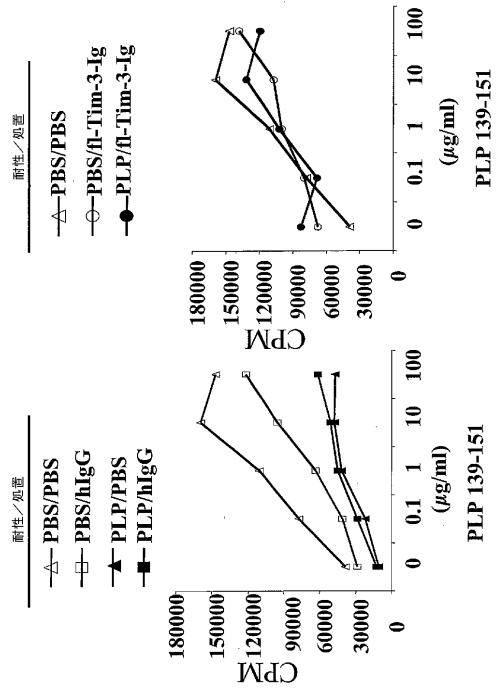
インビボでのTim-3-Ig処置は、耐性の誘導を阻害した

インビボでのPLP 139-151 (100 mg/ml) 再刺激

耐性	処置	免疫処置	cpm	IL-2 (pg/ml)	IFN-γ (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
PBS	hlgG	PLP/CFA	66,696	639	1,316	0	0
PLP	hlgG	PLP/CFA	21,379*	0*	0*	0	0
PBS	Tim-3-Ig	PLP/CFA	86,303	745	2,777	0	0
PLP	Tim-3-Ig	PLP/CFA	84,235*	1,345*	1,976*	0	0

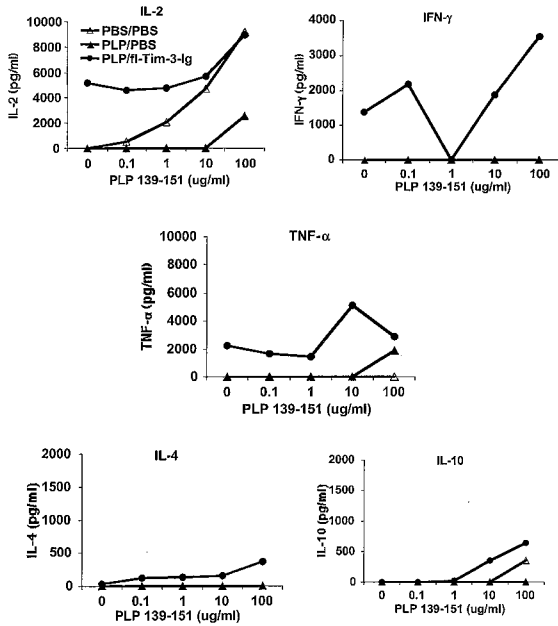
【 図 6 A 】

Fig. 6A



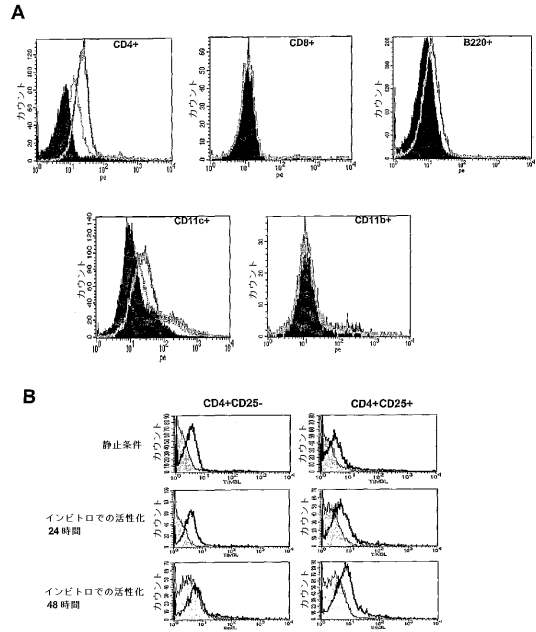
【 図 6 B 】

Fig. 6B



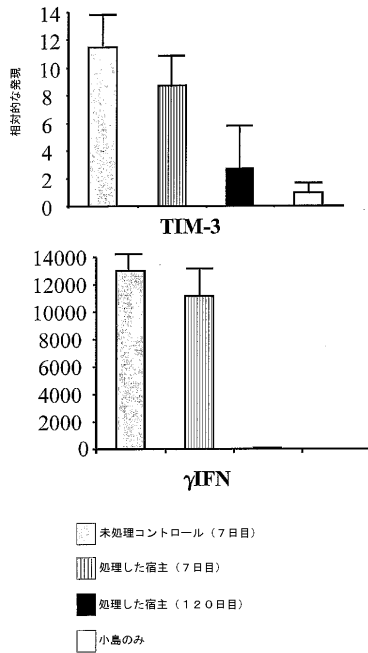
【 図 7 】

Fig. 7



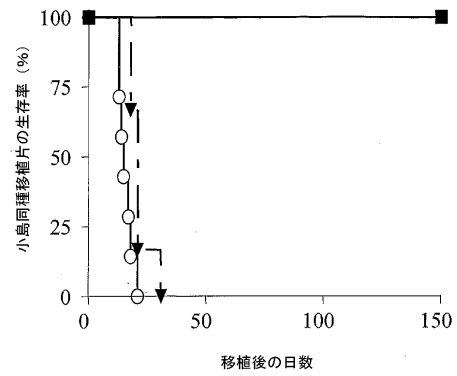
【 図 8 A 】

Fig. 8A



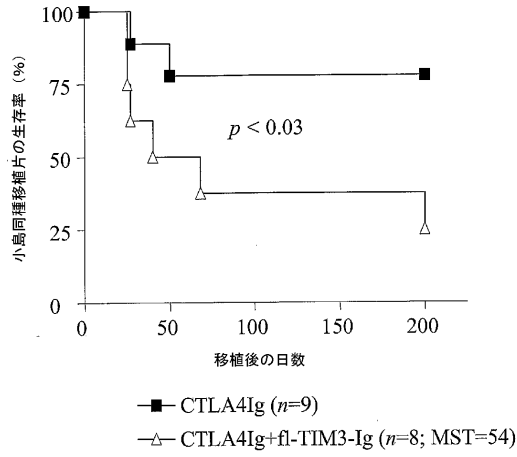
【 図 8 B 】

Fig. 8B



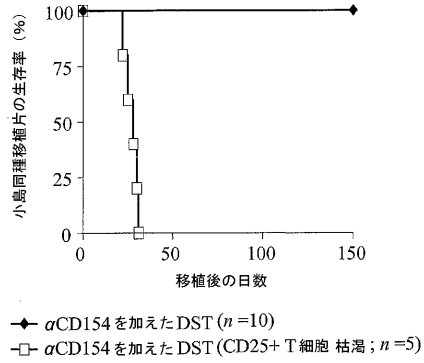
【 図 8 C 】

Fig. 8C



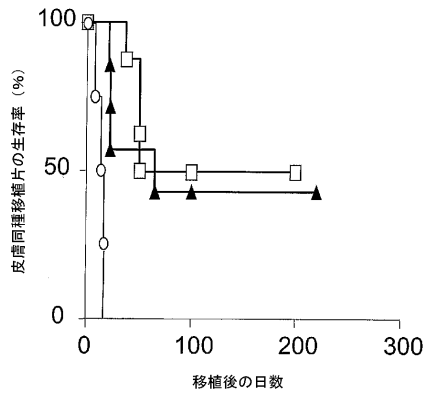
【 図 9 A 】

Fig. 9A



【 図 9 B 】

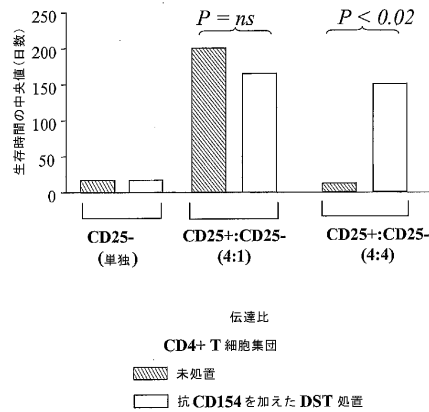
Fig. 9B



- 4×10^5 CD4+CD25 および hIgを加えた 2×10^5 CD4+CD25 (n=5)
- ▲ 4×10^5 CD4+CD25 および fl-TIM3-Igを加えた 2×10^5 CD4+CD25 (n=5)
- 2×10^5 CD4+CD25- (n=10)

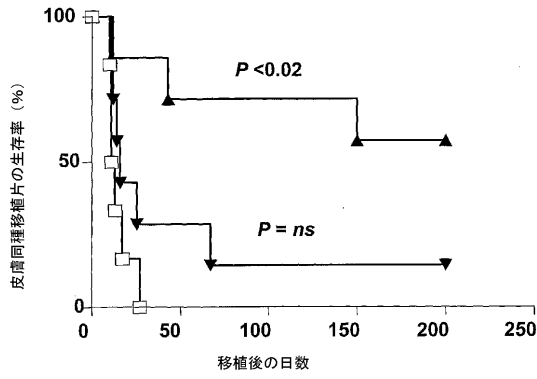
【 図 9 C 】

Fig. 9C



【 図 9 D 】

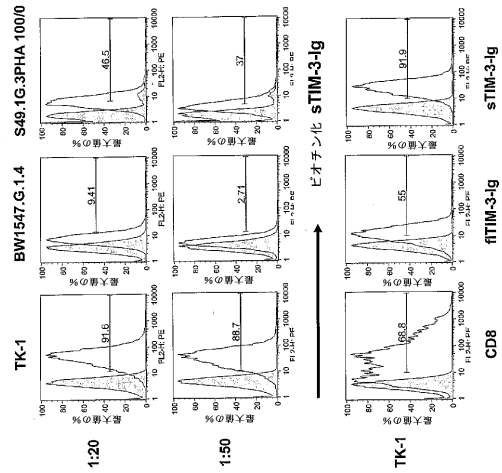
Fig. 9D



- 4x10⁵ CD4+CD25+ を加えた 4x10⁵ CD4+CD25- (未処置のドナー; n = 7; MST = 12)
- ▲ 4x10⁵ CD4+CD25+ を加えた 4x10⁵ CD4+CD25- (DST + αCD154 + hlg1 処置ドナー; n = 7; MST = 150)
- ▼ 4x10⁵ CD4+CD25+ を加えた 4x10⁵ CD4+CD25- (DST + αCD154 + fl-TIM-3-Ig 処置ドナー; n = 7; MST = 16)

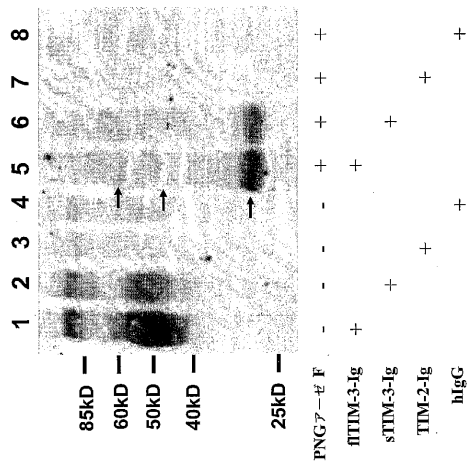
【 図 10 A 】

Fig.10A



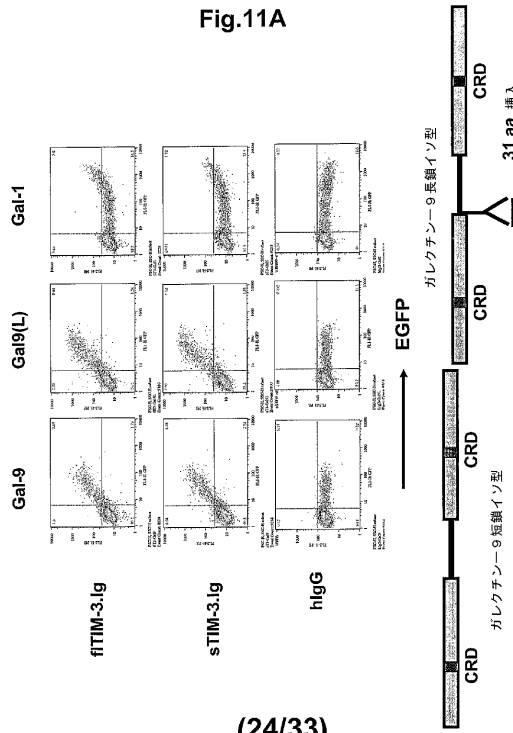
【 図 10 B 】

Fig.10B



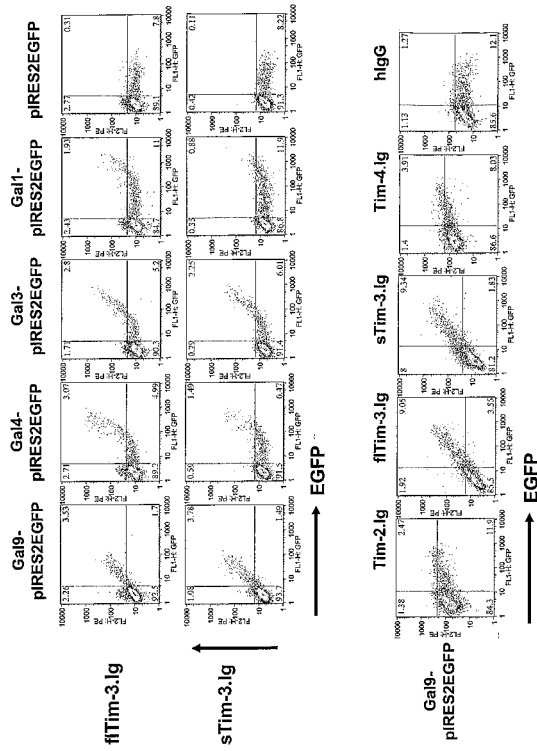
【 図 11 A 】

Fig.11A



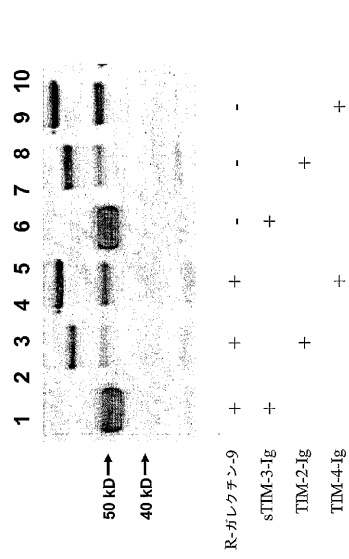
【 1 1 B 】

Fig.11B



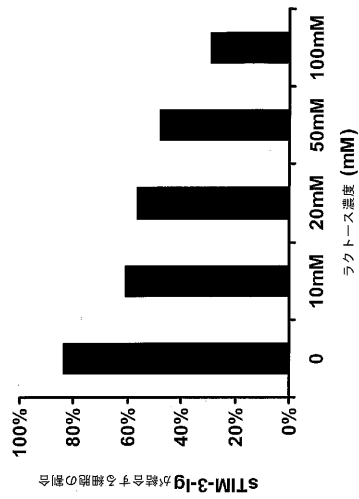
【 1 1 C 】

Fig.11C



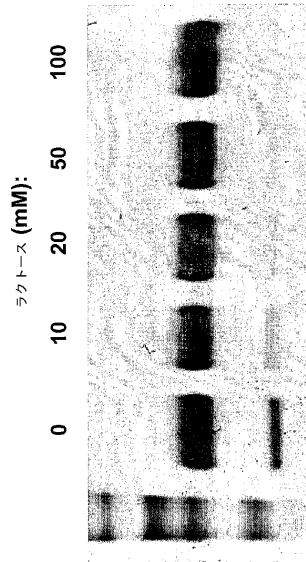
【 1 2 A 】

Fig.12A



【 1 2 B 】

Fig.12B



【 図 1 2 C 】

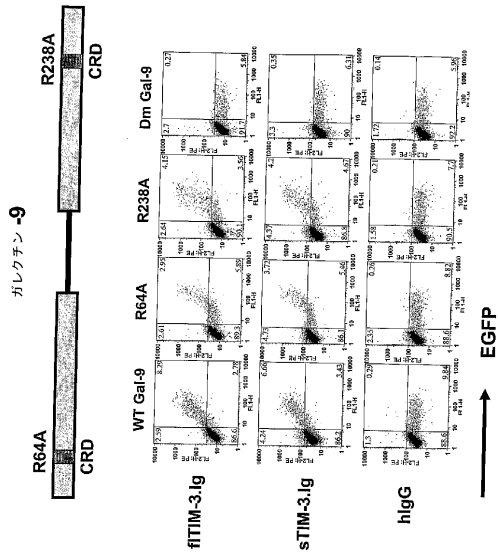


Fig.12C

【 図 1 3 A 】

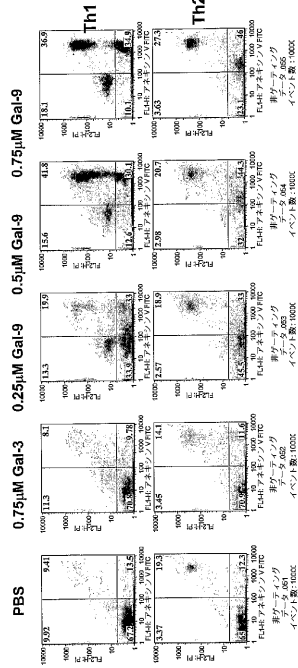


Fig.13A

DO11.10 細胞:
Gal-9処理の8時間後

【 図 1 3 B 】

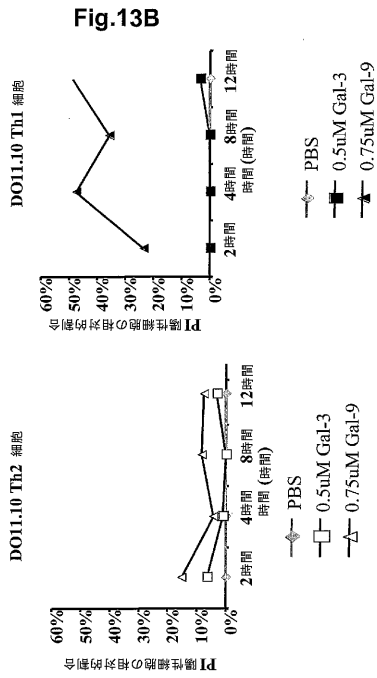


Fig.13B

【 図 1 4 A 】

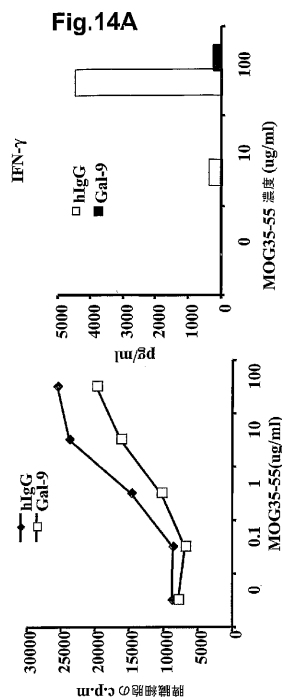
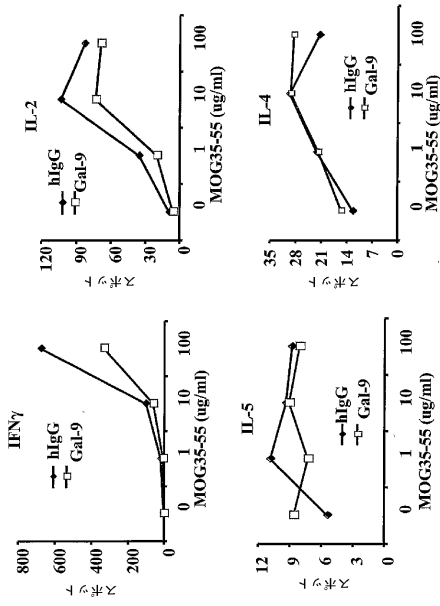


Fig.14A

【 14 B 】

Fig.14B



【 配列表 】

0005474009000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100133905
弁理士 石井 良夫
- (74)代理人 100113837
弁理士 吉見 京子
- (74)代理人 100127421
弁理士 後藤 さなえ
- (74)代理人 100090941
弁理士 藤野 清也
- (72)発明者 クチロー, ビジャイ ケイ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02459-3424, ニュートン, フェアヘイブン
ロード 30
- (72)発明者 ストロム, テリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446, ブルックリン, ケナード ロード 22
- (72)発明者 チャ, ユージーン ケイ.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 11791, マットンタウン, ガーランド ドライブ 31
- (72)発明者 チャクラバルティ, スモネ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, グレイ ストリート 32
ビー
- (72)発明者 サバトス, キャサリーン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446, ブルクッリン, ハーバード ストリート
213, アpartmentナンバー8
- (72)発明者 チュー, チェン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02120, ボストン, セイント アルフォンサス ス
トリート 75, アpartment 209
- (72)発明者 チェン, シン シャオ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02481, ウェルズリー, カークランド アベニュー
35
- (72)発明者 サンチェス-フエゴ, アルバート
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ハーバード ストリート
334

審査官 池上 京子

- (56)参考文献 特表2001-501831(JP, A)
国際公開第03/063792(WO, A1)
MONNEY, L. et al., "Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activ
ation and severity of an autoimmu, NATURE, 2002年 1月31日, Vol.415, No.6871, P
.536-541

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00 - 38/58

A61K 39/00 - 39/44

A61K 48/00

C07K 1/00 - 19/00

C12N 15/00

G01N 33/00 - 33/98

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	TIM-3多肽		
公开(公告)号	JP5474009B2	公开(公告)日	2014-04-16
申请号	JP2011177551	申请日	2011-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	布赖汉姆妇女医院 BETH LSRAEL DEACONESS MEDICAL CENT		
申请(专利权)人(译)	该Buraihamu妇科医院有限公司 贝丝以色列医疗中心Deakonesu		
当前申请(专利权)人(译)	在布莱根妇女医院公司 布里格姆妇女医院, INC. 贝斯以色列Deakonesu医疗中心有限公司		
[标]发明人	クチロービジャイケイ ストロムテリー チャユージーンケイ チャクラバルティスモネ サバトスキャサリーン チューチェン チェンシンシャオ サンチェスフエゴアルバート		
发明人	クチロー, ビジャイ ケイ. ストロム, テリー チャ, ユージーン ケイ. チャクラバルティ, スモネ サバトス, キャサリーン チュー, チェン チェン, シン シャオ サンチェス-フエゴ, アルバート		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C07H21/04 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C12N5/06		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P27/14 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K14/4713 C07K14/70503 C07K16/28 C07K2319/30 C07K16/18 G01N33/505		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K37/02.ZNA A61K38/00 A61K38/16 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K47/26 A61K47/48 A61K47/50 A61K47/54 A61K47/60 A61K47/68 A61P1/00 A61P1/16 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00.101 A61P3/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00.105 A61P43/00.111 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/04 A61P7/06 C07K14/725 C07K16/24 C12N15/00.A C12N15/12 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/686.Z C12Q1/6876.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 4B024/AA01 4B024/AA15 4B024/BA21 4B024/BA53 4B024/BA63 4B024/CA02 4B063 /QA18 4B063/QQ61 4B063/QR16 4B063/QR77 4B063/QS38 4C076/CC07 4C076/DD66A 4C076 /DD66M 4C076/EE23M 4C076/EE41M 4C076/EE59M 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA01 4C084 /BA08 4C084/BA20 4C084/BA41 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA332 4C084/ZA532 4C084/ZA552 4C084/ZA592 4C084/ZA622 4C084/ZA662 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB052 4C084/ZB082 4C084/ZB132 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZC062 4C084/ZC352 4C084/ZC412 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085		

