

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-505843

(P2016-505843A)

(43) 公表日 平成28年2月25日(2016.2.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	4 C O 8 4
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 D	4 H O 4 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-549721 (P2015-549721)	(71) 出願人	512050737
(86) (22) 出願日	平成25年12月19日 (2013.12.19)		アンブリミュン, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月18日 (2015.6.18)		アメリカ合衆国 メリーランド 2087
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/076619		8, ゲイザースバーグ, ダブリュー.
(87) 国際公開番号	W02014/100439		ワトキンス ミル ロード 45, ス
(87) 国際公開日	平成26年6月26日 (2014.6.26)		イート エー
(31) 優先権主張番号	61/739, 272	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成24年12月19日 (2012.12.19)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/739, 353		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成24年12月19日 (2012.12.19)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	61/739, 287	(74) 代理人	100181641
(32) 優先日	平成24年12月19日 (2012.12.19)		弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B 7 - H 4 特異的抗体、並びにその組成物及び使用方法

(57) 【要約】

B 7 - H 4 特異的抗体並びにその組成物及び使用方法が開示される。抗体は、内因性 B 7 - H 4 ポリペプチド、組換え B 7 - H 4 タンパク質及びその融合物、又はそれらの組み合わせに特異的であり得る。B 7 - H 4 特異的抗体を使用して炎症反応を低下させる方法又は炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害を治療する方法もまた開示される。この抗体を対象に投与することにより、対象における細胞遊離 B 7 - H 4 レベルを低下させ、又は B 7 - H 4 媒介性シグナル伝達の細胞遊離 B 7 - H 4 による遮断を低下させることができる。一部の実施形態では、抗体は、膜貫通 B 7 - H 4 を模倣する B 7 - H 4 - I g 融合タンパク質と組み合わせて投与される。好ましくは抗体は、共投与された B 7 - H 4 - I g 融合タンパク質には結合することなしに、細胞遊離 B 7 - H 4 と結合する。診断方法、治療有効性の判定方法、及び治療する患者を選択する方法もまた開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体試料中の B 7 - H 4 ポリペプチドのレベルを決定する方法であって、前記生体試料をイムノアッセイに供するステップを含み、前記イムノアッセイが、前記生体試料を、2 H 9、h B 7 - H 4 . m 1、2 D 1、6 H 3、8 E 1 1、H 7 4、H M H 4 - 5 G 1、そのヒト化変異体、及びその抗原結合断片からなる群から選択される少なくとも1つの B 7 - H 4 特異的抗体と接触させることと、前記抗体を検出することを含む、方法。

【請求項 2】

前記イムノアッセイが、ラジオイムノアッセイ、E L I S A、免疫沈降アッセイ、ウエスタンブロット、蛍光イムノアッセイ、及び免疫組織化学からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記イムノアッセイが、捕捉抗体と検出抗体とを含む E L I S A であり、前記捕捉抗体及び検出抗体が、2 H 9、h B 7 - H 4 . m 1、2 D 1、6 H 3、8 E 1 1、H 7 4、H M H 4 - 5 G 1、そのヒト化変異体、及びその抗原結合断片からなる群から選択される2つの異なる B 7 - H 4 特異的抗体であり、

及び前記捕捉抗体及び検出抗体又は断片が B 7 - H 4 の非重複エピトープを認識する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記捕捉抗体が 2 H 9 F (a b ') 2 であり、且つ前記検出抗体が 6 H 3 である、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記捕捉抗体が 2 H 9 F (a b ') 2 であり、且つ前記検出抗体が h B 7 - H 4 . m 1 である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 B 7 - H 4 ポリペプチドが B 7 - H 4 融合タンパク質であり、捕捉抗体が 2 H 9 F (a b ') 2 又は H 7 4 であり、且つ前記検出抗体が抗 F c 抗体である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記捕捉抗体が B 7 - H 4 の I g V ドメインと結合し、且つ前記検出抗体が B 7 - H 4 の I g V ドメインと結合する、請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記検出抗体が、h B 7 - H 4 . m 1、そのヒト化断片、又はその抗原結合断片である、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記 h B 7 - H 4 . m 1 がビオチン化されている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記捕捉抗体が B 7 - H 4 の前記 I g V ドメインと結合し、且つ前記検出抗体が B 7 - H 4 の前記 I g C ドメインと結合する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 11】

前記捕捉抗体が、2 H 9、ヒト化変異体、又はその抗原結合断片である、請求項 7 又は 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記捕捉抗体が 2 H 9 の F (a b ') 2 断片である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 2 H 9 の F (a b ') 2 断片が、配列番号 5 5 を含む軽鎖可変領域と配列番号 5 5 を含む重鎖可変領域とを含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記検出抗体が、6 H 3、そのヒト化変異体、又はその抗原結合断片である、請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 15】

前記 6H3 抗体が、配列番号 61 を含む軽鎖可変領域と配列番号 63 を含む重鎖可変領域とを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 6H3 抗体がビオチン化されている、請求項 14 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記捕捉抗体が B7 - H4 の IgC ドメインと結合し、且つ前記検出抗体が B7 - H4 の IgV ドメインと結合する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 19】

前記捕捉抗体が、2D1、6H3、8E11、H74、そのヒト化変異体及びその抗原結合断片からなる群から選択され、且つ前記検出抗体が、2D9、そのヒト化変異体、若しくはその抗原結合断片、又は hB7 - H4 . m1、そのヒト化変異体、若しくはその抗原結合断片である、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記捕捉抗体が、2D9、そのヒト化変異体若しくはその抗原結合断片、又は hB7 - H4 . m1、そのヒト化変異体若しくはその抗原結合断片であり、且つ前記検出抗体が、HMH4 - 5G1 又は hB7 - H4 . m1、そのヒト化変異体又はその抗原結合断片であり、前記 ELISA が細胞遊離 B7 - H4 を検出するが、アミノ酸配列の配列番号 10 又は 18 を含む B7 - H4 融合タンパク質は検出しない、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記イムノアッセイが、捕捉抗体と検出抗体とを含む ELISA であり、前記捕捉抗体が、2D9、H74、2D1、6H3、8E11、そのヒト化変異体、又はその抗原結合断片であり、且つ前記検出抗体がヒト IgG1 Fc に特異的であり、前記 ELISA が、ヒト IgG の Fc 領域に融合した B7 - H4 細胞外ドメインを含む B7 - H4 融合タンパク質を検出するが、細胞遊離 B7 - H4 は検出しない、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 22】

B7 - H4 - Ig 融合タンパク質の薬物動態を決定する方法であって、前記融合タンパク質を投与された対象から得られた第 1 の生体試料のアリコート及び第 2 の生体試料のアリコートに対して請求項 21 に記載の ELISA を実施するステップを含む方法。

30

【請求項 23】

前記第 1 の生体試料と前記第 2 の生体試料とが、数分、数時間、数日、又は数週間あけて前記対象から得られる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

捕捉抗体と検出抗体とを含む第 2 の ELISA を実施するステップをさらに含む、請求項 22 又は 23 に記載の方法において、前記捕捉抗体が、2D9、そのヒト化変異体、若しくはその抗原結合断片、又は hB7 - H4 . m1、そのヒト化変異体、若しくはその抗原結合断片であり、且つ前記検出抗体が、HMH4 - 5G1、そのヒト化変異体、又はその抗原結合断片であり、前記 ELISA が細胞遊離 B7 - H4 を検出するが、配列番号 10 又は 18 のアミノ酸配列を含む B7 - H4 融合タンパク質は検出せず、前記第 1 の ELISA 及び第 2 の ELISA が前記第 1 及び第 2 の生体試料の異なるアリコートに対して実施される、方法。

40

【請求項 25】

前記生体試料が組織又は体液試料である、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記生体試料が、尿、全血、血清、血漿、涙、唾液、脳脊髄液、リンパ液、滑液、及び喀痰からなる群から選択される体液である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記体液が血清又は血漿である、請求項 26 に記載の方法。

50

【請求項 28】

免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌に罹っている又は罹っている疑いがある対象における免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌の重症度を決定する方法であって、

(a) 請求項 5～20 のいずれか一項に記載の方法に従い対象からの生体試料における細胞遊離 B7-H4 レベルを決定するステップと、

(b) 前記生体試料の細胞遊離 B7-H4 レベルを、免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌の疾患重症度と相関する基準細胞遊離 B7-H4 レベルと比較するステップであって、それにより前記対象の免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌の重症度を決定するステップと

を含む方法。

【請求項 29】

対象における免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌の診断を補助する方法、又は免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌の発症傾向を評価する方法であって、

請求項 5～20 のいずれか一項に記載の方法に従い対象からの生体試料における前記細胞遊離 B7-H4 レベルを決定するステップ

を含み、

対照の細胞遊離 B7-H4 のレベルと比べた前記生体試料の細胞遊離 B7-H4 レベルの上昇が、免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌の指標、又は免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌を発症する傾向の増加の指標となる、方法。

【請求項 30】

対象における免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌に対する治療の有効性を判定する方法であって、

請求項 5～20 のいずれか一項に記載の方法に従い、治療前又は治療の経過中に前記対象から得られた 1 つ以上の生体試料から細胞遊離 B7-H4 のレベルを決定するステップを含み、

前記対象から得られた試料における細胞遊離 B7-H4 レベルの経時的な減少が、前記治療が有効であることの指標となる、方法。

【請求項 31】

免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌を治療する対象を選択する方法であって、

(a) 請求項 5～20 のいずれか一項に記載の方法に従い、前記対象から得られた生体試料における細胞遊離 B7-H4 レベルを決定するステップと、

(b) 前記生体試料の細胞遊離 B7-H4 レベルを対照の細胞遊離 B7-H4 レベルと比較するステップと、

(c) 前記生体試料の細胞遊離 B7-H4 レベルが前記対照の細胞遊離 B7-H4 レベルより高いとき、前記対象を治療に選択するステップと

を含む方法。

【請求項 32】

対象における免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患／障害、又は癌に対する治療の有効性を判定する方法であって、

請求項 5～20 のいずれか一項に記載の方法に従い、第 1 の生体試料及び前記第 1 の試料より後に採取した第 2 の生体試料の細胞遊離 B7-H4 レベルを決定するステップ

を含み、

前記試料が前記治療の経過にわたり前記対象から得られ、及び前記第 1 の試料と比較した前記第 2 の試料の細胞遊離 B7-H4 レベルの減少が、前記治療が有効であることの指標となる、方法。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

対象における免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害、又は癌の診断を補助する方法、又は免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害、又は癌の発症傾向を評価する方法であって、請求項5～20のいずれか一項に記載の方法に従い第1の生体試料及び前記第1の試料より後に採取した第2の生体試料の細胞遊離B7-H4レベルを決定するステップ

を含み、

前記第1の試料と比較した前記第2の試料の細胞遊離B7-H4レベルの増加が、前記免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害、又は癌の発症又は悪化の指標となる、方法。

【請求項34】

免疫応答、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害、又は癌を治療する対象を選択する方法であって、請求項5～20のいずれか一項に記載の方法に従い、第1の生体試料及び前記第1の試料より後に採取した第2の生体試料の細胞遊離B7-H4レベルを決定するステップと、前記第2の生体試料の細胞遊離B7-H4レベルが前記第1の試料の細胞遊離B7-H4レベルより高いとき、前記対象を治療に選択するステップとを含む方法。

【請求項35】

1つ又は複数の生体試料が血清又は血漿である、請求項28～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

前記炎症性又は自己免疫性疾患/障害が、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、円形脱毛症、強直性脊椎炎(anklosing spondylitis)、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ球増殖性症候群(alps)、自己免疫性血小板減少性紫斑病(ATP)、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー-皮膚炎、慢性疲労免疫不全症候群(chronic fatigue syndrome immune deficiency, syndrome)(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、癩痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、デゴス病(Degos' disease)、皮膚筋炎、皮膚筋炎-若年性、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症-線維筋炎、グレーブス病(Graves' disease)、ギラン・バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA腎症、インスリン依存型糖尿病(I型)、若年性関節炎、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発筋炎・皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフマン症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、白斑、及びウェゲナー肉芽腫症からなる群から選択される、請求項28～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項37】

前記癌が、卵巣癌、食道癌、腎癌、胃癌、肝癌、肺癌、結腸癌、膵癌、乳癌及び前立腺癌、及び皮膚癌(メラノーマ)からなる群から選択される、請求項28～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

前記対象を免疫応答、炎症性又は自己免疫性疾患/障害に関して治療するステップをさらに含む、請求項28～31又は33～34のいずれか一項に記載の対象を治療する方法。

【請求項39】

前記対象において免疫応答、炎症性又は自己免疫性疾患/障害が検出又は診断され、B7-H4-Ig融合タンパク質を含む組成物を前記対象に投与することにより前記対象が治療される、請求項38に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 40】

前記 B7-H4-Ig 融合タンパク質が配列番号 11 のアミノ酸配列を含む、請求項 39 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2012年12月19日に出願された米国仮特許出願第 61/739,272 号明細書、2012年12月19日に出願された米国仮特許出願第 61/739,287 号明細書、及び2012年12月19日に出願された米国仮特許出願第 61/739,353 号明細書の利益及びそれに対する優先権を主張するものであり、各々が全体として参照により援用される。

10

【0002】

本発明の分野は、概して B7-H4 特異的抗体、並びに炎症性及び自己免疫性疾患及び障害の診断及び治療方法におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0003】

免疫応答の調節は、多くの疾患及び障害の治療において重要である。例えば、癌又は感染症に罹患している患者では、免疫応答を増強することが有利であり得る。或いは、炎症性病態に罹患している患者では、免疫応答を阻害し又は低下させることが有益であり得る。

20

【0004】

慢性及び持続性の炎症は、関節リウマチ (RA) 及び全身性エリテマトーデス (SLE) などの全身性自己免疫疾患が発病及び進行する主な原因である。RA は高度に炎症性の多発性関節炎であり、関節の破壊、変形及び機能喪失を生じる場合が多い。末梢関節の付加的で対称性の腫脹が、この疾患の顕著な特徴である。関節外の特徴及び全身症状が見られることがよくあり、関節症状の発症に先行し得る。慢性痛、能力障害及び超過死亡が不運な続発症である。RA が進行する間、滑膜の過形成が起こり、滑膜間質に CD4+ T 細胞、B 細胞、CD8+ T 細胞、マクロファージ、樹状細胞及び好中球が浸潤する結果として、炎症関節の滑膜表層がその厚さを増す (Feldmann, M. et al., Cell, 85:307-10 (1996); Moreland, L.W. et al., N Engl J Med, 337:141-7 (1997))。SLE では自己抗体の産生によって糸球体、皮膚、肺及び滑膜を含む多くの組織及び臓器で免疫複合体の沈着が起こり、それにより特徴的な慢性炎症及び組織損傷を伴うリウマチ性病変が生じる。

30

【0005】

共シグナル伝達分子は、共刺激及び共阻害機能を有するものを含め、有効な免疫応答の誘導及び望ましくない自己免疫の防止にとって重要である。B7-CD28ファミリーを介したシグナルがこのバランスの主要な調節因子であり、自己免疫の調節において中心的役割を果たすことが示されている。全身性自己免疫疾患における炎症反応の持続は、共阻害機能の障害又は共刺激機能の亢進のいずれかがこのバランスの喪失につながることを意味する。この点で、その受容体 PD-1 との結合後の主要な共阻害分子である B7-H1 に対する自己抗体がかなりの割合の RA 患者に認められ、且つその自己抗体の存在が RA 症状の進行に関与していることは、特に興味深い。

40

【0006】

B7-H4 は、最近になって B7ファミリーに加えられたものであり、T細胞応答の負の調節因子である。ヒト及びマウス B7-H4 は 87% のアミノ酸同一性を共有し、進化的に保存された重要な機能が示唆される。ヒト及びマウス B7-H4 mRNA はリンパ器官 (脾臓及び胸腺) 及び非リンパ器官 (肺、肝臓、精巣、卵巣、胎盤、骨格筋、膵臓、及び小腸を含む) の両方で広範に発現する。B7-H4 欠損マウスを陰性対照として用いた免疫組織化学 (IHC) 染色は、マウス B7-H4 が膵島細胞 (Wei, et al

50

、*J. Exp. Med.*、2008(8):1683-94(2011)及び肺上皮内層(Hofmeyer, et al., *J. Immunol.*、189(6):3054-63(2012))を含めた上皮性起源の細胞によって発現されることを明らかにする。B7-H4発現はまた、罹患腎の尿細管上皮細胞においても観察されている(Chen, Y., *Kidney Int.*、70(12):2092-9(2006) Epub 2006 Oct 18.)。しかしながら、造血細胞でのB7-H4の発現については文献に矛盾する報告があり、議論の余地が残されている。IHC染色は、B7-H4が乳房、腎臓、肺及び卵巣の腫瘍においても高度に発現することを明らかにし、及び逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)分析は、マウスB7-H4が前立腺癌、肺癌、及び結腸癌を含めた多くの腫瘍細胞株においても高度に発現することを示している。B7-H4は腫瘍関連マクロファージ(TAM)によって高度に発現され、腫瘍血管系に存在する(Kryczek, et al., *J. Immunol.*、177(1):40-4(2006)、Kryczek, et al., *J. Exp. Med.*、2003(4):871-81(2006)、Kryczek, et al., *Cancer Res.*、67(18):8900-5(2007))。調節性T細胞(Treg)はIL-6及びIL-10を介してTAM上でのB7-H4の上方制御を誘導する;これは、Tregが免疫抑制に寄与する際の機構の一つであると考えられている(Kryczek, J. I., *J. Immunol.*、177(1):40-44(2006))。

10

【0007】

B7-H4の受容体は同定されていない。B7-H4は、CD28、CTLA-4、ICOS、BTLA及びPD-1などの既知のCD28ファミリーメンバーに結合しないことが示されており(Sica, et al., *Immunity*、18:849-861(2003))、従ってこれらがB7-H4の受容体である見込みはない。B7-H4トランスフェクタント及びB7-H4-Ig融合タンパク質を使用した機能的研究は、TCR媒介性CD4⁺及びCD8⁺T細胞増殖、細胞周期進行及びIL-2産生を阻害するシグナルがB7-H4によって伝達されることを実証する。B7-1共刺激はB7-H4-Ig誘導性阻害に打ち勝つことができない。インビトロ活性と一致して、B7-H4の異所性発現は同種移植片モデルにおいて組織寛容を促進する(Wang, et al., *Cell Transplant*、21(1):99-111(2012))。B7-H4の広範な誘導性発現は、機能的研究と併せると、B7-H4が末梢組織で免疫応答を下方制御し末梢寛容を維持する働きを示唆している。

20

30

【0008】

最近の結果は、B7-H4が好中球応答の負の調節因子としても働くことを実証している。好中球は自然免疫系の鍵となる構成要素であり、病原体に対する宿主防御の最前線である。しかしながら好中球は慢性炎症及び自己免疫疾患にも寄与し得る。B7-H4ノックアウトマウスはTh1応答の増加を示し、好中球依存性の免疫応答の増進に起因してリステリア菌(*Listeria monocytogenes*)感染症に対する抵抗性が高くなる(Suh, et al., *Mol Cell Biol.*、26(17):6403-11(2006)及びZhu, G., et al., *Blood*、113(8):1759-67(2009) Epub 2008 Dec 24)。単量体B7-H4-IgVドメイン又は細胞外ドメイン(ECD)を流体力学的にトランスフェクトしたマウスは、リポ多糖(LPS)及びリステリア感染症に対する好中球応答が増加した一方、二量体B7-H4-Igは骨髄由来好中球前駆体の増殖を低減する(Zhu, G., et al., *Blood*、113(8):1759-67(2009) Epub 2008 Dec 24)。

40

【0009】

可溶性形態のB7-CD28ファミリー分子もまた、リウマチ様疾患の進行に関与する。諸研究により、RA患者では可溶性PD-1を検出することができ、可溶性PD-1のレベルが滑液中のTNF-濃度と相関することが分かっている。可溶性B7-H4(sH4)(本明細書では細胞遊離B7-H4及び循環型のB7-H4とも称される)が潜在

50

的なバイオマーカーとして卵巣癌患者に検出されており、68人のRA患者及び24人の健常ボランティアの研究結果からは、健常者では13%に過ぎないのに対し、65%のRA患者の血液に可溶性B7-H4が存在したことが示された(Simon, et al., Cancer Res., 66(3):1570-5(2006)、Azuma, et al., PLoS Med., 6(10):e1000166(2009). Epub 2009 Oct 20)。可溶性B7-H4のレベルは健常者(<5 ng/ml)と比較してRA患者(96.1 ng/ml)で有意に高かった。

マウスモデルにおけるインビボ研究は、sH4の過剰発現及びB7-H4の欠失の両方が炎症を引き起こしたことを示している(Azuma, et al., PLoS Med., 6(10):e1000166(2009). Epub 2009 Oct 20)。

マウスにおける症状は対照と比べて早期に現れ、より重篤であったとともに、可溶性B7-H4の炎症効果は好中球に依存していることが分かった。B7-H4による正常なシグナル伝達を模倣するタンパク質を使用して、マウスにおける疾患の発症が予防された。B7-H4-Ig融合タンパク質を使用して膜貫通B7-H4を介したシグナル伝達を増加させることにより自己免疫性及び炎症性疾患/障害を治療するための組成物及び方法が、例えば、米国特許出願公開第2012/0177645号明細書及び同第2012/0276095号明細書に考察され；及び可溶性B7-H4の生物学的活性を妨げるための組成物及び方法が、例えば、米国特許第7,931,896号明細書及び同第7,989,173号明細書、及び米国特許出願公開第2009/0142342号明細書に考察されている。しかしながら、膜貫通B7-H4を介したシグナル伝達を増加させる薬剤と、膜貫通B7-H4を介したシグナル伝達の細胞遊離B7-H4媒介性阻害を低下させ又は遮断する薬剤とを含む併用療法が依然として必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許出願公開第2012/0177645号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2012/0276095号明細書

【特許文献3】米国特許第7,931,896号明細書

【特許文献4】米国特許第7,989,173号明細書

【特許文献5】米国特許出願公開第2009/0142342号明細書

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Feldmann, M. et al., Cell, 85:307-10(1996)

【非特許文献2】Moreland, L.W. et al., N Engl J Med, 337:141-7(1997)

【非特許文献3】Wei, et al., J. Exp. Med., 208(8):1683-94(2011)

【非特許文献4】Hofmeyer, et al., J. Immunol., 189(6):3054-63(2012)

【非特許文献5】Chen, Y., Kidney Int., 70(12):2092-9(2006) Epub 2006 Oct 18

【非特許文献6】Kryczek, et al., J. Immunol., 177(1):40-4(2006)

【非特許文献7】Kryczek, et al., J. Exp. Med., 203(4):871-81(2006)

【非特許文献8】Kryczek, et al., Cancer Res., 67(18):8900-5(2007)

【非特許文献9】Sica, et al., Immunity, 18:849-861(2003)

10

20

30

40

50

【非特許文献10】Wang, et al., Cell Transplant, 21 (1) : 99 - 111 (2012)

【非特許文献11】Suh, et al., Mol Cell Biol., 26 (17) : 6403 - 11 (2006)

【非特許文献12】Zhu, G., et al., Blood, 113 (8) : 1759 - 67 (2009) Epub 2008 Dec 24

【非特許文献13】Simon, et al., Cancer Res., 66 (3) : 1570 - 5 (2006)

【非特許文献14】Azuma, et al., PLoS Med., 6 (10) : e1000166 (2009). Epub 2009 Oct 20

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

従って、本発明の目的は、免疫応答、炎症性、及び自己免疫性疾患/障害を治療するための組成物及び方法を提供することである。

【0013】

本発明のさらなる目的は、細胞遊離 B7 - H4 の生物学的活性を低下させ又は阻害すると同時に膜貫通 B7 - H4 媒介性シグナル伝達を増加させるための組成物及び方法を提供することである。

【0014】

本発明のさらなる目的は、細胞遊離 B7 - H4 の産生を低下させ、阻害し、又は遮断する方法を提供することである。

20

【0015】

本発明の別の目的は、模倣タンパク質と、細胞遊離タンパク質、膜貫通タンパク質、又はそれらの組み合わせとを含有する試料において、B7 - H4 Ig 融合タンパク質などの、膜貫通 B7 - H4 を模倣する可溶性タンパク質を、細胞遊離 B7 - H4 と、又は膜貫通 B7 - H4 と、又はそれらの組み合わせと区別するための組成物及び方法を提供することである。

【0016】

本発明の別の目的は、細胞遊離 B7 - H4 及び膜貫通 B7 - H4 の両方を含有する試料において、細胞遊離 B7 - H4 を膜貫通 B7 - H4 と区別するための組成物及び方法を提供することである。

30

【0017】

本発明の別の目的は、対象における自己免疫性又は炎症性疾患/障害、又は癌の診断を補助するための、又は対象が自己免疫性又は炎症性疾患/障害、又は癌を発症する傾向を評価するための組成物及び方法を提供することである。

【0018】

本発明のさらなる目的は、自己免疫性又は炎症性疾患/障害、又は癌に罹っている又は罹っている疑いがある対象における自己免疫性又は炎症性疾患/障害、又は癌の重症度を決定するための組成物及び方法を提供することである。

40

【0019】

本発明の別の目的は、自己免疫性又は炎症性疾患/障害、又は癌に対する治療の有効性を判定するための組成物及び方法を提供することである。

【0020】

本発明の別の目的は、自己免疫性又は炎症性疾患/障害、又は癌を治療する対象を選択するための組成物及び方法を提供することである。

【0021】

本発明の別の目的は、膜貫通 B7 - H4 を模倣する可溶性タンパク質などの、B7 - H4 療法薬の薬物動態パラメータ及び薬力学パラメータを計測するための組成物及び方法を提供することである。

50

【課題を解決するための手段】

【0022】

B7-H4 特異的抗体並びにその組成物及び使用方法が開示される。本抗体は、内因型 B7-H4 ポリペプチド、組換え B7-H4 タンパク質及びその融合物、又はそれらの組み合わせに特異的であり得る。例えば、抗体は、タンパク質機能にとって重要な保存されたドメイン、例えば IgV ドメインに結合することにより、B7-H4 ポリペプチドのほとんど又は全ての種を認識することができる。或いは、抗体は、膜貫通 B7-H4 又は B7-H4-Ig 融合タンパク質上ではマスクされているか又は存在しない細胞遊離型の B7-H4 上のエピトープに結合することができる。抗 B7-H4 抗体を含む医薬組成物もまた開示される。

10

【0023】

B7-H4 特異的抗体を使用して免疫応答を低下させる又は炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害を治療する方法もまた開示される。本抗体を、それを必要とする対象に投与することにより、対象における細胞遊離 B7-H4 レベルを低下させ、又は細胞遊離 B7-H4 による B7-H4 媒介性シグナル伝達の遮断を低下させることができる。好ましくは本抗体の投与により B7-H4 媒介性シグナル伝達が増加する。一部の実施形態では、本抗体は、B7-H4 シグナル伝達を誘導することにより膜貫通 B7-H4 を模倣する B7-H4-Ig 融合タンパク質と組み合わせて投与される。好ましくは、本抗体は、共投与された B7-H4-Ig 融合タンパク質には結合することなく細胞遊離 B7-H4 と結合する。一部の実施形態では、本抗 B7-H4 抗体は膜貫通 B7-H4 に結合して細胞外ドメインのタンパク質分解による切断を低下させ、阻害し又は防止し、それにより対象における細胞遊離 B7-H4 の形成を低下させ又は阻害することができる。従って、一部の実施形態では、本抗体の投与によりインビボでの細胞遊離 B7-H4 の産生が低下し又は防止される。好ましい実施形態では、本抗体はインビボでの細胞遊離 B7-H4 の産生を防止する一方、膜貫通 B7-H4 又は膜貫通 B7-H4 を模倣する可溶性タンパク質の活性、コグネイト B7-H4 受容体と会合するその能力、又は B7-H4 受容体を介したシグナル伝達を惹起するその能力を妨げない。

20

【0024】

B7-H4 特異的抗体を使用して生体試料中の B7-H4 ポリペプチドのレベルを決定する方法もまた開示される。例えば、一部の実施形態では、対象から得られた血清又は血漿などの生体試料がイムノアッセイに供され、ここでイムノアッセイは、生体試料を少なくとも1つの B7-H4 特異的抗体又は F(ab')₂ 断片などのその抗原結合断片と接触させることと、抗体又は断片を検出することを含む。好ましいイムノアッセイとしては、限定はされないが、ラジオイムノアッセイ、ELISA、免疫沈降アッセイ、ウエスタンブロット、蛍光イムノアッセイ、及び免疫組織化学が挙げられる。一部の実施形態では、それに加えて又は代えて、生体試料の細胞遊離 B7-H4 レベルは質量分析を用いて計測される。

30

【0025】

特に好ましいイムノアッセイは ELISA である。ELISA は典型的には2つの異なる B7-H4 特異的抗体、即ち捕捉抗体及び検出抗体の使用を含む。一部の実施形態では、B7-H4 のほとんど又は全ての種、例えば IgV ドメイン上のエピトープを認識する抗体又はその抗原結合断片を使用して、試料中の B7-H4 ポリペプチド種のほとんど又は全てが捕捉される。B7-H4 ポリペプチド種のほとんど又は全てを認識することのできる検出抗体を使用して生体試料の全 B7-H4 レベルを決定してもよく、又は検出抗体は B7-H4 ポリペプチドのある種に特異的であってもよい。一部の実施形態では、検出抗体は捕捉抗体と異なるドメイン又はエピトープを認識する。例えば、捕捉抗体又はその抗原 (antigen) 結合断片が IgV ドメインに結合する場合、検出抗体は IgC ドメインに結合し得る。一部の実施形態では、検出抗体は B7-H4 融合タンパク質の第2のポリペプチドを認識する。例えば、融合タンパク質の第2のポリペプチドがヒト IgG1 の Fc 領域である場合、その抗体は抗ヒト IgG1 Fc 抗体であり得る。このように

40

50

して、治療的 B 7 - H 4 融合タンパク質を試料中の全内因性 B 7 - H 4 タンパク質と区別することができる。一部の実施形態では、融合タンパク質が細胞遊離 B 7 - H 4 のみ、膜貫通 B 7 - H 4 のみ、又はそれらの組み合わせと区別され得る。

【 0 0 2 6 】

一部の実施形態では、検出抗体は、B 7 - H 4 融合タンパク質上ではマスクされているか又は存在しない細胞遊離 B 7 - H 4 上のエピトープを認識する。例えば、一部の実施形態において本抗体は、融合タンパク質、例えば配列番号 1 0 の融合タンパク質に存在しない細胞外ドメインの一部分、例えば I g C ドメインのその最後の数個のアミノ酸に結合する。このようにして、細胞遊離 B 7 - H 4 の量を、治療的融合タンパク質などの、生体試料中に存在し得る B 7 - H 4 ポリペプチドの他の種と区別することができる。好ましい実施形態では、生体試料は血漿又は血清である。他の実施形態では、細胞遊離 B 7 - H 4 上で認識されるエピトープは、B 7 - H 4 融合タンパク質上では立体構造の変化又は複合体形成によりエピトープが隠されるため認識されることができない。

10

【 0 0 2 7 】

B 7 - H 4 を検出する本開示の抗体及び方法は、複数の診断アッセイにおいて適用することができる。例えば、免疫応答、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の重症度を決定するための方法；炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害又は癌の診断を補助するための；又は炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の発症傾向を評価するための方法；免疫応答、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌に対する治療の有効性を判定するための方法；免疫応答、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌を治療する対象を選択するための方法；及び対象における免疫応答、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌に対する治療の有効性を判定するための方法が開示される。一部の実施形態では、これらの方法は、疾患 / 障害について対象を治療する追加的なステップを含む。

20

【 0 0 2 8 】

開示される組成物及び方法を使用して診断及び治療され得る炎症性及び自己免疫性疾患 / 障害としては、限定はされないが、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、急性散在性脳脊髄炎 (A D E M)、円形脱毛症、強直性脊椎炎 (a n k l o s i n g s p o n d y l i t i s)、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ球増殖性症候群 (a l p s)、自己免疫性血小板減少性紫斑病 (A T P)、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー - 皮膚炎、慢性疲労免疫不全症候群 (c h r o n i c f a t i g u e s y n d r o m e i m m u n e d e f i c i e n c y , s y n d r o m e) (C F I D S)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、瘢痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、デゴス病 (D e g o ' s d i s e a s e)、皮膚筋炎、皮膚筋炎 - 若年性、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症 - 線維筋炎、グレーブス病 (g r a v e ' s d i s e a s e)、ギラン・バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病 (I T P)、I g A 腎症、インスリン依存型糖尿病 (I 型)、若年性関節炎、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、視神経炎 (O N)、視神経脊髄炎 (N M O 又はデビック病)、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発筋炎・皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフマン症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎 / 巨細胞性動脈炎、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、白斑、及びウエゲナー肉芽腫症が挙げられる。

30

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 9 】

【 図 1 A - 1 G 】 図 1 A ~ 図 1 G は、E L I S A プレート上に固定化した $1 \mu g / m l$ の様々な B 7 - H 4 - I g 融合タンパク質 (配列番号 2 9)、(配列番号 3 1)、(配列番号 3 3)、(配列番号 3 5)、(配列番号 3 7)、及び (配列番号 3 9) と共にインキュ

50

べートした後の、漸増濃度 (ng/mL) の酵素結合抗 B7-H4 抗体 2H9 (図 1A)、2D1 (図 1B)、6H3 (図 1C)、hB7-H4.m1 (図 1D)、8E11 (図 1E)、HMH4-5G1 (図 1F) 及び H74 (図 1G) の検出 (吸光度 450nm) を示す一連の折れ線グラフである。

【図 2】図 2 は、膜貫通 B7-H4 の細胞外ドメインに対する抗体結合の推定認識部位をマッピングする図である。この図はまた、3つの異なる形態の B7-H4 の認識に用いられ得る 3つの例示的な ELISA スキームも示す。2H9/6H3 対は、完全な IgV 及び IgC ドメインを有する細胞遊離 B7-H4 を検出することができる。2H9/HMH4-5G1 対は、完全な IgV、及び IgC ドメインを有する細胞遊離 B7-H4、及び膜近傍 (juxta membrane) ドメインを検出することができる。2H9/hB7-H4.m1 対は、IgV ドメインを有する細胞遊離 B7-H4 を検出することができる。

10

【図 3】図 3 は、B7-H4 融合タンパク質標準の濃度 (pg/ml) を増加させたときの蛍光の計測値 (AU) としての捕捉 (抗 B7-H4 抗体 2H9 を使用) 及び検出 (抗 B7-H4 6H3-ビオチン+ユウロピウム標識ストレプトアビジンを使用) を示す折れ線グラフである。このサンドイッチ ELISA 法の検出限界 (LOD) は 8pg/ml の B7-H4 可溶性タンパク質である。B7-H4-Ig 標準として配列番号 25 を使用した。

【図 4】図 4 は、マウス又はヒト B7-H4 融合タンパク質 (配列番号 11) の濃度 (pg/ml) を増加させたときの吸光度 (450nm) の計測値としての捕捉 (抗 B7-H4 抗体 2H9 を使用) 及び検出 (抗 B7-H4 6H3-ビオチン+西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを使用) を比較する折れ線グラフである。

20

【図 5A-5B】図 5A 及び図 5B は、細胞遊離 B7-H4 の検出に捕捉/検出対: 2H9/6H3、2H9/HMH4-5G1 又は 2H9/hB7-H4.m1 をそれぞれ使用した 3つの ELISA 法を比較する散布図である。B7-H4-Ig 標準として配列番号 25 を使用した。

【図 6】図 6 は、B7-H4-Ig 融合タンパク質 (配列番号 25) の濃度を増加させたときの蛍光の計測値 (AU) としての捕捉 (抗 B7-H4 抗体 2H9 の F(ab')₂ 断片を使用) 及び検出 (抗 B7-H4 6H3 又は hB7-H4.m1 + 抗マウス Ig-ビオチン+ユウロピウム標識ストレプトアビジンを使用) を示す折れ線グラフである。

30

【図 7】図 7 は、健常ドナー (HD)、関節リウマチ対象 (RA)、又はシェーグレン症候群対象 (SS) から採取した血清中の細胞遊離 B7-H4 (ng/mL) のドットプロットである。実線の水平線は各対象集団の中央値を示す。1ng/ml をカットオフとして使用して、各対象集団の中で細胞遊離 B7-H4 の割合が高い患者と低い患者との比較を下側のパネルに示した。点線は検出限界 (LOD) を示す。B7-H4 濃度は、ELISA 法により、捕捉に抗 B7-H4 抗体 2H9 の F(ab')₂ 断片を使用し、且つ検出に抗 B7-H4 抗体 hB7-H4.m1 を使用して計測した。標準として配列番号 25 を使用した。

【図 8】図 8 は、SLE 治療中の経時的な一連の患者の血清中細胞遊離 B7-H4 レベル (sB7-H4 (ng/mL)) の縦断的研究を示す折れ線グラフである。B7-H4 濃度は、ELISA 法により、捕捉に抗 B7-H4 抗体 2H9 を使用し、且つ検出に抗 B7-H4 抗体 6H3 を使用して計測した。標準として配列番号 25 を使用した。

40

【図 9】図 9 は、健常ドナー (HD)、卵巣癌、乳癌、非小細胞肺癌 (NSCLC) 及び腎細胞癌 (RCC) 患者から採取した血清中の細胞遊離 B7-H4 (ng/mL) のドットプロットである。実線の水平線は各対象集団の中央値を示す。B7-H4 濃度は、ELISA 法により、捕捉に抗 B7-H4 抗体 2H9 の F(ab')₂ 断片を使用し、且つ検出に抗 B7-H4 抗体 hB7-H4.m1 を使用して計測した。標準として配列番号 25 を使用した。

【図 10A-10F】図 10A~図 10F は、6H3、2D1、2H9、hB7-H4.m1、HMH4-5G1、及び H74 を含む B7-H4 mAb の濃度を増加させること

50

による、且つ抗マウスIg HRPによって検出した、Ig V及びIg Cドメインを有するB7-H4-Ig(配列番号11)、EPKSC配列を含まないL型を有するB7-H4-Ig(配列番号21)及びL型及びEPKSCの代わりにHLQLLNSK配列を有するB7-H4-Ig(配列番号25)の検出を比較する折れ線グラフである。

【図11A-11C】図11A~図11Cは、漸増濃度のB7-H4-Ig(配列番号11)、Ig Vドメインのみを有するB7-H4-Ig(配列番号29)、完全な細胞外ドメイン(ECD)B7-H4-Ig(配列番号35)又は完全なECD(配列番号35)とB7-H4-Ig(配列番号11)を検出する3つのELISA法の2H9/6H3、2H9/HMH4-5G1及び2H9/hB7-H4.m1対を比較する折れ線グラフである。2H9/HMH4-5G1及び2H9/hB7-H4.m1対は細胞遊離B7-H4を検出することができたが、しかしB7-H4-Ig(配列番号11)は検出することができなかった。

10

【発明を実施するための形態】

【0030】

I. 定義

用語「細胞遊離B7-H4」は、本明細書では循環型のB7-H4、可溶性B7-H4及びsH4とも称され、内因性膜貫通B7-H4に由来する可溶性の単量体B7-H4ポリペプチドを含む。細胞遊離B7-H4は、典型的にはB7-H4の細胞外ドメイン又はその生物学的に活性な断片を含む。ヒト及びマウスB7タンパク質は、短い細胞質内ドメイン、単一の膜貫通ドメイン及び細胞外ドメインを含む。細胞外ドメインは、典型的には2つのIgドメイン、即ち膜近位Ig Cドメインと膜遠位Ig Vドメインとを含む。細胞遊離B7-H4という用語は、インビボで細胞によって産生される膜貫通型のB7-H4から脱落する又は切断されるB7-H4の任意のポリペプチド断片を包含する。細胞遊離B7-H4は、ウエスタンブロット分析によるとき、変性状態の単量体B7-H4分子の細胞外ドメイン全体と等しいサイズである約50kDaであり得る。細胞遊離B7-H4は対象の全身を循環し得るか、組織又は微小環境に局在し得るか、又はそれらの組み合わせであり得る。例えば、細胞遊離B7-H4は炎症部位又は腫瘍周囲に局在し、又はそこで増加し得る。

20

【0031】

用語「膜貫通B7-H4」は、膜貫通ドメインを含むB7-H4タンパク質を指す。膜貫通B7-H4は、典型的には細胞の細胞膜に固定されているB7-H4タンパク質を指す。

30

【0032】

核酸又はタンパク質に関して用語「内因型」の「内因」は、通常宿主に存在するか又はそこで発現する核酸又はタンパク質を指す。この用語はまた、核酸又はタンパク質の不適切な又は異常な発現も包含するが、組換えの核酸又はタンパク質の発現は包含しない。

【0033】

用語「異種」は、通常見出されないところに存在するエレメントを指す。例えば、あるプロモーターが異種核酸配列、例えば、通常はそのプロモーターに作動可能に連結されていることが見出されない配列に連結されてもよい。本明細書においてプロモーターエレメントの記載に使用するとき、異種とは、配列、種、又は数のいずれかが通常天然プロモーターに見出されるものと異なるプロモーターエレメントを意味する。例えば、プロモーター配列中の異種制御エレメントは、プロモーター制御を増強するために加えられた異なるプロモーターの制御/調節エレメント、又は同じプロモーターの追加の制御エレメントであってもよい。従って用語「異種」には、「外因性」及び「外来」エレメントもまた包含され得る。

40

【0034】

「成熟B7-H4」ポリペプチドは、リーダー配列のないB7-H4ポリペプチドを指す。成熟B7-H4ポリペプチドはまた、そのポリペプチドの活性に重要な、グリコシル化などのさらなる翻訳後修飾も含み得る。

50

【0035】

用語「抗体」は、別段の明確な指示がない限り最も広義の意味で用いられる。従って「抗体」は、天然に存在するものであっても、又は従来ハイブリドーマ技術によって産生されるモノクローナル抗体などの人工のものであってもよい。抗B7-H4抗体には、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体並びにそれらの抗体の抗原結合ドメイン及び/又は1つ以上の相補性決定領域を含む断片が含まれる。本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、B7-H4ポリペプチド又はその断片若しくは融合物と特異的に結合し及び/又は所望の生物学的活性を呈する任意の形態の抗体、又はその抗原結合断片を指し、具体的にはモノクローナル抗体(完全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及び抗体断片を、それがB7-H4ポリペプチド又はその断片若しくは融合物に特異的に結合し及び/又は所望の生物学的活性を呈する限りにおいて包含する。本明細書に提供される方法及び組成物においては、任意の特異的抗体を使用することができる。従って、一実施形態において用語「抗体」は、組み合わせられて標的抗原に対する特異的結合部位を形成する軽鎖免疫グロブリン分子由来の少なくとも1つの可変領域と重鎖分子由来の少なくとも1つの可変領域とを含む分子を包含する。一実施形態では、抗体はIgG抗体である。例えば、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4抗体である。抗体の「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、標的、即ち抗原結合領域に結合する免疫グロブリン分子の可変領域の少なくとも一部分として定義される。一実施形態では、それは具体的には、単一の抗B7-H4抗体及びそのクローン(アゴニスト、アンタゴニスト及び中和抗体を含む)並びに多エピトープ特異性を有する抗B7-H4抗体組成物を包含する。本方法及び組成物の抗体はモノクローナルであっても、又はポリクローナルであってもよい。抗体は、Fab断片、F(ab')₂断片、単鎖可変領域などを含む抗原結合抗体断片の形態であってもよい。インタクトな分子の断片は、酵素消化及び組換え手段を含む当該技術分野において周知の方法を用いて生成し得る。

10

20

【0036】

本明細書で使用されるとき、B7-H4に特異的な抗体の生成には任意の形態の「抗原」を使用することができる。従って、誘発B7-H4抗原は、単独の、若しくは当該技術分野において公知の1つ以上の免疫原性増強剤と組み合わせた、単一のエピトープ、複数のエピトープを含み得るか、又はタンパク質全体であり得る。誘発抗原は、単離された完全長タンパク質、細胞表面タンパク質(例えば、抗原の少なくとも一部をトランスフェクトした細胞で免疫する)、又は可溶性タンパク質(例えば、タンパク質の細胞外ドメイン部分のみで免疫する)であってもよい。抗原は遺伝子改変細胞で産生してもよい。抗原をコードするDNAはゲノムDNAであっても又は非ゲノムDNA(例えばcDNA)であってもよく、細胞外ドメインの少なくとも一部分をコードする。本明細書で使用されるとき、用語「部分」は、目的の抗原の免疫原性エピトープを構成する最小数のアミノ酸又は核酸(適宜)を指す。目的の細胞の形質転換に好適な任意の遺伝子ベクターを、限定はされないが、アデノウイルスベクター、プラスミド、及び非ウイルスベクター、例えばカチオン性脂質などを含め、用いることができる。一実施形態では、本明細書における方法及び組成物の抗体は、目的のB7-H4の細胞外ドメインの少なくとも一部分に特異的に結合する。

30

40

【0037】

本明細書に提供される抗体又はその抗原結合断片は、「生物活性剤」とコンジュゲートされてもよい。本明細書で使用されるとき、用語「生物活性剤」は、抗原と結合する及び/又は所望の生物学的作用を増強若しくは媒介する任意の合成の又は天然に存在する化合物を指す。

【0038】

一実施形態では、本発明において有用な結合断片は、生物学的に活性な断片である。本明細書で使用されるとき、用語「生物学的に活性」は、所望の抗原エピトープと結合し、且つ生物学的効果を直接的又は間接的に及ぼす能力を有する抗体又は抗体断片を指す。

50

【0039】

「二重特異性」抗体もまた本方法及び組成物において有用である。本明細書で使用されるとき、用語「二重特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる抗原エピトープに対して結合特異性を有する抗体、典型的にはモノクローナル抗体を指す。一実施形態では、それらのエピトープは同じ抗原のものである。別の実施形態では、それらのエピトープは2つの異なる抗原のものである。二重特異性抗体の作製方法は当該技術分野において公知である。例えば、二重特異性抗体は2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の共発現を用いて組換え産生することができる。例えば、Milstein et al., Nature 305: 537-39 (1983)を参照のこと。或いは、二重特異性抗体は化学的連結を用いて調製することができる。例えば、Brennan, et al., Science 229: 81 (1985)を参照のこと。二重特異性抗体には二重特異性抗体断片が含まれる。例えば、Hollinger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-48 (1993)、Gruber, et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994)を参照のこと。

10

【0040】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、特に「キメラ」抗体（重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である一方、残りの鎖が、別の種に由来する抗体又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である）、並びにかかる抗体の断片が、それが標的抗原と特異的に結合し及び/又は所望の生物学的活性を呈する限りにおいて含まれる（米国特許第4,816,567号明細書；及びMorrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)）。

20

【0041】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原決定基」及び「エピトープ」は同義的に使用され、抗体によって認識される構造を指す。

【0042】

本明細書で使用されるとき、「立体エピトープ」は、抗原アミノ酸配列の不連続な区間を含むエピトープである。抗体は抗原の三次元表面特徴、形状、又は三次構造に基づき立体エピトープと結合する。

30

【0043】

本明細書で使用されるとき、「線状エピトープ」は、抗原の連続的なアミノ酸配列により形成されるエピトープである。線状エピトープは、典型的には約5～約10個の連続するアミノ酸残基を含む。抗体は抗原の一次配列に基づき線状エピトープと結合する。

【0044】

本明細書で使用されるとき、用語「イムノアッセイ」は、1つ又は複数の抗体を使用して抗原と特異的に結合させるアッセイを指す。イムノアッセイは、1つ又は複数の特定の抗体の特異的結合特性を用いた抗原の検出、定量化、及び/又は標的化を特徴とする。

【0045】

結合剤、例えば抗体とタンパク質、例えばバイオマーカーとの間の「特異的結合」は、捕捉剤又は検出剤が混合物、例えば生体試料中に存在する特定の薬剤に優先的に結合する能力を指す。特異的結合はまた、約 10^{-6} M未満；好ましくは、約 10^{-8} M未満；及び、最も好ましくは、約 10^{-9} M未満の解離定数 (K_D) も意味する。

40

【0046】

タンパク質又はペプチドに言及するとき、抗体に「特異的に（又は選択的に）結合する」又は「～と特異的に（又は選択的に）免疫反応する」という語句は、タンパク質及び他の生物学的物質の異種集団の中でそのタンパク質の存在を決定するような結合反応を指す。従って、指定されるイムノアッセイ条件下で、その具体的な抗体は特定のタンパク質又はタンパク質複合体に少なくともバックグラウンドの2倍結合し、試料中に存在する他のタンパク質には実質的に有意な量では結合しない。

50

【0047】

本明細書で使用されるとき、「標識」又は「検出可能な部分」は、分光学的、光化学的、生化学的、放射線学的、免疫化学的、化学的、又は他の物理的手段によって検出可能な組成物である。例えば、有用な標識には、 ^{32}P 、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素（例えば、ELISAで一般に使用されるとおりのもの）、ビオチン、ジゴキシゲニン、又はハプテン及びタンパク質又は例えばペプチドに放射標識を組み込むことによって検出可能にすることができるか、若しくはペプチドと特異的に反応する抗体の検出に使用することができる他の実体が含まれる。標識は、核酸、タンパク質及び抗体に任意の位置で組み込み得る。例えば、Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diegoに記載される方法を用いるなど、抗体を標識とコンジュゲートするための当該技術分野において公知の任意の方法を用いることができる。

10

【0048】

本明細書で使用されるとき、用語「阻害薬」又は「拮抗薬」は、直接的又は間接的に、部分的又は完全に、標的とするバイオマーカーの活性を遮断し、活性化を減少させ、阻止し、遅延させ、活性又は発現を不活性化し、脱感作させ、又は下方制御する化合物又は組成物を指す。拮抗薬は、例えば、抗体などのポリペプチド、及び可溶性受容体、並びにsiRNA又はアンチセンスRNAなどの核酸、並びに小化学分子を含めた天然に存在する及び合成のバイオマーカー拮抗薬である。

20

【0049】

本明細書で使用されるとき、用語「単離された」は、その化合物が天然で存在する場合と異なる環境中であって、例えば、ペプチドを自然中には見られない濃度に濃縮することによるなどしてその天然の環境から切り離されている目的の化合物（例えば、ポリヌクレオチド又はポリペプチドのいずれか）を指す。「単離された」には、目的の化合物が実質的に高濃度化されている及び/又は目的の化合物が部分的又は実質的に精製されている試料中にある化合物が含まれる。

【0050】

「免疫細胞」は、限定はされないが、T細胞、B細胞、単球、樹状細胞、及びマクロファージを含む造血系起源の任意の細胞を指す。

30

【0051】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリペプチド」は、修飾（例えばリン酸化又はグリコシル化）に関わらず、任意の長さのアミノ酸鎖を指す。

【0052】

本明細書で使用されるとき、「共刺激ポリペプチド」又は「共刺激分子」は、T細胞上の細胞表面分子と相互作用するとT細胞応答を調節するポリペプチドである。

40

【0053】

本明細書で使用されるとき、「共刺激シグナル伝達」は、抗原特異的T細胞応答の間に抗原提示細胞上の共刺激ポリペプチドとT細胞上のその受容体との間の相互作用により生じるシグナル伝達活性である。以下の2つのシグナルによって媒介される抗原特異的T細胞応答：1) T細胞受容体(TCR)とMHCのコンテキストで提示される抗原ペプチドとの会合(シグナル1)、及び2) 共刺激受容体/リガンドの種々の対の間の接触によって送達される第2の抗原非依存性シグナル(シグナル2)。この「第2のシグナル」は、T細胞応答のタイプ(活性化か、対して阻害か)並びに当該の応答の強度及び持続期間の決定において重要であってよく、B7タンパク質ファミリーなどの共刺激分子からの正及び負の両方のシグナルによって調節される。

【0054】

本明細書で使用されるとき、用語「B7ポリペプチド」は、限定はされないが、B7-1、B7-2、B7-DC(PD-L2)、B7-H5、B7-H1(PD-L1)、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6を含めた、T細胞を共刺激するタンパク質のB7ファミリーのメンバー及びその生物学的に活性な断片及び/又は変異体を意味す

50

る。生物学的に活性な断片の代表例には、T細胞を共刺激する細胞外ドメイン又は細胞外ドメインの断片が含まれる。

【0055】

本明細書で使用されるとき、「炎症分子」は、限定はされないが、サイトカイン及びメタロプロテアーゼ、例えば、限定はされないが、IL-1、TNF-、TGF-、IFN-、IL-17、IL-6、IL-23、IL-22、IL-21、及びMMPなどを含めた、炎症反応をもたらす分子を指す。

【0056】

本明細書で使用されるとき、「ベクター」は、挿入されたセグメントの複製を生じさせるため別のDNAセグメントが挿入され得るレプリコン、例えば、プラスミド、ファージ、又はコスミドである。本明細書に記載されるベクターは発現ベクターであってもよい。

【0057】

本明細書で使用されるとき、「発現ベクター」は、1つ以上の発現制御配列を含むベクターである。

【0058】

本明細書で使用されるとき、「発現制御配列」は、別のDNA配列の転写及び/又は翻訳を制御及び調節するDNA配列である。

【0059】

「作動可能に連結された」は、そのように記載される構成要素がその通常の又は意図された機能を果たすように構成されるエレメントの配置を指す。従って、一体に作動可能に連結された2つの異なるポリペプチドは、物理的に一体に結合されながらもそのそれぞれの生物学的機能を保持している。

【0060】

本明細書で使用されるとき、「価数」は、分子当たりに利用可能な結合部位の数を指す。

【0061】

本明細書で使用されるとき、「保存」アミノ酸置換は、置換後のアミノ酸が同様の構造的又は化学的特性を有する置換である。

【0062】

本明細書で使用されるとき、用語「宿主細胞」は、組換えベクターが導入され得る原核及び真核細胞を指す。

【0063】

本明細書で使用されるとき、「形質転換された」及び「トランスフェクトされた」は、当該技術分野において公知の多くの技法による細胞への核酸(例えばベクター)の導入を包含する。

【0064】

本明細書で使用されるとき、用語「免疫(immunologic)」応答、「免疫(immunological)」応答又は「免疫(immune)」応答は、被投与患者におけるペプチドに対する有益な体液性応答(抗体媒介性)及び/又は細胞性応答(抗原特異的T細胞又はその分泌産物によって媒介される)の発生である。かかる応答は、免疫原の投与により誘導される能動的応答であることも、又は抗体若しくはプライミングされたT細胞の投与により誘導される受動的応答であることもある。細胞性免疫応答は、クラスI又はクラスII MHC分子の協力によるポリペプチドエピトープの提示により抗原特異的CD4⁺ Tヘルパー細胞及び/又はCD8⁺細胞傷害性T細胞が活性化されることによって誘発される。この応答にはまた、単球、マクロファージ、NK細胞、好塩基球、樹状細胞、星状細胞、小グリア細胞、好酸球の活性化、好中球又は自然免疫の他の成分の活性化又は動員も関与する。細胞媒介性免疫応答の存在は、増殖アッセイ(CD4⁺ T細胞)又はCTL(細胞傷害性Tリンパ球)アッセイにより決定することができる。免疫原の防御又は治療効果に対する体液性応答及び細胞性応答の相対的な寄与は、免疫した同系動物から抗体及びT細胞を別々に単離し、且つ第2の対象における防御又は治療効果

10

20

30

40

50

を計測することにより区別し得る。

【0065】

「免疫原性剤」又は「免疫原」は、哺乳動物への、場合によりアジュバントと併せた投与時に、それ自体に対する免疫応答を誘導する能力を有する。

【0066】

用語「個体」、「宿主」、「対象」、及び「患者」は、本明細書では同義的に使用され、限定はされないが、ヒト、マウス及びラットなどのげっ歯類、及び他の実験動物を含む哺乳動物を指す。

【0067】

用語ポリペプチドには、タンパク質及びその断片が含まれる。ポリペプチドは「外因性」であってもよく、これは、細菌細胞により産生されるヒトポリペプチドなど、利用される宿主細胞にとってそのポリペプチドが「異種」である、即ち外来性であることを意味する。ポリペプチドは、本明細書ではアミノ酸残基配列として開示される。それらの配列はアミノ末端からカルボキシ末端の方向に左から右に書かれる。標準的な命名法に従い、アミノ酸残基配列は以下のように指定されるとおりの三文字記号又は一文字記号のいずれかで表示される：アラニン (Ala、A)、アルギニン (Arg、R)、アスパラギン (Asn、N)、アスパラギン酸 (Asp、D)、システイン (Cys、C)、グルタミン (Gln、Q)、グルタミン酸 (Glu、E)、グリシン (Gly、G)、ヒスチジン (His、H)、イソロイシン (Ile、I)、ロイシン (Leu、L)、リジン (Lys、K)、メチオニン (Met、M)、フェニルアラニン (Phe、F)、プロリン (Pro、P)、セリン (Ser、S)、スレオニン (Thr、T)、トリプトファン (Trp、W)、チロシン (Tyr、Y)、及びバリン (Val、V)。

【0068】

「変異体」は、参照ポリペプチド又はポリヌクレオチドと異なるものの、本質的な特性は保持しているポリペプチド又はポリヌクレオチドを指す。ポリペプチドの典型的な変異体は、別の、参照ポリペプチドとアミノ酸配列が異なる。概して違いは限定的であり、参照ポリペプチド及び変異体の配列が全体的に極めて類似していて、多くの領域で同じであるようなものである。変異体と参照ポリペプチドとは、アミノ酸配列が1つ以上の修飾（例えば、置換、付加、及び/又は欠失）だけ異なり得る。置換又は挿入されたアミノ酸残基は、遺伝子コードによりコードされるものであっても又はそうでなくてもよい。ポリペプチドの変異体は、対立遺伝子変異体のように天然に存在するものであってもよく、又は天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。

【0069】

本開示のポリペプチドの構造に修飾及び変化を設けることができ、それでもなおそのポリペプチドと同様の特性を有する分子を得ることができる（例えば保存的アミノ酸置換）。例えば、特定のアミノ酸が、認め得る程の活性損失なしに配列中の他のアミノ酸を置換し得る。ポリペプチドの相互作用する能力及び性質が、当該のポリペプチドの生物学的機能活性を定義するものであるため、ある種のアミノ酸配列置換をポリペプチド配列に設け、それでもなお同様の特性を有するポリペプチドを達成し得る。

【0070】

かかる変化を設ける際には、アミノ酸の疎水性親水性指標が考慮され得る。ポリペプチドに相互作用性の生物学的機能を付与する際の疎水性親水性アミノ酸指標の重要さは、概して当該技術分野において理解されている。ある種のアミノ酸が同様の疎水性親水性指標又はスコアを有する他のアミノ酸を置換することができ、それでもなお同様の生物学的活性を有するポリペプチドをもたらすことが知られている。各アミノ酸は、その疎水性及び電荷特性に基づき疎水性親水性指標が割り当てられている。その指標は、イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-

10

20

30

40

50

3.2) ; グルタミン酸塩 (-3.5) ; グルタミン (-3.5) ; アスパラギン酸塩 (-3.5) ; アスパラギン (-3.5) ; リジン (-3.9) ; 及びアルギニン (-4.5) である。

【0071】

アミノ酸の相対的な疎水性親水性指標特性が、得られるポリペプチドの二次構造を決定し、ひいてはそれが、そのポリペプチドと他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、抗体、抗原、及び補因子との相互作用を規定すると考えられる。当該技術分野では、あるアミノ酸を、同様の疎水性親水性指標を有する別のアミノ酸に置換することができ、それでもなお機能的に同等のポリペプチドを達成し得ることは公知である。かかる変化では、アミノ酸の置換は疎水性親水性指標が ± 2 以内であることが好ましく、 ± 1 以内のものが特に好ましく、及び ± 0.5 以内のものがさらに特に好ましい。

10

【0072】

同様のアミノ酸の置換はまた、特にそれにより作成される生物学的機能が同等のポリペプチド又はペプチドを免疫学的実施形態で使用することが意図される場合、親水性に基づき設けることもできる。以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3.0) ; リジン (+3.0) ; アスパラギン酸塩 (+3.0 \pm 1) ; グルタミン酸塩 (+3.0 \pm 1) ; セリン (+0.3) ; アスパラギン (+0.2) ; グルタミン (glutamine) (+0.2) ; グリシン (0) ; プロリン (-0.5 \pm 1) ; スレオニン (-0.4) ; アラニン (-0.5) ; ヒスチジン (-0.5) ; システイン (-1.0) ; メチオニン (-1.3) ; バリン (-1.5) ; ロイシン (-1.8) ; イソロイシン (-1.8) ; チロシン (-2.3) ; フェニルアラニン (-2.5) ; トリプトファン (-3.4)。あるアミノ酸が、同様の親水性値を有する別のアミノ酸を置換することができ、それでもなお生物学的に同等の、詳細には免疫学的に同等のポリペプチドを達成し得ることが理解される。かかる変化では、アミノ酸の置換は親水性値が ± 2 以内であることが好ましく、 ± 1 以内のものが特に好ましく、及び ± 0.5 以内のものがさらに特に好ましい。

20

【0073】

上記に概説したとおり、アミノ酸置換は概して、例えばその疎水性、親水性、電荷、サイズなど、アミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性に基づく。様々な前述の特性を考慮した例示的な置換が当業者に周知されており、以下が挙げられる(元の残基：例示的置換)：(Ala : Gly, Ser)、(Arg : Lys)、(Asn : Gln, His)、(Asp : Glu, Cys, Ser)、(Gln : Asn)、(Glu : Asp)、(Gly : Ala)、(His : Asn, Gln)、(Ile : Leu, Val)、(Leu : Ile, Val)、(Lys : Arg)、(Met : Leu, Tyr)、(Ser : Thr)、(Thr : Ser)、(Tyr : Trp, Phe)、及び(Val : Ile, Leu)。従ってこの開示の実施形態は、上記のとおりポリペプチドと機能的又は生物学的に同等のものを企図する。詳細には、ポリペプチドの実施形態には、目的のポリペプチドと約50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性を有する変異体が含まれ得る。

30

【0074】

用語「パーセント(%)配列同一性」は、最大のパーセント配列同一性が達成されるように配列をアラインメントし、必要であればギャップを導入した後の、参照核酸配列中のヌクレオチド又はアミノ酸と同一の候補配列中のヌクレオチド又はアミノ酸のパーセンテージとして定義される。パーセント配列同一性を決定するためのアラインメントは、当該分野の技術の範囲内にある様々な方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。アラインメントの計測に適切なパラメータは、比較する配列の全長にわたる最大のアラインメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含め、公知の方法により決定することができる。

40

【0075】

50

本明細書の目的上、所与のヌクレオチド又はアミノ酸配列 C の、所与の核酸配列 D に対する、それとの、又はそれと比べた % 配列同一性（或いはこれは、所与の配列 D に対して、それと、又はそれと比べてある % 配列同一性を有する又は含む所与の配列 C と表現され得る）は、以下のとおり計算される：

$100 \times \text{割合 } W / Z$ 、

式中、W は配列アラインメントプログラムにより C 及び D の当該プログラムのアラインメントで同一のマッチとしてスコア化されたヌクレオチド又はアミノ酸の数であり、及び Z は D のヌクレオチド又はアミノ酸の総数である。配列 C の長さが配列 D の長さとは等しくない場合、D に対する C の % 配列同一性が C に対する D の % 配列同一性と等しくないことは理解されるであろう。

10

【0076】

用語「ストリンジентなハイブリダイゼーション条件」は、本明細書で使用される時、プローブと標的配列との間に少なくとも 95%、好ましくは少なくとも 97% の配列同一性がある場合に概してハイブリダイゼーションが起こることを意味する。ストリンジентなハイブリダイゼーション条件の例は、50% ホルムアミド、5 × SSC (150 mM NaCl、15 mM クエン酸三ナトリウム)、50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6)、5 × デンハルト溶液、10% 硫酸デキストラン、及び 20 µg/ml 変性切断担体 DNA、例えばサケ精子 DNA を含む溶液中での一晚のインキュベーションと、続く約 65 の 0.1 × SSC でのハイブリダイゼーション支持体の洗浄である。他のハイブリダイゼーション及び洗浄条件は周知されており、Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000) に例示されている。

20

【0077】

本明細書で使用される時、用語「薬学的に許容可能な担体」は、任意の標準的な医薬担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水溶液、水及びエマルジョン、例えば油/水又は水/油エマルジョン、及び各種の湿潤剤を包含する。

【0078】

II. 組成物

1 つ以上の B7 - H4 ポリペプチド又は B7 - H4 融合タンパク質、又はその断片若しくは変異体に結合する抗体が開示される。本明細書に開示される抗体は、典型的には、B7 - H4 ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物上に存在するエピトープに結合するモノクローナル抗体、又はその抗原結合断片である。一部の実施形態では、本抗体は立体エピトープに結合する。一部の実施形態では、本抗体は線状エピトープに結合する。線状エピトープは、4、5、6、7、8、9、10、11 個、又はそれ以上の連続するアミノ酸長であり得る。エピトープは、1 つ以上の非アミノ酸エレメント、翻訳後修飾、又はそれらの組み合わせを含み得る。翻訳後修飾の例としては、限定はされないが、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、シトルリン化及びユビキチン化が挙げられる。例えば、抗体は、少なくとも一部において 1 つ以上の糖基により形成されるエピトープと結合し得る。

30

【0079】

本抗体は、内因性 B7 - H4 ポリペプチド上及び組換え B7 - H4 ポリペプチド上、又はその断片若しくは融合物に存在するエピトープに結合し得る。一部の実施形態では、本抗体は、細胞により発現される B7 - H4 ポリペプチド上のエピトープであって、組換え B7 - H4 ポリペプチド又はその断片若しくは融合物上ではマスクされているか又は存在しないエピトープに結合する。一部の実施形態では、本抗体は、組換え B7 - H4 ポリペプチド又はその断片若しくは融合物上のエピトープであって、内因性 B7 - H4 ポリペプチド上ではマスクされているか又は存在しないエピトープに結合する。内因性 B7 - H4 ポリペプチドは、細胞遊離型の B7 - H4 及び膜貫通 B7 - H4 を含み得る。従って、一部の実施形態では、抗体は、組換え B7 - H4 タンパク質、例えば B7 - H4 - Ig 融合タンパク質と、細胞遊離 B7 - H4、又は膜貫通 B7 - H4、又はそれらの組み合わせと

40

50

を区別することができる。本抗体は、研究、診断及び治療適用で使用することができる。

【0080】

A . B 7 - H 4 ポリペプチド及び融合タンパク質

B 7 - H 4 ポリペプチド、融合物、並びに B 7 - H 4 ポリペプチド及びその断片及び融合物を含む医薬組成物が、米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 7 7 6 4 5 号明細書及び同第 2 0 1 2 / 0 2 7 6 0 9 5 号明細書（これらは全体として参照により本明細書に援用される）に開示される。

【0081】

1 . B 7 - H 4 タンパク質

好ましい実施形態では、抗 B 7 - H 4 抗体は哺乳類種由来の B 7 - H 4 ポリペプチドに結合し得る。例えば、B 7 - H 4 ポリペプチドは、マウス、非ヒト霊長類（チンパンジー（*Pan troglodytes*）、アカゲザル（*Macaca mulatta*）又はカニクイザル（*Macaca fascicularis*））、又はヒト起源であり得る。マウス B 7 - H 4 ポリペプチドは、GenBank 受託番号 NM__178594 又は AY280973 を有する核酸によりコードされる B 7 - H 4 ポリペプチドと少なくとも 80、85、90、95 又は 100% の配列同一性を有し得る。有用なマウス B 7 - H 4 ポリペプチドは、GenBank 受託番号 AAH32925.1 又は NP__848709.2 による B 7 - H 4 ポリペプチドと少なくとも約 80、85、90、95 又は 100% の配列同一性を有する。有用なヒト B 7 - H 4 ポリペプチドは、GenBank 受託番号 AK026071 を有する核酸によりコードされる B 7 - H 4 ポリペプチドと少なくとも約 80、85、90、95 又は 100% の配列同一性を有する。有用なヒト B 7 - H 4 ポリペプチドは、GenBank 受託番号 NP__078902.2 又は BAB15349.1 による B 7 - H 4 ポリペプチドと少なくとも約 80、85、90、95 又は 100% の配列同一性を有する。

10

20

【0082】

例えば、ヒト B 7 - H 4 ポリペプチドは、以下と少なくとも 80%、85%、90%、95%、99%、又は 100% の配列同一性を有するヌクレオチド配列によりコードされ得る：

【化 1】

```

atgggttccc tggggcagat cctcttctgg agcataatta gcatcatcat tattctggct      60
ggagcaattg cactcatcat tggctttggt atttcagggg gacactccat cacagtcaact      120
actgtgcgct cagctgggaa cattggggag gatggaatcc tgagctgcac ttttgaacct      180
gacatcaaac tttctgatat cgtgatataa tggotgaagg aagggttttt aggcttggtc      240
catgagttca aagaaggcaa agatgagctg tcggagcagg atgaaatgtt cagaggcogg      300
acagcagtgt ttgctgatca agtgatagtt ggcaatgcct ctttgcggct gaaaaacgtg      360
caactocacag atgctggcac ctacaaatgt tatacatca cttctaaagg caaggggaat      420
gctaaccttg agtataaaac tggagccttc agcatgcogg aagtgaatgt ggactataat      480
gccagctcag agaccttgog gtgtgaggct ccccgatggt tccccagcc cacagtggtc      540
tgggcatccc aagttgacca gggagocaaac ttctoggaag tctccaatac cagctttgag      600
ctgaactctg agaatgtgac catgaagggt gtgtctgtgc tctacaatgt taogatcaac      660
aacacatact cctgtatgat tgaaaaatgac attgcccagg caacagggga tatcaaagtg      720
acagaatogg agatcaaaaag gcggagtcac ctacagctgc taaactcaaa ggcttctctg      780
tgtgtctctt ctttctttgc catcagctgg gcacttctgc ctctcagccc ttacctgatg      840
ctaaaataa                                     849

```

30

40

（配列番号 1）。

【0083】

一部の実施形態では、ヒト B 7 - H 4 ポリペプチドは、以下と少なくとも 80%、85%、90%、95%、99%、又は 100% の配列同一性を有する：

【化 2】

MASLGQILFW SIISIIIIILA GAIALIIGFG ISGRHSITVT TVASAGNIGE DGILSCTFEP	60
DIKLSDIVIQ WLKEGVLGLV HEFKEGKDEL SEQDEMFRGR TAVFADQVIV GNASLRLKNV	120
QLTDAGTYKC YIITSKGKGN ANLEYKTGAF SMPEVNVVDYN ASSETLRCEA PRWFPQPTVV	180
WASQVDQGAN FSEVSNTSFE LNSENVMTKV VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV	240
TESEIKRRSH LQLLNSKASL CVSSFFAISW ALLPLSPYLM LK	282

(配列番号 2)。

【0084】

シグナル配列を含まない配列番号 2 のヒト B 7 - H 4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る

10

【化 3】

GFGISGRHSI TVTTVASAGN IGEDGILSCT FEPDIKLSDI VIQWLKEGVL GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFRGR RTAVFADQ VIVGNASLRL KNVQLTDAGT YKCYIITSKG KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV DYNASSETLR CEAPRWFPQP TVVWASQVDQ GANFSEVSNT SFELNSENVT	180
MKVSVLYNV TINNTYSCMI ENDIAKATGD IKVTESEIKR RSHLQLLNSK ASLCVSSFFA	240
ISWALLPLSP YMLK	255

(配列番号 3)。

【0085】

一部の実施形態では、ヒト B 7 - H 4 ポリペプチドは、以下と少なくとも 80%、85%、90%、95%、99%、又は 100% の配列同一性を有する：

20

【化 4】

MASLGQILFW SIISIIIIILA GAIALIIGFG ISGRHSITVT TVASAGNIGE DGIQSCCTFEP	60
DIKLSDIVIQ WLKEGVLGLV HEFKEGKDEL SEQDEMFRGR TAVFADQVIV GNASLRLKNV	120
QLTDAGTYKC YIITSKGKGN ANLEYKTGAF SMPEVNVVDYN ASSETLRCEA PRWFPQPTVV	180
WASQVDQGAN FSEVSNTSFE LNSENVMTKV VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV	240
TESEIKRRSH LQLLNSKASL CVSSFFAISW ALLPLSPYLM LK	282

(配列番号 4)。

【0086】

シグナル配列を含まない配列番号 4 のヒト B 7 - H 4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る

30

【化 5】

GFGISGRHSI TVTTVASAGN IGEDGIQSCCT FEPDIKLSDI VIQWLKEGVL GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFRGR RTAVFADQ VIVGNASLRL KNVQLTDAGT YKCYIITSKG KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV DYNASSETLR CEAPRWFPQP TVVWASQVDQ GANFSEVSNT SFELNSENVT	180
MKVSVLYNV TINNTYSCMI ENDIAKATGD IKVTESEIKR RSHLQLLNSK ASLCVSSFFA	240
ISWALLPLSP YMLK	255

(配列番号 5)。

【0087】

B 7 - H 4 ポリペプチドをコードする核酸は、選択の発現宿主での発現用に最適化され得る。B 7 - H 4 核酸配列が由来する哺乳動物と発現宿主との間のコドン使用頻度の違いを考慮して、同じアミノ酸をコードする代替のコドンにコドンを置き換え得る。このようにして、核酸が発現宿主 - 好ましいコドンを使用して合成され得る。

40

【0088】

2. B 7 - H 4 ポリペプチドの断片

B 7 - H 4 タンパク質は細胞外ドメイン内に 2 つの免疫グロブリンドメイン、I g V ドメイン (又は V ドメイン) と I g C ドメイン (又は C ドメイン) とを含み、これらは抗体の可変及び定常ドメインに関係している。これらのドメインは当業者によってファミリー及びドメインデータベースを検索することにより同定され得る。B 7 リガンドファミリーメンバーの I g V ドメインは、受容体結合を媒介すると考えられている。I g C ドメイン

50

は、タンパク質構造を安定化させ、且つリガンド - 受容体相互作用の全体的な結合親和性に寄与すると考えられている。細胞外ドメインの各 I g ドメインは、この折り畳みに典型的であるとおリドメイン内システイン残基間に形成された 1 つのジスルフィド結合を含み、構造 - 機能にとって重要であり得る。配列番号 2 及び 4 では、これらのシステインが I g V ドメインについては残基 5 6 及び 1 3 0 に位置し、I g C ドメインについては 1 6 8 及び 2 2 5 に位置する。

【 0 0 8 9 】

例えば、一部の実施形態では、I g V ドメインは、以下のヒトアミノ酸配列と 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む：

10

【 化 6 】

```
GFGISGRHSI TVTTVASAGN IGEDGIQSC T FEPDIKLSDI VIQWLKEGVL GLVHEFKEGK 60
DELSEQDEMF RGRTAVFADQ VIVGNASLRL KNVQLTDAGT YKCYIITSKG KGNANLEYKT 120
GAFSMPEVN 129
```

(配列番号 6)、又は

【 化 7 】

```
HSITVTTVAS AGNIGEDGIQ SCTFEPDIKL SDIVIQWLKE GVLGLVHEFK EGKDELSEQD 60
EMFRGRTAVF ADQVIVGNAS LRLKNVQLTD AGTYKCYIIT SKGKGNANLE YK 112
```

(配列番号 4 8)、又は

20

【 化 8 】

```
GFGISGRHSI TVTTVASAGN IGEDGILSCT FEPDIKLSDI VIQWLKEGVL GLVHEFKEGK 60
DELSEQDEMF RGRTAVFADQ VIVGNASLRL KNVQLTDAGT YKCYIITSKG KGNANLEYKT 120
GAFSMPEVN 129
```

(配列番号 7)、又は

【 化 9 】

```
HSITVTTVAS AGNIGEDGIL SCTFEPDIKL SDIVIQWLKE GVLGLVHEFK EGKDELSEQD 60
EMFRGRTAVF ADQVIVGNAS LRLKNVQLTD AGTYKCYIIT SKGKGNANLE YK 112
```

30

(配列番号 4 9)。

【 0 0 9 0 】

一部の実施形態では、I g C ドメインは、以下のヒトアミノ酸配列と 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む：

【 化 1 0 】

```
VDYNASSETL RCEAPRWFPPQ PTVVWASQVD QGANFSEVSN TSFELNSENVTM KVVSVLIN 60
VTINNTYSCM IENDIAKATG DIKVT 85
```

(配列番号 5 0)、

40

【 化 1 1 】

```
PEVNVVDYNAS SETLRCEAPR WFPQPTVWVA SQVDQGANFS EVSNTSFELN SENVTM KVVS 60
VLYNVTINNT YSCMIENDIA KATGDIKVT 89
```

(配列番号 5 1)、

【 化 1 2 】

```
FSMPEVNVVDY NASSETLRCE APRWFPPQTV VWASQVDQGA NFSEVSNTSF ELNSENVTMK 60
VVSVLINVTI NNTYSCMIEN DIAKATGDIK VTESEIKRRS 100
```

(配列番号 5 2)、

50

【化 1 3】

VNVDYNASSE TLRCEAPRWF PQPTVVWASQ VDQGANFSEV SNTSFELNSE NVTMKVSVL	60
YNVTINNTYS CMIENDIAKA TGDIKVTESE IKRRS	95

(配列番号 5 3)、又は

【化 1 4】

YNASSETLRC EAPRWFPQPT VVWASQVDQ ANFSEVSNTS FELNSENVTM KVVSVLYNVT	60
INNTYSCMIE NDIAKATGDI KVTSESEIKRR S	91

(配列番号 5 4)。

【0091】

10

一部の実施形態では、B 7 - H 4 の断片は I g V 及び I g C ドメインを含み、しかし細胞外ドメイン全体は含まない。例えば、一部の実施形態では、完全長 B 7 - H 4 の断片は、以下のヒトアミノ酸配列と 80%、85%、90%、95%、99%、又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む：

【化 1 5】

GFGISGRHSI TVTTVASAGN IGEDGIQSCT FEPDIKLSDI VIQWLKEGVL GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFRGRTAVFADQ VIVGNASLRL KNVQLTDAGT YKCYIITSKG KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV DYNASSETLR CEAPRWFPQP TVVWASQVDQ GANFSEVSNT SFELNSENVT	180
MKVSVLYNVTINNTYSCMIE ENDIAKATGD IKVTESEIKR RS	222

20

(配列番号 8)、又は

【化 1 6】

GFGISGRHSI TVTTVASAGN IGEDGILSCT FEPDIKLSDI VIQWLKEGVL GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFRGRTAVFADQ VIVGNASLRL KNVQLTDAGT YKCYIITSKG KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV DYNASSETLR CEAPRWFPQP TVVWASQVDQ GANFSEVSNT SFELNSENVT	180
MKVSVLYNVTINNTYSCMIE ENDIAKATGD IKVTESEIKR RS	222

(配列番号 9)。

【0092】

30

加えて、I g V ドメインに 1 つの予想される N - 結合型グリコシル化部位があり、且つ I g C ドメインに 6 つのグリコシル化部位があり、これらはマウス及びヒトの B 7 - H 4 配列間で保存されている。

【0093】

B 7 - H 4 ポリペプチドの断片には細胞遊離断片が含まれる。細胞遊離 B 7 - H 4 ポリペプチド断片は、産生細胞から脱落し、分泌され又は他の形で抜き取られ得る B 7 - H 4 ポリペプチドの断片である。B 7 - H 4 ポリペプチドの細胞遊離断片は、ポリペプチドの細胞外ドメインの一部又は全てを含み、且つ細胞内及び / 又は膜貫通ドメインの一部又は全てを欠いていてもよい。一実施形態では、B 7 - H 4 ポリペプチド断片は B 7 - H 4 ポリペプチドの細胞外ドメイン全体を含む。他の実施形態では、B 7 - H 4 ポリペプチドの細胞遊離断片は、B 7 - H 4 の生物学的活性を保持している細胞外ドメインの断片を含む。細胞外ドメインは、膜貫通ドメインの 1、2、3、4、又は 5 個の連続するアミノ酸、及び / 又はシグナル配列の 1、2、3、4、又は 5 個の連続するアミノ酸を含み得る。或いは、細胞外ドメインは、1、2、3、4、5 個又はそれ以上のアミノ酸が C 末端、N 末端、又はその両方から取り除かれていてもよい。一部の実施形態では、細胞外ドメインは I g V ドメインのみであるか、又は完全長タンパク質の残基 56 及び 130 に位置する I g V ドメインの保存されたシステイン間にある領域である。

40

【0094】

概して、B 7 - H 4 ポリペプチド又はその断片は、シグナル配列をコードする配列を含む核酸から発現する。概してシグナル配列が未成熟ポリペプチドから切断されることで、シグナル配列を欠く成熟ポリペプチドが生じる。配列番号 3 及び 5 は、各々、シグナルペ

50

プチドを欠いている。B7-H4のシグナル配列、及び場合により、IgVドメインの1、2、3、4、5個、又はそれ以上のアミノ酸を、標準的な分子生物学的技術を用いて別のポリペプチドのシグナル配列に置き換え、ポリペプチドの発現レベル、分泌、溶解度、又は他の特性に影響を与えることができる。B7-H4シグナル配列の置換に使用されるシグナル配列は、当該技術分野において公知の任意のものであってよい。配列番号2及び4は、各々、内因性B7-H4シグナルペプチド(配列番号2及び4のアミノ酸1~約アミノ酸24)を含み、例えばUniProtKB/Swiss-Prot:Q7Z7D3.1を参照のこと。

【0095】

B7-H4ポリペプチド、並びにその断片及び融合物が、シグナル配列を含むもの及び含まないものの両方ともに、本明細書に提供される。成熟タンパク質、即ちシグナル配列を含まないタンパク質配列は、推定成熟タンパク質であることが理解される。正常な細胞発現では、細胞ペプチダーゼによってシグナル配列が取り除かれ、成熟タンパク質が生じ得る。シグナル配列の生体内切断後に発現する実際の成熟タンパク質は、多くが、本明細書に提供される推定成熟タンパク質より1、2、3、4、5、6、7、又は8個多い；又は1、2、3、4、5、6、7、又は8個少ないアミノ酸を含む。また、本明細書に提供される推定成熟タンパク質をコードする核酸配列を、5'末端に内在性又は異種シグナル配列をコードする核酸配列を含むように修飾することができ、これが細胞内で発現すると、本明細書に提供されるそうした推定成熟タンパク質などの成熟B7-H4タンパク質、又は断片、又はその融合物が生じることも理解される。

【0096】

3. B7-H4ポリペプチドの変異体

有用な変異体としては、本明細書に記載されるアッセイのいずれかにより示されるとおり、生物学的活性を増加させるもの、又はタンパク質の半減期若しくは安定性を増加させるものが挙げられる。B7-H4ポリペプチド及びB7-H4断片、又はB7-H4活性を有するその融合物は、生物学的活性が増加するように操作することができる。好ましい実施形態では、B7-H4ポリペプチド又は融合タンパク質は、免疫細胞、例えばT細胞との分子の結合を増加させ且つT細胞に障害シグナルを伝達する少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、又は挿入によって修飾されている。

【0097】

他の好ましい変異体は、他の免疫細胞と比べてある種類のT細胞に選択的に結合するように操作されるB7-H4ポリペプチドである。例えば、B7-H4ポリペプチドは、Treg、Th0、Th1、Th17、又はTh22細胞に優先的に結合するように操作することができる。優先的結合とは、ある種類の細胞に対する結合が、別の種類の細胞と比べて少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又はそれ以上上回る結合を指す。

【0098】

B7-H4のさらに他の変異体は、野生型B7-H4と比べて免疫細胞との結合が低下するように操作することができる。これらの変異体を、より強い結合特性を有する変異体と組み合わせて使用することにより、適度の影響の免疫応答を調節することができる。

【0099】

最後に、変異体B7-H4ポリペプチドは、野生型と比べて半減期が増加するように操作することができる。これらの変異体は、典型的には酵素分解に抵抗するように修飾される。例示的な修飾としては、酵素分解に抵抗する修飾アミノ酸残基及び修飾ペプチド結合が挙げられる。これを達成する様々な修飾が当該技術分野において公知である。例えば、B7-H4の膜近傍領域は二塩基モチーフKRRSを含み、これは潜在的に、例えばプロテアーゼのプロタンパク質転換酵素ファミリーのメンバーによって認識及び切断され得る。このモチーフ(KRRS)を除去、遮断、又は修飾することにより、半減期を増加させることができる。変異体は、血清及びエンドソームpHで受容体に対する親和性がB7-H4ポリペプチド、断片、又はその融合物の半減期に及ぼす効果が調整されるように修飾

10

20

30

40

50

されてもよい。

【0100】

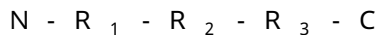
4. B7-H4融合タンパク質

B7-H4融合ポリペプチドは、第2のポリペプチドに直接融合するか又は第2のポリペプチドに融合しているリンカーペプチド配列を介して融合した、B7-H4タンパク質の全て又は一部を含む第1の融合パートナーを有する。融合タンパク質は、2つ以上の融合タンパク質を二量体化又は多量体化する働きをするドメインを場合により含む。ペプチド/ポリペプチドリンカードメインは別個のドメインであってもよく、或いは融合タンパク質の他のドメインの一つ(B7-H4ポリペプチド又は第2のポリペプチド)の中にも含まれていてもよい。同様に、融合タンパク質を二量体化又は多量体化する働きをするドメインは、別個のドメインであってもよく、或いは融合タンパク質の他のドメインの一つ(B7-H4ポリペプチド、第2のポリペプチド又はペプチド/ポリペプチドリンカードメイン)の中にも含まれていてもよい。一実施形態では、二量化/多量体化ドメインとペプチド/ポリペプチドリンカードメインは同じである。

10

【0101】

本明細書に開示される融合タンパク質は、式I:



のものであり、式中、「N」は融合タンパク質のN末端を表し、「C」は融合タンパク質のC末端を表す。好ましい実施形態では、「R₁」はB7-H4ポリペプチドであり、「R₂」は、任意選択のペプチド/ポリペプチドリンカードメインであり、及び「R₃」は第2のポリペプチドである。或いは、R₃がB7-H4ポリペプチドであってもよく、R₁が第2のポリペプチドであってもよい。

20

【0102】

二量化又は多量体化は2つ以上の融合タンパク質の間で又はそれらの中で二量化又は多量体化ドメインを介して起こり得る。或いは、融合タンパク質の二量化又は多量体化は化学的架橋によって起こり得る。形成される二量体又は多量体は、ホモ二量体/ホモ多量体又はヘテロ二量体/ヘテロ多量体であり得る。

【0103】

一実施形態では、第1の融合パートナーはB7-H4の断片である。本明細書で使用される時、B7-H4の断片は、完全長タンパク質より短い少なくとも1つのアミノ酸であるポリペプチドの任意のサブセットを指す。有用な断片は、その天然の1つ又は複数の受容体に結合する能力を保持しているものである。完全長B7-H4の断片であるB7-H4ポリペプチドは、典型的には完全長B7-H4と比較してその天然の受容体と結合する能力の少なくとも20パーセント、30パーセント、40パーセント、50パーセント、60パーセント、70パーセント、80パーセント、90パーセント、95パーセント、98パーセント、99パーセント、100パーセントを有し、又はさらには100パーセントを超える能力を有する。

30

【0104】

好ましい実施形態では、融合タンパク質は、Ig Fc領域と融合したB7-H4の細胞外ドメイン、又はその断片を含み、且つ膜貫通ドメインを含まない。組換えB7-H4-Ig融合タンパク質は、以前記載されているとおり(Chapoval, et al., Methods Mol. Med., 45: 247-255 (2000))、B7-H4の細胞外ドメイン又はその断片のコード領域をヒトIgG1若しくはマウスIgG2aのFc領域、又は他の好適なIgドメインと融合することにより調製し得る。

40

【0105】

a. 例示的融合タンパク質

一実施形態では、代表的なヒトB7-H4融合タンパク質は、以下と少なくとも80%、85%、90%、95%、99%又は100%の配列同一性を有する:

【化 17】

MEWSWVFLFF	LSVTTGVHSG	FGISGRHSIT	VTTVASAGNI	GEDGIQSCF	EPDIKLSDIV	60
IQWLKEGVLG	LVHEFKEGKD	ELSEQDEMFR	GRTAVFADQV	IVGNASRLK	NVQLTDAGTY	120
KCYIITSKKG	GNaNLEYKTG	AFSMPEVNVD	YNASSETLRC	EAPRWFPQPT	VVWASQVDQG	180
ANFSEVSNTS	FELNSENVTM	KVSVLYNVT	INNTYSCMIE	NDIAKATGDI	KVTESEIKRR	240
SEPKSCDKTH	TCPPCPAPEL	LGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK	300
FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE	QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS	NKALPAPIEK	360
TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	RDELTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	420
PPVLDSDGSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSLS	PGK	473

(配列番号 10)。

10

【0106】

シグナル配列を含まない配列番号 10 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 18】

GFGISGRHSI	TVTTVASAGN	IGEDGIQSCF	FEPDIKLSDI	VIQWLKEGVL	GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFR	RGRTAVFADQ	VIVGNASRLK	KNVQLTDAGT	YKCYIITSKG	KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV	DYNASSETLR	CEAPRWFPQP	TVVWASQVDQ	GANFSEVSNT	SFELNSENVT	180
MKVSVLYNV	TINNTYSCMI	ENDIAKATGD	IKVTESEIKR	RSEPKSCDKT	HTCPPCPAPE	240
LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	300
EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	360
SRDELTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	420
KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK			454

20

(配列番号 11)。

【0107】

別の実施形態では、代表的なヒト B7 - H4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 又は 100 % の配列同一性を有する：

【化 19】

MEWSWVFLFF	LSVTTGVHSG	FGISGRHSIT	VTTVASAGNI	GEDGIQSCF	EPDIKLSDIV	60
IQWLKEGVLG	LVHEFKEGKD	ELSEQDEMFR	GRTAVFADQV	IVGNASRLK	NVQLTDAGTY	120
KCYIITSKKG	GNaNLEYKTG	AFSMPEVNVD	YNASSETLRC	EAPRWFPQPT	VVWASQVDQG	180
ANFSEVSNTS	FELNSENVTM	KVSVLYNVT	INNTYSCMIE	NDIAKATGDI	KVTESEIKRR	240
SDKTHTCPPC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	300
DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	360
KGQPREPQVY	TLPPSRDEL	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTPPVLD	420
SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK		468

30

(配列番号 12)。

【0108】

シグナル配列を含まない配列番号 12 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 20】

GFGISGRHSI	TVTTVASAGN	IGEDGIQSCF	FEPDIKLSDI	VIQWLKEGVL	GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFR	RGRTAVFADQ	VIVGNASRLK	KNVQLTDAGT	YKCYIITSKG	KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV	DYNASSETLR	CEAPRWFPQP	TVVWASQVDQ	GANFSEVSNT	SFELNSENVT	180
MKVSVLYNV	TINNTYSCMI	ENDIAKATGD	IKVTESEIKR	RSDKTHTCPP	CPAPELLGGP	240
SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS	300
TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSRDEL	360
TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTPPVL	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	420
QGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KLSLSLSPGK				449

40

(配列番号 13)。

【0109】

50

別の実施形態では、代表的なヒト B 7 - H 4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列同一性を有する：

【化 2 1】

MEWSWVFLFF	LSVTTGVHSG	FGISGRHSIT	VTTVASAGNI	GEDGIQSCTF	EPDIKLSDIV	60
IQWLKEGVLG	LVHEFKEGKD	ELSEQDEMFR	GRTAVFADQV	IVGNASLRLK	NVQLTDAGTY	120
KCYIITSKKG	GNaNLEYKTG	AFSMPEVNVD	YNASSETLRC	EAPRWFPQPT	VWASQVDQG	180
ANFSEVSNTS	FELNSENVTM	KVSVLYNVT	INNTYSCMIE	NDIAKATGDI	KVTESEIDKT	240
HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	300
VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	360
REPQVYTLPP	SRDELTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	420
FFLYSKLTV	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKLSLS	SPGK		464

10

(配列番号 1 4)。

【0 1 1 0】

シグナル配列を含まない配列番号 1 4 のヒト B 7 - H 4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 2 2】

GFGISGRHSI	TVTTVASAGN	IGEDGIQSCT	FEPDIKLSDI	VIQWLKEGVL	GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFR	RGRRTAVFADQ	VIVGNASLRL	KNVQLTDAGT	YKCYIITSKG	KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV	DYNASSETLR	CEAPRWFPQP	TVVWASQVDQ	GANFSEVSNT	SFELNSENVT	180
MKVSVLYNV	TINNTYSCMI	ENDIAKATGD	IKVTESEIDK	THTCPPCPAP	ELGGPSVFL	240
FPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	300
VSVLTVLHQD	WLNGKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTL	PSRDELTKNQ	360
VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	420
FSCSVMHEAL	HNHYTQKLSL	LSPGK				445

20

(配列番号 1 5)。

【0 1 1 1】

別の実施形態では、代表的なヒト B 7 - H 4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列同一性を有する：

【化 2 3】

MEWSWVFLFF	LSVTTGVHSG	FGISGRHSIT	VTTVASAGNI	GEDGIQSCTF	EPDIKLSDIV	60
IQWLKEGVLG	LVHEFKEGKD	ELSEQDEMFR	GRTAVFADQV	IVGNASLRLK	NVQLTDAGTY	120
KCYIITSKKG	GNaNLEYKTG	AFSMPEVNVD	YNASSETLRC	EAPRWFPQPT	VWASQVDQG	180
ANFSEVSNTS	FELNSENVTM	KVSVLYNVT	INNTYSCMIE	NDIAKATGDI	KVTESEIKRR	240
SHLQLLNSKD	KTHTCPPCPA	PELLGGPSVF	LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVDVSHEDP	300
EVKFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQYNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKALPAP	360
IEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSRDELTKN	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	420
KTTPPVLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK	476

30

(配列番号 1 6)。

【0 1 1 2】

シグナル配列を含まない配列番号 1 6 のヒト B 7 - H 4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 2 4】

GFGISGRHSI	TVTTVASAGN	IGEDGIQSCT	FEPDIKLSDI	VIQWLKEGVL	GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFR	RGRRTAVFADQ	VIVGNASLRL	KNVQLTDAGT	YKCYIITSKG	KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV	DYNASSETLR	CEAPRWFPQP	TVVWASQVDQ	GANFSEVSNT	SFELNSENVT	180
MKVSVLYNV	TINNTYSCMI	ENDIAKATGD	IKVTESEIKR	RSHLQLLNSK	DKTHTCPPCP	240
APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	300
PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	360
LPSPSRDELTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTPPVLDSD	DGSFFLYSKL	420
TVDKSRWQQG	NVFCSSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK			457

50

(配列番号 17)。

【0113】

別の実施形態では、代表的なヒト B7 - H4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 又は 100 % の配列同一性を有する：

【化 25】

MEWSWVFLFF	LSVTTGVHSG	FGISGRHSIT	VTTVASAGNI	GEDGILSCTF	EPDIKLSDIV	60
IQWLKEGVLG	LVHEPKEGKD	ELSEQDEMFR	GRTAVFADQV	IVGNASLRLK	NVQLTDAGTY	120
KCYIITSKGG	GNaNLEYKTG	AFSMPEVNVD	YNASSETLRC	EAPRWFPQPT	VWASQVDQG	180
ANFSEVSNTS	FELNSENVTM	KVSVLYNVT	INNTYSCMIE	NDIAKATGDI	KVTESEIKRR	240
SEPKSCDKTH	TCPPCPAPEL	LGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK	300
FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE	QYNSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS	NKALPAPIEK	360
TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	RDELTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	420
PPVLDSDGSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSL	PGK	473

10

(配列番号 18)。

【0114】

シグナル配列を含まない配列番号 18 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 26】

GFGISGRHSI	TVTTVASAGN	IGEDGILSCT	FEPDIKLSDI	VIQWLKEGVL	GLVHEPKEGK	60
DELSEQDEM	RGRTAVFADQ	VIVGNASLRL	KNVQLTDAGT	YKCYIITSKG	KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV	DYNASSETLR	CEAPRWFPQP	TVVWASQVDQ	GANFSEVSNT	SFELNSENVT	180
MKVSVLYNV	TINNTYSCMI	ENDIAKATGD	IKVTESEIKR	RSEPKSCDKT	HTCPPCPAPE	240
LLGGPSVFLF	PKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	300
EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	360
SRDELTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	420
KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK			454

20

(配列番号 19)。

【0115】

別の実施形態では、代表的なヒト B7 - H4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 又は 100 % の配列同一性を有する：

【化 27】

MEWSWVFLFF	LSVTTGVHSG	FGISGRHSIT	VTTVASAGNI	GEDGILSCTF	EPDIKLSDIV	60
IQWLKEGVLG	LVHEPKEGKD	ELSEQDEMFR	GRTAVFADQV	IVGNASLRLK	NVQLTDAGTY	120
KCYIITSKGG	GNaNLEYKTG	AFSMPEVNVD	YNASSETLRC	EAPRWFPQPT	VWASQVDQG	180
ANFSEVSNTS	FELNSENVTM	KVSVLYNVT	INNTYSCMIE	NDIAKATGDI	KVTESEIKRR	240
SDKTHTCPPC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	300
DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	360
KGQPREPQVY	TLPPSRDELT	KNQVSLTCLV	KGFPYSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTPPVLD	420
SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK		468

30

(配列番号 20)。

【0116】

シグナル配列を含まない配列番号 20 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

40

【化 2 8】

GFGISGRHSI	TVTTVASAGN	IGEDGILSCT	FEPDIKLSDI	VIQWLKEGVL	GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFR	RGRTAVFADQ	VIVGNASLRL	KNVQLTDAGT	YKCYIITSKG	KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV	DYNASSETLR	CEAPRWFPQP	TVVWASQVDQ	GANFSEVSNT	SFELNSENVT	180
MKVVSVLNV	TINNTYSCMI	ENDIAKATGD	IKVTESEIKR	RSDKTHTCPP	CPAPELLGGP	240
SVFLFPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS	300
TYRVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSRDEL	360
TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTPVVL	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	420
QGNVFCSCVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK				449

(配列番号 2 1)。

10

【0 1 1 7】

別の実施形態では、代表的なヒト B 7 - H 4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列同一性を有する：

【化 2 9】

MEWSWVFLFF	LSVTTGVHSG	FGISGRHSIT	VTTVASAGNI	GEDGILSCTF	EPDIKLSDIV	60
IQWLKEGVLG	LVHEFKEGKD	ELSEQDEMFR	GRTAVFADQV	IVGNASLRLK	NVQLTDAGTY	120
KCYIITSKKG	GKANLEYKTG	AFSMPEVNV	YNASSETLRC	EAPRWFPQPT	VVWASQVDQG	180
ANFSEVSNTS	FELNSENVTM	KVVSVLNV	INNNTYSCMIE	NDIAKATGDI	KVTESEIDKT	240
HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	300
VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	360
REPQVYTLPP	SRDELTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLSDSGS	420
FFLYSKLTV	KSRWQQGNV	SCSVMHEALH	NHYTQKLSL	SPGK		464

20

(配列番号 2 2)。

【0 1 1 8】

シグナル配列を含まない配列番号 2 2 のヒト B 7 - H 4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 3 0】

GFGISGRHSI	TVTTVASAGN	IGEDGILSCT	FEPDIKLSDI	VIQWLKEGVL	GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFR	RGRTAVFADQ	VIVGNASLRL	KNVQLTDAGT	YKCYIITSKG	KGNANLEYKT	120
GAFSMPEVNV	DYNASSETLR	CEAPRWFPQP	TVVWASQVDQ	GANFSEVSNT	SFELNSENVT	180
MKVVSVLNV	TINNTYSCMI	ENDIAKATGD	IKVTESEIDK	THTCPPCPAP	ELGGPSVFL	240
FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	300
VSVLTVLHQD	WLNGKEYKCK	VSNKALPAPI	EKTISKAKGQ	PREPQVYTL	PSRDELTKNQ	360
VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE	SNGQPENNYK	TPPVLSDSD	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	420
FSCSVMHEAL	HNHYTQKLSL	LSPGK				445

30

(配列番号 2 3)。

【0 1 1 9】

別の実施形態では、代表的なヒト B 7 - H 4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の配列同一性を有する：

【化 3 1】

MEWSWVFLFF	LSVTTGVHSG	FGISGRHSIT	VTTVASAGNI	GEDGILSCTF	EPDIKLSDIV	60
IQWLKEGVLG	LVHEFKEGKD	ELSEQDEMFR	GRTAVFADQV	IVGNASLRLK	NVQLTDAGTY	120
KCYIITSKKG	GKANLEYKTG	AFSMPEVNV	YNASSETLRC	EAPRWFPQPT	VVWASQVDQG	180
ANFSEVSNTS	FELNSENVTM	KVVSVLNV	INNNTYSCMIE	NDIAKATGDI	KVTESEIKRR	240
SHLQLLNSKD	KTHTCPPCPA	PELLGGPSVF	LFPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVDVSHEDP	300
EVKFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQYNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKALPAP	360
IEKTISKAKG	QPREPQVYTL	PPSRDELTKN	QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	420
KTPPVLSDS	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK	476

40

(配列番号 2 4)。

【0 1 2 0】

50

シグナル配列を含まない配列番号 24 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 3 2】

GFGISGRHSI	TVTTVASAGN	IGEDGILSCT	FEPDIKLSDI	VIQWLKEGVL	GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEM	RGRTAVFADQ	VIVGNASLRL	KNVQLTDAGT	YKCYIITSKG	KGANANLEYKT	120
GAFSMPEVNV	DYNASSETLR	CEAPRWFPQP	TVVWASQVDQ	GANFSEVSNT	SFELNSENVT	180
MKVVSPLYNV	TINNTYSCMI	ENDIAKATGD	IKVTESEIKR	RSHLQLLNSK	DKTHTCPPCP	240
APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	300
PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYV	360
LPPSRDELTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSKL	420
TVDKSRWQQG	NVFSQSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSPGK			457

10

(配列番号 25)。

【0 1 2 1】

別の実施形態では、代表的なヒト B7 - H4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 又は 100 % の配列同一性を有する：

【化 3 3】

MEWSWVFLFF	LSVTTGVHSG	FGISGRHSIT	VTTVASAGNI	GEDGILSCTF	EPDIKLSDIV	60
IQWLKEGVLG	LVHEFKEGKD	ELSEQDEMFR	GRTAVFADQV	IVGNASLRLK	NVQLTDAGTY	120
KCYIITSKKG	GNANLEYKTG	AFSMPEVNVD	YNASSETLRC	EAPRWFPQPT	VWASQVDQG	180
ANFSEVSNTS	FELNSENVTM	KVVSPLYNVT	INNTYSCMIE	NDIAKATGDI	KVTESEIKRR	240
SEPKSCDKTH	TCPPCPAPEL	LGGPSVFLFP	PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK	300
FNWYVDGVEV	HNAKTKPREE	QYQSTYRVVS	VLTVLHQDWL	NGKEYKCKVS	NKALPAPIEK	360
TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	RDELTKNQVS	LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN	GQPENNYKTT	420
PPVLDSGDSF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS	CSVMHEALHN	HYTQKSLSLS	PGK	473

20

(配列番号 26)。

【0 1 2 2】

シグナル配列を含まない配列番号 26 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 3 4】

GFGISGRHSI	TVTTVASAGN	IGEDGILSCT	FEPDIKLSDI	VIQWLKEGVL	GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEM	RGRTAVFADQ	VIVGNASLRL	KNVQLTDAGT	YKCYIITSKG	KGANANLEYKT	120
GAFSMPEVNV	DYNASSETLR	CEAPRWFPQP	TVVWASQVDQ	GANFSEVSNT	SFELNSENVT	180
MKVVSPLYNV	TINNTYSCMI	ENDIAKATGD	IKVTESEIKR	RSEPKSCDKT	HTCPPCPAPE	240
LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	300
EYQYSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	360
SRDELTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTV	420
KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK			454

30

(配列番号 27)。

【0 1 2 3】

別の実施形態では、代表的なヒト B7 - H4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 又は 100 % の配列同一性を有する：

【化 3 5】

MEWSWVFLFF	LSVTTGVHSE	GISGRHSITV	TTVASAGNIG	EDGILSCTFE	PDIKLSDIVI	60
QWLKEGVLGL	VHEFKEGKDE	LSEQDEMFRG	RTAVFADQVI	VGNASLRLKN	VQLTDAGTYK	120
CYIITSKKGK	NANLEYKTGA	EPKSSDKTHT	CPPCPAPELL	GGPSVFLFPP	KPKDTLMISR	180
TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	240
GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	300
DIAVEWESNG	QPENNYKTTT	PVLDSGDSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFS	SVMHEALHNN	360
YTQKSLSLSP	G					371

40

(配列番号 28)。

【 0 1 2 4 】

シグナル配列を含まない配列番号 28 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【 化 3 6 】

FGISGRHSIT VTTVASAGNI GEDGILSCTF EPDIKLSDIV IQWLKEGVLG LVHEFKEGKD	60
ELSEQDEMFR GRTAVFADQV IVGNASLRLK NVQLTDAGTY KCYIITSKGK GNANLEYKTG	120
AEPKSSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK	180
FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK	240
TISKAKQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKT	300
PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLS PG	352

10

(配列番号 29)。

【 0 1 2 5 】

別の実施形態では、代表的なヒト B7 - H4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 又は 100 % の配列同一性を有する：

【 化 3 7 】

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSF GISGRHSITV TTVASAGNIG EDGILSCTFE PDIKLSDIVI	60
QWLKEGVLGL VHEFKEGKDE LSEQDEMFRG RTAVFADQVI VGNASLRLKN VQLTDAGTYK	120
CYIITSKGKG NANLEYKTGA FSMPEEPKSS DKHTHTCPPC APELLGGPSV FLFPKPKDT	180
LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH	240
QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK	300
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE	360
ALHNHYTQKS LSLSPG	376

20

(配列番号 30)。

【 0 1 2 6 】

シグナル配列を含まない配列番号 30 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【 化 3 8 】

FGISGRHSIT VTTVASAGNI GEDGILSCTF EPDIKLSDIV IQWLKEGVLG LVHEFKEGKD	60
ELSEQDEMFR GRTAVFADQV IVGNASLRLK NVQLTDAGTY KCYIITSKGK GNANLEYKTG	120
AFSMPEEPKS SDKHTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE	180
DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP	240
APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELTK NQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN	300
NYKTTTPVLDS SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	357

30

(配列番号 31)。

【 0 1 2 7 】

別の実施形態では、代表的なヒト B7 - H4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 又は 100 % の配列同一性を有する：

【 化 3 9 】

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSF GISGRHSITV TTVASAGNIG EDGILSCTFE PDIKLSDIVI	60
QWLKEGVLGL VHEFKEGKDE LSEQDEMFRG RTAVFADQVI VGNASLRLKN VQLTDAGTYK	120
CYIITSKGKG NANLEYKTGA FSMPEVNVDE PKSSDKHTHTC PPCAPELLG GPSVFLFPPK	180
PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL	240
TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT	300
CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFS	360
VMHEALHNHY TQKSLSLSPG	380

40

(配列番号 32)。

【 0 1 2 8 】

50

シグナル配列を含まない配列番号 32 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 40】

FGISGRHSIT VTTVASAGNI GEDGILSCTF EPDIKLSDIV IQWLKEGVLG LVHEFKEGKD	60
ELSEQDEMFR GRTAVFADQV IVGNASLRLK NVQLTDAGTY KCYIITSKGK GNANLEYKTG	120
AFSMPEVNVD EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD	180
VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN	240
KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG	300
QPENNYKTP PVLSDGSGFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFC SVMHEALHNH YTKSLSLSP	360
G	361

10

(配列番号 33)。

【0129】

別の実施形態では、代表的なヒト B7 - H4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 又は 100 % の配列同一性を有する：

【化 41】

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSF GISGRHSITV TTVASAGNIG EDGILSCTFE PDIKLSDIVI	60
QWLKEGVLGL VHEFKEGKDE LSEQDEMFRG RTAVFADQVI VGNASLRLKN VQLTDAGTYK	120
CYIITSKGKG NANLEYKTGA FSMPEVNVDY NASSETLRCE APRWFPQPTV VWASQVDQGA	180
NFSEVSNTSF ELNSENVTMK VVSVLYNVTI NNTYSCMIEN DIAKATGDIK VTESEIKRRS	240
HLQLLNSKAS ESKYGPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVDSQE	300
DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP	360
SSIETKISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN	420
NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	477

20

(配列番号 34)。

【0130】

シグナル配列を含まない配列番号 34 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 42】

FGISGRHSIT VTTVASAGNI GEDGILSCTF EPDIKLSDIV IQWLKEGVLG LVHEFKEGKD	60
ELSEQDEMFR GRTAVFADQV IVGNASLRLK NVQLTDAGTY KCYIITSKGK GNANLEYKTG	120
AFSMPEVNVD YNASSETLRC EAPRWFPQPT VVWASQVDQG ANFSEVSNTS FELNSENVTM	180
KVSVLYNVT INNTYSCMIE NDIKATGDI KVTESEIKRR SHLQLLNSKA SESKYGPCPP	240
CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVDSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK	300
TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV	360
YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS	420
RLTVDKSRWQ EGNVFCSSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG	458

30

(配列番号 35)。

【0131】

別の実施形態では、代表的なヒト B7 - H4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 又は 100 % の配列同一性を有する：

【化 43】

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSE VNVVDYNASSE TLRCEAPRWF PQPTVVWASQ VDQGANFSEV	60
SNTSFELNSE NVTMKVSVL YNVTINNTYS CMIENDIAKA TGDIKVTESE IKQQSHLQLL	120
NSKASEPKSS DKHTCPCPPC APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED	180
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA	240
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN	300
YKTTTPVLD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG	356

40

(配列番号 36)。

【0132】

50

シグナル配列を含まない配列番号 36 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 4 4】

EVNVDYNASS ETLRCEAPRW FPQPTVVWAS QVDQGANFSE VSNTSFELNS ENVTMKVVS	60
LYNVTINNTY SCMIENDIAK ATGDIKVTES EIKQQSHLQL LNSKASEPKS SDKTHTCPPC	120
PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT	180
KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY	240
TLPPSRDELDT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK	300
LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG	337

(配列番号 37)。

10

【0 1 3 3】

別の実施形態では、代表的なヒト B7 - H4 融合タンパク質は、以下と少なくとも 80%、85%、90%、95%、99% 又は 100% の配列同一性を有する：

【化 4 5】

MEWSWVFLFF LSVTTGVHSF GISGRHSITV TTVASAGNIG EDGILSCTFE PDIKLSDIVI	60
QWLKEGVLGL VHEFKEGKDE LSEQDEMFRG RTAVFADQVI VGNASLRLKN VQLTDAGTYK	120
CYIITSKGGK NANLEYKTGA FSMPEVNVDY NASSETLRCE APRWFPQPTV VWASQVDQGA	180
NFSEVSNTSF ELNSENVTM VVSVLYNVTI NNTYSCMIEN DIAKATGDIK VTESEIKQQS	240
HLQLLNSKAS EPKSSDKTHT CPPCPAPPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD	300
VSHEDPEVKF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN	360
KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG	420
QPENNYKTPP PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP	480
G	481

20

(配列番号 38)。

【0 1 3 4】

シグナル配列を含まない配列番号 38 のヒト B7 - H4 融合タンパク質のアミノ酸配列は以下となり得る：

【化 4 6】

FGISGRHSIT VTTVASAGNI GEDGILSCTF EPDIKLSDIV IQWLKEGVLG LVHEFKEGKD	60
ELSEQDEMFR GRTAVFADQV IVGNASLRLK NVQLTDAGTY KYIITSKGGK GNANLEYKTG	120
AFSMPEVNVD YNASSETLRC EAPRWFPQPT VVWASQVDQG ANFSEVSNTS FELNSENVTM	180
KVSVLYNVTI INNTYSCMIE NDIAKATGDI KVTESEIKQQ SHLQLLNSKA SEPKSSDKTH	240
TCPPCPAPEL LGGPSVFLFPP KPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV	300
HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR	360
EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTPP PVLDSGGSF	420
FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLS PG	462

30

(配列番号 39)。

【0 1 3 5】

前述の例示的融合タンパク質は、本明細書に記載される変異体の任意の組み合わせを取り入れることができる。別の実施形態では、前述の例示的融合タンパク質の末端リジンが欠失している。

40

【0 1 3 6】

開示される融合タンパク質は標準的な分子生物学的技術を用いて単離することができる。例えば、B7 - H4 - Ig 融合タンパク質をコードする DNA 配列を含む発現ベクターがリン酸カルシウム沈殿によって 293 細胞にトランスフェクトされ、無血清 DMEM 中で培養される。72 時間で上清が回収され、融合タンパク質が、プロテイン G、又は好ましくはプロテイン A セファロース (登録商標) カラム (Pharmacia、Uppsala、スウェーデン) によって精製される。

【0 1 3 7】

b. ペプチド及びポリペプチド修飾

50

融合タンパク質は、例えば、リン酸化、メチル化、アミド化、硫酸化、アシル化、グリコシル化、SUMO化及びユビキチン化など、通常の細胞環境下でポリペプチドに存在し得る化学的部分により修飾されてもよい。融合タンパク質はまた、限定はされないが、放射性同位元素及び蛍光化合物を含めた、検出可能なシグナルを提供することが可能な標識で直接的に或いは間接的に修飾されてもよい。

【0138】

融合タンパク質はまた、通常は細胞環境下でポリペプチドに加えられることのない化学的部分により修飾されてもよい。例えば、開示される融合タンパク質はまた、限定はされないが、ポリエチレングリコールポリマー(PEG)鎖(即ちペグ化)を含めた、高分子鎖の共有結合により修飾されてもよい。最近になって、巨大分子とPEGとのコンジュゲーションが、種々の薬物の薬物動態(PK)プロファイルの改変、従ってその治療可能性の改善に有効な戦略として出現している。PEGコンジュゲーションは、酵素消化から保護し、腎臓による過剰を遅延させ、且つ中和抗体の産生を低減することにより、循環中における薬物の貯留を増加させる。加えてPEGコンジュゲートは、融合タンパク質を多量体化させるために使用することができる。

10

【0139】

修飾は、ポリペプチドの標的アミノ酸残基を、選択された側鎖又は末端残基との反応能を有する有機誘導体化剤と反応させることにより分子に導入され得る。別の修飾は、タンパク質の環化である。

20

【0140】

ポリペプチドの化学的誘導体の例としては、コハク酸又は他のカルボン酸無水物で誘導体化されたリシニル及びアミノ末端残基が挙げられる。環状カルボン酸無水物による誘導体化は、リシニル残基の電荷を反転させる効果を有する。アミノ含有残基を誘導体化するための他の好適な試薬としては、イミドエステル、例えばメチルピコリンイミデート；ピリドキサルリン酸；ピリドキサル；クロロポロヒドリド；トリニトロベンゼンスルホン酸；O-メチルイソウレア；2,4ペンタンジオン；及びグリオキシル酸によるアミノ基転移酵素触媒反応が挙げられる。カルボキシル側基のアスパルチル又はグルタミルが、カルボジイミド($R-N=C=N-R'$)、例えば1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-(4-エチル)カルボジイミド又は1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル)カルボジイミドとの反応によって選択的に修飾されてもよい。さらに、アスパルチル及びグルタミル残基は、アンモニアとの反応によってアスパラギニル及びグルタミニル残基に変換することができる。融合タンパク質はまた、1つ以上のL-アミノ酸に代えて1つ以上のD-アミノ酸を含んでもよい。

30

【0141】

c. 結合特性の改良

B7-H4ポリペプチド、その断片及び融合物(まとめてB7-H4ポリペプチドと称される)の結合特性は、投与される用量及び用量レジメンに関係する。一実施形態では、開示されるB7-H4ポリペプチドは、免疫細胞上の受容体分子の占有がその受容体分子の他のリガンドと比べてより長い期間である、又はより高い割合であることを実証するT細胞上の少なくとも1つの受容体に対する結合特性を有する。他の実施形態では、開示されるB7-H4ポリペプチドは、野生型B7-H4と比べてT細胞上の受容体に対する結合親和性が低下しており、タンパク質が投与後3ヶ月、2ヶ月、1ヶ月、3週間、2週間、1週間、又は数日未満の期間で解離することを可能にする。

40

【0142】

一部の実施形態では、B7-H4ポリペプチド、又は断片、又はその融合物は、その受容体に対して比較的高い親和性を有し、従ってオフ速度が比較的低速であり得る。他の実施形態では、B7-H4ポリペプチドは数日、数週間又は数ヶ月の期間にわたり間欠的に投与され、それにより免疫応答が抑えられることで次の投与前に回復させることが可能となり、これは免疫応答を完全に消すことなく免疫応答を低減する働きをし得るとともに、長期にわたる副作用を回避し得る。

50

【0143】

5. 単離核酸分子

B7-H4ポリペプチド、その断片及び融合物をコードする単離核酸配列が本明細書に開示される。有用なマウスB7-H4核酸は、GenBank受託番号NM_178594又はAY280973を有するB7-H4核酸と少なくとも約80、85、90、95又は100%の配列同一性を有する。有用なヒトB7-H4核酸は、GenBank受託番号AK026071を有するB7-H4核酸と少なくとも約80、85、90、95又は100%の配列同一性を有する。本明細書で使用されるとき「単離核酸」は、通常哺乳類ゲノムにおいて核酸の片側又は両側に隣接する核酸（例えば、非B7-H4タンパク質をコードする核酸）を含めた、哺乳類ゲノム中に存在する他の核酸分子と切り離されている核酸を指す。用語「単離された」にはまた、本明細書で核酸に関連して使用されるとき、任意の天然に存在しない核酸配列との組み合わせも含まれ、これはかかる天然に存在しない配列が自然中に見られず、且つ天然に存在するゲノム中では直ちに隣接する配列を有しないためである。

10

【0144】

単離核酸は、例えばDNA分子であってもよいが、但し、通常天然に存在するゲノム中で当該のDNA分子に直ちに隣接して見られる核酸配列の一つが取り除かれているか又は存在しないものとする。従って、単離核酸には、限定なしに、他の配列と独立して別個の分子として存在するDNA分子（例えば、化学的に合成された核酸、又はPCR若しくは制限エンドヌクレアーゼ処理によって産生されたcDNA若しくはゲノムDNA断片）、並びにベクター、自己複製プラスミド、ウイルス（例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、又はヘルペスウイルス）に組み込まれるか、又は原核生物若しくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれた組換えDNAが含まれる。加えて、単離核酸には、ハイブリッド又は融合核酸の一部である組換えDNA分子などの操作された核酸が含まれ得る。例えばcDNAライブラリ又はゲノムライブラリ内、又はゲノムDNA制限消化物を含むゲル切片内の数百個乃至数百万個の他の核酸の中に存在する核酸は、単離核酸とは見なされない。

20

【0145】

ポリペプチドをコードする核酸は、選択の発現宿主での発現用に最適化され得る。B7-H4核酸配列が由来する哺乳動物と発現宿主との間のコドン使用頻度の違いを考慮して、同じアミノ酸をコードする代替のコドンにコドンを置き換え得る。このようにして、核酸が発現宿主-好ましいコドンを使用して合成され得る。

30

【0146】

核酸はセンス方向又はアンチセンス方向であってもよく、又はB7-H4ポリペプチドをコードする参照配列に相補的であってもよい。核酸は、DNA、RNA、又は核酸類似体であってもよい。核酸類似体は、塩基部分、糖部分、又はリン酸骨格において修飾され得る。かかる修飾は、例えば、核酸の安定性、ハイブリダイゼーション、又は溶解度を改善し得る。塩基部分での修飾には、デオキシチミジンに対するデオキシウリジン、及びデオキシシチジンに対する5-メチル-2'-デオキシシチジン又は5-プロモ-2'-デオキシシチジンが含まれ得る。糖部分の修飾には、リボース糖の2'ヒドロキシルの修飾による2'-O-メチル糖又は2'-O-アシル糖の形成が含まれ得る。デオキシリボースリン酸骨格の修飾は、モルホリノ核酸（各塩基部分が6員のモルホリノ環に連結されている）、又はペプチド核酸（デオキシリン酸骨格が擬ペプチド骨格に置き換えられ、且つ4個の塩基が保持されている）を生じ得る。例えば、Summerton and Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7: 187-195; 及び Hyrup et al. (1996) *Bioorgan. Med. Chem.* 4: 5-23を参照のこと。加えて、デオキシリン酸骨格を、例えば、ホスホロチオエート又はホスホロジチオエート骨格、ホスホロアミダイト、又はアルキルリン酸トリエステル骨格に置き換えることができる。

40

【0147】

50

ポリペプチドをコードする核酸は、それを必要とする対象に投与することができる。核酸送達には、「外来」核酸を細胞に、及び最終的には生きた動物に導入することが関わる。対象に核酸を送達するための組成物及び方法は、当該技術分野において公知である（Understanding Gene Therapy, Lemoine, N. R., ed., BIOS Scientific Publishers, Oxford, 2008を参照のこと）。

【0148】

6. ベクター及び宿主細胞

B7-H4ポリペプチド、その断片及び融合物をコードするベクターもまた提供される。上記に記載されるような核酸が、細胞で発現させるためのベクターに挿入され得る。本明細書で使用されるとき、「ベクター」は、プラスミド、ファージ、ウイルス又はコスミドなどのレプリコンであり、そこに別のDNAセグメントが挿入されることにより、挿入されたセグメントの複製がもたらされ得る。ベクターは発現ベクターであってもよい。「発現ベクター」は、1つ以上の発現制御配列を含むベクターであり、「発現制御配列」は、別のDNA配列の転写及び/又は翻訳を制御及び調節するDNA配列である。

10

【0149】

ベクター中の核酸は、1つ以上の発現制御配列に作動可能に連結されてもよい。本明細書で使用されるとき、「作動可能に連結された」は、発現制御配列が目的のコード配列の発現を有効に制御するように遺伝子コンストラクトに組み込まれていることを意味する。発現制御配列の例としては、プロモーター、エンハンサー、及び転写終結領域が挙げられる。プロモーターは、典型的には転写が始まる点（概してRNAポリメラーゼIIの開始部位近傍）の上流100ヌクレオチドの範囲内の、DNA分子のある領域から構成される発現制御配列である。コード配列をプロモーターの制御下に置くには、ポリペプチドの翻訳リーディングフレームの翻訳開始部位をプロモーターの1～約50ヌクレオチド下流に置くことが必要である。エンハンサーは、時間、位置、及びレベルの点で発現特異性を提供する。プロモーターと異なり、エンハンサーは転写部位から様々な距離に位置するときに機能することができる。エンハンサーはまた、転写開始部位から下流にも位置し得る。コード配列は、RNAポリメラーゼがそのコード配列をmRNAに転写することができるとき、細胞において発現制御配列に「作動可能に連結されている」とともに、その「制御下にある」とされ、次にはこのmRNAが、コード配列によりコードされるタンパク質に翻訳され得る。

20

30

【0150】

好適な発現ベクターとしては、限定なしに、例えば、バクテリオファージ、バキュロウイルス、タバコモザイクウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、及びアデノ関連ウイルスに由来するプラスミド及びウイルスベクターが挙げられる。数多くのベクター及び発現系が、Novagen (Madison, WI)、Clontech (Palo Alto, CA)、Stratagene (La Jolla, CA)、及びInvitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA)などの企業から市販されている。

【0151】

発現ベクターはタグ配列を含み得る。タグ配列は、典型的にはコードされるポリペプチドとの融合物として発現する。かかるタグは、カルボキシル末端又はアミノ末端のいずれかを含め、ポリペプチド内のどこに挿入されてもよい。有用なタグの例としては、限定はされないが、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、ポリヒスチジン、c-myc、ヘマグルチニン、Flag (商標) タグ (Kodak, New Haven, CT)、マルトースE結合タンパク質及びプロテインAが挙げられる。一実施形態では、B7-H4融合ポリペプチドをコードする核酸分子が、ヒト免疫グロブリンC1鎖のヒンジ、CH2及びCH3領域に対応するアミノ酸配列を好ましくは有するIg重鎖定常領域の1つ以上のドメインをコードする核酸を含むベクター中に存在する。

40

50

【 0 1 5 2 】

発現させる核酸を含むベクターは、宿主細胞に移入させることができる。用語「宿主細胞」は、組換え発現ベクターを導入することのできる原核細胞及び真核細胞を含むことが意図される。本明細書で使用されるとき、「形質転換された」及び「トランスフェクトされた」は、多くの技法のうちの一つによって核酸分子（例えばベクター）を細胞に導入することを包含する。特定の技法に限定されるものではないが、これらの技法の多くが当該技術分野で十分に確立されている。原核細胞は、例えば電気穿孔又は塩化カルシウムの媒介による形質転換により、核酸で形質転換することができる。核酸は、例えば、リン酸カルシウム共沈殿、D E A E - デキストランの媒介によるトランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、又はマイクロインジェクションを含む技法によって哺乳類細胞にトランスフェクトすることができる。宿主細胞（例えば、原核細胞又はC H O細胞などの真核細胞）を使用して、例えば、本明細書に記載されるB 7 - H 4 ポリペプチドを産生することができる。

10

【 0 1 5 3 】

記載されるベクターを使用して、細胞、例えば、臍島細胞などの移植用細胞においてB 7 - H 4 ポリペプチドを発現させることができる。例示的ベクターとしては、限定はされないが、アデノウイルスベクターが挙げられる。一つの手法には、培養下の初代細胞への核酸移入と、続く宿主に対するエキソビボ形質転換細胞の全身的な、或いは特定の臓器又は組織への自家移植が含まれる。エキソビボ方法には、例えば、対象から細胞を回収するステップ、細胞を培養するステップ、それらの細胞に発現ベクターを形質導入するステップ、及びコードされたポリペプチドの発現に好適な条件下に細胞を維持するステップが含まれ得る。これらの方法は分子生物学の技術分野において公知である。形質導入ステップは、例えば、リン酸カルシウム、リポフェクション、電気穿孔、ウイルス感染、及び微粒子銃遺伝子移入を含めた、エキソビボ遺伝子療法に使用される任意の標準的な手段によって達成することができる。或いは、リボソーム又は高分子マイクロパーティクルを使用することができる。次に形質導入が成功した細胞を、例えばコード配列の発現又は薬剤耐性遺伝子の発現で選択することができる。次に細胞は、（必要であれば）致死放射線を照射し、対象に注入又は移植することができる。一実施形態では、融合タンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターは、それを必要とする対象に投与される細胞にトランスフェクトされる。

20

30

【 0 1 5 4 】

インビボ核酸療法は、機能的に活性なD N Aをインビボで哺乳類体細胞組織又は臓器に直接移入することにより達成し得る。例えば、本明細書に開示されるポリペプチドをコードする核酸をリンパ組織又は腫瘍に直接投与することができる。或いは、リンパ組織特異的転写調節エレメント（T R E）、例えば、Bリンパ球特異的、Tリンパ球特異的、又は樹状細胞特異的T R Eを使用して、リンパ組織特異的ターゲティングを実現し得る。リンパ組織特異的T R Eは、当該技術分野において公知である。

【 0 1 5 5 】

核酸はまた、インビボでウイルス手段によって投与されてもよい。融合タンパク質をコードする核酸分子が、当該技術分野において周知されているとおり、複製欠損レトロウイルスを産生するパッケージング細胞株を使用してレトロウイルスベクターにパッケージングされ得る。組換えアデノウイルス及びワクシニアウイルスを含め、非複製性にするのできる他のウイルスベクターもまた用いられ得る。ネイキッドD N A若しくはR N A、又はウイルスベクターに加え、操作された細菌をベクターとして使用することもできる。

40

【 0 1 5 6 】

核酸はまた、リボソーム、高分子マイクロ粒子及びナノ粒子並びにポリカチオン、例えばアシアロ糖タンパク質 / ポリリジンを含む他の担体によっても送達され得る。

【 0 1 5 7 】

インビボでのウイルスの媒介及び担体の媒介による遺伝子移入に加え、プラスミドD N Aの投与及び微粒子ボンバードメントの媒介による遺伝子移入を含めた当該技術分野で周

50

知の物理的手段を、DNAの直接移入に使用することができる。

【0158】

7. 製造方法

a. ポリペプチドの作製方法

開示されるB7-H4ポリペプチド、その断片及び融合物は、当該技術分野において公知の従来技術を用いて製造することができる。単離融合タンパク質は、例えば化学合成によるか、又は宿主細胞での組換え産生によって得ることができる。ポリペプチドを組換え産生するには、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸を使用して細菌又は真核生物宿主細胞（例えば、昆虫、酵母、又は哺乳類細胞）が形質転換、形質導入、又はトランスフェクトされ得る。一般に、核酸コンストラクトは、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結された調節配列を含む。調節配列（本明細書では発現制御配列とも称される）は、典型的には遺伝子産物をコードしな代わりに、それらが作動可能に連結されている核酸配列の発現に作用する。

10

【0159】

ポリペプチドの発現及び産生に有用な原核細胞株及び真核細胞株は、例えば、BL-21などの大腸菌（*Escherichia coli*）株、及びCHO細胞などの培養哺乳類細胞を含め、当該技術分野において周知されている。

【0160】

真核生物宿主細胞では、融合タンパク質の発現に多くのウイルスベースの発現系を利用することができる。ウイルスベースの発現系は当該技術分野において周知されており、限定はされないが、バキュロウイルス、SV40、レトロウイルス、又はワクシニアベースのウイルスベクターが挙げられる。

20

【0161】

ポリペプチドを安定に発現する哺乳類細胞株は、適切な制御エレメント及び選択可能なマーカを含む発現ベクターを使用して作製することができる。例えば、真核細胞発現ベクターpCR3.1（Invitrogen Life Technologies）及びp91023（B）（Wong et al. (1985) Science 228: 810-815を参照）が、例えば、チャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、COS-1細胞、ヒト胎児腎臓293細胞、NIH3T3細胞、BHK21細胞、MDCK細胞、及びヒト血管内皮細胞（HUVEC）における変異ポリペプチドの発現に好適である。さらなる好適な発現系としては、Lonza Group Ltdから入手可能なGS Gene Expression System（商標）が挙げられる。

30

【0162】

電気穿孔、リポフェクション、リン酸カルシウム、又は塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストラン、又は他の好適なトランスフェクション方法による発現ベクターの導入後、安定な細胞株を（例えば、代謝選択、又はG418、カナマイシン、若しくはハイグロマイシンに対する抗生物質耐性により）選択することができる。トランスフェクト細胞を、目的のポリペプチドが発現するように培養することができ、そのポリペプチドを例えば細胞培養上清から、又は溶解細胞から回収し得る。或いは、融合タンパク質は、（a）増幅配列をpcDNA3（Invitrogen Life Technologies）などの哺乳類発現ベクターにライゲートし、及び（b）コムギ胚芽抽出物又はウサギ網状赤血球ライセートを使用してインビトロで転写及び翻訳することにより、作製することができる。

40

【0163】

ポリペプチドは、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換（exchange）クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、DEAEイオン交換、ゲルろ過、及びヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどのクロマトグラフ法を用いて単離することができる。一部の実施形態では、アフィニティマトリックス上へのポリペプチドの捕捉を可能にするアミノ酸配列を含むさらなるドメインが含まれるようにポリペプチドを操作することができる。例えば、細胞培養上清又は細胞質抽出物中のFc

50

融合ポリペプチドは、プロテイン A カラムを使用して単離することができる。加えて、c - myc、ヘマグルチニン、ポリヒスチジン、又は Flag (商標) (Kodak) などのタグを使用してポリペプチド精製を促進することができる。かかるタグは、カルボキシル末端又はアミノ末端のいずれかを含め、ポリペプチド内のどこにでも挿入することができる。有用であり得る他の融合物としては、アルカリホスファターゼなどの、ポリペプチドの検出に役立つ酵素が挙げられる。イムノアフィニティークロマトグラフィーもまたポリペプチドの精製に用いることができる。ポリペプチドは、さらに、それを産生する細胞によるポリペプチドの分泌を生じさせる分泌シグナルを含むように操作することができる (分泌シグナルが既に存在しない場合)。分泌されたポリペプチド、例えば融合タンパク質は、次に好都合には細胞培地から単離することができる。

10

【0164】

b. 単離核酸分子の作製方法

単離核酸分子は、限定なしに、一般的な分子クローニング及び化学的核酸合成技法を含めた標準的な技法により作製することができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技法を使用して、ポリペプチドをコードする単離核酸を得ることができる。PCRは、標的核酸が酵素的に増幅される技法である。典型的には、目的の領域の末端又はその先からの配列情報を用いることにより、増幅する鋳型の逆鎖と配列が同じであるオリゴヌクレオチドプライマーが設計され得る。PCRを使用すると、全ゲノムDNA又は全細胞RNAからの配列を含め、DNA並びにRNAから特定の配列を増幅することができる。プライマーは典型的には14~40ヌクレオチド長であるが、10ヌクレオチド長から数百ヌクレオチド長の範囲に及び得る。一般的なPCR技法については、例えば、PCR Primer: A Laboratory Manual, ed. by Diefenbach and Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995に記載される。RNAを鋳型源として使用する場合、逆転写酵素を使用して相補DNA (cDNA) 鎖を合成することができる。リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、自家持続配列複製法又は核酸配列ベースの増幅もまた、単離核酸を得るために使用することができる。例えば、Lewis (1992) Genetic Engineering News 12:1; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878; 及び Weiss (1991) Science 254:1292-1293を参照のこと。

20

30

【0165】

単離核酸は、単一の核酸分子として、或いは一連のオリゴヌクレオチドとして (例えば、3'から5'方向の自動DNA合成用のホスホラミダイト技法を用いて) 化学的に合成することができる。例えば、所望の配列を含む長いオリゴヌクレオチド (例えば、>100ヌクレオチド) の1つ以上の対を合成することができ、ここでは各対が相補性の短いセグメント (例えば、約15ヌクレオチド) を含み、従ってそれらのオリゴヌクレオチド対がアニールされると二重鎖が形成される。DNAポリメラーゼを使用してオリゴヌクレオチドを伸長すると、オリゴヌクレオチド対当たり一つの二本鎖核酸分子を得ることができ、次にそれをベクターにライゲートすることができる。単離核酸はまた、突然変異誘発によって得ることもできる。ポリペプチドをコードする核酸を、PCRによるオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発及び/又は部位特異的突然変異誘発を含め、標準的な技法を用いて突然変異させることができる。Short Protocols in Molecular Biology, Chapter 8, Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, 編者 Ausubel et al, 1992を参照のこと。修飾することのできるアミノ酸位置の例としては、本明細書に記載されるものが挙げられる。

40

【0166】

B. 抗B7-H4抗体

1. B7-H4ポリペプチドに結合する抗体

1つ以上のB7-H4ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体及びその抗原結合断

50

片が開示される。組換え B 7 - H 4 ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物が抗体によって認識されるエピトープを含むとき、抗体はまた、その組換え B 7 - H 4 ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物にも結合することができる。一部の実施形態では、抗体は、細胞により発現される B 7 - H 4 ポリペプチド上のエピトープであって、組換え B 7 - H 4 ポリペプチド又はその断片若しくは融合物上ではマスクされているか又は存在しないエピトープに結合する。一部の実施形態では、抗体は、組換え B 7 - H 4 ポリペプチド又はその断片若しくは融合物上のエピトープであって、内因性 B 7 - H 4 ポリペプチド上ではマスクされているか又は存在しないエピトープに結合する。

【0167】

抗 B 7 - H 4 抗体又はその抗原 (a n i t g e n) 結合断片は、検出可能なマーカーで標識するか又は第 2 の分子とコンジュゲートすることができる。好適な検出可能なマーカーとしては、限定はされないが、放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、ビオチン、化学発光化合物、金属キレート剤又は酵素が挙げられる。一部の実施形態では、第 2 の分子は薬物である。さらに、2 つ以上の B 7 - H 4 エピトープに特異的な二重特異的抗体を、概して当該技術分野において公知の方法を用いて生成することができる。ホモ二量体抗体もまた、当該技術分野において公知の架橋技法 (例えば、W o l f f e t a l . , C a n c e r R e s . 5 3 : 2 5 6 0 - 2 5 6 5) によって生成することができる。

10

【0168】

a . B 7 - H 4 の I g V ドメインに結合する抗体

20

抗体は、B 7 - H 4 ポリペプチドの I g V ドメイン内にあるエピトープと結合し得る。典型的には、B 7 - H 4 の I g V ドメインは、I g V ドメイン内部のジスルフィド結合の形成に重要であり得る保存されたシステイン残基を含む。従って、抗体は、N 末端メチオニンから付番して配列番号 2 (即ち、配列番号 6) 又は配列番号 4 (即ち、配列番号 7) の約アミノ酸 5 6 とアミノ酸 1 3 0 との間を含む I g V ドメインの 4、5、6、7、8、9、10、11 個、又はそれ以上の連続するアミノ酸を含む線状エピトープに結合することができる。

【0169】

I g V ドメインは、配列番号 2 又は配列番号 4 の約アミノ酸 3 7 から約アミノ酸 1 5 4 を含み得る。従って、一部の実施形態では、抗体は、N 末端メチオニンから付番して配列番号 2 又は配列番号 4 の約アミノ酸 3 7 とアミノ酸 1 5 4 との間を含む I g V ドメインの 4、5、6、7、8、9、10、11 個、又はそれ以上の連続するアミノ酸を含む線状エピトープに結合する。

30

【0170】

抗体は、B 7 - H 4 の I g V ドメインの三次元表面特徴、形状、又は三次構造を含む立体エピトープと結合することができる。

【0171】

一部の実施形態では、抗体は、細胞により発現される膜貫通 B 7 - H 4、細胞遊離 B 7 - H 4、並びに I g V ドメインを含むその組換え断片及び融合物と結合するが、I g V の一部又は全てを欠失させた B 7 - H 4 の組換え断片及び融合物には結合しない。例えば、一部の実施形態では、抗体は配列番号 2、4、10、18、28、30、32、34、38 のポリペプチド、又はそれらの組み合わせに結合するが、配列番号 36 には結合しない。従って、一部の実施形態では、抗体は、以下の範囲内にある又はそれにより形成されるエピトープに結合する

40

【化 47】

```
GFGISGRHSI TVTTVASAGN IGEDGILSCT FEPDIKLSDI VIQWLKEGVL GLVHEFKEGK 60
DELSEQDEMF RGRTAVFADQ VIVGNASLRL KNVQLTDAGT YKCYIITSKG KGNANLEYKT 120
GAFSMP 126
```

(配列番号 4 0)、又は

50

【化 4 8】

FGISGRHSIT VTTVASAGNI GEDGILSCTF EPDIKLSDIV IQWLKEGVLG LVHEFKEGKD	60
ELSEQDEMFR GRTAVFADQV IVGNASLRLK NVQLTDAGTY KCYIITSKGK GNANLEYKTG	120
AFSMP	125

(配列番号 4 1)、又は

【化 4 9】

GFGISGRHSI TVTTVASAGN IGEDGIQSCF FEPDIKLSDI VIQWLKEGVL GLVHEFKEGK	60
DELSEQDEMFR RGRTAVFADQ VIVGNASLRL KNVQLTDAGT YKCYIITSKG KGNANLEYKT	120
GAFSMP	126

10

(配列番号 4 2)、又は

【化 5 0】

FGISGRHSIT VTTVASAGNI GEDGIQSCF EPDIKLSDIV IQWLKEGVLG LVHEFKEGKD	60
ELSEQDEMFR GRTAVFADQV IVGNASLRLK NVQLTDAGTY KCYIITSKGK GNANLEYKTG	120
AFSMP	125

(配列番号 4 3)。

【0 1 7 2】

従って、この抗体は、配列番号 4 0、4 1、4 2、又は 4 3 を含むポリペプチドとの特異的結合に使用することができる。

20

【0 1 7 3】

B 7 - H 4 の I g V ドメイン、例えば配列番号 4 0、4 1、4 2、又は 4 3 の配列を含む B 7 - H 4 ポリペプチドに結合する例示的抗体としては、クローン 2 H 9 が挙げられる。

【0 1 7 4】

一部の実施形態では、抗体は B 7 - H 4 の「L」変異体に結合するが、「Q」変異体には結合しない。「L」及び「Q」変異体とは、完全長 B 7 - H 4 の開始メチオニンから付番してアミノ酸位置番号 5 4 にロイシン(「L」)又はグルタミン(「Q」)を有する B 7 - H 4 ポリペプチドを指す。例えば、「L」変異体である配列番号 2 及び 3、並びに「Q」変異体である配列番号 4 及び 5 を参照のこと。従って、一部の実施形態では、抗体は、アミノ酸配列の配列番号 4 2 又は配列番号 4 3 の範囲内にある又はそれにより形成されるエピトープに結合するが、アミノ酸配列の配列番号 4 0 又は配列番号 4 1 の範囲内にある又はそれにより形成されるエピトープには結合しない。従って、この抗体は、配列番号 4 2 又は 4 3 を含むが 4 0 又は 4 1 は含まないポリペプチドとの特異的結合に使用することができる。B 7 - H 4 「L」変異体の I g V ドメインに結合するが、B 7 - H 4 「Q」変異体の I g V ドメイン、例えば配列番号 4 2 又は 4 3 の配列を含む B 7 - H 4 ポリペプチドには結合しない例示的な抗体としては、h B 7 - H 4 . m 1 が挙げられる。従って、h B 7 - H 4 . m 1 は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む B 7 - H 4 - I g に結合することができるが、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む B 7 - H 4 - I g には結合することができない。

30

40

【0 1 7 5】

代替的实施形態において、抗体は、アミノ酸配列の配列番号 4 0 又は配列番号 4 1 の範囲内にある又はそれにより形成されるエピトープに結合するが、アミノ酸配列の配列番号 4 2 又は配列番号 4 3 の範囲内にある又はそれにより形成されるエピトープには結合しない。従って、この抗体は、配列番号 4 0 又は 4 1 を含むが 4 2 又は 4 3 は含まないポリペプチドとの特異的結合に使用することができる。

【0 1 7 6】

b . B 7 - H 4 の I g C ドメインに結合する抗体

抗体は、B 7 - H 4 ポリペプチドの I g C ドメイン内にあるエピトープに結合し得る。

50

典型的には、B7-H4のIgCドメインは、IgCドメイン内部のジスルフィド結合の形成に重要であり得る保存されたシステイン残基を含む。例えば、抗体は、N末端メチオニンから付番して配列番号2又は配列番号4の約アミノ酸168とアミノ酸225との間を含むIgCドメインの4、5、6、7、8、9、10、11個、又はそれ以上の連続するアミノ酸を含む線状エピトープに結合することができる。

【0177】

一部の実施形態では、IgCドメインは、配列番号2又は配列番号4の約アミノ酸155から約アミノ酸241を含み得る。従って、一部の実施形態では、抗体は、N末端メチオニンから付番して配列番号2又は配列番号4の約アミノ酸155とアミノ酸241との間を含むIgCドメインの4、5、6、7、8、9、10、11個、又はそれ以上の連続するアミノ酸を含む線状エピトープに結合する。

10

【0178】

抗体は、B7-H4のIgCドメインの三次元表面特徴、形状、又は三次構造を含む立体エピトープと結合することができる。

【0179】

一部の実施形態では、抗体は、膜貫通B7-H4、細胞遊離B7-H4、並びにIgCドメインを含むその組換え断片及び融合物に結合するが、IgCの一部又は全てを欠失させたB7-H4の組換え断片及び融合物には結合しない。例えば、一部の実施形態では、配列番号2、4、10、18、28、36、38のポリペプチド、又はそれらの組み合わせに結合するが、配列番号28又は30には結合しない抗体。一部の実施形態では、抗体は、以下の範囲内にある又はそれにより形成されるエピトープに結合する

20

【化51】

```
SMPEVNVNDYN ASSETLRCEA PRWFPQPTTV WASQVDQGAN FSEVSNTSFE LNSENVMTKV    60
VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV TESEIKRRS                               99
```

(配列番号44)。従ってこの抗体は、配列番号44を含むポリペプチドとの特異的結合に使用することができる。

【0180】

B7-H4のIgCドメインに結合する例示的抗体としては、クローン2D1、6H3、8E11、及びH74が挙げられる。

30

【0181】

c. B7-H4の他の領域と結合する抗体

抗体は、完全にはB7-H4ポリペプチドのIgVドメイン又はIgCドメインの範囲内にはないエピトープに結合し得る。例えば、抗体は、IgCドメイン又はIgVドメインの一部を含む三次元表面特徴、形状、又は三次構造、又はそれらの組み合わせを含む配列又は立体エピトープと結合することができる。一部の実施形態では、抗体は、B7-H4のIgCドメイン又はIgVドメインの外側にある三次元表面特徴、形状、又は三次構造、又はそれらの組み合わせを含む配列又は立体エピトープと結合することができる。例えば、抗体は、シグナル配列、膜貫通ドメイン、細胞質ドメイン、細胞外ドメイン、又はそれらの組み合わせの一部を含むか、又はそれに依存する線状又は立体エピトープに結合することができる。好ましい実施形態では、抗体は、B7-H4のIgV及びIgCドメイン外にあるB7-H4の細胞外ドメインの一部に結合する。例えば、一部の実施形態では、抗体は、B7-H4のIgV又はIgCドメイン外にある1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11個、又はそれ以上の連続するアミノ酸を含む線状エピトープに結合する。抗体は、IgVドメイン、IgCドメイン、又はそれらの組み合わせの一部を含むが、完全にはこれらのドメインの一つの範囲内にはない線状エピトープに結合することができる。従って、抗体は、4、5、6、7、8、9、10、11個、又はそれ以上の連続するアミノ酸を含む線状エピトープであって、完全にはB7-H4のIgV又はIgCドメインの範囲内にはないエピトープに結合することができる。例えば、一部の実施形態では、エピトープ全体は、N末端メチオニンから付番して配列番号2又は配列番号4の酸56

40

50

からアミノ酸 225 のアミノ酸配列の範囲内にはない。

【0182】

好ましい実施形態では、エピトープは、細胞膜に隣接した B7 - H4 ポリペプチドの細胞外ドメインの一部である配列を含む。エピトープはまた Ig C ドメインの一部も含み得る。

【0183】

一部の実施形態では、抗体は配列番号 24 及び配列番号 34 に結合するが、配列番号 10、20、28、30、32、36、又は 38 には結合しない。一部の実施形態では、抗体は、アミノ酸配列 KR RSH LQL LNS K (配列番号 45) の一部又は全てを含むか又はそれにより形成されるエピトープに結合するが、抗体は、配列 KQQSH LQL LNS K (配列番号 46) 又は KR RSE PKSC (配列番号 47) には結合しない。従って、抗体は、配列番号 45 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと特異的に結合することができるが、配列番号 46、又は 47 のアミノ酸配列を含むポリペプチドとは結合しない。配列番号 45 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合するが、アミノ酸配列 KQQS を含むエピトープとは結合しない例示的抗体は、HM H4 - 5G1 である。

10

【0184】

2. B7 - H4 融合タンパク質に結合する抗体

組換え B7 - H4 融合タンパク質に結合する抗体もまた開示される。上記で考察したとおり、組換え B7 - H4 融合タンパク質は、典型的には、第 2 のポリペプチドに直接融合するか又は第 2 のポリペプチドに融合しているリンカーペプチド配列を介して融合した、B7 - H4 タンパク質の全て又は一部を含む第 1 の融合パートナーを含む。好ましい実施形態では、融合タンパク質は、Ig Fc 領域に融合した B7 - H4 の細胞外ドメイン、又はその断片を含む。例えば、組換え B7 - H4 - Ig 融合タンパク質は、ヒト Ig G1、ヒト Ig G4、又はマウス Ig G2a の Fc 領域に融合した B7 - H4 の細胞外ドメイン又はその断片を含む。例示的 B7 - H4 - Ig 融合タンパク質としては、例えば、配列番号 10 ~ 39 が挙げられる。

20

【0185】

組換え B7 - H4 ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物が、上記で考察したような B7 - H4 ポリペプチドのエピトープを提示するとき、抗体はまた、その組換え B7 - H4 ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物にも結合することができる。しかしながら、一部の実施形態では、抗体は、内因性 B7 - H4 ポリペプチド上ではマスクされているか又は存在しない組換え B7 - H4 融合タンパク質上のエピトープに結合する。

30

【0186】

例えば、B7 - H4 融合タンパク質の B7 - H4 ポリペプチドは、内因性 B7 - H4 ポリペプチドの対応する配列と比較して 1 つ以上の突然変異を含む変異 B7 - H4 ポリペプチドであってもよい。B7 - H4 融合タンパク質の B7 - H4 ポリペプチドは、内因性 B7 - H4 ポリペプチドと比べて 1 つ以上の挿入、欠失、置換、又はそれらの組み合わせを含み得る。従って、一部の実施形態では、変異 B7 - H4 ポリペプチドを含む B7 - H4 融合タンパク質に結合する抗体は、内因性 B7 - H4 ポリペプチドと比べて 1 つ以上の挿入、欠失、置換、又はそれらの組み合わせを含む B7 - H4 のセグメントを含むエピトープに結合し得る。一部の実施形態では、エピトープは、融合タンパク質の二次又は三次構造における、その挿入、欠失、置換、又はそれらの組み合わせに部分的に又は完全に依存する立体構造上の変化を含む。従って、一部の実施形態では、抗体は、B7 - H4 融合タンパク質の B7 - H4 ポリペプチドに結合するが、内因性 B7 - H4 ポリペプチドには結合しない。

40

【0187】

エピトープは、融合タンパク質の第 2 のポリペプチド又はリンカー配列に依存する連続的なアミノ酸配列、二次若しくは三次構造、翻訳後修飾、又はそれらの組み合わせで構成され得る。例えば、一部の実施形態では、抗体は、融合タンパク質のリンカー領域又は第 2 のポリペプチドの 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 個、又はそれ以上

50

の連続するアミノ酸を含む線状エピトープに結合する。一部の実施形態では、抗体は、B7-H4ポリペプチドと第2のポリペプチド、B7-H4ポリペプチドとリンカー配列、又はB7-H4ポリペプチドとリンカー配列と第2のポリペプチドからのアミノ酸を含む線状エピトープに結合する。

【0188】

抗体は、融合タンパク質のリンカー配列、融合タンパク質の第2のポリペプチド、又はそれらの組み合わせに部分的に、又は完全に依存する三次元表面特徴、形状、又は三次構造を含む立体エピトープと結合することができる。例えば、一部の実施形態では、抗体は、B7-H4ポリペプチドと第2のポリペプチド、B7-H4ポリペプチドとリンカー配列、又はB7-H4ポリペプチドとリンカー配列と第2のポリペプチドの組み合わせに依存する三次元表面特徴、形状、又は三次構造を含む立体エピトープに結合することができる。

10

【0189】

一部の実施形態では、抗体は、融合タンパク質の第2のポリペプチド上のエピトープに結合する。方法によっては、B7-H4融合タンパク質は、融合タンパク質の第2のポリペプチド (polypeptide) に特異的な検出抗体を使用して検出することができる。例えば、第2のポリペプチドがヒトIgG1、ヒトIgG4、又はマウスIgG2aのFc領域である場合、抗体は、それぞれヒトIgG1、ヒトIgG4、又はマウスIgG2のFc領域に特異的であり得る。

【0190】

20

3. 抗体組成物及び製造方法

B7-H4ポリペプチド、その断片又は融合物に特異的に結合する抗体の調製には、精製B7-H4ポリペプチド、その断片、融合物、若しくはエピトープ、又はそれらの核酸配列から発現するポリペプチドを使用することができる。精製B7-H4ポリペプチド、その断片、融合物、若しくはエピトープ又はそれらの核酸配列から発現するタンパク質を使用して、抗体を、当該技術分野において公知の任意の好適な方法を用いて調製することができる。

【0191】

本明細書に開示される抗体は、細胞培養物、ファージ、又は限定はされないが、雌ウシ、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ヒツジ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジー、類人猿を含む様々な動物で産生させることができる。従って、一実施形態では、抗体は哺乳類抗体である。ファージ技術を使用して初期抗体を単離し、又は改変された特異性若しくはアビディティ特性を備える変異体を産生させることができる。かかる技術は当該技術分野において常法であり、周知されている。一実施形態では、抗体は、当該技術分野において公知の組換え手段によって作製される。例えば、抗体をコードするDNA配列を含むベクターを宿主細胞にトランスフェクトすることにより、組換え抗体を作製することができる。1つ以上のベクターを使用することにより、宿主細胞において少なくとも1つのVL領域と1つのVH領域とを発現するDNA配列をトランスフェクトしてもよい。組換え的な抗体産生及び作製手段の例示的な説明としては、Delves, *Antibody Production: Essential Techniques* (Wiley, 1997); Shephard, et al., *Monoclonal Antibodies* (Oxford University Press, 2000); Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles And Practice* (Academic Press, 1993); *Current Protocols In Immunology* (John Wiley & Sons, 最新改訂版) が挙げられる。

30

40

【0192】

開示される抗体は、組換え手段によって修飾することにより、所望の機能の媒介における抗体の有効性を高めることができる。従って、抗体は、組換え手段を用いた置換によって修飾することができる。典型的には、この置換は保存的置換であり得る。例えば、抗体

50

の定常領域における少なくとも1つのアミノ酸を別の残基に置き換えることができる。例えば、米国特許第5,624,821号明細書、米国特許第6,194,551号明細書、国際公開第9958572号パンフレット；及びAngal, et al., Mol. Immunol. 30:105-08(1993)を参照のこと。アミノ酸の修飾には、アミノ酸の欠失、付加、置換が含まれる。ある場合には、かかる変化は、望ましくない活性、例えば補体依存性細胞傷害を低下させるために設けられる。多くの場合に抗体は検出可能なシグナルを提供する物質を、共有結合的に、或いは非共有結合的につなぎ合わせるにより標識される。各種の標識及びコンジュゲーション技術は公知であり、科学文献及び特許文献の両方に広範に報告されている。これらの抗体は、B7-H4ポリペプチド、又は断片、又はその融合物との結合についてスクリーニングすることができる。例えば、Antibody Engineering: A Practical Approach (Oxford University Press, 1996)を参照のこと。

10

【0193】

所望の生物活性を有する好適な抗体は、限定はされないが：増殖、遊走、接着、軟寒天成長、血管新生、細胞間コミュニケーション、アポトーシス、輸送、シグナル伝達を含むインビトロアッセイ、及び腫瘍成長の阻害などの以下のインビボアッセイにより同定することができる。

【0194】

本明細書に提供される抗体はまた、診断適用においても有用であり得る。抗体は、捕捉抗体又は非中和抗体として、抗原の受容体結合活性又は生物学的活性を阻害することなしに特異的抗原と結合する能力に関してスクリーニングされ得る。本抗体は、中和抗体として、競合的結合アッセイにおいて有用であり得る。本抗体はまた、B7-H4ポリペプチド又はその受容体の定量化にも使用することができる。

20

【0195】

開示される組成物及び方法で使用することのできる抗体には、任意のクラスの全免疫グロブリン（即ちインタクトな抗体）、その断片、及び抗体の少なくとも抗原結合可変ドメインを含む合成タンパク質が含まれる。可変ドメインは抗体間で配列が異なり、その特定の抗原に対する特定の抗体毎の結合及び特異性において用いられる。しかしながら、可変性は通常は抗体の可変ドメインにわたって均等に分布していない。それは典型的には、軽鎖及び重鎖の両可変ドメインの相補性決定領域（CDR）又は超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのなかでより高度に保存された部分はフレームワーク（FR）と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、各々が4つのFR領域を含み、FR領域は大部分がシート構造をとり、そのシート構造を接続し、且つある場合にはその一部を形成するループを形成する3つのCDRにより接続されている。各鎖のCDRはFR領域によってごく近接して一体に保持され、他方の鎖のCDRと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。

30

【0196】

また、生物活性を有する抗体の断片も開示される。この断片は、他の配列に結合しているか否かに関わらず、その断片の活性が非修飾抗体又は抗体断片と比較して著しく変化する又は損なわれることがない限り、特定の領域又は特異的なアミノ酸残基の挿入、欠失、置換、又は他の選択された修飾を含む。

40

【0197】

本開示の抗原タンパク質に特異的な一本鎖抗体を作製するための技術もまた応用することができる。一本鎖抗体の作製方法は当業者に周知されている。一本鎖抗体は、短いペプチドリンカーを使用して重鎖及び軽鎖の可変ドメインを併せて融合し、それにより単一の分子上に抗原結合部位を再構成することにより作成し得る。一方の可変ドメインのC末端が15~25個のアミノ酸ペプチド又はリンカーによって他方の可変ドメインのN末端にテザー係留されている一本鎖抗体可変断片（scFv）が、抗原結合又は結合の特異性を著しく破壊することなしに開発されている。リンカーは、重鎖及び軽鎖がそれらの適切な立体構造上の配向で一体に結合することを可能にするように選択される。

50

【0198】

2つのs c F vを連結することにより、二価一本鎖可変断片(ジ-s c F v)を設計することができる。これは、2つのV H及び2つのV L領域を含む単一のペプチド鎖を作製し、タンデムs c F vを生じさせることにより実施できる。s c F vはまた、2つの可変領域を共に折り畳むには短か過ぎるリンカーペプチド(約5アミノ酸)でs c F vを強制的に二量体化することによっても設計することができる。このタイプはダイアボディとして知られる。ダイアボディは、対応するs c F vと比べて最大40倍低い解離定数を有することが示されており、つまりダイアボディはその標的に対してはるかに高い親和性を有するということになる。さらに短いリンカー(1又は2アミノ酸)は三量体(トリアボディ又はトリボディ)の形成をもたらす。テトラボディもまた作製されている。テトラボディはその標的に対してダイアボディよりさらに高い親和性を呈する。

10

【0199】

モノクローナル抗体が、抗体の実質的に均質な集団(即ちその集団内の個々の抗体は、ごく一部の抗体分子に存在し得る可能な天然に存在する突然変異を除き同一である)から得られる。モノクローナル抗体には、「キメラ」抗体(重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種に由来する又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である一方、鎖の残りの部分が、別の種に由来する又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である)、並びにかかる抗体の断片が、それらが所望の拮抗活性を呈する限りにおいて含まれる。

20

【0200】

モノクローナル抗体は、モノクローナル抗体を生じる任意の手順を用いて作成することができる。ハイブリドーマ法では、マウス又は他の適切な宿主動物が典型的には免疫剤で免疫され、その免疫剤に特異的に結合し得る抗体を産生する又はその産生能を有するリンパ球が誘発される。或いは、リンパ球がインビトロで免疫されてもよい。

【0201】

抗体はまた、組換えDNA法によっても作成され得る。開示される抗体をコードするDNAは、従来手順を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に対し特異的結合能を有するオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより)容易に単離して配列決定することができる。また、ファージディスプレイ技術を用いて抗体又は活性抗体断片のライブラリを作成し、スクリーニングすることもできる。

30

【0202】

a. ヒト及びヒト化抗体

多くの非ヒト抗体(例えば、マウス、ラット、又はウサギに由来するもの)が、ヒトにおいて天然で抗原性であり、従ってヒトに投与されると望ましくない免疫応答を引き起こし得る。従って、本方法におけるヒト抗体又はヒト化抗体の使用は、ヒトに投与された抗体が望ましくない免疫応答を誘発する可能性を減らすのに役立つ。

【0203】

免疫化時に内因性免疫グロブリンの産生なしにヒト抗体の完全なレパートリーを産生する能力を有するトランスジェニック動物(例えばマウス)が用いられ得る。例えば、キメラ及び生殖細胞系列変異マウスにおける抗体重鎖接合領域(J(H))遺伝子のホモ接合性欠失が、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。かかる生殖細胞系列変異マウスにおけるヒト生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原チャレンジ時におけるヒト抗体の産生をもたらす。

40

【0204】

場合により、抗体は他の種で作成され、ヒトにおける投与用に「ヒト化」される。ヒト化形態の非ヒト(例えばマウス)抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片(抗体のF v、F a b、F a b'、F(a b')₂、又は他の抗原結合部分配列など)である。ヒト化抗体は、レシピエント抗体の相補性決定領域(CDR)の残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基に置き換えられ

50

ているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基に置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、又は移入されるCDR若しくはフレームワーク配列にも見られない残基も含み得る。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことができ、ここではCDR領域の全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた、最適には免疫グロブリン定常領域（Fc）（典型的にはヒト免疫グロブリンのもの）の少なくとも一部分も含み得る。

【0205】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当該技術分野において周知されている。概して、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそこに導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合に「移入」残基と称され、これは典型的には「移入」可変ドメインから取られる。抗体ヒト化技術には、概して、抗体分子の1つ以上のポリペプチド鎖をコードするDNA配列を操作するための組換えDNA技術の使用が関わる。ヒト化は、本質的には、げっ歯類CDR又はCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置換することにより実施し得る。従って、ヒト化形態の非ヒト抗体（又はその断片）はキメラ抗体又は断片であり、ここでは実質的にインタクトとはいえないヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的には、一部のCDR残基及び場合により一部のFR残基がげっ歯類抗体の類似部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。

【0206】

軽鎖及び重鎖の両方の、ヒト化抗体の作成に使用するヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低下させるために極めて重要である。「最良適合」法によれば、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列が既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングされる。次にげっ歯類の配列に最も近いヒト配列が、ヒト化抗体用のヒトフレームワーク（FR）として認められる。別の方法は、特定の軽鎖又は重鎖サブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークがいくつかの異なるヒト化抗体に用いられ得る。

【0207】

さらに、抗原に対する高親和性及び他の好ましい生物学的特性を保持しておきながら抗体をヒト化することが重要である。この目標を達成するため、ヒト化抗体は好ましくは、親配列及びヒト化配列の三次元モデルを使用した親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析プロセスによって調製される。三次元免疫グロブリンモデルは一般に利用可能であり、当業者は熟知している。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元立体構造を図示及び表示するコンピュータプログラムが利用可能である。それらの表示を調べることにより、候補免疫グロブリン配列が機能する際のそうした残基の見込まれる役割の分析、即ち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このようにして、FR残基をコンセンサス及び移入配列から選択して組み合わせることができ、それにより所望の抗体特性、例えば1つ又は複数の標的抗原に対する親和性の増加が実現する。一般に、抗原結合に影響を及ぼすことにおいてはCDR残基が直接的且つ最も実質的に関与する。

【0208】

b. 一本鎖抗体

一本鎖抗体の作製方法は当業者に周知されている。一本鎖抗体は、短いペプチドリンカーを使用して重鎖及び軽鎖の可変ドメインを併せて融合し、それにより単一の分子上に抗原結合部位を再構成することにより作成される。一方の可変ドメインのC末端が15～25個のアミノ酸ペプチド又はリンカーによって他方の可変ドメインのN末端にテザー係留されている一本鎖抗体可変断片（scFv）が、抗原結合又は結合の特異性を著しく破壊することなしに開発されている。リンカーは、重鎖及び軽鎖がそれらの適切な立体構造上

10

20

30

40

50

の配向で一体に結合することを可能にするように選択される。これらのFvは、天然抗体の重鎖及び軽鎖に存在する定常領域(Fc)を欠いている。

【0209】

c. 一価抗体

インビトロ方法は一価抗体の調製にも好適である。抗体の消化によるその断片、特にFab断片の作製は、当該技術分野において公知の常法の技法を用いて達成することができる。例えば、パパインを使用して消化を実施することができる。抗体のパパイン消化は、典型的には、単一の抗原結合部位を各々有するFab断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片と、残りのFc断片とを生じる。ペプシン処理はF(ab')₂断片と呼ばれる断片を生じ、この断片は2つの抗原が組み合わさった部位を有し、なおも抗原の架橋能を有する。

10

【0210】

抗体消化で作製されたFab断片はまた、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第1定常ドメインとを含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む重鎖ドメインのカルボキシ末端における数個の残基の付加だけFab断片と異なる。F(ab')₂断片は、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab'断片を含む二価の断片である。Fab'-SHは、定常ドメインの1つ又は複数のシステイン残基が遊離チオール基を有するFab'の本明細書における名称である。抗体断片は、当初はヒンジシステインを間に有するFab'断片の対として作製された。抗体断片の他の化学的カップリングもまた公知である。

20

【0211】

d. ハイブリッド抗体

抗B7-H4抗体はハイブリッド抗体であってもよい。ハイブリッド抗体では、一方の重鎖及び軽鎖対が、あるエピトープに対して産生される抗体に見られるものと相同であると同時に、他方の重鎖及び軽鎖対が、別のエピトープに対して産生される抗体に見られる対と相同である。これは多官能価の特性をもたらし、即ち二価抗体は少なくとも2つの異なるエピトープに同時に結合する能力を有する。かかるハイブリッドは、それぞれの構成成分抗体を産生するハイブリドーマの融合によるか、又は組換え技術によって形成することができる。かかるハイブリッドは、当然ながら、またキメラ鎖を用いて形成してもよい。

30

【0212】

e. 抗体断片のコンジュゲート又は融合物

抗体又はその断片を治療剤とカップリングすることにより、抗体のターゲティング機能を治療的に用いることができる。抗体又は断片(例えば、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分)と治療剤とのかかるカップリングは、抗体又は抗体断片と治療剤とを含む、イムノコンジュゲートを作成することによるか、又は融合タンパク質を作成することにより実現することができる。

【0213】

抗体又は断片と治療剤とのかかるカップリングは、抗体又は抗体断片と治療剤とを含む、イムノコンジュゲートを作成することによるか、又は融合タンパク質を作成することによるか、又は抗体若しくは断片をsiRNAなどの核酸と連結することにより実現することができる。

40

【0214】

一部の実施形態では、抗体が修飾され、その半減期が改変される。一部の実施形態では、抗体が循環中又は治療部位により長い時間存在するように抗体の半減期を増加させることが望ましい。例えば、抗体の力価を循環中又は治療する部位に長時間維持することが望ましいこともある。抗体は半減期を延長させるFc変異体によって、例えばXtend(商標)抗体半減期延長技術(Xencor、Monrovia、CA)を使用して操作することができる。他の実施形態では、潜在的副作用を低下させるため抗DNA抗体の半減期が短縮される。開示されるコンジュゲートは、所与の生物学的反応の修飾に使用するこ

50

とができる。薬物部分は古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。かかるタンパク質としては、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素、又はジフテリア毒素などの毒素を挙げることができる。

【0215】

f. タンパク質ケミストリーを用いた抗体の作成方法

抗体を含むタンパク質を作製する1つの方法は、タンパク質ケミストリー技術によって2つ以上のペプチド又はポリペプチドを共に連結することである。例えば、ペプチド又はポリペプチドを、現在利用可能な実験装置を使用して、Fmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)又はBoc(tert-ブチルオキシカルボニル(butyloxycarbonyl))ケミストリー(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)のいずれかを用いて化学的に合成することができる。当業者は、例えば抗体に対応するペプチド又はポリペプチドを標準的な化学反応によって合成し得ることを容易に理解し得る。例えば、ペプチド又はポリペプチドを合成し、その合成樹脂から切断しなくてもよく、一方、抗体の他の断片を合成し、続いて樹脂から切断することにより、その他の断片上で機能的に遮断されている末端基を曝露してもよい。ペプチド縮合反応により、これらの2つの断片をそれらのそれぞれカルボキシル末端及びアミノ末端でペプチド結合によって共有結合的につなぎ合わせ、抗体、又はその断片を形成することができる。或いは、ペプチド又はポリペプチドは上記に記載したとおりインビボで独立して合成される。単離後、これらの独立したペプチド又はポリペプチドを同様のペプチド縮合反応によって連結し、抗体又はその抗原(anitgen)結合断片を形成し得る。

10

20

30

40

【0216】

例えば、クローニングし又は合成したペプチドセグメントの酵素的ライゲーションにより、比較的短いペプチド断片をつなぎ合わせてより大きいペプチド断片、ポリペプチド又は全タンパク質ドメインを作製することが可能である。或いは、合成ペプチドの天然の化学的ライゲーションを利用して、より短いペプチド断片から大きいペプチド又はポリペプチドを合成的に構築することができる。この方法は二段階の化学反応からなる。第1の段階は、非保護合成ペプチド-チオエステルと、アミノ末端Cys残基を含む別の非保護ペプチドセグメントとの化学選択的反応であり、それにより初期共有結合生成物としてチオエステル結合中間体が得られる。反応条件を変更することなしに、この中間体が自発的な高速の分子内反応を起こし、ライゲーション部位に天然ペプチド結合が形成される。

【0217】

4. 例示的抗B7-H4抗体

本明細書に記載される組成物及び方法で使用することのできる例示的抗体を提供する。例えば、抗B7-H4抗体は、米国特許第7,888,477号明細書；同第7,737,255号明細書；同第7,619,068号明細書；同第6,962,980号明細書、及び米国特許出願公開第2008/0199461号明細書に開示されている。抗B7-H4抗体はまた、国際公開第2013/025779号パンフレット(これは特に全体として参照により本明細書に援用される)にも開示されている。

【0218】

他の例示的抗体としては、本明細書において2H9、hB7-H4.m1、2D1、6H3、2E11、8E11、H74、HMH4-5G1と称されるもの、並びにその断片、キメラ、変異体、特にヒト化変異体が挙げられる。一部の実施形態では、抗体は、例えばマウス又は他の非ヒト抗B7-H4軽鎖及び重鎖可変領域とヒトFc領域(例えばIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4)とを含むキメラ抗体である。

【0219】

抗体H74は市販の抗ヒトB7-H4抗体(eBioscience, San Diego, CA)である。

【0220】

50

抗体 H M H 4 - 5 G 1 は、マウス B 7 - H 4 ヒト I g G 1 F c 融合タンパク質に対して産生される市販のアルメニアンハムスター I g G 抗体 (B i o L e g e n d 、 S a n D i e g o , C A) である。

【 0 2 2 1 】

a . 抗ヒト B 7 - H 4 クローン 2 H 9

抗 B 7 - H 4 m A b 2 H 9 の軽鎖及び重鎖可変領域のアミノ酸配列は、以下のとおりである (C D R には下線を引く) :

軽鎖可変領域 :

【 化 5 2 】

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESID NYGISFMHWY QQKPGQPPKL LIYRASNLES
GIPARFSGSG SRTDFTLTIN PVETDDVATY FCQQSDEGRT FGGGTKLEIK

10

(配列番号 5 5)

重鎖可変領域 :

【 化 5 3 】

EVQLVESGGN LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NSAMSWVRQT PEKRLWVAT ISDGGRYTY
PDNVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSHLKSED TALLYCARDR PHWYFDVWGT GATVTVSS

(配列番号 5 6) 。

【 0 2 2 2 】

b . 抗ヒト B 7 - H 4 クローン 2 D 1

抗 B 7 - H 4 m A b 2 D 1 の軽鎖及び重鎖可変領域のアミノ酸配列は、以下のとおりである (C D R には下線を引く) :

軽鎖可変領域 :

【 化 5 4 】

DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSHSLV HSNGNTYLHW YLQKPGQSPN LLIYIVSNRF
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP PTFGAGTKLE LK

20

(配列番号 5 7)

重鎖可変領域 :

【 化 5 5 】

EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFN SHGMSWVRQT PEKRLDWVAT ISDGGTYTY
PVNVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSHLKSED TAMYYCARDG GGGAYWGQGT LVTVSA

30

(配列番号 5 8) 。

【 0 2 2 3 】

c . 抗ヒト B 7 - H 4 クローン 2 E 1 1

抗 B 7 - H 4 m A b 2 E 1 1 の軽鎖及び重鎖可変領域のアミノ酸配列は、以下のとおりである (C D R には下線を引く) :

軽鎖可変領域 :

【 化 5 6 】

DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT VSCKSSQSL YSTNQRTYLA WFQQKPGQSP KLLIYWASTR
ESGVPDRFTG SSGTDFTLT ISSVKAEDLA VYYCQQYYNY PLTFGTGTKL ELK

40

(配列番号 5 9)

重鎖可変領域 :

【 化 5 7 】

EVKLVESGG LVQPGSSMKL SCTASGFKFT DYYMAWVRQV PEKGLEWVAN INYDGSSTYY
LDSLKSRFII SRDNAKNNLY LQMNLSKSED TATYYCARKG YFDYWGQGT LTVSS

50

(配列番号 60)。

【0224】

d. 抗ヒト B7 - H4 クローン 6H3

マウス抗ヒト B7 - H4 抗体 6H3 をコードする DNA を配列決定した。軽鎖及び重鎖の可変ドメインのアミノ酸配列及びコードポリヌクレオチド配列は、以下に示すとおりである。CDR 配列は太字及び下線で示す：

軽鎖可変領域：

【化 58】

DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HINGNTYLHW YLQKPGQSPK VLIYKVSNRF
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP LTFGAGTKLE LK

10

(配列番号 61)

軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド：

【化 59】

gatgttgtga tgacccaaac tcctctctcc ctgcoctgtca gtcttgagaga tcaagcctcc
atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacattaatg gaaacaacta tttacattgg
taoctgcaga agccaggcca gtctccaaag gtcoctgatct acaaagtttc caaccgattt
tctggggctcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattctgtct ctcaaagtac acatgttccg
ctcacgttcc gtgctgggac caagctggag ctgaaac

20

(配列番号 62)

重鎖可変領域：

【化 60】

EVQLQQSGPV LVKPGTSVKM SCKASGYTFT DYYMNVKQS HGKSLEWIGV INPYNDTTY
NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MEVNSLTFED SAVYYCARYP ESTYWGQGTL VTVSA

(配列番号 63)

軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド：

【化 61】

gaggctcagc tgcaacagtc tggacctgta ctggtgaagc ctgggacttc agtgaagatg
tcctgtaagg cttctggata cacattcaact gactactata tgaactgggt gaagcagagc
catggaaga gtcttgagtg gattggagtt attaatacctt acaacggtga cactaactac
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacattg actggtgaca agtcoctccag cacagcctac
atggaggtca acagcoctgac atttgaggac totgcagtct attactgtgc aagatacccg
gagagtactt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca

30

(配列番号 64)。

【0225】

III. 検出及び診断方法

A. 生体試料中における B7 - H4 の検出方法

40

一部の実施形態では、抗 B7 - H4 抗体は、生体試料中の B7 - H4 を検出する方法において使用される。対象から得られた生体試料中の B7 - H4 ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物の検出は、多くの従来方法により可能となる。好ましい方法としては、B7 - H4 ポリペプチド、又は断片若しくは融合物が B7 - H4 特異的抗体とのその相互作用によって検出されるイムノアッセイが挙げられる。B7 - H4 特異的抗体を使用して、B7 - H4 ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物の存在を定性的或いは定量的な形で検出することができる。B7 - H4 ポリペプチドの検出に用いることのできる例示的イムノアッセイとしては、限定はされないが、ラジオイムノアッセイ、ELISA、免疫沈降アッセイ、ウエスタンブロット、蛍光イムノアッセイ、及び免疫組織化学が挙げられる。以下に記載する検出及び診断方法において用いることのできる例示的抗体としては、

50

限定はされないが、2H9、hB7-H4.m1、2D1、6H3、8E11、H74、HMH4-5G1、及びそれらの組み合わせが挙げられる。一部のイムノアッセイ、例えばELISAでは、2つの異なるB7-H4特異的抗体が必要であり得ることは理解されるであろう。従って、本明細書に開示される抗体は、生体試料中のB7-H4の検出に好適な任意の組み合わせで使用することができる。しかしながら、以下でさらに詳細に考察するとおり、全B7-H4、又は細胞遊離B7-H4単独、又はB7-H4融合タンパク質（例えばB7-H4-Ig）単独の検出には、抗体の特定の組み合わせが好ましい。

【0226】

B7-H4ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物を含み得る生体試料は、個体から得ることができる。生体試料が組織又は細胞起源である場合、その試料は、場合によりカオトロピック剤、界面活性剤、還元剤、緩衝剤、及び塩を含有する溶解緩衝液に可溶化される。試料は好ましくは、対象から採取された生体液試料である。生体試料の例としては、尿、バルボタージ、血液、血清、血漿、涙、唾液、脳脊髄液、組織、リンパ液、滑液、又は喀痰等が挙げられる。好ましい実施形態では、生体液は全血、又はより好ましくは血清若しくは血漿である。血清は、血球細胞でもなく（血清は白血球又は赤血球を含まない）、凝固因子でもない全血の成分である。血清はフィブリノゲンが取り除かれた血漿である。従って、血清は、血液凝固（凝血）に用いられない全てのタンパク質、並びに全ての電解質、抗体、抗原、ホルモン、及び任意の外因性物質（例えば薬物及び微生物）を含む。試料は、試料を抗体に接触させる前に好適な希釈剤で希釈され得る。

【0227】

概して、対象から得られた試料は、B7-H4ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物と特異的に結合する抗体と接触させることができる。場合により、抗体を試料と接触させる前に、洗浄及び続く複合体の単離を促進するため抗体が固体支持体に固定化され得る。固体支持体の例としては、例えば、マイクロタイタープレート、スティック、ビーズ、又はマイクロビーズの形態のガラス又はプラスチックが挙げられる。抗体はまた、プローブ基板又はProteinChip（登録商標）アレイに付着させてもよく、上記に記載したとおり気相イオン分光法によって分析し得る。

【0228】

B7-H4ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物を検出するためのイムノアッセイ（immunoassay）は、免疫特異的抗原-抗体相互作用が起こり得るような条件下で生体試料をB7-H4ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物に特異的な抗体に接触させた後、続いてその相互作用を検出又は計測する能力を含む。抗体とB7-H4ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物との結合を用いることにより、B7-H4ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物の存在及び産生の変化を検出し得る。

【0229】

イムノアッセイは、試料中のマーカーを検出及び分析するステップを含み得る。例えば、方法は、（a）B7-H4ポリペプチド、その断片、又は融合物に特異的に結合する抗体を提供するステップ；（b）試料を抗体と接触させるステップ；及び（c）試料中のB7-H4ポリペプチド、その断片、又は融合物に結合した抗体の複合体の存在を検出するステップを含み得る。抗体の提供後、当該技術分野において公知の好適な免疫学的結合アッセイのいずれかを用いてB7-H4ポリペプチド、その断片、又は融合物を検出及び/又は定量化することができる。有用なアッセイとしては、例えば、酵素免疫アッセイ（EIA）、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、放射免疫アッセイ（RIA）、ウエスタンブロットアッセイ、又はスロットブロットアッセイが挙げられる。これらの方法は、例えば、Methods in Cell Biology, Antibodies in Cell Biology, volume 37 (Asai, ed. 1993); Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr, eds., 7th ed. 1991); 及びHarlow & Lane、前掲にも記載されている。

【0230】

試料を抗体とインキュベートした後、混合物を洗浄し、形成された抗体 - マーカー複合体を検出することができる。これは、洗浄した混合物を検出試薬とインキュベートすることにより達成し得る。この検出試薬は、例えば、検出可能標識で標識される二次抗体であってもよい。例示的な検出可能標識としては、磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（商標））、蛍光色素、放射標識、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（horse radish peroxide）、アルカリホスファターゼ及びELISAで一般的に用いられる他のもの）、及びカロリメトリック標識、例えばコロイド金又は着色ガラス若しくはプラスチックビーズが挙げられる。或いは、試料中のB7-H4ポリペプチド、断片、又は融合物は、間接的アッセイを用いて検出することができ（この場合、例えば、結合したB7-H4特異的抗体が二次標識抗体を使用して検出される）、及び/又は競合又は阻害アッセイで検出することができる（この場合、例えば、B7-H4又はその断片若しくは融合物の個別的なエピトープに結合するモノクローナル抗体が混合物と同時にインキュベートされる）。

【0231】

一般的な酵素イムノアッセイは、「酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）」である。ELISAは、標識された（例えば、酵素が結合した）形態の抗体を使用して抗原の濃度を検出及び計測する技法である。種々の形態のELISAがあり、それらは当業者に周知されている。ELISAに関する当該技術分野において公知の標準的な技法は、“Methods in Immunodiagnosis”, 2nd Edition, Rose and Bigazzi, eds. John Wiley & Sons, 1980; Campbell et al., “Methods and Immunology”, W. A. Benjamin, Inc., 1964; 及び Oellerich, M., J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22: 895 - 904 (1984) に記載されている。

【0232】

「サンドイッチELISA」では、本明細書で「捕捉」抗体として参照されるとおりの、B7-H4ポリペプチド、その断片、又は融合物に特異的な第1の抗体を固相（即ちマイクロタイタープレート）に結合させて、抗原（例えばバイオマーカータンパク質）を含む生体試料に曝露する。次に固相を洗浄して未結合の抗原を除去する。次に、本明細書で「検出」抗体と称される二次抗体を、結合済みの抗原（存在する場合）に結合させて抗体 - 抗原 - 抗体サンドイッチを形成させる。好ましい実施形態では、二次抗体は標識される（例えば酵素が結合される）。一部の実施形態では、固相は洗浄により未結合の抗体が除去され、二次抗体に結合してその検出を可能にする第3の標識抗体で処理される。抗体に結合させ得る酵素の例は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、ウレアーゼ、及びB-ガラクトシダーゼである。酵素が結合した抗体は、基質と反応することにより、計測可能な色の付いた反応生成物を生じる。

【0233】

「競合ELISA」では、抗体を、B7-H4ポリペプチド、その断片、又は融合物（即ち抗原）を含有する試料とインキュベートする。次に抗原 - 抗体混合物を、抗原がコーティングされた固相（例えばマイクロタイタープレート）に接触させる。試料中に存在する抗原が多い程、固相との結合に利用可能な遊離抗体は少なくなる。次に標識された（例えば、酵素が結合した）二次抗体を固相に加え、固相に結合した一次抗体の量を決定する。

【0234】

実施者の選択により、且つ本開示に基づき、他の技法を用いてバイオマーカーを検出してもよい。かかる技法の一つはウエスタンブロッティングであり（Towbin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 4350 (1979)）、ここでは好適に処理された試料をSDS-PAGEゲル上で泳動させた後、ニトロセルロースフィルターなどの固体支持体に移す。次に、B7-H4ポリペプチド、その断片、又は融合物に特異的に結合する検出可能に標識された抗体を使用してペプチドレベルを評価すること

ができ、ここでは検出可能標識からのシグナルの強度が、存在するペプチドの量に対応する。レベルは、例えばデンストメトリーによって定量化することができる。

【0235】

一部の実施形態では、アッセイは、本明細書に記載されるアッセイの感度又は基礎検出レベルを増加させるための1つ以上の方法又は試薬を取り入れる。例えば、MESO-SCALE DISCOVERY (登録商標) (MSD (登録商標)) 技術を用いてアッセイの感度を増加させることができる。MSD技術は、電気化学発光検出とパターンニングされたアレイとの組み合わせを含む。MSD (登録商標) マイクロプレートは、プレートの底面に一体化された炭素製の電極を有する。この炭素に受動的吸着によって生物学的試薬を付着させ、高レベルの生物学的活性を維持することができる。MSD (登録商標) アッセイは検出に電気化学発光標識を使用する。こうした標識は非放射性で安定しており、特徴、異なるカップリングケミストリーである。電気化学発光標識は、電気化学的に刺激されると光を発生し、その光がマイクロプレートの底面にある電極によって検出される。電極近傍の標識のみが励起及び検出され、従ってこのアッセイは洗浄ステップなしに実施することができる。アッセイに使用される緩衝液中にはさらなる共反応物が存在する。これらの共反応物もまた、マイクロプレートにおいて電極に近接しているとき刺激され、電気化学発光シグナルを増強する。

10

【0236】

対象の生体試料中におけるB7-H4ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物の検出及び定性的又は定量的計測用の試薬を含むアッセイ及びキットもまた提供される。例えば、B7-H4ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物の検出がELISAによる場合、アッセイ又はキットの構成要素には、B7-H4ポリペプチド、又はその断片若しくは融合物の特定のエピトープに特異的な抗体が含まれることになり、ここでこの抗体は、場合により酵素、蛍光色素又は放射性標識に結合されていてもよい。

20

【0237】

B. 例示的ELISAアッセイ

生体試料のB7-H4レベルを計測するための好ましいアッセイは、サンドイッチELISAである。上記で考察したとおり、サンドイッチELISAは、標的タンパク質に特異的な2つの抗体、即ち捕捉抗体と検出抗体とを必要とする。従って、ELISAアッセイを用いてB7-H4レベルを計測するには2つの抗B7-H4抗体が必要であり、或いは、特にB7-H4融合タンパク質を検出しようとする場合には、2つの抗体のうち一方がB7-H4融合パートナー (例えば、B7-H4-Ig融合タンパク質の検出では抗Fc抗体) と結合し得る。従って、実施者は、生体試料中における特定のB7-H4種の検出に適切な1つ又は複数の抗体を選択することができる。「捕捉」抗体と「検出」抗体との好ましい組み合わせを以下に提供するが、一部の実施形態では、以下で考察する「捕捉」抗体が「検出」抗体として使用され、「検出」抗体が「捕捉」抗体として使用されることが理解されるであろう。

30

【0238】

1. 捕捉抗体

一部の実施形態では、捕捉抗体、又はその抗原結合断片は、上記に開示したB7-H4ポリペプチドのほとんど又は全ての既知の種、並びにB7-H4-Ig融合タンパク質の多くの種に共通する領域に結合する。好ましい実施形態では、捕捉抗体は、B7-H4に対する抗体のF(ab')₂断片であり得る。最も好ましい実施形態では、捕捉抗体は2H9のF(ab')₂断片である。膜貫通B7-H4、細胞遊離B7-H4、及び治療的B7-H4融合タンパク質は、典型的にはB7-H4のIgVドメインを含む。従って、一部の実施形態では、試料中におけるB7-H4ポリペプチドの総量の計測に使用することができる抗体は、B7-H4のIgVドメインに結合し得る。B7-H4のIgVドメイン、例えば配列番号40、41、42、又は43の配列を含むB7-H4ポリペプチドに結合する例示的な抗体は、2H9又はhB7-H4.m1である。

40

【0239】

50

別の例において、捕捉抗体は B 7 - H 4 の I g C ドメインに結合することができ、例えば配列番号 4 4 を含むポリペプチドに結合する抗体である。B 7 - H 4 の I g C ドメインに結合する例示的抗体としては、2 D 1、6 H 3、8 E 1 1、及び H 7 4 が挙げられる。

【 0 2 4 0 】

2 . 検出抗体

一部の実施形態では、生体試料中の全ての B 7 - H 4 ポリペプチドを計測することが望ましい。従って、一部の実施形態では、検出抗体は、I g V ドメイン又は I g C ドメインなど、内因性 B 7 - H 4 ポリペプチドのほとんど又は全ての既知の種に共通する領域に結合する。好ましい実施形態では、捕捉抗体が一つのドメイン（例えば I g V ドメイン）に結合し、且つ検出抗体が別のドメイン（即ち I g C ドメイン）又は同じドメイン（即ち I g V ドメイン）の異なる領域若しくはエピトープに結合する。従って、一部の実施形態では、単一の生体試料中における B 7 - H 4 の複数の種を検出するための捕捉抗体及び検出抗体は、2 H 9、2 D 1、6 H 3、8 E 1 1、及び H 7 4 からなる群から選択される2つの異なる抗体である。例えば、血漿又は血清などの生体試料中の全 B 7 - H 4 を検出するための好ましい実施形態では、捕捉抗体が 2 H 9 であり、且つ検出抗体が h B 7 - H 4 . m 1 又は 6 H 3 である。全 B 7 - H 4 の検出には 6 H 3 が好ましい。詳細な実施形態において、6 H 3 はマウス抗ヒト B 7 - H 4 抗体、又はマウス重鎖及び軽鎖可変領域とマウス若しくはヒト F c 領域（例えば、マウス I g G 1、マウス I g G 2 a、ヒト I g G 1、ヒト I g G 4 等）を含むそのキメラ抗体である。好ましい実施形態では、捕捉抗体が抗体 2 H 9 の F (a b ') 2 断片であり、且つ検出抗体が h B 7 - H 4 . m 1 又は 6 H 3 である。

10

20

【 0 2 4 1 】

特定の E L I S A アッセイでは、2 H 9 F (a b ') 2 断片を使用して、対象から得られた血清試料中の細胞遊離 B 7 - H 4 が捕捉される。検出抗体はビオチン化 h B 7 - H 4 . m 1 又は 6 H 3 であってもよい。細胞遊離 B 7 - H 4 の検出には h B 7 - H 4 . m 1 が好ましい。以下でさらに詳細に考察するとおり、このアッセイを用いることにより、高レベルの細胞遊離 B 7 - H 4 に関連する疾患又は障害に関して対象を検出、診断、又は他の方法で評価することができる。細胞遊離 B 7 - H 4 は、アビジン又はストレプトアビジンにコンジュゲートした検出試薬を使用して検出することができる。好ましい実施形態では、この E L I S A アッセイを用いて関節リウマチ、多発性硬化症、又は癌の疾患重症度が検出、診断、又は決定される。

30

【 0 2 4 2 】

一部の実施形態では、生体試料中における B 7 - H 4 ポリペプチドの1つ以上の種を B 7 - H 4 ポリペプチドの他の種と区別することが望ましい。従って、一部の実施形態では、検出抗体は、計測する1つ以上の種に特異的な領域に結合する。例えば、一部の実施形態では、抗体は、B 7 - H 4 「L」変異体の I g V ドメインに結合するが、B 7 - H 4 「Q」変異体の I g V ドメインには結合しない。B 7 - H 4 「L」変異体の I g V ドメインの範囲内にある又はそれにより形成されるエピトープ (e p i t o p e) には結合するが、B 7 - H 4 「Q」変異体の I g V ドメイン、例えば配列番号 4 2 又は 4 3 の配列における「Q」を含むエピトープには結合しない例示的抗体は、h B 7 - H 4 . m 1 である。別の実施形態では、抗体は、B 7 - H 4 「Q」変異体の「Q」を含む I g V ドメインの範囲内にある又はそれにより形成されるエピトープには結合するが、B 7 - H 4 「L」変異体の「L」を含む I g V ドメインには結合しない。

40

【 0 2 4 3 】

一部の実施形態では、エピトープは、K R R S H L Q L L N S K (配列番号 4 5) の B 7 - H 4 細胞膜隣接領域の一部又は全てを含むか又はそれにより形成される。配列番号 4 5 を含むか又はそれにより形成されるエピトープと結合する例示的抗体は、H M H 4 - 5 G 1 である。従って、H M H 4 - 5 G 1 は、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドとの特異的結合に使用することができる。H M H 4 - 5 G 1 などの、配列番号 4 5 の細胞膜隣接エピトープに結合する抗体を使用して、完全長 B 7 - H 4、並びに、限定はさ

50

れないが、配列番号16、17、24、25、34又は35を含むが、しかし配列番号10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、26、27、28、29、30、31、32、33、36、37、38又は39は含まない、細胞膜隣接領域を含むB7-H4ポリペプチド及び融合タンパク質の種を検出することができる。

【0244】

HMH4-5G1は、配列KQQSHLQLLSK(配列番号46)又はKRRS E P K S C(配列番号47)に結合しない。HMH4-5G1などの、配列番号45のアミノ酸配列を含むポリペプチドには結合するが、しかしアミノ酸配列KQQSを含むエピートとは結合しない抗体を、ELISAアッセイフォーマットにおいて検出抗体として使用することにより、膜貫通又は細胞遊離B7-H4を、配列番号10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、26、27、28、29、30、31、32、33、36、37、38又は39など、それが結合しないB7-H4断片又は融合タンパク質と区別することができる。

10

【0245】

好ましい実施形態では、2H9を捕捉抗体として使用し、且つHMH4-5G1を検出抗体として使用することにより膜貫通又は細胞遊離B7-H4が検出され、しかし配列番号10、11、12、13、14、15、18、19、20、21、22、23、26、27、28、29、30、31、32、33、36、37、38又は39などのB7-H4-Ig融合タンパク質は検出されない。これは、B7-H4融合タンパク質が治療的に投与され、且つ治療法に反応した内因性タンパク質レベルの変化など、内因性タンパク質レベルに対する薬力学的治療効果があるかどうかを決定するなどのために、内因性膜貫通又は細胞遊離B7-H4のレベルの決定が重要である場合に、特に有用である。かかるアッセイはまた、抗細胞遊離B7-H4特異的抗体などの、細胞遊離B7-H4を特異的に標的化するが、しかし膜貫通B7-H4は標的化しない治療法の有効性の計測にも有用である。かかるアッセイを用いて、膜貫通B7-H4を発現する細胞を含まないか、又は細胞が欠損している血清などの生体試料中の細胞遊離B7-H4もまた特異的に計測することができる。

20

【0246】

一部の実施形態では、B7-H4融合タンパク質は、IgV又はIgCドメインに結合する捕捉抗体を、第2の融合部分又はタンパク質に結合する検出抗体と併せて使用して検出することができる。好ましい実施形態では、2H9又はH74を捕捉抗体として使用し、且つ第2のポリペプチドに結合する抗体を検出抗体として使用することにより、配列番号10などのB7-H4-Igが検出され、しかし細胞遊離B7-H4は検出されない。一部の実施形態では、第2のポリペプチドは、マウスIgG1、ヒトIgG1、又はヒトIgG4などのIgGであり、検出抗体は、それぞれ抗マウスIgG1、抗ヒトIgG1、又は抗ヒトIgG4などの適切な抗IgG抗体である。このアッセイフォーマットは、B7-H4融合タンパク質が治療的に投与され、且つ治療用タンパク質の薬物動態を決定するために、膜貫通又は細胞遊離B7-H4を検出することなしにB7-H4融合タンパク質のレベルを決定する必要がある場合に、特に有用である。

30

40

【0247】

一実施形態では、捕捉抗体が2H9 F(ab')₂であり、且つ検出抗体が6H3である。このアッセイは、可溶性B7-H4及びB7-H4-Ig融合タンパク質を含む全B7-H4の検出に有用である。

【0248】

別の実施形態では、捕捉抗体が2H9 F(ab')₂であり、且つ検出抗体がhB7-H4.m1である。このアッセイは細胞遊離B7-H4単独の検出に有用であり、B7-H4-Ig融合タンパク質は検出しない。

【0249】

なおも別の実施形態では、捕捉抗体がH74であり、且つ検出抗体が抗Fc抗体である

50

。このアッセイは、B7-H4-Ig融合タンパク質の検出に有用である。

【0250】

C. 生体試料中の2つのB7-H4種間の区別

一部の実施形態では、対象から採取された生体試料は、B7-H4ポリペプチド、その断片、又は融合物の2つ以上の種を含有する。以下でさらに詳細に考察するとおり、一部の実施形態では、免疫応答を有するか、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害を有する対象、特に高レベルの細胞遊離B7-H4を有する対象に治療的B7-H4-Ig融合タンパク質が投与されてもよく、これは細胞遊離B7-H4の機能を遮断し得るか、B7-H4媒介性シグナル伝達を増加させ得るか、又はそれらの組み合わせが可能である。従って、一部の実施形態では、B7-H4-Igによる治療を受けている対象から採取された血漿又は血清などの生体試料は、細胞遊離B7-H4並びに上記に開示されるような可溶性の二量体B7-H4-Ig融合タンパク質の両方を含有し得る。従って、全B7-H4ポリペプチド、その断片、及び融合物、その、細胞遊離B7-H4単独、並びにB7-H4-Ig融合タンパク質単独を区別するための方法及び組成物が開示される。

10

【0251】

生体試料中における特定のB7-H4ポリペプチド種又は全B7-H4ポリペプチドからの一部のB7-H4ポリペプチド種の量を決定する方法は、生体試料に対して第1のELISAを実施すること(ここで捕捉抗体及び検出抗体は、IgVドメイン又はIgCドメインなどの、B7-H4ポリペプチドのほとんど又は全ての既知の種に共通する領域を検出する2つの異なる抗体、例えば、2H9、2D1、6H3、8E11及びH74である);生体試料に対して第2のELISAを実施すること(ここで捕捉抗体は、IgVドメイン又はIgCドメインなどの、B7-H4ポリペプチドのほとんど又は全ての既知の種に共通する領域を検出し(例えば、2H9、2D1、6H3、8E11及びH74)、検出抗体は、B7-H4ポリペプチドの種又はB7-H4ポリペプチドの1つ又は複数の種の一部に特異的であるが、試料中のB7-H4ペプチドの全てには結合しない)を含み得る。

20

【0252】

例えば、B7-H4-Ig融合タンパク質のレベルは、第2のELISA法により、B7-H4特異的捕捉抗体とhIgG1Fc特異的検出抗体とを使用して計測することができる。細胞遊離B7-H4のレベルは、第3のELISA法により、B7-H4ポリペプチドのほとんど又は全ての既知の種に共通する領域を検出する捕捉抗体と、細胞遊離B7-H4ポリペプチドに特異的であるが、しかし試料中のB7-H4-Ig融合タンパク質ペプチドは検出しない検出抗体とを使用して計測することができる。一部の実施形態では、生体試料は、膜貫通B7-H4を発現する細胞を含まない血清又は血漿などの生体液である。

30

【0253】

一部の実施形態では、第2のELISAは、B7-H4融合タンパク質の第2のポリペプチドに特異的な検出抗体で実施される。試料中のB7-H4融合タンパク質の量が第2のELISAによって決定され、且つ試料中の内因性B7-H4の総量が第3のELISAによって決定される。かかるアッセイを用いて治療的B7-H4融合タンパク質の薬物動態を決定することができる。

40

【0254】

一部の実施形態では、第2のELISAは、細胞遊離B7-H4に特異的な検出抗体で実施される。試料中の細胞遊離B7-H4の量が第2のELISAによって決定され、且つ試料中のB7-H4融合タンパク質の総量がhIgG1Fc特異的検出抗体を使用することにより決定される。かかるアッセイを用いて、細胞遊離B7-H4レベルに対する薬力学的治療効果を決定することができる。

【0255】

D. 診断アッセイ

抗B7-H4抗体、及びB7-H4の検出方法を用いることにより、B7-H4ポリペ

50

プチド、又はその断片若しくは融合物の存在及び産生の変化を検出することができる。

【0256】

細胞遊離 B7 - H4 は、サンプリングした関節リウマチ (RA) を有する患者及びシェーグレン症候群患者の約 3 分の 1 の血清中に見られる。個体における細胞遊離 B7 - H4 の濃度は、特に自己免疫疾患において、炎症の重症度、病期及び進行と密接に関連する。RA 及び SLE の実験マウスモデルでは細胞遊離 B7 - H4 の効果が再現されており、細胞遊離 B7 - H4 が膜貫通 B7 - H4 の抑制機能を遮断するデコイとして働き、全身性自己免疫疾患の増悪を引き起こすものと考えられる (Zhu, G., et al., Blood, 113 (8) : 1759 - 67 (2009) Epub 2008 Dec 24)。これらの結果は、全身性自己免疫疾患の発病における細胞遊離 B7 - H4 の役割を実証している。

10

【0257】

様々な癌の発生、診断、及び予後における膜貫通型、及び可溶型の B7 - H4 の役割が、He, et al., Clinical and Developmental Immunology, 695834; 8 頁 (2011) (これは特に全体として参照により援用される) においてレビューされている。例えば、多くのタイプのヒト癌において B7 - H4 が mRNA 及びタンパク質レベルで発現し、予後不良と負の相関を示すことが分かっている (以下の表 1 を参照のこと)。ヒト腫瘍における B7 - H4 の発現は、その細胞表面タンパク質発現が正常ヒト組織ではまれであることから、腫瘍における転写後の異常調節に起因すると考えられる。重症複合免疫不全症 (SCID) / ベージュ異種移植片増殖モデルを含むいくつかのモデルにおいて、腫瘍細胞における B7 - H4 発現の増加は細胞アポトーシスの低下及び腫瘍の増殖亢進と関連したとともに、B7 - H4 が広範囲で可変的に N - グリコシル化され、それが「パリア」機構として働き免疫監視を回避し得ることが示されている。

20

【0258】

多くの研究が、限定はされないが、卵巣癌、食道癌、腎癌、胃癌、肝癌、肺癌、結腸癌、膵癌、乳癌及び前立腺癌、及び皮膚癌 (メラノーマ)、及び以下の表 1 に示す他の癌を含む様々な癌の抗腫瘍免疫における B7 - H4 の役割と整合している。さらに、卵巣癌、RCC、結腸癌、乳癌、肺癌、及び前立腺癌の患者の血液試料中に細胞遊離 B7 - H4 が検出された。これらの研究は、血清 B7 - H4 がそれぞれの癌の診断及び予後に有用なマーカーとなり得ることを示している。

30

【0259】

従って、一部の実施形態では、生体試料中における細胞遊離 B7 - H4 レベルの変化の検出が、疾患、又は治療に対する反応性の指標となることができ、ここでは細胞遊離 B7 - H4 レベルを決定することが、薬力学的な読み取りである。細胞遊離 B7 - H4 レベルは、対照、例えば健常な対象、例えば、免疫応答、又は自己免疫性若しくは炎症性疾患 / 障害、又は癌を有しない対象から得られた標準 ; 又は異なる疾患重症度又は予後の免疫応答、又は自己免疫性又は炎症性疾患 / 障害又は癌と診断された対象と比較することができる。対照は、同じアッセイを用いた同様の個体の単一の値、又はより好ましくはプールされた若しくは平均化した値であってもよい。

40

【0260】

細胞遊離 B7 - H4 の生物学的活性を妨げるための組成物及び方法が、例えば、米国特許第 7,931,896 号明細書及び同第 7,989,173 号明細書、及び米国特許出願公開第 2009/0142342 号明細書 (全体として参照により本明細書に援用される) に開示される。

【0261】

一実施形態では、試料中で検出され得る細胞遊離 B7 - H4 には、B7 - H4 の膜遠位 IgV ドメイン及び膜近位 IgC ドメインが含まれる。別の実施形態では、検出される細胞遊離 B7 - H4 には、配列番号 8 又は配列番号 9 と 80%、85%、90%、95%、又は 99% の配列同一性であるアミノ酸配列が含まれる。

50

【0262】

別の実施形態では、検出される細胞遊離 B 7 - H 4 には、配列番号 6 又は配列番号 7 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、又は 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む B 7 - H 4 の I g V ドメインが含まれる。

【0263】

さらに別の実施形態では、検出される細胞遊離 B 7 - H 4 には、配列番号 2 又は配列番号 4 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、又は 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する B 7 - H 4 の断片が含まれる。

【0264】

対象が炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌を発症する又はそれを有する傾向を、対象における細胞遊離 B 7 - H 4 レベル、好ましくは対象における血清又は血漿中細胞遊離 B 7 - H 4 レベルに基づき決定することができる。対象における細胞遊離 B 7 - H 4 レベルが、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌を有しない対象における平均細胞遊離 B 7 - H 4 レベルと比べて高い場合、その対象は炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌を発症する可能性；又は炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌を有する可能性がより高い。

10

【0265】

以下の実施例に示すとおり、血清中細胞遊離 B 7 - H 4 レベルは、関節リウマチ (R A) 及びシェーグレン症候群を含むいくつかの炎症性及び自己免疫性障害を有する対象で上昇する。これらの例はまた、1 ng / ml 以上の細胞遊離 B 7 - H 4 レベルがヒトにおいて疾患及び重症度と相関することも示している。

20

【0266】

個体における免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌を、その個体の生体試料中における細胞遊離 B 7 - H 4 の量を定量化することにより診断又は検出することができ、ここで対照と比較した個体の生体試料中における細胞遊離 B 7 - H 4 の量の増加が、免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の指標となる。例えば、対象における免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の診断を補助する方法、又は免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の発症傾向を評価する方法は、対象からの生体試料中の細胞遊離 B 7 - H 4 レベルを決定するステップを含んでもよく、ここで対照の細胞遊離 B 7 - H 4 レベルと比べて高い生体試料の細胞遊離 B 7 - H 4 レベルが、免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の指標となり、又は免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌を発症する傾向の増加の指標となる。

30

【0267】

対象における免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の診断を補助する方法又はその発症傾向を評価する方法はまた、第 1 の生体試料及び第 1 の試料からある期間後に採取した第 2 の生体試料における細胞遊離 B 7 - H 4 レベルを決定するステップを含んでもよく、ここで第 1 の試料と比較した第 2 の試料における細胞遊離 B 7 - H 4 レベルの増加が、免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の発生又は悪化の指標となり、又は細胞遊離 B 7 - H 4 レベルの低下が、薬力学的 (p h a r m c o d y n a m i c) 治療反応性の指標となる。

40

【0268】

免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の重症度を決定する方法もまた開示される。この方法は、(a) 対象からの生体試料中の細胞遊離 B 7 - H 4 レベルを決定するステップ；及び (b) 生体試料における細胞遊離 B 7 - H 4 レベルを、免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の疾患重症度と相関する基準細胞遊離 B 7 - H 4 レベルと比較するステップであって、それにより対象の免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の重症度を決定するステップを含み得る。

50

【0269】

免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害、又は癌の重症度は、個体の生体試料における細胞遊離 B7 - H4 レベルを定量化し、且つ個体の生体試料中の細胞遊離 B7 - H4 の量を、免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害、又は癌の種々の病期の指標となる細胞遊離 B7 - H4 の量と相関付けることにより検出又は評価し得る。免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害、又は癌の種々の病期又は種々の重症度レベルと相関する細胞遊離 B7 - H4 の量は、免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害、又は癌の種々の病期にある、又は疾患の種々の重症度を有する患者において細胞遊離 B7 - H4 を定量化することにより予め決定し得る。

10

【0270】

例えば、RA では、典型的には以下の重症度分類が用いられる：クラス I：通常の活動は制限なしに行うことができる；クラス II：やや制限があるものの、日常生活のほとんどの活動を行うことができる；クラス III：著しく制限され、日常生活及び仕事の大半の活動を行うことができない；及びクラス IV：寝たきり又は車椅子に座ったきりで、活動能力がなくなる。各分類の患者において細胞遊離 B7 - H4 レベルを決定し、特定の重症度レベルと相関し得る細胞遊離 B7 - H4 の基準レベルを作成することができる。

【0271】

免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害、又は癌を治療する対象を選択する方法もまた開示される。この方法は、(a) 対象から得られた生体試料中の細胞遊離 B7 - H4 レベルを決定するステップ；(b) 生体試料の細胞遊離 B7 - H4 レベルを対照の細胞遊離 B7 - H4 レベルと比較するステップ；及び(c) 生体試料の細胞遊離 B7 - H4 レベルが対照の細胞遊離 B7 - H4 レベルより高いとき、その対象を治療に選択するステップを含み得る。治療する対象を選択する方法はまた、第1の生体試料及び第1の試料の後に採取した第2の生体試料における細胞遊離 B7 - H4 レベルを決定するステップ、及び第2の生体試料の細胞遊離 B7 - H4 レベルが第1の試料の細胞遊離 B7 - H4 レベルより高いとき、その対象を治療に選択するステップも含み得る。

20

【0272】

上記及び He, et al., *Clinical and Developmental Immunology*, 695834; 8頁(2011)において考察されるとおり、一部の癌は、癌細胞上又はその中での B7 - H4 の増加した、異常な、又は不適切な発現によって特徴付けられるが、必ずしも体液試料中における細胞遊離 B7 - H4 レベルの増加によって特徴付けられるわけではない。従って、上記で考察する癌を有する対象を検出、診断、評価、又は選択する方法は、それに代えて又は加えて、非癌性である同じ組織の細胞などの対照と比較した、癌細胞上の又は癌細胞における、限定はされないが膜貫通 B7 - H4 を含む B7 - H4 のレベルを計測するステップを含むことができる。

30

【0273】

一部の実施形態では、本明細書に開示される組成物及び方法を使用して投薬量レジームが作成、又は変更される。例えば、対象に第1の投与期間にわたり組成物の第1の用量が投与され；及び第2の投与期間にわたり組成物の第2の用量が投与され、場合により続いて1つ以上のさらなる投与期間にわたり1つ以上のさらなる用量が投与され得る。第1の投与期間は、1週間未満、1週間、又は2週間以上であり得る。

40

【0274】

一部の実施形態では、投薬量レジームは用量漸増投薬量レジームである。第1の用量は低用量であり得る。十分な生化学的又は臨床的反応、例えば対象における血清又は血漿中細胞遊離 B7 - H4 レベルの低下が達成されるまで、用量漸増が継続され得る。次に、投薬量が維持されるか又は維持量まで徐々に減らされ得る。こうした方法を用いて用量レベル、投与頻度、又は治療期間を標準化し、最適化し、又はカスタマイズすることができる。

【0275】

50

I V . 診断及び治療方法

A . 診断及び治療される疾患 / 障害

1 . 炎症性及び自己免疫性疾患 / 障害

開示される組成物を使用して検出及び治療され得る代表的な炎症性又は自己免疫性疾患 / 障害としては、限定はされないが、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、円形脱毛症、強直性脊椎炎 (ankylosing spondylitis)、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ球増殖性症候群 (alps)、自己免疫性血小板減少性紫斑病 (ATP)、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー - 皮膚炎、慢性疲労免疫不全症候群 (chronic fatigue syndrome immune deficiency , syndrome) (CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、癩痕性類天疱瘡、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、デゴス病 (Degos ' s disease)、皮膚筋炎、皮膚筋炎 - 若年性、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症 - 線維筋炎、グレーブス病 (grave ' s disease)、ギラン・バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、I g a腎症、インスリン依存型糖尿病 (I型)、若年性関節炎、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発性動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発筋炎・皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、ステイフマン症候群、高安動脈炎、側頭動脈炎 / 巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、血管炎、白斑、及びウェゲナー肉芽腫症が挙げられる。

10

20

【 0 2 7 6 】

好ましい実施形態では、炎症性及び自己免疫性疾患 / 障害は、関節リウマチ (RA)、全身性エリテマトーデス (SLE)、シェーグレン症候群、ループス腎炎、多発性硬化症、又はI型糖尿病である。

【 0 2 7 7 】

B 7 - H 4 は炎症経路における複数の点で、且つより高いレベルで働き、それにより B 7 - H 4 は TNF - などのエフェクターサイトカインの発現及び / 又は活性に影響を及ぼすように制御する主調節因子として働く。従って、本明細書に記載される B 7 - H 4 組成物は、ENBREL (登録商標) (エタネルセプト)、REMICADE (登録商標) (インフリキシマブ)、CIMZIA (登録商標) (セルトリズマブ) 及び HUMIRA (登録商標) (アダリムマブ) などの TNF - 遮断薬に反応しない患者の治療に、又は TNF - 遮断薬が安全若しくは有効でない場合に特に有用である。加えて、炎症経路における主調節因子としてのその活性のため、開示される B 7 - H 4 組成物は慢性及び持続性炎症の治療に特に有用である。好ましい実施形態では、本明細書に記載される B 7 - H 4 組成物を使用して再発寛解型多発性硬化症が治療される。

30

【 0 2 7 8 】

2 . 癌

一部の実施形態では、開示される組成物及び方法を使用して癌を有する対象が診断される。従って、一部の実施形態では、開示される組成物及び方法を使用して、卵巣、食道、腎臓、胃、肝臓、肺、結腸、膵臓、乳房及び前立腺、及びメラノーマ、又は表1に掲載する、若しくは He , et al . , Clinical and Developmental Immunology , 695834 ; 8頁 (2011) で考察される他のものを有する対象が診断及び / 又は治療される。一部の実施形態では、細胞遊離 B 7 - H 4 は、卵巣癌、RCC、結腸癌、乳癌、肺癌、及び前立腺癌の検出、診断、及び / 又は治療用バイオマーカーを提供する。好ましい実施形態では、癌は卵巣癌又は乳癌である。

40

【 0 2 7 9 】

【表 1】

表 1: 癌患者における B7-H4 の発現を調べる臨床試験の概要 (He, et al.,
Clinical and Developmental Immunology, 695834; 8 頁 (2011)から引用。

癌の種類	試料数	方法	陽性率 (%)	有意性
食道扁平上皮癌	112	IHC	98.5%	性別、遠隔転移、TNM ステージと相関; CD3 ⁺ 及び CD8 ⁺ T 細胞の密度、及び生存と逆相関
腎細胞癌	102	IHC	17.6% (早期 T1)	年齢、性別、TNM ステージ、リンパ管浸潤又は核異型度と無相関; 再発と相関; 生存と逆相関
メラノーマ	29	IHC	96.6% (原発性)、 89.7% (転移性)	生存と逆相関; CD8 ⁺ T 細胞浸潤と無相関
胃癌	94	RT-PCR	75.5 %	生存と逆相関
胃癌	156	IHC	44.9%	生存と逆相関
卵巣癌	34	ELISA	--	診断マーカーと無相関
11 種の癌*	289	IHC	全体 52.9% (詳細は論文参照)	ステージと相関
ブレンナー腫瘍	34	IHC	100%	CA-125 及び CEA でより高い割合の発現
卵巣癌	98	ELISA	--	化学療法後の短期(1年)生存増殖抑制期間の予測に有用

10

20

30

【 0 2 8 0 】

【表 2】

癌の種類	試料数	方法	陽性率 (%)	有意性
膵管腺癌	36	IHC	91.7%	p53 より強力、潜在的診断用途
腎細胞癌	101	ELISA	52.5%	ステージと相関; 診断及び予後の潜在的血清マーカー
乳癌	--	IHC	--	浸潤性腺管癌及び T リンパ球浸潤の低下と相関
卵巣癌	103	IHC	--	Treg 細胞数と相関
類子宮内膜腺癌	90	IHC, WB	100%	類子宮内膜腺癌の高リスクと相関; T 細胞浸潤と逆相関
卵巣癌	251	ELISA	48% (ステージ I) 55% (ステージ II) 67% (ステージ III)	予後不良と相関
卵巣癌	68	ELISA	100%	卵巣癌の早期発見に有望なマーカー
前立腺癌	823	IHC	99%	疾患の広がり及び不良転帰に関連; 治療的操作に魅力的な標的
乳癌及び結腸直腸癌	8 (乳癌)、 11 (結腸直腸癌)	RT-PCR	100% (乳癌) 一貫しない	潜在的治療標的
腎細胞癌	259	IHC	59.1%	B7-H4 は RRC 患者に有用な予後マーカーである
非小細胞肺癌	70	IHC	43%	T 細胞浸潤数の減少と相関

10

20

30

【 0 2 8 1 】

【表3】

癌の種類	試料数	方法	陽性率 (%)	有意性	
結腸癌、乳癌、 肺癌、前立腺 癌、及び卵巣癌	102.3 (確認試 験:200)	ELISA, IHC	--	卵巣癌では粘液性 の組織型と比べて 類内膜及び漿液性 の組織型でより高 いレベル	
卵巣癌	125	IHC, WB	99% (粘液性)、 100% (他の組 織型及び転移)	卵巣癌の潜在的診 断マーカー又は治 療標的	10
卵巣漿液性乳頭 癌	19	マイクロア レイ	--	最も高度に過剰発 現した遺伝子の中 で、B7-H4が初期 スクリーニングの 候補バイオマーカ ーであることを示 している	20
乳癌及び卵巣癌	19 (乳癌)、 13 (卵巣癌)	RT-PCT, WB, IHC	100% (乳癌) 53.8% (卵巣癌)	潜在的治療標的	
乳癌	173 (原発性)、 246 (転移性)	IHC	95.4% (原発性)、 97.6% (転移性)	ネガティブプロゲ ステロン受容体及 びHER-2/neu状 態、化学療法歴と 相関、悪性度ステ ージと無相関	
卵巣癌及び肺癌	22 (卵巣癌)、 16 (肺癌)	IHC	85% (卵巣癌)、31% (肺癌)	腫瘍免疫回避にお ける潜在的な役割	30

【0282】

B. 治療方法

1. 炎症性及び自己免疫性疾患/障害の治療用活性薬剤

免疫応答を低下させるため、又は炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害を治療するためのB7-H4特異的抗体の使用方もまた開示される。本方法は、限定はされないが、可溶性(s o u b l e) B7-H4の発現の増加によって特徴付けられるものを含む疾患/障害の治療に用いられ得る。本方法は、典型的には、それを必要とする対象に免疫抑制剤を投与するステップを含む。

【0283】

a. 免疫抑制剤 - B7-H4特異的

一部の実施形態では、治療剤はB7-H4媒介性シグナル伝達をもたらす。治療剤は、B7-H4媒介性シグナル伝達の作動薬、細胞遊離B7-H4の拮抗薬、又はそれらの組み合わせであってもよい。好適な治療剤としては、細胞遊離B7-H4の発現又は生物学的活性を阻害する化合物が挙げられる。例えば、この薬剤は、B7-H4媒介性シグナル伝達を増加させるのに有効な量の、膜貫通B7-H4若しくはその受容体の作動薬、又は細胞遊離B7-H4の拮抗薬、又はそれらの組み合わせであってもよい。

【0284】

i . 抗体

本明細書に開示される抗体は、それを必要とする対象に、対象における細胞遊離 B 7 - H 4 レベルを低下させるため、又は B 7 - H 4 媒介性シグナル伝達の細胞遊離 B 7 - H 4 による遮断を低下させるために投与され得る。一実施形態において、抗体の投与は作動薬活性を有し、B 7 - H 4 媒介性シグナル伝達を増加させる。好ましい実施形態では、抗体の投与は、以下に記載するとおり、膜貫通 B 7 - H 4 のタンパク質分解による切断を低減することによって血清中の s H 4 レベルを低下させる。一部の実施形態では、抗体は、膜貫通 B 7 - H 4 を模倣して B 7 - H 4 媒介性シグナル伝達を誘導することにより阻害性の免疫細胞応答を生じさせる B 7 - H 4 - I g 融合タンパク質の有効量と組み合わせて投与される。一部の実施形態では、抗体は別の活性薬剤と組み合わせて投与される。好ましくは、抗体は、共投与された B 7 - H 4 - I g 融合タンパク質に結合することなく、膜貫通 B 7 - H 4 媒介性シグナル伝達を低下させたり又は阻害したりすることなく、又はそれらの組み合わせで、細胞遊離 B 7 - H 4 と結合する。従って、一部の実施形態では、抗体の投与はインビボでの細胞遊離 B 7 - H 4 の産生を低下させ又は阻止する。

10

【0285】

例示的抗体

細胞遊離 B 7 - H 4 に特異的に結合する抗体又は抗体断片を使用して、s H 4 の生物学的活性を拮抗することができる。例示的抗体は、m A b h H 4 . 3 (C h o i , I . H . e t a l . , J I m m u n o l , 1 7 1 : 4 6 5 0 - 4 (2 0 0 3)) である。他の例示的抗体としては、2 H 9、h B 7 - H 4 . m 1、2 D 1、6 H 3、8 E 1 1、H M H 4 - 5 G 1 及び H 7 4 が挙げられる。

20

【0286】

好ましい実施形態では、抗体は、膜貫通 B 7 - H 4、又は上記に開示されるような B 7 - H 4 - I g 融合タンパク質には結合することなく、又はその機能を阻害することなく、細胞遊離 B 7 - H 4 に結合し、その機能を阻害する。

【0287】

細胞遊離 B 7 - H 4 は B 7 - H 4 の細胞外部分の酵素的切断により生じると考えられる。完全長 B 7 - H 4 c D N A をトランスフェクトした 2 9 3 T 細胞は培養上清中に細胞遊離 B 7 - H 4 を放出し、この分泌は、様々なプロテアーゼ阻害薬とインキュベートすることにより阻害し得る。一部の実施形態では、抗 B 7 - H 4 抗体は膜貫通 B 7 - H 4 に結合して細胞外ドメインのタンパク質分解による切断を阻止し、これにより細胞遊離 B 7 - H 4 の産生が阻止される。好ましい実施形態では、抗体は、B 7 - H 4 媒介性シグナル伝達を遮断又は阻害することなしに、B 7 - H 4 の細胞外ドメインの切断を阻止する。

30

【0288】

細胞外ドメインの B 7 - H 4 の膜隣接領域における K R R S 配列は、プロテアーゼが B 7 - H 4 細胞外ドメインに結合し又はそれを切断するのに重要であると考えられている。従って、一部の実施形態では、抗体は、細胞外ドメインの K R R S を含むエピトープに結合する。一部の実施形態では、エピトープは細胞外ドメインの K R R S に隣接する。例えば、一部の実施形態では、抗体は、アミノ酸配列 K R R S H L Q L L N S K (配列番号 4 5) に結合することができるが、この抗体は、配列 K Q Q S H L Q L L N S K (配列番号 4 6) 又は K R R S E P K S C (配列番号 4 7) には結合しない。配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに結合するが、配列番号 4 6 又は配列番号 4 7 には結合しない例示的抗体は、H M H 4 - 5 G 1 である。従って、推定プロテアーゼ切断エピトープに結合する抗体、例えば抗体 H M H 4 - 5 G 1 は、膜貫通 B 7 - H 4 の切断を阻害し、血清中の s H 4 レベルを低下させ得るものと考えられる。

40

【0289】

i i . プロテアーゼ阻害薬

上記に考察したとおり、細胞遊離 B 7 - H 4 は膜貫通 B 7 - H 4 の細胞外ドメインのタンパク質分解による切断によって産生されると考えられ、従って、特定の実施形態では、

50

治療剤はプロテアーゼ阻害薬である。例示的プロテアーゼ阻害薬としては、限定はされないが、セリンプロテアーゼ阻害薬、システインプロテアーゼ阻害薬、アスパラギン酸プロテアーゼ阻害薬、及びメタロプロテアーゼ阻害薬が挙げられる。特定のプロテアーゼ阻害薬としては、ロイペプチン、PMSF、AEBSF、アプロチニン、キモスタチン、アンチトロンピンIII、3,4-ジクロロイソクマリン、TLCK、TPCK、DIFP、アンチパイン、2-マクログロブリン、N-エチルマレイミド、E-64、キモスタチン、ペプスタチンA、1,10-フェナントロリン、ホスホラミドン、及びベスタチンが挙げられる。

【0290】

iii. B7-H4ポリペプチド、その断片、及び融合物

本明細書に開示されるB7-H4ポリペプチド、又はその断片、又は融合物は、治療剤として有用である。免疫細胞、好ましくはT細胞をインビボ又はエキソビボでB7-H4融合ポリペプチドと接触させることにより、限定はされないが炎症を含めた免疫応答を低下させ又は阻害することができる。B7-H4融合ポリペプチドと接触させるT細胞は、
/ 及び / T細胞受容体を含め、T細胞受容体を発現する任意の細胞であってよい。T細胞には、CD4及びCD8もまた発現するT細胞サブセットを含め、CD3を発現するあらゆる細胞が含まれる。T細胞には、ナイーブ細胞及び記憶細胞の両方並びにCTLなどのエフェクター細胞が含まれる。T細胞にはまた、Th1、Tc1、Th2、Tc2、Th3、Th17、Th22、Treg、及びTr1細胞などの調節細胞も含まれる。T細胞にはまた、NKT細胞及び同様のユニークなT細胞系統クラスも含まれる。例えば、本組成物を使用して、Th1、Th17、Th22、又は炎症分子、例えば、限定はされないが、IL-1、TNF-、TGF-、IFN-、IL-17、IL-6、IL-23、IL-22、IL-21、及びMMPを分泌する他の細胞、又は他の細胞によるその分泌を生じさせる他の細胞を調節することができる。また本組成物を使用して、Tregの活性を増加させ又は促進し、TregからのIL-10などのサイトカインの産生を増加させ、Tregの分化を増加させ、Tregの数を増加させ、又はTregの生存を増加させることもできる。

【0291】

開示されるB7-H4ポリペプチド、その断片又は融合物で治療することのできる他の免疫細胞としては、T細胞前駆体、樹状細胞及び単球若しくはそれらの前駆体などの抗原提示細胞、B細胞又はそれらの組み合わせが挙げられる。B細胞を有効量のB7-H4組成物と接触させて、B細胞による抗体産生を対照と比べて阻害し又は低下させることにより、B7-H4組成物を使用してB細胞による抗体の産生を調節することができる。B7-H4組成物はまた、B細胞によるサイトカインの産生も調節することができる。

【0292】

iv. B7-H4ポリペプチド、その断片、及び融合物の遺伝子デリバリー

B7-H4ポリペプチド、並びにその断片及び融合物又はB7-H4抗体をコードする核酸を、それを必要とする個体に有効な量で投与することにより、炎症反応、炎症性疾患/障害、又は自己免疫疾患/障害を治療することができる。DNAデリバリーには、典型的には、「外来性」DNAを細胞に、及び最終的には生きた動物に導入することが関わる。遺伝子デリバリーはウイルスベクター又は非ウイルスベクターを使用して実現することができる。遺伝子を対象に送達するための組成物及び方法は当該技術分野において公知である(Understanding Gene Therapy, Lemoine, N. R., ed., BIOS Scientific Publishers, Oxford, 2008を参照)。一つの手法としては、培養下の初代細胞に対する核酸移入と、続く個体に対するエキソビボ形質転換細胞の、全身的な、或いは特定の臓器又は組織への自家移植が挙げられる。

【0293】

核酸療法は、機能的に活性なDNAをインビボで哺乳類体細胞組織又は臓器に直接移入することにより達成し得る。DNA移入は、以下に記載する多くの手法を用いて達成する

ことができる。これらのシステムは、選択可能なマーカー（例えば、G418耐性）を使用してDNAを発現するトランスフェクトされたクローンを選択し、続いてB7-H4発現産物の存在を、適切なイムノアッセイでその産物に対する抗体を使用して（誘導性システムの場合には誘導物質で処理した後に）検出することにより、インビトロで発現の成功について試験することができる。この手順の効率、DNA取り込み、プラスミドの組み込み及び組み込まれたプラスミドの安定性を含め、公知の方法を用いたプラスミドDNAの線状化、及び高分子量哺乳類DNAを「担体」として使用するコトランスフェクションにより向上させることができる。

【0294】

レトロウイルスの介在によるヒト治療法は、アンホトロピックな(amphotropic)複製欠損レトロウイルス系を利用する(Weiss and Taylor, Cell, 82:531-533(1995))。かかるベクターを使用して機能性DNAがヒト細胞又は組織に導入されており、例えば、アデノシンデアミナーゼ遺伝子がリンパ球に、NPT-1I遺伝子及び腫瘍壊死因子遺伝子が腫瘍浸潤リンパ球に導入されている。レトロウイルスの介在による遺伝子デリバリーは、概して遺伝子移入のために標的細胞の増殖が必要である(Bordignon et al., Science 270:470-475(1995))。この条件は、本DNA分子を導入しようとするある種の好ましい標的細胞、即ち活発に成長する腫瘍細胞によって満たされる。多くの方法のうちいずれかを用いるプラスミドによる及びレトロウイルスベクターによるトランスフェクションを使用した囊胞性線維症の遺伝子療法が、Collins et al., 米国特許第5,240,846号明細書により記載されている。

10

20

【0295】

B7-H4ポリペプチド又は融合タンパク質をコードするDNA分子が、当該技術分野で周知されているとおり、複製欠損レトロウイルスを産生するパッケージング細胞株を使用してレトロウイルスベクターにパッケージングされ得る。遺伝子デリバリー用のさらなるウイルスは、Reynolds et al., Molecular Medicine Today, 5:25-31(1999)に記載される。

【0296】

他のウイルスベクターもまた、ニューロン特異的送達及び持続のための組換えアデノウイルス、単純ヘルペスウイルス(HSV)を含め、用いられ得る。ヒト遺伝子療法に対するアデノウイルスベクターの利点としては、組換えがまれであり、かかるウイルスに関連するヒト悪性腫瘍が知られておらず、アデノウイルスゲノムが二本鎖DNAであって、最大7.5kbのサイズの外来遺伝子を受け入れるように操作することができ、且つ生きているアデノウイルスが安全なヒトワクチン生命体であるという点が挙げられる。アデノ随伴ウイルスもまたヒト治療に有用である。

30

【0297】

開示されるDNA分子を発現し得るとともに、本治療状況下で、特にヒトにおいて有用な別のベクターは、非複製性にするのできるワクシニアウイルスである。

【0298】

ネイキッドDNA若しくはRNA、又はウイルスベクターに加え、操作された細菌をベクターとして使用してもよい。サルモネラ属(Salmonella)、BCG及びリステリア菌(Listeria monocytogenes:LM)を含む多くの細菌株が使用されている。これらの生物は、ワクチンベクターとしての使用に有望な以下の2つの特徴を示す:(1)腸内感染経路(経口ワクチン送達の可能性をもたらず);及び(2)単球/マクロファージの感染と、それによるプロフェッショナルAPCに対する抗原の標的化。

40

【0299】

インビボでのウイルスの媒介による遺伝子移入に加え、プラスミドDNAの投与及び微粒子ボンバードメントの媒介による遺伝子移入を含めた当該技術分野で周知の物理的手段をDNAの直接移入に使用することができる。さらに、インビトロで遺伝子を細胞に移入

50

させる周知の手段である電気穿孔を用いて、DNA分子をインピボで組織に移入することができる。

【0300】

「担体媒介性遺伝子移入」もまた記載されている。好ましい担体は、アシル化mAbを脂質二重層に取り込むことのできる免疫リボソームなどの標的化されたリボソーム(Liu et al. Curr Med Chem, 10:1307-1315 (2003))である。アジア糖タンパク質/ポリリジンなどのポリカチオンを使用してもよく、ここでコンジュゲートは、標的組織を認識する分子(例えば肝臓に対するアジアロオロソムコイド)と、トランスフェクトしようとするDNAに結合するDNA結合化合物とを含む。ポリリジンは、DNAに損傷を与えることなくDNAと結合するDNA結合分子の一例である。このコンジュゲートは、次に移入のためプラスミドDNAと複合体化される。

10

【0301】

トランスフェクション又はマイクロインジェクションに使用されるプラスミドDNAは、当該技術分野において周知の方法を用いて、例えば、Qiagen手順(Qiagen)と、続く公知の方法、例えば本明細書に例示する方法を用いたDNA精製を用いて調製されてもよい。

【0302】

b. 免疫抑制剤 - 非B7 - H4特異的

一部の実施形態では、免疫応答、又は炎症性/自己免疫性疾患/障害は、B7 - H4シグナル伝達経路に特異的でない免疫抑制剤を対象に投与することにより治療される。B7 - H4シグナル伝達経路に特異的でない免疫抑制剤は、単独で投与されても、又は上記に記載する抗体などの、B7 - H4シグナル伝達経路に特異的な免疫抑制剤と組み合わせて投与されてもよい。B7 - H4シグナル伝達経路に特異的でないかかる免疫抑制剤としては、限定はされないが、(例えば、他のリンパ球表面マーカー(例えば、CD40、 - 4インテグリン)に対する抗体又はサイトカインに対する抗体)、他の融合タンパク質(例えば、CTLA-4-Ig(Orencia(登録商標))、TNFR-Ig(Enbrel(登録商標)))、TNF-遮断薬、例えばエンブレル(Enbrel)、レミケード(Remicade)、シムジア(Cimzia)及びヒュミラ(Humira)、シクロホスファミド(CTX)(即ちEndoxan(登録商標)、Cytosoxan(登録商標)、Neosar(登録商標)、Procytosox(登録商標)、Revimmune(商標))、メトトレキサート(MTX)(即ちRheumatrex(登録商標))、Trexall(登録商標)、ベリムマブ(即ちBenlysta(登録商標))、又は他の免疫抑制薬(例えば、シクロスポリンA、FK506様化合物、ラパマイシン化合物、又はステロイド)、抗増殖薬、細胞傷害剤、又は免疫抑制を補助し得る他の化合物が挙げられる。

20

30

【0303】

一部の実施形態では、薬剤は、B7 - H4シグナル伝達経路と別の経路を通じたT細胞活性化を阻害し又は低下させる働きをする。一つのかかる実施形態において、治療剤は、CTLA-4融合タンパク質、例えばCTLA-4-Ig(アバタセプト)である。CTLA-4-Ig融合タンパク質は、抗原提示細胞上のCD80/CD86(B7-1/B7-2)との結合に関してT細胞上の共刺激受容体CD28と競合し、従ってT細胞活性化を阻害する働きをする。別の実施形態では、治療剤は、ベラタセプトとして知られるCTLA-4-Ig融合タンパク質である。ベラタセプトは、インピボでのCD86に対するそのアビディティを顕著に増加させる2つのアミノ酸置換(L104E及びA29Y)を含む。別の実施形態では、治療剤はMaxy-4である。

40

【0304】

別の実施形態では、治療剤はシクロホスファミド(CTX)である。シクロホスファミド(ENDOXAN(登録商標)、CYTOXAN(登録商標)、NEOSAR(登録商標)、PROCYTOX(登録商標)、REVIMMUNE(商標)の一般名)は、シトホスファンとしても知られ、オキサゾホリン(oxazophorine)類のナイトロ

50

ジェンマスタードアルキル化剤である。シクロホスファミドは各種の癌及び一部の自己免疫障害の治療に用いられる。シクロホスファミド（CTX）は、腎ループス患者において増殖性糸球体腎炎を拡散させるために使用される主要な薬物である。

【0305】

一部の実施形態では、治療剤は、それを必要とする患者において抗二本鎖DNA（抗ds DNA）自己抗体の血中又は血清レベルを低下させる及び/又はタンパク尿を低下させるのに有効な量で投与される。

【0306】

別の実施形態では、治療剤は血清中のアデノシンの量を増加させる（例えば、国際公開第08/147482号パンフレットを参照）。例えば、第2の治療剤は、CD73-Ig、組換えCD73、又はCD73の発現を増加させる別の薬剤（例えばサイトカイン又はモノクローナル抗体又は小分子）であってもよい（例えば国際公開第04/084933号パンフレットを参照）。別の実施形態では、治療剤はインターフェロンである。

10

【0307】

別の実施形態では、治療剤は、タイサブリ（Tysabri）又は別のMS治療薬である。別の実施形態では、第2の治療剤は慢性炎症を優先的に治療し、従って治療レジメンは急性炎症及び慢性炎症の両方を標的とする。好ましい実施形態では、第2の治療薬はTNF-遮断薬である。

【0308】

別の実施形態では、治療剤は、Th1、Th17、Th22、及び/又は炎症分子、例えば、限定はされないが、IL-1、TNF-、TGF-、IFN-、IL-17、IL-6、IL-23、IL-22、IL-21、及びMMPを分泌する他の細胞、又は他の細胞によるその分泌を生じさせる他の細胞による分化、増殖、活性、及び/又はサイトカイン産生及び/又は分泌を阻害し又は低下させる小分子である。別の実施形態では、治療剤は、Tregと相互作用する、Treg活性を増強する、TregによるIL-10分泌を促進又は増強する、Tregの数を増加させる、Tregの抑制能力を増加させる、又はそれらの組み合わせの小分子である。

20

【0309】

典型的には、有用な小分子は有機分子、好ましくは、分子量が100ダルトンより大きく且つ約2,500ダルトンより小さい、より好ましくは100~2000、より好ましくは約100~約1250、より好ましくは約100~約1000、より好ましくは約100~約750、より好ましくは約200~約500ダルトンの小型の有機化合物である。小分子は、タンパク質との構造上の相互作用、特に水素結合に必要な官能基を含み、典型的には少なくともアミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基又はカルボキシル基、好ましくはこれらの官能性化学基のうち少なくとも2つを含む。小分子は、多くの場合に、環状炭素又は複素環式構造及び/又は上記の官能基の1つ以上で置換された芳香族又は多環芳香族構造を含む。小分子にはまた、ペプチド、サッカリド、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体又はそれらの組み合わせを含む生体分子も含まれる。一実施形態では、小分子はレチノイン酸又はその誘導体である。例えば、レチノイン酸はTh17細胞の分化及び/又は活性を阻害し又は低下させることが示されている。

30

40

【0310】

一部の実施形態では、組成物はTreg活性又は産生を増加させる。例示的Treg増強剤としては、限定はされないが、グルココルチコイドフルチカゾン、サルメテロール（salmeterol）、抗体であって、IL-12、IFN-、及びIL-4に対する抗体；ビタミンD3、及びデキサメタゾン、及びそれらの組み合わせが挙げられる。

【0311】

一部の実施形態では、治療剤は抗体、例えば、IL-6、IL-23、IL-22又はIL-21などの炎症誘発性分子に対する機能遮断抗体である。

【0312】

本明細書で使用されるとき、用語「ラパマイシン化合物」は、中性三環式化合物ラパマ

50

イシン、ラパマイシン誘導体、ラパマイシン類似体、及びラパマイシンと同じ作用機序（例えばサイトカイン機能の阻害）を有すると考えられる他のマクロライド化合物を含む。語句「ラパマイシン化合物」は、その治療有効性が増強するように修飾された、ラパマイシンと構造的類似性を有する化合物、例えば同様の大きな環状構造を有する化合物を含む。例示的ラパマイシン化合物は当該技術分野において公知である（例えば国際公開第95122972号パンフレット、国際公開第95116691号パンフレット、国際公開第95104738号パンフレット、米国特許第6,015,809号明細書；同第5,989,591号明細書；米国特許第5,567,709号明細書；同第5,559,112号明細書；同第5,530,006号明細書；同第5,484,790号明細書；同第5,385,908号明細書；同第5,202,332号明細書；同第5,162,333号明細書；同第5,780,462号明細書；同第5,120,727号明細書を参照）。

10

【0313】

語句「FK506様化合物」は、FK506、並びにその治療有効性が増強するように修飾されたFK506誘導体及び類似体、例えば、FK506と構造的類似性を有する化合物、例えば同様の大きな環状構造を有する化合物を含む。FK506様化合物の例としては、例えば国際公開第00101385号パンフレットに記載されるものが挙げられる。好ましくは、語句「ラパマイシン化合物」は、本明細書で使用されるとき、FK506様化合物を含まない。

【0314】

c. 抗炎症薬

他の好適な治療剤としては、限定はされないが、抗炎症剤が挙げられる。抗炎症剤は、非ステロイド系、ステロイド系、又はそれらの組み合わせであってもよい。一実施形態は、約1% (w/w) ~ 約5% (w/w)、典型的には約2.5% (w/w)の抗炎症剤を含有する経口組成物を提供する。非ステロイド系抗炎症剤の代表例としては、限定なしに、オキシカム、例えば、ピロキシカム、イソキシカム、テノキシカム、スドキシカム；サリチル酸塩、例えば、アスピリン、ジサルシド、ベノリラート、トリリサート、サファプリン (safapryn)、ソルプリン、ジフルニサル、及びフェンドサル；酢酸誘導体、例えば、ジクロフェナク、フェンクロフェナク、インドメタシン、スリダク、トルメチン、イソキセパク、フロフェナク、チオピナク、ジドメタシン、アセマタシン (acematacin)、フェンチアザク、ゾメピラク、クリンダナク (clindanac)、オキセピナク、フェルピナク、及びケトロラク；フェナム酸、例えば、メフェナム酸、メクロフェナム酸、フルフェナム酸、ニフルミン酸、及びトルフェナム酸；プロピオン酸誘導体、例えば、イブプロフェン、ナプロキセン、ベノキサプロフェン、フルルビプロフェン、ケトプロフェン、フェノプロフェン、フェンブフェン、インドプロフェン (indopropfen)、ピルプロフェン、カルプロフェン、オキサプロジン、プラノプロフェン、ミロプロフェン、チオキサプロフェン (tioxaprofen)、スプロフェン、アルミノプロフェン、及びチアプロフェン酸；ピラゾール、例えば、フェニルブタゾン、オキシフェンブタゾン、フェブラゾン、アザプロバゾン、及びトリメタゾン (trimethazone) が挙げられる。これらの非ステロイド系抗炎症剤の混合物もまた用いられ得る。

20

30

40

【0315】

ステロイド系抗炎症薬の代表例としては、限定なしに、コルチコステロイド、例えば、ヒドロコルチゾン、ヒドロキシル-トリウムシノロン、-メチルデキサメタゾン、リン酸デキサメタゾン、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、吉草酸クロベタゾール、デソニド、デスオキシメタゾン、酢酸デスオキシコルチコステロン、デキサメタゾン、ジクロリゾン、二酢酸ジフロラゾン、吉草酸ジフルコルトロン、フルアドレノロン (fludrenolone)、フルクロロロンアセトニド、フルドロコルチゾン、ピバル酸フルメタゾン、フルオシノロンアセトニド (fluosinolone acetone)、フルオシノニド、フルコルチンブチルエステル (flucortine butylester)、フルオコルトロン、酢酸フルブレドニデン (フルブレドニリデン)、フルランドレ

50

ノロン、ハルシノニド、酢酸ヒドロコルチゾン、酪酸ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、トリアムシノロンアセトニド、コルチゾン、コルトドキソン、フルセトニド (flucetonide)、フルドロコルチゾン、二酢酸ジフルオロゾン (difluorosone diacetate)、フルアドレノロン (fluradrenolone)、フルドロコルチゾン、二酢酸ジフルロゾン (difluorosone diacetate)、フルアドレノロンアセトニド (fluradrenolone acetonide)、メドリゾン、アムシナフェル (amcinafel)、アムシナフィド (amcinafide)、ベタメタゾン及びそのエステル残部、クロロプレドニゾン、酢酸クロロプレドニゾン (chlorprednisone acetate)、クロコルテルロン (clocortelone)、クレスシノロン (clescincinolone)、ジクロリゾン、ジフルプレドナート (diflurprednate)、フルクロニド、フルニソリド、フルオロメタロン (fluoromethalone)、フルペロロン、フルプレドニゾロン、吉草酸ヒドロコルチゾン、シクロペンチルプロピオン酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルタメート、メプレドニゾン、パラメタゾン、プレドニゾロン、プレドニゾン、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、トリアムシノロン、及びこれらの混合物が挙げられる。

10

【0316】

2. 併用療法

本明細書に開示される治療剤は、単独で、又は互いに若しくは他の治療剤と組み合わせて投与することができる。一部の実施形態では、2つの治療剤は別個に、しかし同時に投与される。2つの治療剤はまた、同じ組成物の一部として投与されてもよい。他の実施形態では、2つの治療剤は別個に、且つ異なる時点で、しかし同じ治療レジームの一部として投与される。

20

【0317】

対象には、第1の治療剤を投与してから1、2、3、4、5、6時間後、若しくはそれ以上後、又は1、2、3、4、5、6、7日後、若しくはそれ以上後に第2の治療剤を投与してもよい。一部の実施形態では、対象には1つ以上の用量の第1の薬剤が1、2、3、4、5、6、7、14、21、28、35、又は48日おきに投与された後、第2の薬剤の初回投与が行われ得る。

【0318】

治療剤は、炎症性疾患/障害又は自己免疫性疾患/障害を治療する治療レジームの一部として投与されてもよい。例えば、第1の治療剤が対象に4日おきに投与される場合、第2の治療剤は1日目、2日目、3日目、又は4日目、又はそれらの組み合わせに投与されてもよい。第1の治療剤は治療レジーム (regiment) 全体を通じて繰り返し投与されてもよい。

30

【0319】

好ましい実施形態では、1つ以上のB7-H4特異的抗体が、膜貫通B7-H4を模倣するB7-H4-Ig融合タンパク質、例えば配列番号10と組み合わせて投与される。好ましくは、抗体は共投与されたB7-H4-Ig融合タンパク質に結合することなく細胞遊離B7-H4に特異的に結合し、又は膜貫通B7-H4の細胞外ドメインの切断を阻止する。

40

【0320】

同時治療の一例では、B7-H4-Ig及びCTXが有効量で共投与され、全身性エリテマトーデス (SLE) などの慢性自己免疫疾患/障害が予防又は治療される。別の実施形態では、第2の治療薬による投与頻度を減らすことを可能にしてPMLなどの副作用のリスクを低減し、且つ第2の治療薬に対する抵抗性を防ぐため、B7-H4-Igはタイサブリ (Tysabri) とサイクル投与されるか、又は休薬期間に使用される。

【0321】

3. 医薬組成物

本明細書に開示されるB7-H4ポリペプチド、断片、融合ポリペプチド、核酸、及び

50

ペプチドを含む医薬組成物が提供される。ペプチド又はポリペプチドを含有する医薬組成物は、非経口（筋肉内、腹腔内、静脈内（IV）又は皮下注射）、経皮（受動的に、或いはイオントフォレシス若しくは電気穿孔を使用）、又は経粘膜（鼻内、腔内、直腸内、又は舌下）の投与経路によるか又は生体内侵食性インサートを使用して投与されてもよく、各投与経路に適切な剤形に製剤化され得る。

【0322】

一部のインビボ手法では、本明細書に開示される組成物は治療有効量で対象に投与される。本明細書で使用されるとき、用語「有効量」又は「治療有効量」は、治療する障害の1つ以上の症状を治療、阻害、若しくは軽減し又は他の形で所望の薬理的及び/又は生理学的効果を提供するのに十分な投薬量を意味する。正確な投薬量は、対象に依存する変数（例えば、年齢、免疫系の健康等）、疾患、及び達成される治療など、様々な要因に応じて異なり得る。

10

【0323】

本明細書に開示されるポリペプチド組成物及びそれをコードする核酸については、さらなる研究が行われるに伴い、様々な患者における様々な病態の治療に適切な投薬量レベルに関する情報が出てくることになり、当業者は、治療のコンテキスト、被投与者の年齢、及び全般的な健康を考慮して適切な投薬を確かめることができるであろう。選択される投薬量は、所望の治療効果、投与経路、及び所望の治療期間に依存する。ポリペプチド組成物については、概して1日0.001~20mg/kg体重の投薬量レベルが哺乳動物に投与される。概して、静脈内注射又は注入では投薬量はより低くなり得る。

20

【0324】

特定の実施形態において、ポリペプチド組成物は、例えば治療する部位に直接注射することによって局所投与される。典型的には（Typically）、注射はポリペプチド組成物の局所濃度の増加を生じさせ、これは全身投与により実現し得るより高い。例えば、多発性硬化症などの神経障害の場合、タンパク質はCNS近傍の部位に局所投与され得る。ポリペプチド組成物を上記に記載したとおりマトリックスと組み合わせることで、治療する部位から出ていくポリペプチドの受動拡散を低下させてポリペプチド組成物の局所濃度の増加を生じさせることを補助し得る。

【0325】

a. 非経口投与用製剤

好ましい実施形態では、本明細書に開示される組成物は、ペプチド及びポリペプチドを含有するものを含め、水溶液中において非経口注射により投与される。製剤はまた、懸濁液又はエマルションの形態であってもよい。概して、有効量のペプチド又はポリペプチドを含む医薬組成物が提供され、場合により薬学的に許容可能な希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント及び/又は担体を含む。かかる組成物は、場合により以下に関して1つ以上を含む：希釈剤、滅菌水、様々な緩衝含有分（例えば、トリス-HCl、酢酸塩、リン酸塩）、pH及びイオン強度の緩衝生理食塩水；及び添加剤、例えば、界面活性剤及び可溶化剤（例えば、ツイーン20（TWEEN 20）（ポリソルベート20）、ツイーン80（TWEEN 80）（ポリソルベート80））、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム）、及び保存剤（例えば、チメロサル（Thimersol）、ベンジルアルコール）及び増量物質（例えば、ラクトース、マンニトール）。非水性溶媒又は媒体の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油及びトウモロコシ油、ゼラチン、及び注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。製剤は凍結乾燥され、使用直前に再溶解/再懸濁されてもよい。製剤は、例えば、細菌保持フィルタでのろ過、組成物への滅菌剤の組み込み、組成物の照射、又は組成物の加熱により滅菌されてもよい。

30

40

【0326】

b. 局所投与用製剤

本明細書に開示される融合タンパク質は局所適用することができる。多くのペプチド製剤で局所投与は上手く機能しないが、それが特に肺、鼻、口（舌下、頬側）、腔、又は直

50

腸粘膜に適用される場合には有効となり得る。

【0327】

組成物は、約5ミクロン未満の空気動学的直径を有するエアロゾル或いは噴霧乾燥粒子として送達されるとき、吸入する間に肺に送達され、肺上皮内層を横切って血流に至り得る。

【0328】

限定はされないが、ネブライザー、定量噴霧式吸入器、及び粉末吸入器を含め、治療生成物の肺送達用に設計された幅広い機械的装置を使用することができ、それらは全て、当業者が熟知している。市販の装置のいくつかの具体的な例は、Ultraventネブライザー (Mallinckrodt Inc., St. Louis, Mo.); Acorne IIネブライザー (Marquest Medical Products, Englewood, Colo.); Ventolin定量噴霧式吸入器 (Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.); 及びSpinhaler粉末吸入器 (Fisons Corp., Bedford, Mass.)である。Nektar、Alkermes及びMannkindは、いずれも承認済み又は臨床試験中の吸入可能インスリン粉末製剤を有し、その技術は本明細書に記載される製剤に適用することができる。

10

【0329】

粘膜への投与用製剤は、典型的には噴霧乾燥薬物粒子であり、これは錠剤、ゲル、カプセル、懸濁液又はエマルジョンに組み込まれ得る。標準的な医薬賦形剤は任意の製剤化業者から入手可能である。経口製剤は、チューインガム、ゲルストリップ、錠剤又はロゼンジの形態であってもよい。

20

【0330】

経皮製剤もまた調製され得る。これらは典型的には軟膏、ローション、スプレー、又はパッチであり、いずれも標準的な技術を用いて調製することができる。経皮製剤は浸透促進剤を含めることが必要となり得る。

【0331】

c. 制御送達ポリマーマトリックス

本明細書に開示される融合タンパク質はまた、制御放出製剤で投与されてもよい。制御放出ポリマー装置は、ポリマー装置の植え込み後 (ロッド、シリンダ、フィルム、ディスク) 又は注射後 (マイクロパーティクル) に全身的に長期放出されるように作製することができる。マトリックスはマイクロスフェアなどのマイクロパーティクルの形態であってもよく、ここではペプチドが固体ポリマーマトリックス又はマイクロカプセルの中に分散しており、ここでコアはポリマーシェルと異なる材料であり、液体又は固体の性質であってもよいコアにペプチドが分散又は懸濁されている。本明細書で特に定義しない限り、マイクロパーティクル、マイクロスフェア、及びマイクロカプセルは同義的に使用される。或いは、ポリマーは、数ナノメートル乃至4センチメートルの範囲の薄スラブ又は薄膜か、粉碎又は他の標準的な技法によって作製される粉末か、又はさらにはハイドロゲルなどのゲルとしてキャストされてもよい。

30

【0332】

融合ポリペプチド又は融合ポリペプチドをコードする核酸の送達には非生分解性又は生分解性のいずれのマトリックスも使用することができ、しかし生分解性マトリックスが好ましい。これらは天然ポリマーであっても、又は合成ポリマーであってもよいが、分解の特性及び放出プロファイルがより良好であるため、合成高分子が好ましい。ポリマーは、所望の放出期間に基づき選択される。ある場合には線形的な放出が最も有用であり得るが、他の場合にはパルス放出又は「バルク放出」がより効果的な結果をもたらし得る。ポリマーはハイドロゲルの形態 (典型的には水の重量基準で最大約90%まで吸収する) であってもよく、場合により多価イオン又はポリマーと架橋されてもよい。

40

【0333】

マトリックスは、溶媒蒸発、噴霧乾燥、溶媒抽出及び当業者に公知の他の方法によって

50

形成することができる。生体内侵食性マイクロスフェアは、例えば、Mathiowitz and Langer, J. Controlled Release, 5: 13 - 22 (1987); Mathiowitz, et al., Reactive Polymers, 6: 275 - 283 (1987); 及び Mathiowitz, et al., J. Appl. Polymer Sci., 35: 755 - 774 (1988) によって記載されるとおり、薬物デリバリー用のマイクロスフェアを作製するために開発された方法のいずれかを用いて調製することができる。

【0334】

これらの装置は、植え込まれた又は注射された範囲を治療するための局所放出用 - これは典型的には全身治療の投薬量よりはるかに少ない投薬量を送達し得る - 又は全身送達用に製剤化することができる。これらの装置は、筋肉、脂肪に植え込まれるか若しくは皮下注射されてもよく、又は嚥下されてもよい。

10

【0335】

C. 治療する対象の選択方法

一部の実施形態では、上記に開示する膜貫通 B7 - H4、細胞遊離 B7 - H4 を検出する方法、細胞遊離 B7 - H4 を B7 - H4 融合タンパク質と区別する方法、又は診断する方法が、検出又は診断される疾患 / 障害を治療する方法と組み合わせられる。従って、一部の実施形態では、本開示の方法は、対象を治療する1つ以上のさらなるステップを含む。例えば、一部の実施形態では、本方法は、有効量の治療剤を対象に投与することにより、検出又は診断される疾患 / 障害の1つ以上の症状を軽減することを含む。

20

【0336】

また、治療する対象の選択方法も開示される。例えば、一部の実施形態では、対象は、対照と比較した、生体試料中における細胞遊離 B7 - H4 の発現増加の検出、又は癌細胞上での又はそれからの膜貫通若しくは細胞遊離 B7 - H4 の発現若しくは発現増加に基づき治療から選択される。治療対象の選択方法は、上記で考察する検出又は診断方法の1つ以上を、治療する対象を選択すること、及び場合により対象に治療を投与することと組み合わせ含み得る。

【0337】

V. 治療有効性の判定方法

生体試料中における細胞遊離 B7 - H4 タンパク質レベルの検出は、免疫媒介性又は炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害又は癌を有する患者の治療に使用される薬物若しくは化合物又は手順の有効性をモニタするのに有用であり得る。例えば、免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌に対する治療の治療有効性は、治療の経過にわたる個体の生体試料中の細胞遊離 B7 - H4 レベルを定量化することにより評価し得る。個体からの生体試料中に存在する細胞遊離 B7 - H4 のレベルは、治療前と、続いて治療中に様々な時間間隔で決定することができる。治療を受けている個体の生体試料中に存在する細胞遊離 B7 - H4 のレベルを、治療前の、又は治療の経過における異なる時点での同じ個体からの生体試料中に存在する細胞遊離 B7 - H4 のレベルと比較することにより、免疫応答又は病態、炎症性又は自己免疫性疾患 / 障害を低下させ又は阻害すること、又は癌の1つ以上の症状を治療することにおける治療の有効性を判定し得る。それに加えて又は代えて、治療を受けている個体の生体試料中の細胞遊離 B7 - H4 レベルは、免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌の種々の病期の指標となる細胞遊離 B7 - H4 の量と比較することができる。

30

40

【0338】

例えば、対象における免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患 / 障害、又は癌に対する治療の有効性を判定する方法は、治療前又は治療の経過中に対象から得た1つ以上の生体試料から細胞遊離 B7 - H4 レベルを決定するステップを含んでもよく、ここでは対象から得た試料中の細胞遊離 B7 - H4 レベルの経時的な減少が、その治療が有効であることの指標となる。

【0339】

50

対象における免疫応答若しくは病態、炎症性若しくは自己免疫性疾患/障害、又は癌に対する治療の有効性を判定する方法はまた、第1の生体試料及び第1の試料より後に採取した第2の生体試料の細胞遊離B7-H4レベルを決定するステップを含んでもよく、ここでは治療の経過にわたり対象から試料が得られ、及び第1の試料と比較した第2の試料における細胞遊離B7-H4レベルの減少が、その治療が有効であることの指標となる。

【実施例】

【0340】

実施例1：一連の抗B7-H4抗体は様々な結合特性を呈する

材料及び方法

一連の抗B7-H4モノクローナル抗体を調製し(2H9、hB7-H4.m1、2D1、6H3、8E11)又は購入した(H74、HMH4-5G1)。

【0341】

一連のB7-H4-Ig融合タンパク質を、以下の配列で調製した：変異体1(配列番号29)、変異体2(配列番号31)、変異体3(配列番号33)、変異体4(配列番号35)、変異体5(配列番号37)、及び変異体6(配列番号39)。

【0342】

単離したB7-H4-Ig融合タンパク質をマイクロタイタープレート上にコーティングし、漸増濃度のビオチン化抗B7-H4抗体を使用するELISAアッセイの基質として使用し、続いてストレプトアビジン-HRP二次抗体とインキュベートし、吸光度450nmで酵素を検出した。

【0343】

結果

ELISA及びウエスタンブロットアッセイを実施して、様々なB7-H4-Ig融合タンパク質に対する一連の抗B7-H4モノクローナル抗体の結合特性を特徴付けた。

【0344】

代表的な結果を図1A~図1Gに示し、及び以下の表2に提供する。「+」は融合タンパク質に結合した抗体を示し、一方、「-」は、抗体が融合タンパク質との結合をほとんど又は全く呈しなかったことを示す。

【0345】

図2は、一連の抗体に対するエピトープの推定位置を示す。

【0346】

10

20

30

【表 4】

表2

	配列 番号 10	配列 番号 35	配列 番号 39	配列 番号 19	配列 番号 25	配列 番号 29、30、31			配列 番号 39
2H9	+	+	+	+	+	+	+	+	-
hB7- H4.m1	-	+	+	+	+	+	+	+	-
2D1	+	+	+	+	+	-	-	-	+
6H3	+	+	+	+	+	-	-	-	+
8E11	-	+	+	-	-	-	-	-	+
H74	+	+	+	+	+	-	-	-	+
HMH4- 5G1	-	+	-	-	+	-	-	-	-

10

20

30

40

50

【0347】

実施例 2：2H9 及び 6H3 又は hB7-H4.m1 は、マウス及びヒト細胞遊離 B7-H4 の捕捉及び検出に有効である

材料及び方法

B7-H4-細胞遊離 B7-H4 マウス又はヒト融合タンパク質

抗体 2H9 又は 2H9 の F(ab')₂ 断片 (捕捉)；6H3 又は hB7-H4.m1 又は HMH4-5G1 (検出)

【0348】

結果

一連の ELISA アッセイを用いて、2H9 及び 6H3 又は hB7-H4.m1 が細胞遊離 B7-H4 を捕捉及び検出する能力を特徴付けた。結果を図 3、図 4、図 5 及び図 6 に示す。

【0349】

図 3 は、2H9 / 6H3 による細胞遊離 B7-H4 の捕捉 / 検出の濃度依存的な増加を示す。

【0350】

図 4 は、抗体の組み合わせが、マウス及びヒト細胞遊離 B7-H4 の捕捉 / 検出における使用に有効であることを示す。

【0351】

図 5 は、細胞遊離 B7-H4 の検出に使用した 3 つの抗体捕捉 / 検出の組み合わせ：2H9 / 6H3、2H9 / hB7-H4.m1、及び 2H9 / HMH4-5G1 による 3 つ

の E L I S A 法が、直線的な相関を示すことを示す。

【 0 3 5 2 】

図 6 は、2 H 9 の F (a b) ' 2 断片 (捕捉) 及び 6 H 3 又は h B 7 - H 4 . m 1 (検出) による細胞遊離 B 7 - H 4 の捕捉 / 検出の濃度依存的な増加を示す。

【 0 3 5 3 】

実施例 3 : 血清レベル細胞遊離 B 7 - H 4 の計測は、炎症性 / 自己免疫性障害の診断指標である

材料及び方法

健常個体 (H D) 及び関節リウマチ (R A) 、全身性エリテマトーデス (S L E) 、シェーグレン症候群及び腎癌 / 卵巣癌 / 乳癌 / 肺癌と診断された個体から血清試料を得て、2 H 9 F (a b ') 2 / h B 7 - H 4 . m 1 を使用した E L I S A 捕捉 / 検出アッセイに供した (図 7 、 図 8 及び 図 9) 。

【 0 3 5 4 】

結果

結果を図 7 ~ 図 9 及び以下の表 3 に提供する。

【 0 3 5 5 】

【 表 5 】

表 3 - 図 7 の細胞遊離 B7-H4 レベル

	<1ng/ml	>1ng/ml
RA	32/46(70%)	14/46(30%)
HD	26/26(100%)	0/26(0%)
SS	19/25(79%)	6/25(24%)

【 0 3 5 6 】

表 3 は、全個体における < 1 n g / m L 及び > 1 n g / m L が計測された各疾患集団 (又は対照) の比を示す。

【 0 3 5 7 】

図 7 及び表 3 の結果は、R A 及びシェーグレン症候群患者では、健常ドナーと比較して細胞遊離 B 7 - H 4 の有意な上昇があることを示している。1 n g / m l を上回る B 7 - H 4 の細胞遊離レベルはヒトにおける疾患及び重症度と相関し、R A 及び S L E のマウスモデルで疾患の増悪の発症閾値である；細胞遊離 B 7 - H 4 を使用して疾患を診断し、治療する患者を選択し、及び治療の進行をモニタすることができる。

【 0 3 5 8 】

図 8 の結果は、一連の S L E 治療患者における経時的な血清中細胞遊離 B 7 - H 4 レベルの縦断的研究を示している。細胞遊離 B 7 - H 4 濃度は治療に伴い変化し、それを利用して疾患重症度の変化の指標とし、治療の進行をモニタすることができる。

【 0 3 5 9 】

図 9 に示す結果は、5 ~ 2 5 % の癌患者 (卵巣癌 / 乳癌 / 腎癌 / 肺癌) に細胞遊離 B 7 - H 4 の上昇があることを示している。腫瘍関連 B 7 - H 4 は予後不良と関連付けられ、抗腫瘍免疫応答の抑制に関係している。癌患者血清中の細胞遊離 B 7 - H 4 を使用して疾患を診断し、治療する患者を選択し、及び治療の進行をモニタすることができる。

【 0 3 6 0 】

実施例 4 : 判別的 E L I S A アッセイの使用による治療的 B 7 - H 4 - I g 融合タンパク質の治療時における細胞遊離 B 7 - H 4 のモニタリング

材料及び方法

種々の抗体クローンが細胞遊離 B 7 - H 4 及び B 7 - H 4 - I g に結合する能力を、直接結合 E L I S A によって評価した (図 1 0 を参照のこと) 。捕捉 / 検出の組み合わせ：2 H 9 / 6 H 3 、 2 H 9 / H M H 4 - 5 G 1 及び 2 H 9 / h B 7 - H 4 . m 1 を含め、種

10

20

30

40

50

々のサンドイッチELISA法が細胞遊離B7-H4及びB7-H4-Ig融合タンパク質を検出する能力を評価した(図11を参照のこと)。

【0361】

結果

図10及び図11に提供する結果は、2H9/HMH4-5G1及び2H9/hB7-H4.m1対が細胞遊離B7-H4を検出することができたが、B7-H4-Igは検出できなかったことを示している。従って、2H9/HMH4-5G1及び2H9/hB7-H4.m1対を利用して、自己免疫疾患患者におけるB7-H4-Ig治療中の細胞遊離B7-H4レベルをモニタすることができる。

【0362】

実施例5：血清中細胞遊離B7-H4(sH4)レベルは関節リウマチ疾患重症度と関連する

材料及び方法

健常個体(HD)並びに関節リウマチ(RA)及びシェーグレン症候群と診断された個体から血清試料を得た。血清試料を、2H9-F(ab')₂/hB7-H4.m1を使用したELISA捕捉/検出アッセイに供した(図7)。

【0363】

結果

DAS-28は、関節リウマチ(RA)患者の疾患活動性を測る合成指標であり、(1)腫脹している及び/又は圧痛のある手、手首、肘、肩、及び膝の関節数；(2)炎症の程度を計測する赤血球沈降速度(ESR)又は血中C反応性タンパク質(CRP)；(3)当日の患者の具合を0(とても良い)から10(とても悪い)で評価する患者のビジュアルアナログスコア(簡易スケール)に基づく。これらの結果を合わせることでDAS28スコアが作成され、これは疾患活動性の程度と関連する：

- ・ < 2.6 : 疾患寛解
- ・ 2.6 ~ 3.2 : 低い疾患活動性
- ・ 3.2 ~ 5.1 : 中程度の疾患活動性
- ・ > 5.1 : 高い疾患活動性

(Fransen, et al., Clin Exp Rheumatol, 23 (Suppl. 39) : S93-S99 (2005))。

【0364】

関節リウマチ(rheumatoid arthritis)患者から48例の臨床血清試料を得て、即日臨床評価及びDAS-28スコアに供した。結果を以下の表4に提供する。3例の最も高い細胞遊離B7-H4(sH4)試料が3つの最も高いDAS-28スコアも有した。5例の中程度の試料が境界域陽性であった。

【0365】

【表6】

表4: 48例の臨床試料における血清中細胞遊離B7-H4(sH4)レベル

現在 (DAS 28)		sH4>1ng/ml
≤ 3.2	活動性なし	12例中0例
> 3.2 且つ ≤ 6.0	中程度	29例中5例
> 6.0	極めて高い活動性	7例中3例

【0366】

実施例6：細胞遊離B7-H4血清レベルは多発性硬化症(MS)の疾患検出と関連する材料及び方法

多発性硬化症(MS)と診断された健常個体から得た血清試料を、2H9-F(ab')

10

20

30

40

50

) 2 / h B 7 - H 4 . m 1 を使用した E L I S A 捕捉 / 検出アッセイに供した (表 5 及び表 6 を参照) 。

【 0 3 6 7 】

結果

多発性硬化症の臨床評価を受けている 5 8 人の患者から得られた血清試料を、テキサス大学サウスウェスタン (U T - S o u t h w e s t e r n) から入手した。血清試料中の細胞遊離 B 7 - H 4 レベル (s H 4) を、捕捉抗体として 2 H 9 F (a b) ' 2 及び検出抗体として 6 H 3 を使用した E L I S A アッセイにより決定した。細胞遊離 B 7 - H 4 と疾患検出及び重症度との間の相関を、以下の表 5 及び表 6 に提供する。

【 0 3 6 8 】

【 表 7 】

10

表5: 58例の臨床試料における疾患検出と細胞遊離B7-H4 (sH4)レベルとの相関

疾患状態		sH4>1ng/ml
新規診断	活動性	19例中4例
新規発病	活動性	18例中3例
寛解	非活動性	21例中1例

20

【 0 3 6 9 】

【 表 8 】

表6: 8例の臨床試料における細胞遊離B7-H4 (sH4)レベル

ID	sH4 ng/ml
0907M01E**	20.4
0910M01E***	202.1
0958M01E**	53.7
0851Z01E*	94.0
0837M01E**	47.1
1035M01E**	111.6
0503P01E*	34.6
0550M01E*	1481.5

30

40

【 図 1 A - 1 G 】

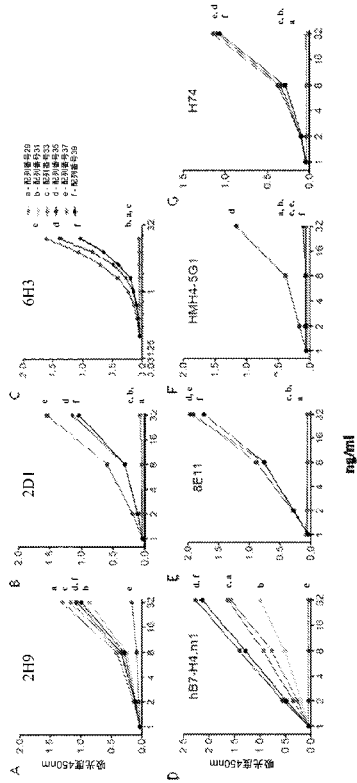
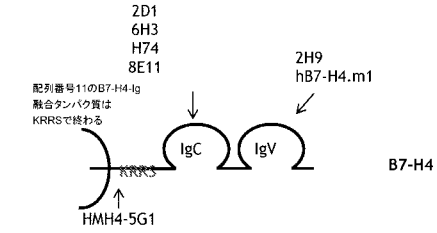


図 1A-G

【 図 2 】



1. IgV-IgC B7-H4: 捕捉2H9; 検出6H3
2. 完全ECD sB7-H4: 捕捉2H9; 検出HMH4-5G1
3. IgVのみのB7-H4: 捕捉2H9; 検出hB7-H4.m1

図 2

【 図 3 】

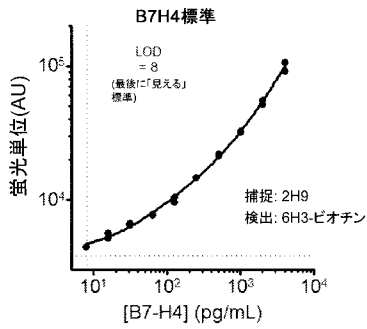


図 3

【 図 5 A - 5 B 】

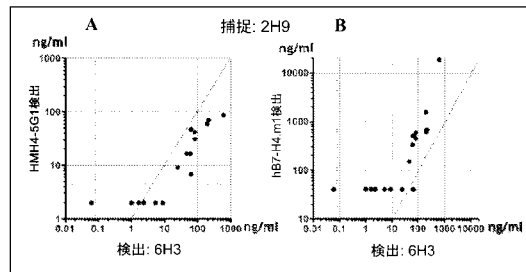


図5A及び5B

【 図 4 】

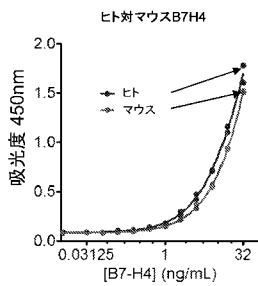


図 4

【 図 6 】

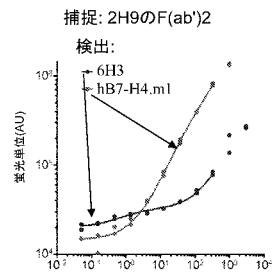


図 6

【 図 7 】

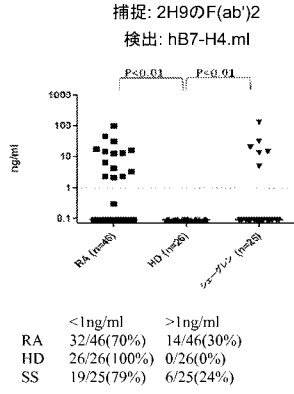


図 7

【 図 9 】

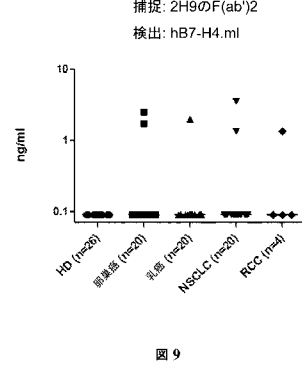


図 9

【 図 8 】

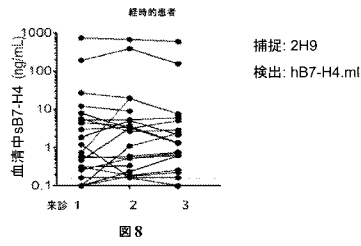


図 8

【 図 10 A - 10 F 】

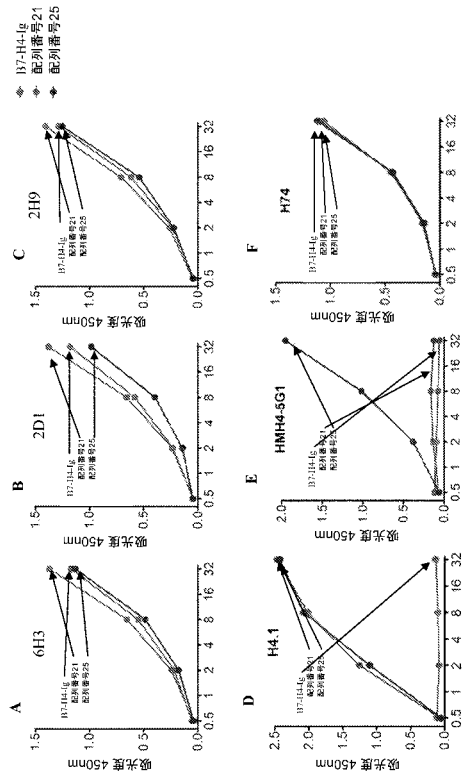


図 10A-F

【 図 11 A - 11 C 】

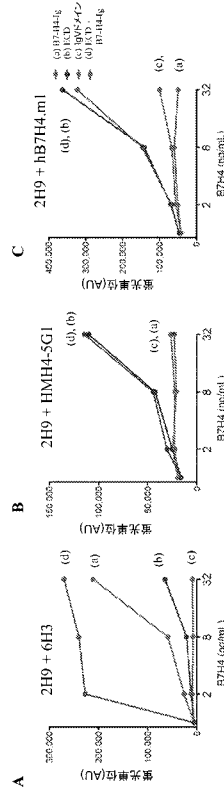


図 11A-C

【配列表】

2016505843000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/076619

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/011444 A1 (CHEN LIEPING [US]) 8 January 2009 (2009-01-08) claims 1-2; example; par. 32-33; SEQ. 1-4 -----	1-40
A	US 2008/160036 A1 (CHEN LIEPING [US]) 3 July 2008 (2008-07-03) claims 1-3, 16, examples 5, 9-10, par. 191 -----	1-40
A	WO 2011/026122 A2 (AMPLIMMUNE INC [US]; LANGERMANN SOLOMON [US]; LIU LINDA [US]; PODOJIL) 3 March 2011 (2011-03-03) examples; claims 1-6 -----	1-40
X,P	WO 2013/025779 A1 (AMPLIMMUNE INC [US]; LIU LINDA [US]; MARSHALL SHANNON [US]; LANGERMANN) 21 February 2013 (2013-02-21) par 197-200; SEQ 38, 40; claims 9,11,16 ----- -/--	1-40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 July 2014		06/08/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hohwy, Morten

6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/076619

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/041783 A1 (TAKAYAMA HIROSHI [JP] ET AL) 12 February 2009 (2009-02-12) SEQ 114 -----	1-40
A	WO 2012/145493 A1 (AMPLIMUNE INC [US]; LANGERMANN SOLOMON [US]; LIU LINDA [US]; MARSHALL) 26 October 2012 (2012-10-26) Table 22; Figs 1-2 -----	1-40
A	WO 2006/074418 A2 (DIADEXUS INC [US]; PAPKOFF JACKIE [US]; SHROYER KENNETH R [US]) 13 July 2006 (2006-07-13) p. 27; claim 1 -----	1-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/US2013/076619**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-40(partially)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ US2013/ 076619

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-40(partially)

A method for measuring the level of a B7-H4 polypeptide in a biological sample and the use of said measurement for diagnosis and monitoring of immune/inflammatory diseases, wherein said methods comprise the use of an anti-B7-H4 antibody, wherein said antibody is 2H9.

2. claims: 1-40(partially)

A method for measuring the level of a B7-H4 polypeptide in a biological sample and the use of said measurement for diagnosis and monitoring of immune/inflammatory diseases, wherein said methods comprise the use of an anti-B7-H4 antibody, wherein said antibody is hB7-H4.m1.

3. claims: 1-40(partially)

A method for measuring the level of a B7-H4 polypeptide in a biological sample and the use of said measurement for diagnosis and monitoring of immune/inflammatory diseases, wherein said methods comprise the use of an anti-B7-H4 antibody, wherein said antibody is 2D1.

4. claims: 1-40(partially)

A method for measuring the level of a B7-H4 polypeptide in a biological sample and the use of said measurement for diagnosis and monitoring of immune/inflammatory diseases, wherein said methods comprise the use of an anti-B7-H4 antibody, wherein said antibody is 6H3.

5. claims: 1-40(partially)

A method for measuring the level of a B7-H4 polypeptide in a biological sample and the use of said measurement for diagnosis and monitoring of immune/inflammatory diseases, wherein said methods comprise the use of an anti-B7-H4 antibody, wherein said antibody is 8E11.

6. claims: 1-40(partially)

A method for measuring the level of a B7-H4 polypeptide in a biological sample and the use of said measurement for diagnosis and monitoring of immune/inflammatory diseases, wherein said methods comprise the use of an anti-B7-H4 antibody, wherein said antibody is H74.

International Application No. PCT/ US2013/ 076619

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. claims: 1-40(partially)

A method for measuring the level of a B7-H4 polypeptide in a biological sample and the use of said measurement for diagnosis and monitoring of immune/inflammatory diseases, wherein said methods comprise the use of an anti-B7-H4 antibody, wherein said antibody is HMH4-5G1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/076619

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009011444	A1	08-01-2009	US 2009011444 A1 08-01-2009 US 2012039883 A1 16-02-2012
US 2008160036	A1	03-07-2008	AU 2007339762 A1 10-07-2008 AU 2007339773 A1 10-07-2008 CA 2673659 A1 10-07-2008 CA 2673752 A1 10-07-2008 EP 2109455 A2 21-10-2009 EP 2124998 A2 02-12-2009 EP 2586458 A1 01-05-2013 JP 5481199 B2 23-04-2014 JP 2010530354 A 09-09-2010 JP 2011502954 A 27-01-2011 JP 2013155199 A 15-08-2013 US 2008160036 A1 03-07-2008 US 2008206235 A1 28-08-2008 US 2011171207 A1 14-07-2011 US 2011195073 A1 11-08-2011 WO 2008083228 A2 10-07-2008 WO 2008083239 A2 10-07-2008
WO 2011026122	A2	03-03-2011	AU 2010286351 A1 15-03-2012 AU 2010286361 A1 15-03-2012 CA 2772199 A1 03-03-2011 CA 2772204 A1 03-03-2011 CN 102666581 A 12-09-2012 CN 102741279 A 17-10-2012 EP 2473521 A2 11-07-2012 EP 2473523 A2 11-07-2012 JP 2013503204 A 31-01-2013 JP 2013503205 A 31-01-2013 US 2012177645 A1 12-07-2012 US 2012276095 A1 01-11-2012 WO 2011026122 A2 03-03-2011 WO 2011026132 A2 03-03-2011
WO 2013025779	A1	21-02-2013	AU 2012296613 A1 27-02-2014 CA 2845536 A1 21-02-2013 EP 2756094 A1 23-07-2014 WO 2013025779 A1 21-02-2013
US 2009041783	A1	12-02-2009	CN 101253264 A 27-08-2008 CN 102875679 A 16-01-2013 EP 2363416 A2 07-09-2011 JP 4185555 B2 26-11-2008 US 2009041783 A1 12-02-2009 US 2009092612 A1 09-04-2009 US 2011217318 A1 08-09-2011 US 2013095120 A1 18-04-2013 US 2014044723 A1 13-02-2014 WO 2006117910 A1 09-11-2006
WO 2012145493	A1	26-10-2012	AU 2012245477 A1 31-10-2013 CA 2833636 A1 26-10-2012 CN 103608040 A 26-02-2014 EP 2699264 A1 26-02-2014 KR 20140048121 A 23-04-2014 US 2014044738 A1 13-02-2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/076619

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2012145493 A1	26-10-2012
-----		-----	-----
WO 2006074418 A2	13-07-2006	AT 462726 T	15-04-2010
		DK 1841793 T3	19-07-2010
		EP 1841793 A2	10-10-2007
		EP 2230517 A1	22-09-2010
		ES 2343746 T3	09-08-2010
		JP 2008526883 A	24-07-2008
		US 2008199461 A1	21-08-2008
		WO 2006074418 A2	13-07-2006
		-----	-----

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	17/14 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	5/38 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	17/14	
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P	5/38	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	7/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	27/16	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	1/14 (2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	5/14 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/14	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	19/04 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/04	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	19/08	
A 6 1 P	9/08 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	A 6 1 P	9/08	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	A 6 1 P	27/02	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	Z N A
		C 1 2 N	15/00	A
		C 0 7 K	19/00	
		C 0 7 K	14/47	

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ランゲーマン, ソロモン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 1 5, ボルチモア, クロス カントリー プールバ

ード 6606

(72)発明者 ヤオ, シェン
アメリカ合衆国 メリーランド 21004, コロンビア, プライス オーバールック コー
ト 11748

(72)発明者 オーバーストリート, マイケル グレン
アメリカ合衆国 メリーランド 21032, クラウンズビル, ブリュースター ゲート ロ
ード 1500

(72)発明者 リウ, リンダ
アメリカ合衆国 メリーランド 21029, クラークスビル, ティペラリー コート 65
12

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS03
QS36 QX01

4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 NA14 ZA011 ZA331
ZA341 ZA361 ZA391 ZA511 ZA531 ZA551 ZA681 ZA691 ZA751 ZA811
ZA891 ZA921 ZA941 ZA961 ZB071 ZB081 ZB111 ZB151 ZB211 ZB261
ZC061 ZC081 ZC351

4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 BA41 CA40 DA75 EA20 EA50

专利名称(译)	B7-H4特异性抗体，其组成和使用方法		
公开(公告)号	JP2016505843A	公开(公告)日	2016-02-25
申请号	JP2015549721	申请日	2013-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	放大器Rimyu下来公司		
申请(专利权)人(译)	放大器Rimyu下来，公司		
[标]发明人	ランゲーマンソロモン ヤオシエン オーバーストリートマイケルグレン リウリンダ		
发明人	ランゲーマン, ソロモン ヤオ, シエン オーバーストリート, マイケル グレン リウ, リンダ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P29/00 A61K38/00 A61P19/02 A61P17/14 A61P5/38 A61P7/06 A61P1/16 A61P27/16 A61P43/00 A61P7/04 A61P17/00 A61P9/00 A61P1/14 A61P1/04 A61P5/14 A61P25/00 A61P13/12 A61P3/10 A61P19/04 A61P21/04 A61P19/08 A61P21/00 A61P7/00 A61P17/06 A61P9/08 A61P35/00 A61P27/02 C07K16/18 C12N15/09 C07K19/00 C07K14/47		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/08 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 C07K16/2827 C07K16/3069 C07K2317/24 C07K2317/30 C07K2317/34 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/76 C07K2317/77 C07K2317/92 G01N33/574 C07K16/30 C07K2317/31 C07K2317/56		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N33/53.U G01N33/543.545.D C12Q1/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P29/00 A61K37/02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P17/14 A61P5/38 A61P7/06 A61P1/16 A61P27/16 A61P43/00.105 A61P7/04 A61P17/00 A61P9/00 A61P1/14 A61P1/04 A61P5/14 A61P25/00 A61P13/12 A61P3/10 A61P19/04 A61P21/04 A61P19/08 A61P21/00 A61P7/00 A61P17/06 A61P9/08 A61P35/00 A61P27/02 C07K16/18.ZNA C12N15/00.A C07K19/00 C07K14/47		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS36 4B063/QX01 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA331 4C084/ZA341 4C084/ZA361 4C084/ZA391 4C084/ZA511 4C084/ZA531 4C084/ZA551 4C084/ZA681 4C084/ZA691 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA921 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZB071 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB151 4C084/ZB211 4C084/ZB261 4C084/ZC061 4C084/ZC081 4C084/ZC351 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/739272 2012-12-19 US 61/739353 2012-12-19 US 61/739287 2012-12-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

能与B7-H4免疫特异性结合的抗人B7-H4抗体“6H3”，其抗原结合片段，衍生物和人源化变体，以及此类分子在癌症和其他疾病的诊断和治疗中的用途被披露。在优选的实施方案中，分子用于延迟或预防肿瘤生长，抑制肿瘤介导的抑制，消除肿瘤和/或消耗或阻断肿瘤相关巨噬细胞（“TAM”）的活性，从而改变其活性和/或减少TAM介导的免疫抑制。

(21) 出願番号	特願2015-549721 (P2015-549721)	(71) 出願人	512050737
(86) (22) 出願日	平成25年12月19日 (2013.12.19)		アンブリムン、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年6月18日 (2015.6.18)		ド
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/076619		アメリカ合衆国 メリーランド 2087
(87) 国際公開番号	W02014/100439		8, ケイザースバーグ, ダブリュー.
(87) 国際公開日	平成26年6月26日 (2014.6.26)		ワトキンス ミル ロード 45, ス
(31) 優先権主張番号	61/739, 272		イト エー
(32) 優先日	平成24年12月19日 (2012.12.19)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	61/739, 353	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成24年12月19日 (2012.12.19)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100181674
(31) 優先権主張番号	61/739, 287		弁理士 飯田 貴敬
(32) 優先日	平成24年12月19日 (2012.12.19)	(74) 代理人	100181641
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石川 大輔

最終頁に続く