

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6120848号  
(P6120848)

(45) 発行日 平成29年4月26日 (2017. 4. 26)

(24) 登録日 平成29年4月7日 (2017. 4. 7)

(51) Int. Cl.	F I
C 0 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28 Z N A
C 0 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/04
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00

請求項の数 12 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-526161 (P2014-526161)	(73) 特許権者	504333972 メディミュン, エルエルシー アメリカ合衆国 20878 メリーラン ド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミ ュン ウエイ
(86) (22) 出願日	平成24年8月15日 (2012. 8. 15)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(65) 公表番号	特表2014-531409 (P2014-531409A)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(43) 公表日	平成26年11月27日 (2014. 11. 27)	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/050903	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 国際公開番号	W02013/025779	(74) 代理人	230113332 弁護士 山本 健策
(87) 国際公開日	平成25年2月21日 (2013. 2. 21)		
審査請求日	平成27年7月29日 (2015. 7. 29)		
(31) 優先権主張番号	61/523, 819		
(32) 優先日	平成23年8月15日 (2011. 8. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗B7-H4抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

B7-H4発現腫瘍関連マクロファージ(TAM)の免疫抑制活性を下方調節するために使用するための、3つの軽鎖相補性決定領域(CDR)および3つの重鎖CDRを含む、B7-H4に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含む組成物であって、

前記3つの軽鎖CDRが、配列番号7のアミノ酸24~38を含むCDR1と、配列番号7のアミノ酸54~60を含むCDR2と、配列番号7のアミノ酸93~100を含むCDR3とを含み、

前記3つの重鎖CDRが、配列番号8のアミノ酸26~35を含むCDR1と、配列番号8のアミノ酸50~66を含むCDR2と、配列番号8のアミノ酸99~107を含むCDR3とを含み、

前記使用は、前記B7-H4発現TAMに対する前記抗体またはその抗原結合フラグメントの結合が、前記TAMによる、T細胞活性のB7-H4により媒介される抑制を中和することを特徴とする、組成物。

【請求項2】

癌を有する被検体におけるT細胞活性化を抑制することができるB7-H4発現腫瘍関連マクロファージ(TAM)の有効濃度の上昇を検出するための、3つの軽鎖相補性決定領域(CDR)および3つの重鎖CDRを含む、B7-H4に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含む組成物であって、前記B7-H4発現腫瘍関連TAMの濃度は、癌を有する被検体における腫瘍の悪性度および癌の重症度と関連し、

前記3つの軽鎖CDRが、配列番号7のアミノ酸24～38を含むCDR1と、配列番号7のアミノ酸54～60を含むCDR2と、配列番号7のアミノ酸93～100を含むCDR3とを含み、

前記3つの重鎖CDRが、配列番号8のアミノ酸26～35を含むCDR1と、配列番号8のアミノ酸50～66を含むCDR2と、配列番号8のアミノ酸99～107を含むCDR3とを含み、

以下：

(a) 前記被検体から得られた腫瘍または組織試料におけるB7-H4発現TAMのレベルが、前記B7-H4発現TAMに対する前記抗体またはその抗原結合フラグメントの結合によって決定され；そして

(b) (a)において決定された前記試料におけるB7-H4発現TAMのレベルが、適切な対照と比較され、前記対照のレベルと比較した、前記試料中のB7-H4発現TAMのレベルの上昇から、前記被検体におけるB7-H4発現TAMの有効濃度の上昇が示唆される、

ことを特徴とし、ここで、前記被検体におけるB7-H4発現TAMのレベルの上昇は、前記被検体における腫瘍の悪性度および癌の重症度と相関する、組成物。

【請求項3】

ステップ(b)によって決定された、前記被検体の試料中のB7-H4発現TAMのレベルの上昇は、前記被検体が、化学療法、ホルモン療法、生物療法、免疫療法、放射線療法または手術のうち1つ以上を含む癌処置と共に投与される必要がある、または、前記癌処置と共に投与されることを推奨されるかどうかの指標として使用される、請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

T細胞活性の単球により媒介される抑制の阻止を必要とする被検体において、T細胞活性の単球により媒介される抑制の阻止に使用するための、3つの軽鎖相補性決定領域(CDR)および3つの重鎖CDRを含む、B7-H4に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含む組成物であって、

前記3つの軽鎖CDRが、配列番号7のアミノ酸24～38を含むCDR1と、配列番号7のアミノ酸54～60を含むCDR2と、配列番号7のアミノ酸93～100を含むCDR3とを含み、

前記3つの重鎖CDRが、配列番号8のアミノ酸26～35を含むCDR1と、配列番号8のアミノ酸50～66を含むCDR2と、配列番号8のアミノ酸99～107を含むCDR3とを含み、

B7-H4を発現する前記被検体の単球が、前記被検体のT細胞の存在下で、前記B7-H4に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含む前記組成物と接触されることを特徴とし、ここで、前記組成物は、T細胞活性の単球により媒介される抑制を阻止する、組成物。

【請求項5】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、またはそれらの組み合わせを含む、請求項1、請求項2、または請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、配列番号38のアミノ酸配列を含む軽鎖、配列番号40のアミノ酸配列を含む重鎖、またはそれらの組み合わせを含む、請求項1、請求項2、または請求項4に記載の組成物。

【請求項7】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、

(I) 細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に結合する；

(II) 内因性濃度で生細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に結合する；

(III) 生細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に結合し、B7-H4とその細胞受

10

20

30

40

50

容体との間の結合を調節する；

( I V ) 生細胞の表面に配置されたヒト B 7 - H 4 に結合し、腫瘍関連マクロファージによる免疫抑制を阻害する；

( V ) 生細胞の表面に配置されたヒト B 7 - H 4 に結合し、腫瘍関連マクロファージの活性を調節する；

( V I ) 生腫瘍細胞の表面に配置されたヒト B 7 - H 4 に結合し、腫瘍による抑制を阻害する；または

( V I I ) 生腫瘍細胞の表面に配置されたヒト B 7 - H 4 に結合し、腫瘍特異的細胞溶解を引き起こす

請求項 1、請求項 2、または請求項 4 に記載の組成物。

10

【請求項 8】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、ヒト免疫グロブリン定常領域 ( F c ) に由来する 1 つまたは複数の定常ドメインを含む請求項 1、請求項 2、または請求項 4 に記載の組成物であって、前記ヒト定常ドメインは I g A、I g D、I g E、I g G または I g M ドメインから選択される、組成物。

【請求項 9】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントは I g G 1 抗体またはその抗原結合フラグメントであるかまたは A D C C 活性を有し、直接的な腫瘍殺傷活性を発揮する、および/または、T A M もしくは腫瘍による抑制を阻害することができる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 10】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、検出可能に標識されるか、あるいは、コンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、または受容体リガンドを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体または 1 本鎖抗体である、請求項 1、請求項 2、または請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントは、二重特異性抗体、または多重特異性抗体である、請求項 1、請求項 2、または請求項 4 に記載の組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体を本明細書に援用する米国特許出願第 6 1 / 5 2 3 , 8 1 9 号明細書 ( 2 0 1 1 年 8 月 1 5 日に出願 ; 係属中 ) に対する優先権を主張する。

【0002】

配列表の参照

本出願は、紙およびコンピューター読み取り可能な媒体の両方で開示される、37C.F.R. 1.821 および以下参照に準拠した 1 つまたは複数の配列表を含み、紙およびコンピューター読み取り可能な開示内容はその全体を援用する。

40

【背景技術】

【0003】

本発明は、抗 B 7 - H 4 抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびに B 7 - H 4 に免疫特異的に結合することができる他の分子 ( 対応する抗原 / 受容体に結合する融合タンパク質等を含む ) と、癌および他の疾患の診断および処置におけるそうした分子の使用とに関する。本発明は特に、腫瘍増殖を遅延もしくは予防する、腫瘍による抑制を阻害する、腫瘍を排除する、ならびに / または、腫瘍関連マクロファージ ( 「 T A M 」 ) の活性を欠乏させるかもしくは阻止して T A M の活性を変化させるおよび / もしくは T A M による免疫抑制を低下させるための、そうした分子の使用を対象とする。

50

## 【 0 0 0 4 】

## A . 細胞性免疫反応

ヒトおよび他の哺乳動物の免疫系は、感染および疾患を防止する役割を担っている。こうした防止は、液性免疫反応および細胞性免疫反応により行われる。液性反応では、抗体と外来の標的（抗原）を認識し、中和することができる他の生体分子とが作られる。一方、細胞性免疫反応では、T細胞によりマクロファージ、ナチュラルキラー細胞（NK）および抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球が活性化し、抗原の認識に反応して様々なサイトカインが放出される（非特許文献1）。

## 【 0 0 0 5 】

T細胞が抗原に対する免疫反応を最適に媒介できるには、2つの異なるシグナル伝達の相互作用を必要とする（Viglietta, V. et al. (2007) 「Modulating Co-Stimulation,」 *Neurotherapeutics* 4:666-675; Korman, A. J. et al. (2007) 「Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,」 *Adv. Immunol.* 90:297-339）。最初に、抗原提示細胞（APC）の表面に配置されている抗原が、抗原特異的ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞に提示されなければならない。こうした提示があると、シグナルがT細胞受容体（TCR）を介して伝達され、提示された抗原に特異的となる免疫反応をT細胞が開始するように誘導する。次に、APCと特有のT細胞表面分子との間の相互作用を介して行われるいくつかの共刺激シグナルが、最初にT細胞の活性化および増殖の引き金を引き、最終的にT細胞の抑制を誘導する。こうして、第1のシグナルは免疫反応に特異性を付与するのに対し、第2のシグナルは反応の性質、大きさおよび持続期間を決定する働きをする。

## 【 0 0 0 6 】

免疫系は、共刺激リガンドおよび共刺激受容体によりしっかりと制御されている。これらの分子は、T細胞活性化のための第2のシグナルを与え、正のシグナルおよび負のシグナルのネットワークのバランスを取って、自己に対する免疫を抑制しながら感染に対する免疫反応を最大化する（Wang, L. et al. (March 7, 2011) 「VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T Cell Responses,」 *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) 「The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections,」 *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 8:279-288）。特に重要性なのは、APCのB7.1（CD80）リガンドおよびB7.2（CD86）リガンドと、Tリンパ球のCD28受容体およびCTLA-4受容体との間の結合である（Sharpe, A. H. et al. (2002) 「The B7-CD28 Superfamily,」 *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) 「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」 *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P. S. et al. (2009) 「The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,」 *Immunol. Rev.* 229:307-321）。B7.1またはB7.2がCD28に結合すると、T細胞の活性化が刺激されるのに対し、B7.1またはB7.2がCTLA4に結合すると、そうした活性化が阻害される（Dong, C. et al. (2003) 「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」 *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P. S. et al. (2009) 「The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,」 *Immunol. Rev.*

10

20

30

40

50

. 229:307-321; Greenwald, R. J. et al. (2005) 「The B7 Family Revisited,」 *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548)。CD28は、T細胞の表面に恒常的に発現する一方 (Gross, J., et al. (1992) 「Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse,」 *J. Immunol.* 149:380-388)、CTLA4の発現は、T細胞活性化後に急速に上方制御される (Linsley, P. et al. (1996) 「Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement,」 *Immunity* 4:535-543)。CTLA4は高親和性受容体であるため (Sharpe, A. H. et al. (2002) 「The B7-CD28 Superfamily,」 *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126)、結合すると、最初にT細胞増殖を惹起し (CD28を介して)、次いでT細胞増殖を阻害する (CTLA4の新たな発現により) ことで、増殖がもはや必要でなくなったときにその作用を抑制する。

【0007】

CD28受容体のリガンドに関する詳細な調査により、関連する一連のB7分子 (「B7スーパーファミリー」) の同定および特徴付けが行われてきた (Coyle, A. J. et al. (2001) 「The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function,」 *Nature Immunol.* 2(3):203-209; Sharpe, A. H. et al. (2002) 「The B7-CD28 Superfamily,」 *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Greenwald, R. J. et al. (2005) 「The B7 Family Revisited,」 *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) 「The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,」 *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) 「Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells,」 *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214; Korman, A. J. et al. (2007) 「Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,」 *Adv. Immunol.* 90:297-339; Flies, D. B. et al. (2007) 「The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,」 *J. Immunother.* 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) 「The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance,」 *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Lenschow, D. J. et al. (1996) 「CD28/B7 System of T Cell Costimulation,」 *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) 「Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses,」 *Microbes Infect.* 6:759-766)。このファミリーには、少なくとも8つのメンバー、すなわちB7.1 (CD80)、B7.2 (CD86)、inducible co-stimulator ligand (ICOS-L; B7-H2)、programmed death-1 ligand (PD-L1; B7-H1)、programmed death-2 ligand (PD-L2

10

20

30

40

50

; B7 - DC)、B7 - H3 (B7 - RP2)、B7 - H4 (B7xおよびB7S1とも呼ばれる; Sica, G. L. et al. (2003)「B7 - H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」Immunity 18: 849 - 861; Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100: 10388 - 10392; Prasad, D. V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,」Immunity 18: 863 - 873)およびB7 - H6 (Brandt, C. S. et al. (2009)「The B7 family member B7 - H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans,」J Exp Med. 206 (7): 1495 - 503)が存在する。

10

## 【0008】

## B. B7 - H4

ヒトB7 - H4タンパク質をコードするcDNAが同定され、胎盤cDNAからクローニングされた(Sica, G. L. et al. (2003)「B7 - H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」Immunity 18: 849 - 861; Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100: 10388 - 10392)。B7 - H4については、米国特許第7, 931, 896号明細書; 同第7, 875, 702号明細書; 同第7, 847, 081号明細書; 同第7, 622, 565号明細書; 米国特許出願公開第2011/0085970号明細書; 同第2011/0020325号明細書; 同第2010/0256000号明細書; 同第2010/0240585号明細書; 同第2010/0227343号明細書; 同第2010/0227335号明細書; 同第2010/0158936号明細書; 同第2010/0092524号明細書; 同第2010/0028450号明細書; 同第2009/0275633号明細書; 同第2009/0215084号明細書; 同第2009/0176317号明細書; 同第2009/0142342号明細書; 同第2009/0118175号明細書; 同第2009/0087416号明細書; 同第2009/0048122号明細書; 同第2009/0022747号明細書; 同第2009/0018315号明細書; 同第2008/0206235号明細書; 同第2008/0160036号明細書; 同第2008/0177039号明細書; 同第2008/0050370号明細書; 同第2007/0218032号明細書; 同第2007/0184473号明細書; 同第2007/0172504号明細書; 同第2007/0160578号明細書; 同第2007/0122378号明細書; 同第2007/0036783号明細書; 同第2006/0003452号明細書; 欧州特許第2124998号明細書および欧州特許第2109455号明細書; および国際公開第2011/026132A2号パンフレット; 国際公開第2011/026122A2号パンフレット; 国際公開第2011/005566A2号パンフレット; 国際公開第2010/144295A1号パンフレット; 国際公開第2010/102177A1号パンフレット; 国際公開第2010/102167A1号パンフレット; 国際公開第2009/111315A2号パンフレット; 国際公開第2009/073533A2号パンフレット; 国際公開第2008/092153A2号パンフレット; 国際公開第2008/083239A2号パンフレット; 国際公開第2008/083228A2号パンフレット; 国際公開第2007/124361A2号パンフレット; 国際公開第2007/122369A2号パンフレット; 国際公開第2007/1092

20

30

40

50

54A2号パンフレット；国際公開第2007/087341A2号パンフレット；国際公開第2007/082154A2号パンフレット；国際公開第2007/067682A2号パンフレット；国際公開第2007/067681A2号パンフレット；国際公開第2007/041694A2号パンフレット；国際公開第2006/138670A2号パンフレット；国際公開第2006/133396A2号パンフレット；国際公開第2006/121991A2号パンフレット；国際公開第2006/066229A2号パンフレット；および国際公開第2006/007539A1号パンフレットで考察されている。

【0009】

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、および米国特許出願公開第2008/0199461号明細書に開示されている。

10

【0010】

B7-H4タンパク質は282個のアミノ酸残基を有し、アミノ酸残基は、アミノ末端細胞外ドメイン、大きな疎水性膜貫通ドメイン、および非常に短い細胞内ドメイン(2個のアミノ酸残基のみからなる)を含むものとして分類されている。他のB7ファミリーメンバーと同様に、B7-H4は、その細胞外ドメインに一对のIg様領域を有する。B7-H4タンパク質は、I型膜貫通タンパク質の全体構造を有する。このタンパク質は、他のB7ファミリーメンバーとの相同性が最小である(約25%)(Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:10388-10392)。

20

【0011】

ヒトB7-H4のcDNA配列を使用してマウスのB7-H4ホモログが同定されてきた。マウスオーソログとヒトオーソログとの同一性(約87%)から、B7-H4が進化的に高度に保存されていることが示唆される(Sica, G. L. et al. (2003) B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity, Immunity 18:849-861; Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:10388-10392)。この高い相同性は、B7-H4受容体への結合に関係するこのタンパク質のIgVドメインでは91%まで高まる(Stamper, C. C. et al. (2001) Crystal Structure Of The B7-1/CTLA-4 Complex That Inhibits Human Immune Responses, Nature 410:608-611; Schwartz, J. C. et al. (2001) Structural Basis For Co-Stimulation By The Human CTLA-4/B7-2 Complex, Nature 410:604-608)。

30

40

【0012】

他のB7メンバーとは異なり、B7-H4のmRNAは広く発現する。その発現は、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、胎盤、前立腺、骨格筋、皮膚、小腸、脾臓、胃、精巣、胸腺、胸腺および子宮で認められてきた(Sica, G. L. et al. (2003) B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity, Immunity 18:849-861; Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation, Proc. Natl. Aca

50

d. Sci. (USA) 100:10388-10392; Prasad, D. V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,」Immunity 18:863-873; Prasad, D. V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,」Immunity 18:863-873)。

【0013】

B7-H4のmRNAの広範な発現にもかかわらず、正常な細胞の表面上のB7-H4タンパク質の存在は、限定されているようである(Sica, G. L. et al. (2003)「B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」Immunity 18:849-861; Choi, I. H. et al. (2003)「Genomic Organization And Expression Analysis Of B7-H4, An Immune Inhibitory Molecule Of The B7 Family,」J. Immunol. 171:4650-4654)。単離されたばかりのヒトT細胞、B細胞、単球および樹状細胞では、その細胞表面にB7-H4が発現しない(FACS分析による判定)けれども、リポ多糖(LPS)、フィトヘマグルチニン(PHA)、インターフェロン(INF-)、ホルポール12-ミリスレート13-アセテート(PMA)またはイオノマイシンによるインビトロ刺激後は、そうした細胞上にその発現を誘導することができる(Sica, G. L. et al. (2003)「B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」Immunity 18:849-861)。こうしたB7-H4の発現の広範な分布の発見から、B7-H4の機能が他の抑制性B7分子の機能とまったく異なることが示唆される(Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:10388-10392を参照されたい)。

【0014】

こうした示唆と、B7-H4の細胞外ドメインが他のB7ファミリーメンバーと約25%のアミノ酸相同性しか有さないという観察とを裏付けるように、B7-H4は、既知のB7ファミリー受容体(すなわち、CTLA-4、ICOS、PD-1またはCD28)と結合しない。B7-H4特異的受容体を同定しようとする努力により、こうした受容体が活性化T細胞に発現することが明らかになった(Sica, G. L. et al. (2003)「B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」Immunity 18:849-861)。B7-H4融合タンパク質がT細胞上のその推定受容体に結合すると、T細胞増殖およびサイトカイン(IL-2およびIL-10)産生を著しく阻害することが明らかになり、こうした阻害は、CD28共刺激で元に戻せないことが見出された(Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:10388-10392; Prasad, D. V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,」Immunity 18:863-873)。B7-H4は、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期においてT細胞の細胞周期の進行を停止させることが明らかになっている(Sica, G. L. et al. (2003)「B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」

10

20

30

40

50

Immunity 18 : 849 - 861) ことから、このタンパク質がアポトーシスの誘導によるのではなく、細胞周期の停止により阻害作用を媒介することが示唆される。

【0015】

抗B7-H4抗体は、インビトロで脾臓細胞により産生されるIL-2のレベルを大きく上昇させ、インビボで免疫反応を増強することが分かっている(Prasad, D. V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,」Immunity 18 : 863 - 873; Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100 : 10388 - 10392; Prasad, D. V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,」Immunity 18 : 863 - 873)。

10

【0016】

B7-H4が存在しないと、好中球前駆細胞の増殖の直接制御を介してリステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)感染に対する耐性が高まることが立証されている(Zhu, G. et al. (2009)「B7-H4 Deficient Mice Display Augmented Neutrophil-Mediated Innate Immunity,」Blood 113 : 1759 - 1769; Wei, J. et al. (2011)「Tissue-Specific Expression Of B7x Protects From CD4 T Cell-Mediated Autoimmunity,」J. Exper. Med. 208 (8) : 1683 - 1694)。したがってB7-H4は、免疫、特に自己免疫および感染に対する耐性に一定の役割を果たすと提唱されてきた。このためアゴニスト抗B7-H4抗体および可溶性B7-H4タンパク質が炎症性障害の処置に提唱されてきた(米国特許第7,931,896号明細書;米国特許出願公開第2007/0122378号明細書;同第2008/0160036号明細書;同第2009/0142342号明細書;および同第2011/0020325号明細書;欧州特許第2124998号明細書;国際公開第2006/133396号パンフレット;国際公開第2007/041694号パンフレット;国際公開第2008/083228号パンフレット;国際公開第2009/111315号パンフレット;国際公開第2010/144295号パンフレット;国際公開第2011/005566号パンフレット;国際公開第2011/026122号パンフレット;および国際公開第2011/026132号パンフレット)。

20

30

【0017】

インビボでのB7-H4の意義についてはさらに、高レベルのB7-H4発現が多くの腫瘍組織、たとえば、ヒト卵巣癌(Choi, I. H. et al. (2003)「Genomic Organization And Expression Analysis Of B7-H4, An Immune Inhibitory Molecule Of The B7 Family,」J. Immunol. 171 : 4650 - 4654; Kryczek, I. et al. (2006)「B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma,」J. Exp. Med. 203 (4) : 871 - 881; Bignotti, E. et al. (2006)「Differential Gene Expression Profiles Between Tumor Biopsies And Short Term Primary Cultures Of Ovarian Serous Carcinomas: Identification Of Novel Molecular Biomarkers For Early Diagnosis And Therapy,」Gynecol. Oncol. 103 : 405 - 416;

40

50

Tringler, B. et al. (2006) 「B7-H4 Overexpression In Ovarian Tumors,」 *Gynecol. Oncol.* 100:44-52; Simon, I. et al. (2006) 「B7-h4 Is A Novel Membrane-Bound Protein And A Candidate Serum And Tissue Biomarker For Ovarian Cancer,」 *Cancer Res.* 66:1570-1575; Salceda, S. et al. (2005) 「The Immunomodulatory Protein B7-H4 Is Overexpressed In Breast And Ovarian Cancers And Promotes Epithelial Cell Transformation,」 *Exp. Cell Res.* 306:128-141)、非小細胞肺癌 (Sun, Y. et al. (2006) 「B7-H3 And B7-H4 Expression In Non-Small-Cell Lung Cancer,」 *Lung Cancer* 53:143-151)、乳管癌および小葉乳癌 (Salceda, S. et al. (2005) 「The Immunomodulatory Protein B7-H4 Is Overexpressed In Breast And Ovarian Cancers And Promotes Epithelial Cell Transformation,」 *Exp. Cell Res.* 306:128-141; Tringler, B. et al. (2005) 「B7-H4 Is Highly Expressed In Ductal And Lobular Breast Cancer,」 *Clin. Cancer Res.* 11:1842-1848)、ならびに腎細胞癌腫 (Krambeck, A. E. et al. (2006) 「B7-H4 Expression In Renal Cell Carcinoma And Tumor Vasculature: Associations With Cancer Progression And Survival,」 *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 103:10391-10396)で見られることによっても立証される。腫瘍細胞上でのB7-H4の発現は、臨床的に問題となる病理学的特徴、たとえば腫瘍の悪性度と相関することが明らかになっている (Krambeck, A. E. et al. (2006) 「B7-H4 Expression In Renal Cell Carcinoma And Tumor Vasculature: Associations With Cancer Progression And Survival,」 *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 103(2):10391-10396)。

#### 【0018】

#### C. 腫瘍関連マクロファージ (TAM)

炎症と癌との間の関連は、腫瘍部位への多数の白血球の浸潤について言及した知見まで一世紀以上さかのぼる (Balkwill, F. et al. (2001) 「Inflammation And Cancer: Back To Virchow?,」 *Lancet* 357:539-545; Coussens, L. M. et al. (2002) 「Inflammation and Cancer,」 *Nature* 420:860-867)。現在では、いくつかの研究から、炎症と癌とを関連付ける2つの主経路、すなわち内因性経路および外因性経路が確認されている (Allavena, P. et al. (2008) 「Pathways Connecting Inflammation and Cancer,」 *Curr. Opin. Genet. Devel.* 18:3-10; Colotta, F. (2009) 「Cancer-Related Inflammation, The Seventh Hallmark of Cancer: Links to Genetic Instability,」 *Carcinogenesis* 30(7):1073-1081; Porta, C. et al. (2009) 「Cellular and Molecular Pathways Linking Inflammation and Cancer,」 *Immunobiology* 214:761-777)。内因性経路は炎症および発癌に至る遺伝子変化を含む一

方、外因性経路は、癌発症に関連する組織における慢性炎症の引き金となる微生物/ウイルス感染症または自己免疫疾患を特徴とする。どちらの経路も炎症性メディエーターの中心的転写因子(たとえば、NF- $\kappa$ B、STAT3およびHIF-1)を活性化し、炎症において重要な役割を果たす白血球のリクルートメントをもたらす(Solinas, G. et al. (2009)「Tumor-Associated Macrophages (TAM) As Major Players Of The Cancer-Related Inflammation,」J. Leukoc. Biol. 86(5): 1065-1073)。

【0019】

TAMは炎症と癌を結び付ける。マクロファージは、活性化血中単球に由来する免疫系細胞である。マクロファージは主に、病原体、死細胞、細胞残屑および細胞外マトリックス(ECM)の様々な成分を除去する(すなわち、貪食する)働きをすることで、病原体または組織損傷により誘導される炎症反応に関与すると考えられている。マクロファージは、腫瘍微小環境において重要な構成要素を構成し、腫瘍量の最大50%に相当することが明らかになっている。

【0020】

マクロファージは食作用を媒介するだけでなく、血管新生促進増殖因子およびマトリックスリモデリングプロテアーゼを分泌し、したがって腫瘍の発生および増殖に必要な血管系の発生(すなわち、血管新生)にも役割を果たしている(Pollard, J.W. (2009)「Trophic Macrophages In Development And Disease,」Nat. Rev. Immunol. 9: 259-270)。このため、腫瘍内にマクロファージが存在すると、腫瘍の増殖が促進されるようである。多くの研究から、腫瘍内に腫瘍関連マクロファージが存在することは、生存の負の予後因子であることが明らかになっている(Farinha, P. et al. (2005)「Analysis Of Multiple Biomarkers Shows That Lymphoma-Associated Macrophage (LAM) Content Is An Independent Predictor Of Survival In Follicular Lymphoma (FL),」Blood 106: 2169-2174; Dave, S.S. et al. (2004)「Prediction Of Survival In Follicular Lymphoma Based On Molecular Features Of Tumor-Infiltrating Immune Cells,」N. Engl. J. Med. 351: 2159-2169; Solinas, G. et al. (2009)「Tumor-Associated Macrophages (TAM) As Major Players Of The Cancer-Related Inflammation,」J. Leukoc. Biol. 86(5): 1065-1073)。

B7-H4は、卵巣腫瘍に存在するTAMなどTAMに過剰発現することが示されている(Kryczek, I. et al. (2006)「B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma,」J. Exp. Med. 203(4): 871-881; Kryczek, I. et al. (2007)「Relationship Between B7-H4, Regulatory T Cells, And Patient Outcome In Human Ovarian Carcinoma,」Cancer Res. 67(18): 8900-8905)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0021】

【非特許文献1】Dong, C. et al. (2003)「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」

10

20

30

40

50

Immunolog. Res. 28 (1) : 39 - 48

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

炎症および癌の処置におけるこれまでのあらゆる進歩にもかかわらず、癌の処置のための免疫療法を改善することができる組成物が依然として求められている。本発明は、そうした組成物と、癌ならびに他の疾患および状態を処置するための、その使用とを対象とする。

【課題を解決するための手段】

【0023】

本発明は、抗B7-H4抗体およびその抗原結合フラグメント、ならびにB7-H4に免疫特異的に結合することができる他の分子（対応する抗原/受容体に結合する融合タンパク質等を含む）と、癌および他の疾患の診断および処置におけるそうした分子の使用とに関する。本発明は特に、腫瘍増殖を遅延または予防する、腫瘍による抑制を阻害する、腫瘍を排除する、ならびに/または、腫瘍関連マクロファージ（「TAM」）の活性を変化させるおよび/もしくはTAMを調節もしくは欠乏してTAMによる免疫抑制を低下させるための、そうした分子の使用を対象とする。

【0024】

詳細には、本発明は、ヒトB7-H4に免疫特異的に結合する抗体の抗原結合フラグメントを含む分子、好ましくはそうしたB7-H4結合分子が生細胞の表面に配置されたB7-H4に結合することができる実施形態、および/または、そうしたB7-H4結合分子が内因性濃度のB7-H4に結合することができる実施形態を提供する。

【0025】

本発明は、抗体の抗原結合フラグメントを含む分子であって、ヒトB7-H4に免疫特異的に結合する分子を提供する。本発明は特に、

(I) 細胞（特に生細胞）の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合する；

(II) 内因性濃度で細胞（特に生細胞）の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合する；

(III) 生細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合し、B7-H4とその細胞受容体との間の結合を調節する；

(IV) 生細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合し、腫瘍関連マクロファージによる免疫抑制を阻害する；

(V) 生細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合し、腫瘍関連マクロファージの活性を調節する；

(VI) 生腫瘍細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合し、腫瘍による抑制を阻害する；または

(VII) 生腫瘍細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合し、腫瘍特異的細胞溶解を引き起こす

そうした分子を提供する。

【0026】

本発明はさらに、そうした分子が検出可能に標識されるか、または、コンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、受容体リガンドを含む、そうした分子の実施形態に関する。本発明はさらに、分子が細胞内に移行し、細胞の死を媒介することができる、そうしたすべての分子の実施形態に関する。

【0027】

本発明はさらに、生細胞が腫瘍細胞、病原体感染細胞またはマクロファージである、そうしたすべての分子の実施形態に関する。

【0028】

本発明はさらに、分子が抗体であり、抗体は、

10

20

30

40

50

( I )モノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体もしくはヒト化抗体；または

( I I )二重特異性抗体、三重特異性抗体もしくは多重特異性抗体

である

そうしたすべての分子の実施形態に関する。

【 0 0 2 9 】

本発明はさらに、分子が A D C C 活性を有し、直接的な腫瘍殺傷活性を発揮する、および/または、 T A M または腫瘍による抑制を阻害することができる、そうしたすべての分子の実施形態に関する。

【 0 0 3 0 】

本発明はさらに、分子が、 B 7 - H 4 および同じ細胞上の別の分子に結合することができる二重特異性抗体、三重特異性抗体または多重特異性抗体であるそうしたすべての分子の実施形態に関する。

【 0 0 3 1 】

本発明はさらに、抗原結合フラグメントが 6 つの C D R を含み、

( I ) 6 つの C D R は抗 B 7 - H 4 抗体、すなわち 2 D 1、 2 E 1 1 および 2 H 9 の C D R の少なくとも 1 つのコンセンサス C D R を含み、残りすべての C D R は、

( A ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 D 1 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R ；

( B ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 E 1 1 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R ；または

は

( C ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 H 9 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R ；

から選択される、

あるいは

( I I ) 6 つの C D R は、

( A ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 D 1 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R ；

( B ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 E 1 1 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R ；または

は

( C ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 H 9 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R

から選択される

そうしたすべての分子の実施形態に関する。

【 0 0 3 2 】

本発明はさらに、癌または感染症の処置のための医薬組成物であって、治療上有効な量または予防上有効な量の上記分子のいずれか、および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含み、分子は B 7 - H 4 による抑制を拮抗して免疫反応を上方調節する、医薬組成物も提供する。

【 0 0 3 3 】

本発明は、癌または感染症の症状を示している被検体の癌または感染症（特に慢性ウイルス感染症）の処置のための、または症状を示す前の被検体の癌または感染症の予防のための、そうした医薬組成物の使用をさらに含む。

【 0 0 3 4 】

本発明はさらに、治療上有効な量または予防上有効な量の上記分子のいずれか、および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含み、分子が B 7 - H 4 による抑制を増強して免疫反応を下方調節する、炎症の処置のための医薬組成物も提供する。

【 0 0 3 5 】

本発明は、炎症（特に自己免疫疾患、移植片対宿主病、宿主対移植片病または移植拒絶反応の処置のためのそうした医薬組成物の使用をさらに含み、その使用は、自己免疫疾患、移植片対宿主病、宿主対移植片病または移植拒絶反応の処置である）

【 0 0 3 6 】

本発明は、被検体の疾患（特に癌または T 細胞の数もしくは健康に影響を与える疾患）の存在を診断するための細胞学的アッセイにおける、上記分子のいずれかの使用であって、細胞学的アッセイは、被検体の細胞について分子に結合するその能力をアッセイするこ

10

20

30

40

50

とを含む、使用をさらに含む。

【0037】

本発明は、抗癌剤を用いた腫瘍の処置に対する適合性を判定するための、上記分子のいずれかの使用をさらに含み、使用は、腫瘍中の腫瘍関連マクロファージの有効濃度または実際の濃度を判定することを含み、特に抗癌剤の用量または抗癌剤を用いた処置は腫瘍関連マクロファージの判定された有効濃度または実際の濃度に基づき設定または調整される。

【0038】

本発明は、B7-H4発現腫瘍関連マクロファージの有効濃度の上昇を示すことが認められた患者の癌の処置における、治療上有効な量の上記医薬組成物のいずれかの使用をさらに含む。

10

【0039】

本発明は、腫瘍または癌の処置が化学療法、ホルモン療法、生物療法、免疫療法、放射線療法または手術をさらに含む、そうした使用をさらに含む。

【0040】

本発明はさらに、細胞（すなわち生細胞）が腫瘍細胞、病原体感染細胞またはマクロファージである、そうしたB7-H4結合分子の実施形態に関する。

【0041】

本発明はさらに、そうしたB7-H4結合分子はB7-H4とその細胞受容体との間の結合を調節する、分子の実施形態に関する。

20

【0042】

本発明は特に、抗原結合フラグメントが6つのCDRを含み、CDRは抗B7-H4抗体、すなわち2D1、2E11および2H9のCDRの少なくとも1つのコンセンサスCDRを含み、残りすべてのCDRは、

(A) 抗B7-H4抗体2D1の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR；

(B) 抗B7-H4抗体2E11の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR；または

は

(C) 抗B7-H4抗体2H9の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR

から選択される、そうしたB7-H4結合分子の実施形態を対象とする。

【0043】

30

本発明は特に、6つのCDRは、

(A) 抗B7-H4抗体2D1の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR；

(B) 抗B7-H4抗体2E11の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR；または

は

(C) 抗B7-H4抗体2H9の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR

である、そうしたB7-H4結合分子の実施形態を対象とする。

【0044】

本発明は特に、そうしたすべてのB7-H4結合分子の実施形態であって、分子はモノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である実施形態を対象とする。本発明はさらに、そうした抗体の実施形態であって、抗体は二重特異性抗体、三重特異性抗体または多重特異性抗体である実施形態に関する。

40

【0045】

本発明はさらに、そうしたすべてのB7-H4結合分子の実施形態であって、分子は、検出可能に標識されるか、または、コンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、受容体リガンドを含む、実施形態に関する。

【0046】

本発明は特に、そうしたすべてのB7-H4結合分子の実施形態であって、分子は腫瘍関連マクロファージを欠乏するまたはその活性を調節する、実施形態を対象とする。

【0047】

本発明はさらに、癌を処置するための医薬組成物であって、治療上有効な量の上記分子

50

のいずれか、および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含む医薬組成物を対象とする。本発明はさらに、疾患の症状を示す被検体の癌を処置するための方法であって、治療上有効な量のそうした医薬組成物を被検体に投与することを含む方法を対象とする。本発明はさらに、そうした方法の実施形態であって、抗癌剤の用量または抗癌剤を用いた処置が腫瘍関連マクロファージの判定された有効濃度または実際の濃度に基づき設定または調整される、実施形態を対象とする。本発明はさらに、B7-H4発現腫瘍関連マクロファージの有効濃度の上昇を示すことが認められた患者の腫瘍を処置する方法であって、治療上有効な量のそうした医薬組成物患者に与える方法を対象とする。本発明はさらに、そうした方法の実施形態であって、その方法はその処置を化学療法、ホルモン療法、生物療法、免疫療法、放射線療法または手術と組み合わせることをさらに含む、実施形態を対象とする。本発明はさらに、そうした癌を予防処置するための方法であって、疾患の症状を示す前に予防上有効な量のそうした医薬組成物を被検体に投与することを含む、方法を対象とする。

10

## 【0048】

本発明はさらに、抗癌剤を用いた腫瘍の処置に対する適合性を判定するための方法であって、上記分子のいずれかを利用して腫瘍中の腫瘍関連マクロファージの有効濃度または実際の濃度を判定することを含む、方法を対象とする。

## 【0049】

本発明はさらに、治療上有効なを含む、感染症（特に慢性ウイルス性疾患）の処置のための医薬組成物を対象とする。

20

## 【0050】

そうした炎症性疾患を予防処置するための方法であって、疾患の症状を示す前に予防上有効な量のそうした医薬組成物を被検体に投与することを含む方法をさらに対象とする。

## 【0051】

本発明はさらに、被検体の細胞についてヒトB7-H4に免疫特異的に結合する抗体の抗原結合フラグメントを含む分子に結合するその能力をアッセイすることを含む、被検体の疾患（特に癌、またはT細胞の数もしくは健康に影響を与える疾患）を診断するための方法、好ましくはそうしたB7-H4結合分子が生細胞の表面に配置されたB7-H4に結合することができる実施形態、および/または、そうしたB7-H4結合分子が内因性濃度のB7-H4に結合することができる実施形態を対象とし、特にその方法は被検体の疾患の存在を診断するための細胞学的アッセイである、実施形態に関する。

30

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

抗体の抗原結合フラグメントを含む分子であって、ヒトB7-H4に免疫特異的に結合する分子。

(項目2)

前記分子は、

(I) 細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合する；

(II) 内因性濃度で生細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合する；

40

(III) 生細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合し、B7-H4とその細胞受容体との間の結合を調節する；

(IV) 生細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合し、腫瘍関連マクロファージによる免疫抑制を阻害する；

(V) 生細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合し、腫瘍関連マクロファージの活性を調節する；

(VI) 生腫瘍細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合し、腫瘍による抑制を阻害する；または

(VII) 生腫瘍細胞の表面に配置されたヒトB7-H4に免疫特異的に結合し、腫瘍特異的細胞溶解を引き起こす

50

項目 1 に記載の分子。

( 項目 3 )

前記分子は、検出可能に標識されるか、あるいは、コンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、受容体リガンドを含む、項目 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の分子。

( 項目 4 )

前記分子は前記細胞内に移行し、前記細胞の死を媒介することができる、項目 2 ~ 3 のいずれか一項に記載の分子。

( 項目 5 )

前記生細胞は、腫瘍細胞、病原体感染細胞またはマクロファージである、項目 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の分子。

( 項目 6 )

前記分子は抗体であり、前記抗体は、  
( I ) モノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体もしくはヒト化抗体；または  
( I I ) 二重特異性抗体、三重特異性抗体もしくは多重特異性抗体  
である、項目 1 に記載の分子。

( 項目 7 )

前記分子は I g G 1 抗体であるかまたは A D C C 活性を有し、直接的な腫瘍殺傷活性を発揮する、および/または、T A M もしくは腫瘍による抑制を阻害することができる、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の分子。

( 項目 8 )

前記分子は、B 7 - H 4 および同じ細胞上の別の分子に結合することができる二重特異性抗体、三重特異性抗体または多重特異性抗体である、項目 6 に記載の分子。

( 項目 9 )

前記抗原結合フラグメントは 6 つの C D R を含み、  
( I ) 前記 6 つの C D R は抗 B 7 - H 4 抗体、すなわち 2 D 1、2 E 1 1 および 2 H 9 の C D R の少なくとも 1 つのコンセンサス C D R を含み、残りすべての C D R は、  
( A ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 D 1 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R ；  
( B ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 E 1 1 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R ；または

( C ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 H 9 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R ；  
から選択される

あるいは

( I I ) 前記 6 つの C D R は、

( A ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 D 1 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R ；

( B ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 E 1 1 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R ；または

( C ) 抗 B 7 - H 4 抗体 2 H 9 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R

である、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の分子。

( 項目 1 0 )

治療上有効な量または予防上有効な量の項目 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の分子、および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含み、前記分子は B 7 - H 4 による抑制を拮抗して免疫反応を強化する、癌または感染症の処置のための医薬組成物。

( 項目 1 1 )

治療上有効な量または予防上有効な量の項目 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の分子、および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含み、前記分子は B 7 - H 4 による抑制を促進して免疫反応を下方調節する、炎症の処置のための医薬組成物。

( 項目 1 2 )

癌または感染症の症状を示している被検体の癌または感染症の処置のための、または前記症状を示す前の被検体の癌または感染症の予防のための、項目 1 0 に記載の医薬組成物の使用。

10

20

30

40

50

(項目13)

前記炎症の症状を示している被検体の炎症の処置のための、または前記症状を示す前の被検体の炎症の予防のための、項目11に記載の医薬組成物の使用。

(項目14)

慢性ウイルス性疾患の処置のための前記組成物および前記使用は前記慢性ウイルス性疾患の処置である、項目10に記載の医薬組成物または項目9に記載のその使用。

(項目15)

自己免疫疾患、移植片対宿主病、宿主対移植片病または移植拒絶反応の処置のための前記組成物、および前記使用は、前記自己免疫疾患、移植片対宿主病、宿主対移植片病または移植拒絶反応の処置である、項目11に記載の医薬組成物または項目10に記載のその使用。

10

(項目16)

被検体の疾患の存在を診断するための細胞学的アッセイにおける項目1~9に記載のいずれか一項に記載の分子の使用であって、前記細胞学的アッセイは、前記被検体の細胞について前記分子に結合するその能力をアッセイすることを含む、使用。

(項目17)

前記疾患は、癌またはT細胞の数もしくは健康に影響を与える疾患である、項目16に記載の使用。

(項目18)

抗癌剤を用いた腫瘍の処置に対する適合性を判定するための項目1~9のいずれか1項に記載の分子の使用であって、前記腫瘍の腫瘍関連マクロファージの有効濃度または実際の濃度を判定することを含む、使用。

20

(項目19)

前記抗癌剤の用量または前記抗癌剤による前記処置は、前記腫瘍関連マクロファージの前記判定された有効濃度または実際の濃度に基づき設定または調整される、項目18に記載の使用。

(項目20)

B7-H4発現腫瘍関連マクロファージの有効濃度の上昇を示すことが認められた患者の癌の処置における、治療上有効な量の項目10に記載の医薬組成物の使用。

(項目21)

前記腫瘍または前記癌の前記処置は、化学療法、ホルモン療法、生物療法、免疫療法、放射線療法または手術をさらに含む、項目12、18または20のいずれか一項に記載の使用。

30

**【図面の簡単な説明】****【0052】**

**【図1】**マウスB7-H4Igコンストラクトで免疫した3匹の各マウス由来の血清による抗B7-H4抗体の検出を示す(OD<sub>450</sub>で測定)。

**【図2】**B7-H4hIg結合プレートへの抗B7-H4抗体の結合を示す。H74(市販されている抗B7-H4抗体)、2D1、2E11および2H9の原液から希釈系列を作製し、B7-H4hIgまたはB7-DChIgでコートした96ウェルELISAプレートに加えた。インキュベーションおよび洗浄後、プレートに西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート抗マウスIgG抗体を加えた。インキュベーションおよび洗浄後、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質を加えた。H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>停止液で発色を停止させ、450nm波長の吸光度を測定するプレートリーダーで読み取った。

40

**【図3】**293T、B7-H4細胞に対する抗B7-H4抗体の結合を示す。抗体2D1、2E11および2H9を未希釈(未希釈(Neat))、または1:3、1:9および1:27に希釈して使用して、293T、B7-H4細胞を染色した。結合の検出に関しては、APC標識抗マウスIgG抗体を利用し、続いてAPC陽性細胞のFACS分析を行った。1μg/mLのH74(市販されている抗B7-H4抗体)を陽性対照として使

50

用した。陰性対照は、 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のmIgG1であった。APC標識抗マウスIgG抗体とインキュベートした293T・B7-H4細胞(DAM APCのみ)、および未希釈2D1で染色した親293T細胞(未希釈(Neat)[293T])をさらに陰性結合対照とした。

【図4A】卵巣癌患者由来の腹水から単離し、蛍光活性化セルソーター(FACS)を使用して判定したCD11b<sup>+</sup>TAM、CD19<sup>+</sup>TAM、CD14<sup>+</sup>TAM、CD123<sup>+</sup>TAM、CD86<sup>+</sup>TAM、CD80<sup>+</sup>TAM、HLA-DC<sup>+</sup>TAM、B7-H1<sup>+</sup>TAM、B7-H4<sup>+</sup>TAMおよびB7-DC<sup>+</sup>TAMの比率をそれぞれ示す。

【図4B】卵巣癌患者由来の腹水から単離し、蛍光活性化セルソーター(FACS)を使用して判定したCD11b<sup>+</sup>TAM、CD19<sup>+</sup>TAM、CD14<sup>+</sup>TAM、CD123<sup>+</sup>TAM、CD86<sup>+</sup>TAM、CD80<sup>+</sup>TAM、HLA-DC<sup>+</sup>TAM、B7-H1<sup>+</sup>TAM、B7-H4<sup>+</sup>TAMおよびB7-DC<sup>+</sup>TAMの比率をそれぞれ示す。

【図4C】卵巣癌患者由来の腹水から単離し、蛍光活性化セルソーター(FACS)を使用して判定したCD11b<sup>+</sup>TAM、CD19<sup>+</sup>TAM、CD14<sup>+</sup>TAM、CD123<sup>+</sup>TAM、CD86<sup>+</sup>TAM、CD80<sup>+</sup>TAM、HLA-DC<sup>+</sup>TAM、B7-H1<sup>+</sup>TAM、B7-H4<sup>+</sup>TAMおよびB7-DC<sup>+</sup>TAMの比率をそれぞれ示す。

【図4D】卵巣癌患者由来の腹水から単離し、蛍光活性化セルソーター(FACS)を使用して判定したCD11b<sup>+</sup>TAM、CD19<sup>+</sup>TAM、CD14<sup>+</sup>TAM、CD123<sup>+</sup>TAM、CD86<sup>+</sup>TAM、CD80<sup>+</sup>TAM、HLA-DC<sup>+</sup>TAM、B7-H1<sup>+</sup>TAM、B7-H4<sup>+</sup>TAMおよびB7-DC<sup>+</sup>TAMの比率をそれぞれ示す。

【図4E】卵巣癌患者由来の腹水から単離し、蛍光活性化セルソーター(FACS)を使用して判定したCD11b<sup>+</sup>TAM、CD19<sup>+</sup>TAM、CD14<sup>+</sup>TAM、CD123<sup>+</sup>TAM、CD86<sup>+</sup>TAM、CD80<sup>+</sup>TAM、HLA-DC<sup>+</sup>TAM、B7-H1<sup>+</sup>TAM、B7-H4<sup>+</sup>TAMおよびB7-DC<sup>+</sup>TAMの比率をそれぞれ示す。

【図4F】卵巣癌患者由来の腹水から単離し、蛍光活性化セルソーター(FACS)を使用して判定したCD11b<sup>+</sup>TAM、CD19<sup>+</sup>TAM、CD14<sup>+</sup>TAM、CD123<sup>+</sup>TAM、CD86<sup>+</sup>TAM、CD80<sup>+</sup>TAM、HLA-DC<sup>+</sup>TAM、B7-H1<sup>+</sup>TAM、B7-H4<sup>+</sup>TAMおよびB7-DC<sup>+</sup>TAMの比率をそれぞれ示す。

【図4G】卵巣癌患者由来の腹水から単離し、蛍光活性化セルソーター(FACS)を使用して判定したCD11b<sup>+</sup>TAM、CD19<sup>+</sup>TAM、CD14<sup>+</sup>TAM、CD123<sup>+</sup>TAM、CD86<sup>+</sup>TAM、CD80<sup>+</sup>TAM、HLA-DC<sup>+</sup>TAM、B7-H1<sup>+</sup>TAM、B7-H4<sup>+</sup>TAMおよびB7-DC<sup>+</sup>TAMの比率をそれぞれ示す。

【図4H】卵巣癌患者由来の腹水から単離し、蛍光活性化セルソーター(FACS)を使用して判定したCD11b<sup>+</sup>TAM、CD19<sup>+</sup>TAM、CD14<sup>+</sup>TAM、CD123<sup>+</sup>TAM、CD86<sup>+</sup>TAM、CD80<sup>+</sup>TAM、HLA-DC<sup>+</sup>TAM、B7-H1<sup>+</sup>TAM、B7-H4<sup>+</sup>TAMおよびB7-DC<sup>+</sup>TAMの比率をそれぞれ示す。

【図4I】卵巣癌患者由来の腹水から単離し、蛍光活性化セルソーター(FACS)を使用して判定したCD11b<sup>+</sup>TAM、CD19<sup>+</sup>TAM、CD14<sup>+</sup>TAM、CD123<sup>+</sup>TAM、CD86<sup>+</sup>TAM、CD80<sup>+</sup>TAM、HLA-DC<sup>+</sup>TAM、B7-H1<sup>+</sup>TAM、B7-H4<sup>+</sup>TAMおよびB7-DC<sup>+</sup>TAMの比率をそれぞれ示す。

【図5A】IFN $\gamma$ でプライムした単球による抑制を本発明の分子が除去できることを示す。T細胞をIL-2(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5A；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5B)、TNF(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5C；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5D)またはIL-8(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5E；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5F)に対して染色した。

【図5B】IFN $\gamma$ でプライムした単球による抑制を本発明の分子が除去できることを示す。T細胞をIL-2(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5A；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5B)、TNF(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5C；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5D)またはIL-8(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5E；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5F)に対して染色した。

【図5C】IFN $\gamma$ でプライムした単球による抑制を本発明の分子が除去できることを示す。T細胞をIL-2(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5A；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5B)、TNF

10

20

30

40

50

(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5C；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5D)またはIL-8(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5E；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5F)に対して染色した。

【図5D】IFN $\gamma$ でプライムした単球による抑制を本発明の分子が除去できることを示す。T細胞をIL-2(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5A；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5B)、TNF(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5C；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5D)またはIL-8(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5E；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5F)に対して染色した。

【図5E】IFN $\gamma$ でプライムした単球による抑制を本発明の分子が除去できることを示す。T細胞をIL-2(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5A；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5B)、TNF(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5C；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5D)またはIL-8(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5E；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5F)に対して染色した。

【図5F】IFN $\gamma$ でプライムした単球による抑制を本発明の分子が除去できることを示す。T細胞をIL-2(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5A；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5B)、TNF(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5C；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5D)またはIL-8(CD4<sup>+</sup>T細胞、図5E；CD8<sup>+</sup>T細胞、図5F)に対して染色した。

【図6】抗体がヒトB7-H4抗原に結合する用量反応性を示す。配列番号33(抗B7-H4抗体2D1の軽鎖をコードする)、配列番号35、(抗B7-H4抗体2D1の重鎖をコードする)、配列番号37(抗B7-H4抗体2H9の軽鎖をコードする)および配列番号39(抗B7-H4抗体2H9の重鎖をコードする各配列を有するポリヌクレオチドの組換え発現により抗体を作製した(HC、重鎖；LC、軽鎖)。

【発明を実施するための形態】

【0053】

上記で論じたように、初発腫瘍には、酸素および栄養物を増殖している腫瘍細胞に送達できる自身の脈管構造が必要とされる。このため、腫瘍の進行には、腫瘍微小環境における腫瘍細胞と非悪性細胞との間の協調的なシグナル伝達が不可欠である(Kaler, P. et al. (2010)「Tumor Associated Macrophages Protect Colon Cancer Cells from TRAIL-Induced Apoptosis through IL-1-Dependent Stabilization of Snail in Tumor Cells」, PLoS ONE 5(7): e11700 1-13)。現在では、TAMのほか、好中球、線維芽細胞および他の細胞が腫瘍細胞と協同して腫瘍の血管新生を促進することが十分確認されている(Nucera, S. et al. (2011)「The Interplay Between Macrophages And Angiogenesis In Development, Tissue Injury And Regeneration」, Int. J. Dev. Biol. doi:10.1387/ijdb.103227sn; Zamarron, B. F. et al. (2011)「Dual Roles Of Immune Cells And Their Factors In Cancer Development And Progression」, Int. J. Biol. Sci. 7(5): 651-658; Liu, J. et al. (2011)「Tumor-Associated Macrophages Recruit CCR6+ Regulatory T Cells And Promote The Development Of Colorectal Cancer Via Enhancing CCL20 Production In Mice」, PLoS One. 6(4): e19495; Rigo, A. et al. (2010)「Macrophages May Promote Cancer Growth Via A GM-CSF/HB-EGF Paracrine Loop That Is Enhanced By CXCL12」, Molec. Cancer 9(273): 1-13; Lin, J. Y. et al. (2011)「Clinical Significance Of Tumor-Associated Macrophage Infiltration In Supraglottic Laryngeal Carcinoma」, Chin. J. Cancer 30(4): 280-286;

10

20

30

40

50

Vergati, M. (2011) 「The Consequence Of Immune Suppressive Cells In The Use Of Therapeutic Cancer Vaccines And Their Importance In Immune Monitoring,」 *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:182413).

【0054】

多くの腫瘍組織、たとえば、ヒト卵巣癌に見られる高レベルのB7-H4発現からは、免疫抑制の媒介においてB7-H4が果たす重要な役割が示唆される。B7-H4を発現するTAMは、腫瘍関連抗原特異的T細胞免疫を抑制することが明らかになっている (Kryczek, I. et al. (2006) 「B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma,」 *J. Exp. Med.* 203(4):871-881)。TAMにおけるB7-H4発現の強度は、腫瘍におけるTreg細胞数と著しく相関する。さらに、TAM上に発現したB7-H4は、患者の予後不良とも関連する (Kryczek, I. et al. (2006) 「B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressive Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma,」 *J. Exp. Med.* 203(4):871-881)。また、以前公表されたデータから、TAMは、Treg細胞の腫瘍への輸送、およびTAM自身を含む抗原提示細胞(APC)上のTreg細胞誘導性のB7-H4発現を媒介するケモカインCCL22を自然に産生することが示された (Kryczek, I. et al. (2006) 「Cutting Edge: Induction Of B7-H4 On APCs Through IL-10: Novel Suppressive Mode For Regulatory T Cells,」 *J. Immunol.* 177(1):40-44)。以上を総合すると、これらの知見から、B7-H4を発現するTAMが、腫瘍微小環境における免疫抑制に非常に重要な役割を果たし、腫瘍が免疫系による検出を回避すること(「免疫逃避」)を可能にすることが示唆される。B7-H4に免疫特異的に結合する、またはそのネイティブな受容体との相互作用を阻止することができる分子(抗B7-H4抗体など)は、B7-H4の遮断、その表面発現の調節、B7-H4によるシグナル伝達の調節またはTAMのB7-H4の欠乏により、癌の効果的な免疫療薬として新規な戦略となる。

【0055】

したがって本発明は、抗体(抗B7-H4抗体を含む)およびその抗原結合フラグメント、ならびにB7-H4(特にヒトB7-H4)に免疫特異的に結合することができる他の分子(対応する抗原/受容体に結合するタンパク質および融合タンパク質等)と、癌および他の疾患の診断および処置におけるその使用とに関する。本発明は特に、腫瘍増殖を遅延または予防する、腫瘍による抑制を阻害する、腫瘍を排除する、および/または、TAMの活性を欠乏させるかもしくは阻止してTAMによる免疫抑制を低下させるための、そうした分子の使用を対象とする。

【0056】

特に、本発明は、TAMを標的とし、様々な機能活性、たとえばB7-H4とその推定受容体(単数または複数)との間の相互作用の調節、B7-H4レベルの調節、および負のシグナル伝達の減弱および/またはB7-H4陽性細胞の欠乏についてスクリーニングするのに使用することができる抗B7-H4抗体を提供する。B7-H4抗体は、組換えDNA技術を用いれば、Fc受容体(FcR)結合活性をほとんどあるいはまったく有さない、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性の増強された、または補体依存性細胞傷害(CDC)活性の増強された、Fcドメインを含むように操作することができる。そうした組換え抗体を調節分子として使用して、腫瘍微小環境においてTAM上のB7-H4を減少させる、またはTAM上のB7-H4がT細胞または他の細胞上の抑制性受容体(単数または複数)と相互作用しないようにすることで、T細胞または他の機能的細胞をB7-

10

20

30

40

50

H4チェックポイント(「中断」)/抑制シグナル伝達から解放する。Fc機能性組換えB7-H4抗体は、T細胞または他の機能的細胞をチェックポイントから解放すると考えられる、B7-H4を発現するTAMを欠乏させるADCCまたはCDCを誘導するだけでなく、他の活性、たとえば抑制性細胞の表面のB7-H4の調節、またはB7-H4発現細胞の直接的な殺傷も誘導することができる。ADCC活性を有する抗B7-H4抗体は、B7-H4発現腫瘍細胞を欠乏させると同時にTAMによる免疫抑制を阻害するのに特に有用である場合がある。

## 【0057】

ヒトB7-H4の配列は下記(配列番号1)である。

## 【化1】

```
MASLGQILFW SIISIILILA GAIALIIGFG ISGKHSITVT TVASAGNIGE
DGILSCTFEP DIKLSDIVIQ WLKEGVLGLV HEFKEGKDEL SEQDEMFRGR
TAVFADQVIV GNASRLKLV QLTADAGTYKC YIITSKGKGN ANLEYKTGAF
SMPEVNVVDYN ASSETLRCEA PRWFPQPTVV WASQVDQGAN FSEVSNTSFE
LNSENVMTKV VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV TESEIKRRSH
LQLLNSKASL CVSSFFAISW ALLPLSPYLM LK
```

10

## 【0058】

マウスB7-H4の配列は下記(配列番号2)である。

## 【化2】

```
MASLGQIIFW SIINIILILA GAIALIIGFG ISGKHFITVT TFTSAGNIGE
DGTLSCTFEP DIKLNIGIVIQ WLKEGKGLV HEFKEGKDDL SQQHEMFRGR
TAVFADQVVV GNASRLKLV QLTADAGTYTC YIRTSKGKGN ANLEYKTGAF
SMPEINVDYN ASSESLRCEA PRWFPQPTVA WASQVDQGAN FSEVSNTSFE
LNSENVMTKV VSVLYNVTIN NTYSCMIEND IAKATGDIKV TDSEVKRRSQ
LQLLNSGPSP CVFSSAFVAG WALLSLSCCL MLR
```

20

## 【0059】

本明細書で使用する場合、ある分子が第2の分子に「免疫特異的に結合する」ことができるというのは、抗体に対応する抗原に対して抗体の特異性および親和性がそうした結合に示される場合である。抗体が抗原(特に、抗原B7-H4)の標的領域または立体構造(「エピトープ」)に「免疫特異的に結合する」ことができるとされるのは、そうした結合が免疫グロブリン分子の抗原認識部位に関係する場合である。特定の抗原に免疫特異的に結合する抗体は、たとえば、イムノアッセイ、BIACORE(登録商標)アッセイまたは当該技術分野において公知の他のアッセイで判定して、他の抗原が抗原認識部位により認識される配列または立体構造に類似性のある程度有する場合、より低い親和性を持つ他の抗原に結合することもあるが、まったく無関係の抗原には結合しないと考えられる。ただし、抗体(およびその抗原結合フラグメント)は、他の抗原と交差反応しないことが好ましい。また、抗体は、Fc領域など抗原認識部位を含まない分子の他の領域/ドメインの結合ドメインに基づき、免疫特異的でない形でFcR受容体など他の分子に結合することもある。分子が第2の分子に「生化学特異的に結合する」とされるのは、受容体に対応する結合リガンドに対して受容体の特異性および親和性がそうした結合に示される場合

30

40

## 【0060】

本発明の分子は、腫瘍中に存在するTAMの濃度「を欠乏させる」(すなわち、一部または完全に低下させる)、またはTAMの活性を阻止する能力を有する。こうした欠乏は、腫瘍中に存在する(またはリクルートされた)マクロファージの絶対数に関するものでもよいし、あるいは、活性マクロファージの濃度(すなわち、血管新生促進作用または腫瘍形成促進作用を媒介する能力を有する、腫瘍中または腫瘍にリクルートされたマクロフ

50

アージの濃度)に関するものでもよい。好ましくは、こうした欠乏により測定可能な免疫系の活性(たとえば、マクロファージ数、血管新生能、血管新生、マクロファージの生存率等)が少なくとも10%変化する、一層好ましくは、そうした活性が少なくとも50%変化する、またはそうした活性が少なくとも2倍、5倍、10倍、またはさらに一層好ましくは、少なくとも100倍変化する。

#### 【0061】

本明細書で使用する場合、「調節する」という用語は、ある作用または結果を変化させる能力に関する。特に、本発明は、B7-H4とそれに対応する受容体との間の結合を調節する、および/または、B7-H4と対応する受容体との結合の結果として起こるシグナル伝達を調節することができる分子(特にヒトB7-H4に免疫特異的に結合である抗体もしくはその抗原結合フラグメント、またはB7-H4またはそれに対応する受容体に生化学特異的に結合する分子)に関する。こうした調節は、部分的なものであってもよい(すなわち、B7-H4の活性を減弱させるが、消失させない)、あるいは、そうした活性を完全に消失させてもよい(たとえば、シグナル伝達を媒介するB7-H4の能力を中和する)。調節は、抗体結合後の受容体のインターナリゼーション、または標的細胞上の受容体発現の低下を含んでもよい。さらなる実施形態では、そうした調節は、B7-H4とそれに対応する受容体との間の相互作用を増強するか、さもなければ促進して、B7-H4と対応する受容体との結合またはシグナル伝達を行いやすくしてもよい。なおさらになる実施形態では、そうした調節は、誘導されたシグナル伝達の性質を変化させるように、B7-H4とそれに対応する受容体との間の相互作用の性質を変化させてもよい。たとえば、本発明の分子は、B7-H4に結合することにより、そうした分子が他の受容体に結合する能力を変化させ、それによりその全体の活性を変化させる。好ましくは、そうした調節により、測定可能な免疫系の活性が少なくとも10%変化する、一層好ましくは、そうした活性が少なくとも50%変化する、またはそうした活性が少なくとも2倍、5倍、10倍、またはさらに一層好ましくは、少なくとも100倍変化する。したがって、そうした調節の結果、B7-H4(たとえば、腫瘍細胞上の)がそれに対応する受容体に結合する能力を減弱させるか、または完全に消失させ、よってB7-H4により媒介される免疫反応の阻害を抑制(または防止)してもよい。そういうものとして、本発明は、癌、感染症および免疫反応の増強が望ましい他の疾患の処置剤を提供する。あるいは、B7-H4結合分子は、腫瘍の増殖、発生、生存率、活性等に直接影響し得る腫瘍特異的B7-H4(およびTAM)に対して調節活性を発揮してもよい。

#### 【0062】

本明細書で使用する場合、B7-H4により媒介される「共刺激」シグナルは、正の共刺激シグナル(たとえば、活性を増強するシグナル)および負の共刺激シグナル(たとえば、活性を阻害するシグナル)を包含する。

#### 【0063】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、「可変領域」抗原認識部位を有する免疫グロブリン分子を意味することを意図している。「可変領域」という用語は、免疫グロブリンのそうしたドメインと、抗体により広く共有されるドメイン(抗体のFcドメインなど)を区別することを意図している。可変領域は、その残基が抗原結合を担う「超可変領域」を含む。超可変領域は、「相補性決定領域」すなわち「CDR」のアミノ酸残基(すなわち、典型的には軽鎖可変ドメインの約24~34残基(L1)、50~56残基(L2)および89~97残基(L3)と、重鎖可変ドメインの約27~35残基(H1)、50~65残基(H2)および95~102残基(H3); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))および/または「超可変ループ」のアミノ酸残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの26~32(L1)残基、50~52(L2)残基および91~96(L3)残基と、重鎖可変ドメインの26~32(H1)、53~55(H2)および96~10

10

20

30

40

50

1 (H3); Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-917) を含む。「フレームワーク領域」すなわち「FR」残基は、本明細書で定義したような超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。抗体という用語は、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体(たとえば、Muyldermans et al., 2001, Trends Biochem. Sci. 26: 230; Nuttall et al., 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1: 253; Reichmann and Muyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231: 25; 国際公開第94/04678号パンフレットおよび国際公開第94/25591号パンフレット; 米国特許第6,005,079号明細書を参照)、一本鎖Fv(scFv)(たとえば、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) を参照)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、イントラボディおよび抗イディオタイプ(抗Id)抗体(たとえば、本発明の抗体に対する抗Idおよび抗-抗Id抗体)を含む。特に、そうした抗体は、任意の種類(たとえば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(たとえば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>およびIgA<sub>2</sub>)またはサブクラスの免疫グロブリン分子を含む。

10

#### 【0064】

20

本明細書で使用する場合、抗体の「抗原結合フラグメント」という用語は、抗体の相補性決定領域(「CDR」と、任意に抗体の「可変領域」抗原認識部位を含むフレームワーク残基とを含み、抗原に免疫特異的に結合する能力を示す抗体の1つまたは複数の部分をいう。そうしたフラグメントは、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv、一本鎖(scFv)およびこれらのミュータント、天然変異体、ならびに抗体の「可変領域」抗原認識部位と異種タンパク質(たとえば、トキシン、別の抗原の抗原認識部位、酵素、受容体または受容体リガンド等)とを含む融合タンパク質を含む。本明細書で使用する場合、「フラグメント」という用語は、少なくとも5個の連続するアミノ酸残基、少なくとも10個の連続するアミノ酸残基、少なくとも15個の連続するアミノ酸残基、少なくとも20個の連続するアミノ酸残基、少なくとも25個の連続するアミノ酸残基、少なくとも40個の連続するアミノ酸残基、少なくとも50個の連続するアミノ酸残基、少なくとも60個の連続するアミノ酸残基、少なくとも70個の連続するアミノ酸残基、少なくとも80個の連続するアミノ酸残基、少なくとも90個の連続するアミノ酸残基、少なくとも100個の連続するアミノ酸残基、少なくとも125個の連続するアミノ酸残基、少なくとも150個の連続するアミノ酸残基、少なくとも175個の連続するアミノ酸残基、少なくとも200個の連続するアミノ酸残基、または少なくとも250個の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドをいう。

30

#### 【0065】

ヒト抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体は、ヒトにおけるインビボでの使用に特に好ましいものであるが、しかしながら、マウス抗体または他の種の抗体も多くの用途(たとえば、インビトロまたはインサイツ検出アッセイ、インビボでの急性使用等)に有利に利用することができる。完全なヒト抗体は、ヒト被験者の治療処置に特に望ましい。

40

#### 【0066】

ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いたファージディスプレイ法など当該技術分野において公知の種々の方法により作製することができる(米国特許第4,444,887号明細書および同第4,716,111号明細書;ならびに国際公開第98/46645号パンフレット、国際公開第98/50433号パンフレット、国際公開第98/24893号パンフレット、国際公開第98/16654号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレット、国際公開第96/33735号パンフレットおよび国際公開第91/10741号パンフレットを参照)。ヒト抗体は、

50

機能的内因性免疫グロブリンを発現できないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて製造してもよい。たとえば、ヒト重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子の複合体は、ランダムにまたは相同組換えによりマウス胚性幹細胞に導入することができる。あるいは、ヒト重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域をマウス胚性幹細胞に導入してもよい。マウス重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別に非機能的にしても、あるいは同時に非機能的にしてもよい。特に、 $J_H$ 領域がホモ接合性に欠失すると、内因性抗体の産生が妨げられる。改変された胚性幹細胞は、増殖させ、胚盤胞に微量注入してキメラマウスを作製する。次いでキメラマウスを交配して、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を得る。このトランスジェニックマウスを、  
 10  
 選択された抗原、たとえば、本発明のポリペプチドの全部または一部で従来の方法を用いて免疫する。従来ハイブリドーマ技術を用いれば、免疫したトランスジェニックマウスから、抗原に対するモノクローナル抗体を得ることができる（たとえば、米国特許第5,916,771号明細書を参照）。トランスジェニックマウスが持つヒト免疫グロブリン導入遺伝子はB細胞分化において再編成し、その後クラススイッチおよび体細胞突然変異が起る。このように、こうした技術を用いて、治療上有用なIgG抗体、IgA抗体、IgM抗体およびIgE抗体を作製することができる。このヒト抗体の作製に関する技術の概要については、LonbergおよびHuszar（その全体を本明細書に援用する1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93）を参照されたい。この  
 20  
 ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体に関する技術の詳細な考察と、そうした抗体を作製するためのプロトコルに関しては、たとえば、本明細書にその全体を援用する国際公開第98/24893号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレットおよび国際公開第96/33735号パンフレット；ならびに米国特許第5,413,923号明細書、同第5,625,126号明細書、同第5,633,425号明細書、同第5,569,825号明細書、同第5,661,016号明細書、同第5,545,806号明細書、同第5,814,318号明細書および同第5,939,598号明細書を参照されたい。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) および Medarex (Princeton, NJ) などの会社は、上述の技術と同様の技術を用いて、  
 30  
 選択された抗原に対するヒト抗体の提供に従事している場合がある。

#### 【0067】

「キメラ抗体」は、非ヒト抗体に由来する可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有する抗体など、抗体の様々な部分が、異なる免疫グロブリン分子に由来する分子である。キメラ抗体を作製するための方法は、当該技術分野において公知である。たとえば、Morrison, 1985, Science 229: 1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4: 214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125: 191-202; ならびに米国特許第6,311,415号明細書、同第5,807,715号明細書、同第4,816,567号明細書および同第4,816,397号明細書を参照されたい。非ヒト種由来の1つまたは複数のCDRと、ヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを含むキメラ抗体は、当該技術分野において公知の種々の技術、たとえば、CDR移植法（  
 40  
 欧州特許第239,400号明細書；国際公開第91/09967号パンフレット；ならびに米国特許第5,225,539号明細書、同第5,530,101号明細書および同第5,585,089号明細書）、ベニヤリング（veneering）またはリサーフイング（resurfacing）（欧州特許第592,106号明細書；欧州特許第519,596号明細書；Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7: 805; および Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 969）、および鎖シャフリング（米国特許第5,565,332号明細書）を用いて作製することができる。

10

20

30

40

50

## 【0068】

本発明は特に、「ヒト化抗体」を対象とする(たとえば、欧州特許第239,400号明細書、欧州特許第592,106号明細書および欧州特許第519,596号明細書;国際公開第91/09967号パンフレットおよび国際公開第93/17105号パンフレット;米国特許第5,225,539号明細書、同第5,530,101号明細書、同第5,565,332号明細書、同第5,585,089号明細書、同第5,766,886号明細書および同第6,407,213号明細書;ならびにPadlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, *PNAS* 91:969-973; Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-1125; Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-360; Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-79; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684; Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55(23 Supp):5973s-5977s; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10; Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-973; Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann et al., 1988, *Nature* 332:323-329; および Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596を参照されたい)。本明細書で使用する場合、「ヒト化抗体」という用語は、ヒトフレームワーク領域および非ヒト(通常マウスまたはラット)免疫グロブリン由来の1つまたは複数のCDRを含む免疫グロブリンをいう。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンを「ドナー」と呼び、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンを「アクセプター」と呼ぶ。定常領域は存在しなくてもよいが、存在する場合、定常領域はヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85~90%、好ましくは約95%以上同一でなければならない。このため、おそらくCDRを除くヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。たとえば、ヒト化抗体は、典型的なキメラ抗体を包含しないと考えられる。たとえば、キメラ抗体の全可変領域は非ヒトであるためである。ドナー抗体は、「ヒト化」のプロセスにより「ヒト化」されてきたようである。得られるヒト化抗体が、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合すると予想されるからである。ほとんどの場合、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)であり、レシピエントの超可変領域残基が、非ヒト種(ドナー抗体)、たとえばマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類由来の、所望の特異性、親和性および能力を有する超可変領域残基で置き換えられている。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために施される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを実質的に全部含むもので、超可変領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンの超可変領域に対応し、FRの全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリン配列のFRである。また、ヒト化抗体は任意に、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはアミノ酸残基の置換、欠失または付加(すなわち、突然変異)の導入により変化したFc R I I Bポリペプチドに免疫特異的に結合するヒト免疫グロブリンのFcの少なくとも一部を含む。

## 【0069】

特に好ましい実施形態では、本発明の抗体および抗原結合フラグメントは、TAMに結

10

20

30

40

50

合し、それによりそうした細胞を欠乏させる、またはその活性を調節する能力により選択される。

【0070】

本発明の方法に使用する抗体は、単一特異性であってもよい。特に注目されるのは、二重特異性抗体、三重特異性抗体、またはB7-H4に加えて様々な免疫系標的に特異性を示すより大きい多重特異性抗体である。たとえば、そうした抗体は、B7-H4と、抗体が特定の細胞型または組織を標的とするのに重要な抗原(たとえば、処置している腫瘍の癌抗原に関連する抗原)との両方に結合することができる。別の実施形態では、そうした多重特異性抗体は、免疫調節を増強して、1つの分子において複数の作用機序、たとえばリガンドのブロッキングと直接腫瘍ターゲティングとを組み合わせるため、別の免疫調節経路に  
10  
関与する分子(受容体またはリガンド)、たとえばB7-H1、PD-1、CTLA4、TIM3、TIM4、OX40、CD40、GITR、4-1-BB、LIGHTまたはLAG3に結合する。たとえば、B7-H1はTAM上にも発現し、B7-H1とB7-H4との両方を標的とする二重特異性抗体は、TAMによる免疫抑制の障害を増強するほか、腫瘍によるB7-H1+およびB7-H4+免疫抑制の障害をも増強すると考えられる。さらに、PD-1とB7-H4との両方を標的とする二重特異性抗体も、TAMによる免疫抑制の障害、腫瘍による免疫抑制の障害(B7-H4経路およびPD-1経路の両方を介して)、エフェクターであるCTLの認識を高めるための消耗T細胞の再活性化、およびPD-1:B7-H4「ブリッジ」を介した、エフェクターCTLの腫瘍への再指令/ターゲティングを行うと考えられる。さらに、多重特異性抗体は、急性および  
20  
慢性免疫反応の両方の調節に特に関係し得るエフェクター分子、たとえばサイトカイン(たとえば、IL-7、IL-15、IL-12、IL-4、TGF-β、IL-10、IL-17、IFNγ、Flt3、Blys)およびケモカイン(たとえば、CCL21)に結合してもよい。同様に、B7-H4に結合できるインターナライズ抗体またはトキシコンジュゲート抗体を用いて、細胞内取り込みおよびB7-H4を発現する腫瘍細胞の殺傷の誘導を媒介してもよい。

【0071】

マクロファージは、HIV感染の初期段階に大きく関係していることが示されている(Carter, C. A. et al. (2008) 「Cell Biology Of HIV-1 Infection Of Macrophages,」 Ann. Rev. Microbiol. 62:425-443; Noursadeghi, M. et al. (2006) 「HIV-1 Infection Of Mononuclear Phagocytic Cells: The Case For Bacterial Innate Immune Deficiency In AIDS,」 Lancet Infect. Dis. 6:794-804)。したがって、B7-H4およびマクロファージ特異的マーカー、たとえばCD14、CD68、CD163、TLR2等)に結合する抗体(特にトキシコンジュゲートされている場合)は、HIV感染の予防に有用である。

【0072】

好ましいヒトアクセプターのフレームワーク配列をコードするDNA配列には、ヒト生殖系列VHセグメントVH1~18およびJH6と、ヒト生殖系列VLセグメントVK-A26およびJK4とに由来するFRセグメントがあるが、これに限定されるものではない。特定の実施形態では、通常の組換えDNA技術を用いて1つまたは複数のCDRをフレームワーク領域内に挿入する。フレームワーク領域は天然のフレームワーク領域でも、あるいはコンセンサスフレームワーク領域でもよく、好ましくはヒトフレームワーク領域である(たとえば、ヒトフレームワーク領域のリストに関するChothia et al., 1998, 「Structural Determinants In The Sequences Of Immunoglobulin Variable Domain,」 J. Mol. Biol. 278:457-479を参照)。

【0073】

10

20

30

40

50

本発明のヒト化抗体またはキメラ抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを実質的に全部含んでもよく、CDR領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)のCDR領域に対応し、フレームワーク領域の全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である。好ましくは、本発明の抗体は、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Fcの少なくとも一部をさらに含む。本発明の抗体の定常ドメインは、抗体の想定される機能、特に必須である場合があるエフェクター機能に関連して選択してもよい。いくつかの実施形態では、本発明の抗体の定常ドメインは、ヒトIgAドメイン、IgDドメイン、IgEドメイン、IgGドメインまたはIgMドメインである(または、それらを含む)。特定の実施形態では、本発明のヒト化抗体が治療用途を意図し、抗体エフェクター機能、たとえば抗体依存性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)活性を必要とする場合、ヒトIgG定常ドメイン、特にIgG1およびIgG3アイソタイプのヒトIgG定常ドメインを使用する。代替の実施形態では、本発明の抗体が治療目的を意図し、抗体エフェクター機能を必要とする場合、IgG2およびIgG4アイソタイプを使用する。本発明は、米国特許出願公開第2005/0037000号明細書および同第2005/0064514号明細書に開示されているアミノ酸修飾など、抗体エフェクター機能を変化させる1つまたは複数のアミノ酸修飾を含むFc定常ドメインを包含する。

#### 【0074】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、軽鎖と少なくとも重鎖の可変ドメインとの両方を含む。他の実施形態では、本発明の抗体は、重鎖のCH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域およびCH4領域の1つまたは複数を含んでもよい。抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEなど免疫グロブリンの任意のクラス、ならびにIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>およびIgG<sub>4</sub>などの任意のアイソタイプから選択することができる。いくつかの実施形態では、定常ドメインは補体結合定常ドメインであり、抗体が細胞障害活性を示し、クラスは典型的にはIgG<sub>1</sub>であることが望ましい。そうした細胞障害活性が望ましくない他の実施形態では、定常ドメインはIgG<sub>2</sub>クラスのものであってもよい。本発明の抗体は、2つ以上のクラスまたはアイソタイプ由来の配列を含んでもよく、所望のエフェクター機能を最適化する特定の定常ドメインを選択することは、当業者の技術の範囲である。

#### 【0075】

ヒト化抗体のフレームワーク領域およびCDR領域は、親配列に正確に一致する必要はなく、たとえば、少なくとも1つの残基の置換、挿入または欠失により、ドナーCDRまたはコンセンサスフレームワークに変異を誘発して、その部位のCDR残基またはフレームワーク残基がコンセンサスあるいはドナー抗体に一致しないようにしてもよい。ただし、そうした突然変異は、好ましくは大規模なものではない。通常、ヒト化抗体残基は、親フレームワーク領域(FR)配列およびCDR配列の残基と少なくとも75%、より頻繁には90%、最も好ましくは95%超一致する。ヒト化抗体は、当該技術分野において公知の様々な技術、以下に限定されるものではないが、CDR移植法(欧州特許第239,400号明細書;国際公開第91/09967号パンフレット;ならびに米国特許第5,225,539号明細書、同第5,530,101号明細書および同第5,585,089号明細書)、ペニヤリング(veneering)またはリサーフィニング(resurfacing)(欧州特許第592,106号明細書および欧州特許第519,596号明細書;Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6): 805-814; および Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 969-973)、鎖シャフリング(米国特許第5,565,332号明細書)および、たとえば、米国特許第6,407,213号明細書、同第5,766,886号明細書、同第5,585,089号明細書、国際公開第9317105号パンフレット、Tan et al.

, 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25, Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-60, Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-79, Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84, Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904, Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55(23 Supp):5973s-5977s, Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22, Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10, Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73, Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525, Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323および Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596に開示されている技術を用いて作製することができる。多くの場合、フレームワーク領域のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させる、好ましくは向上させるため、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換される。こうしたフレームワークの置換は、当該技術分野において周知の方法、たとえば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するための、CDR残基とフレームワーク残基との相互作用のモデル化、および特定の位置の特殊なフレームワーク残基を特定するための配列比較により確認される。(たとえば、Queen et al., 米国特許第5,585,089号明細書;米国特許出願公開第2004/0049014号明細書および同第2003/0229208号明細書;米国特許第6,350,861号明細書;同第6,180,370号明細書;同第5,693,762号明細書;同第5,693,761号明細書;同第5,585,089号明細書;および同第5,530,101号明細書、ならびにRiechmann et al., 1988, *Nature* 332:323を参照)。

#### 【0076】

本発明の抗体は、たとえば、インビトロ合成、組換えDNA作製および同種のものなど、ポリペプチドの製造に有用な当該技術分野において公知のどのような方法により作製してもよい。好ましくは、ヒト化抗体は、組換えDNA技術により作製する。本発明の抗体は、組換え免疫グロブリン発現技術を用いて作製してもよい。ヒト化抗体を含む免疫グロブリン分子の組換え体の作製については、米国特許第4,816,397号明細書(Boss et al.)、米国特許第6,331,415号明細書および同第4,816,567号明細書(どちらもCabilly et al.)、英国特許第2,188,638号明細書(Winter et al.)、および英国特許第2,209,757号明細書に記載されている。ヒト化免疫グロブリンを含む免疫グロブリンの組換え発現の技術は、Goeddel et al., *Gene Expression Technology Methods in Enzymology Vol. 185 Academic Press* (1991)、およびBorreback, *Antibody Engineering*, W. H. Freeman (1992)でも確認することができる。組換え抗体の生成、設計および発現に関する追加情報は、Mayforth, *Designing Antibodies*, Academic Press, San Diego (1993)で確認することができる。

#### 【0077】

本発明の組換えキメラ抗体を作製するための例示的方法は、a)従来の分子生物学法により、抗体重鎖をコードし発現する発現ベクターであって、マウス抗ヒトB7-H4モノクローナル抗体のCDRおよび可変領域を、ヒト免疫グロブリンに由来するFc領域に融合した発現ベクターを構築することで、キメラ抗体重鎖発現用のベクターを作製すること; b)従来の分子生物学法により、マウス抗ヒトB7-H4モノクローナル抗体の抗体軽鎖をコードし発現する発現ベクターを構築することで、キメラ抗体軽鎖発現用のベクターを作製すること; c)従来の分子生物学法により発現ベクターを宿主細胞に導入して、キメラ抗体発現用のトランスフェクトされた宿主細胞を作製すること; およびd)キメラ抗

10

20

30

40

50

体を産生するように、トランスフェクト細胞を従来の細胞培養技術により培養することを含んでもよい。

【0078】

本発明の組換えヒト化抗体を作製するための例示的方法は、a)従来の分子生物学法により、抗ヒトB7-H4重鎖をコードし発現する発現ベクターであって、ドナー抗体結合特異性の保持に必要とされているCDRおよび可変領域フレームワークの最小限の部分が非ヒト免疫グロブリン、たとえばマウス抗ヒトB7-H4モノクローナル抗体に由来し、抗体の残りの部分がヒト免疫グロブリンに由来する発現ベクターを構築することで、ヒト化抗体重鎖の発現用のベクターを作製すること；b)従来の分子生物学法により、抗体軽鎖をコードし発現する発現ベクターであって、ドナー抗体結合特異性の保持に必要とされるCDRおよび可変領域フレームワークの最小限の部分が非ヒト免疫グロブリン、たとえばマウス抗ヒトB7-H4モノクローナル抗体に由来し、抗体の残りの部分がヒト免疫グロブリンに由来する発現ベクターを構築することで、ヒト化抗体軽鎖発現用のベクターを作製すること；c)発現ベクターを従来の分子生物学法により宿主細胞に導入して、ヒト化抗体の発現用のトランスフェクトされた宿主細胞を作製すること；およびd)ヒト化抗体を産生するように、トランスフェクト細胞を従来の細胞培養技術により培養することを含んでもよい。

【0079】

どちらの例示的な方法に関しても、そうした各発現ベクターを宿主細胞にコトランスフェクトしてもよく、各発現ベクターは、様々な選択可能なマーカーを含んでもよいが、重鎖コード配列および軽鎖コード配列以外は、同一であることが好ましい。この手順により、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドが同等に発現される。あるいは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一のベクターを使用してもよい。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAもしくはゲノムDNAまたは両方を含んでもよい。本発明の組換え抗体の発現に使用する宿主細胞は、細菌細胞、たとえばエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) でも、あるいは一層好ましくは真核細胞 (たとえば、チャイニーズハムスターの卵巣 (CHO) 細胞またはHEK-293細胞) でもよい。発現ベクターの選択は宿主細胞の選択によって異なり、選択された宿主細胞において所望の発現および制御特性を有するように選択してもよい。使用し得る他の細胞株として、CHO-K1、NSOおよびPER.C6 (CruCell, Leiden, Netherlands) があるが、これに限定されるものではない。

【0080】

当業者によく知られている技術により、上記抗体のいずれかを用いて抗イディオタイプ抗体を生成してもよい (たとえば、Greenspan, N. S. et al. (1989) 「Idiotypes: Structure And Immunogenicity,」 FASEB J. 7: 437-444; および Nisimoff, A. (1991) 「Idiotypes: Concepts And Applications,」 J. Immunol. 147 (8): 2429-2438 を参照)。

【0081】

上記抗体のいずれかの結合特性は、必要に応じて、そうした所望の特性を示す変異体をスクリーニングすることによりさらに改良してもよい。たとえば、そうした抗体は、当該技術分野において公知の様々なファージディスプレイ法を用いて作製することができる。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインがそれをコードするポリヌクレオチド配列を持つファージ粒子の表面上に提示される。特定の実施形態では、そうしたファージを利用して、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー (たとえば、ヒトまたはマウス) から発現した抗原結合ドメイン、たとえばFabおよびFvまたはジスルフィド結合安定化Fvを提示させてもよい。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、たとえば、標識抗原、あるいは、固体表面もしくはビーズに結合または捕捉された抗原を用いて選択または特定することができる。こうした方法に使用されるファージは典型的にはfdおよびM13などの繊維状ファージである。抗原

10

20

30

40

50

結合ドメインは、ファージ遺伝子IIIタンパク質あるいはファージ遺伝子VIIタンパク質との組換え融合タンパク質として発現される。本発明の免疫グロブリンまたはそのフラグメントの製造に使用できるファージディスプレイ法の例として、Brinkman, U. et al. (1995)「Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments,」J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames, R. S. et al. (1995)「Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins,」J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough, C. A. et al. (1994)「Isolation Of Tumor Cell-Specific Single-Chain Fv From Immunized Mice Using Phage-Antibody Libraries And The Re-Construction Of Whole Antibodies From These Antibody Fragments,」Eur. J. Immunol., 24:952-958, 1994; Persic, L. et al. (1997)「An Integrated Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies Or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries,」Gene, 187:9-18; Burton, D. R. et al. (1994)「Human Antibodies From Combinatorial Libraries,」Adv. Immunol. 57:191-280; 国際公開第92/001047号パンフレット; 国際公開第90/02809号パンフレット; 国際公開第91/10737号パンフレット; 国際公開第92/01047号パンフレット; 国際公開第92/18619号パンフレット; 国際公開第93/11236号パンフレット; 国際公開第95/15982号パンフレット; 国際公開第95/20401号パンフレット; および米国特許第5,698,426号明細書; 同第5,223,409号明細書; 同第5,403,484号明細書; 同第5,580,717号明細書; 同第5,427,908号明細書; 同第5,750,753号明細書; 同第5,821,047号明細書; 同第5,571,698号明細書; 同第5,427,908号明細書; 同第5,516,637号明細書; 同第5,780,225号明細書; 同第5,658,727号明細書; 同第5,733,743号明細書および同第5,969,108号明細書に開示されているものがある。

#### 【0082】

上記の参考文献に記載されているように、ファージの選択後、抗体をコードする領域をファージから単離し、これを使用して全抗体、たとえばヒト化抗体または他の任意の所望のフラグメントを作製し、たとえば、以下に詳述するように所望の宿主、たとえば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌で発現させることができる。また、たとえば、当該技術分野において公知の方法により、Fabフラグメント、Fab'フラグメントおよびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを組換えにより作製する技術を利用してよい(たとえば国際公開第92/22324号パンフレット; Mullinax, R. L. et al. (1992)「Expression Of A Heterodimeric Fab Antibody Protein In One Cloning Step,」BioTechniques, 12(6):864-869; および Sawai et al. (1995)「Direct Production Of The Fab Fragment Derived From The Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction And cDNA Expression Vectors,」Am. J. Reprod. Immunol. 34:26-34; および Better, M. et al. (1988)「Escherichia coli Secretion Of

10

20

30

40

50

An Active Chimeric Antibody Fragment,」Science 240:1041-1043に開示されている方法)。一本鎖Fvおよび抗体の作製に使用できる技術の例として、米国特許第4,946,778号明細書および同第5,258,498号明細書;Huston,J.S.et al.(1991)「Protein Engineering Of Single-Chain Fv Analogs And Fusion Proteins,」Methods in Enzymology 203:46-88;Shu,L.et al.,「Secretion Of A Single-Gene-Encoded Immunoglobulin From Myeloma Cells,」Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)90:7995-7999;およびSkerra,A.et al.(1988)「Assembly Of A Functional Immunoglobulin Fv Fragment In Escherichia coli,」Science 240:1038-1040に記載されているものが挙げられる。

10

## 【0083】

ファージディスプレイ技術は、B7-H4に対する本発明の抗体の親和性を高めるために使用してもよい。この技術は、本発明のコンビナトリアル法に使用し得る高親和性抗体を得るのに有用であると考えられる。この技術は、親和性成熟と呼ばれ、変異誘発またはCDRウォーキング、およびそうした受容体もしくはリガンド(またはそれらの細胞外ドメイン)またはその抗原性フラグメントを用いた再選択を利用して、最初の抗体または親抗体と比較すると、より高い親和性で抗原に結合する抗体を特定する(たとえば、Glaser,S.M.et al.(1992)「Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System,」J.Immunol.149:3903-3913を参照)。単一のヌクレオチドではなく全コドンに変異を誘発すると、アミノ酸突然変異をセミランダムに導入したレパトリーが得られる。各々が単一のCDRに単一のアミノ酸変化を含み、かつCDR残基ごとに可能なそれぞれのアミノ酸置換を示す変異体を含む、変異体クローンのプールからなるライブラリーを構築してもよい。抗原に対する結合親和性が増加したミュータントは、固定化したミュータントを標識抗原と接触させることによりスクリーニングすることができる。当該技術分野において公知の任意のスクリーニング法を用いれば、抗原に対するアビディティーが向上したミュータント抗体を特定することができる(たとえば、ELISA)(たとえば、Wu,H.et al.(1998)「Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized Mab,」Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)95(11):6037-6042;Yelton,D.E.et al.(1995)「Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis,」J.Immunol.155:1994-2004を参照されたい)。軽鎖にランダム変異を導入するCDRウォーキングを使用してもよい(Schier et al.(1996)「Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site,」J.Mol.Biol.263:551-567を参照)。このように本発明は、ランダム変異誘発を使用して改良されたCDRを特定することを意図している。ファージディスプレイ技術を使用して、CDRの親和性を高め(または低め)てもよい。

20

30

40

## 【0084】

そうした親和性成熟を達成するための方法は、たとえば、Krause,J.C.et al.(2011)「An Insertion Mutation That Di

50

starts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody,」MBio. 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C. T. et al. (2010) 「Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas,」Int. J. Cancer 10.1002/ijc.25645; Hackel, B. J. et al. (2010) 「Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes,」J. Mol. Biol. 401(1): 84-96; Montgomery, D. L. et al. (2009) 「Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41,」MAbs 1(5): 462-474; Gustchina, E. et al. (2009) 「Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth,」Virology 393(1): 112-119; Finlay, W. J. et al. (2009) 「Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions,」J. Mol. Biol. 388(3): 541-558; Bostrom, J. et al. (2009) 「Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development,」Methods Mol. Biol. 525: 353-376; Steidl, S. et al. (2008) 「In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification,」Mol. Immunol. 46(1): 135-144; および Barderas, R. et al. (2008) 「Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26): 9029-9034に記載されている。

【0085】

本発明は特に、上記抗体およびその抗原結合フラグメントのいずれかの「誘導体」の作製および使用を意図している。

【0086】

「誘導体」という用語は、抗原に免疫特異的に結合するが、「親」（または野生型）分子に対して1、2、3、4、5またはそれを上回るアミノ酸の置換、付加、欠失または修飾を含む抗体またはその抗原結合フラグメントをいう。そうしたアミノ酸の置換または付加は、天然の（すなわち、DNAによりコードされた）アミノ酸残基を導入しても、あるいは非天然のアミノ酸残基を導入してもよい。そうしたアミノ酸は、グリコシル化しても（たとえば、マンノース、2-N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコース、グルコース、シアル酸、5-N-アセチルノイラミン酸、5-グリコルノイラミン酸等の量

を変化させても)、アセチル化しても、ペグ化しても、リン酸化しても、アミド化しても、既知の保護基/ブロッキング基により誘導体化しても、タンパク質分解切断しても、細胞リガンドまたは他のタンパク質に連結するなどしてもよい。いくつかの実施形態では、変化させた糖鎖修飾により、抗体の可溶化、細胞内輸送および抗体の分泌の促進、抗体形成の促進、立体構造の安定性および抗体のエフェクター機能のうち1つまたは複数が調節される。特定の実施形態では、変化させた糖鎖修飾により、糖鎖修飾がない抗体と比較して抗体のエフェクター機能が增強される。抗体のエフェクター機能を変化させる糖鎖修飾は、当該技術分野において周知である(たとえば、Shields, R. L. et al. (2002)「Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcγ<sub>3</sub> RIIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity.」, J. Biol. Chem. 277(30):26733-26740; Davies J. et al. (2001)「Expression Of GnTIIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through Higher Affinity For Fcγ<sub>3</sub> RIIII,」Biotechnology & Bioengineering 74(4):288-294を参照)。

糖鎖量を変化させる方法は当業者に公知であり、たとえば、Wallick, S. C. et al. (1988)「Glycosylation Of A VH Residue Of A Monoclonal Antibody Against Alpha(1-3-6) Dextran Increases Its Affinity For Antigen,」J. Exp. Med. 168(3):1099-1109; Tao, M. H. et al. (1989)「Studies Of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human IgG. Role Of Carbohydrate In The Structure And Effector Functions Mediated By The Human IgG Constant Region,」J. Immunol. 143(8):2595-2601; Routledge, E. G. et al. (1995)「The Effect Of Aglycosylation On The Immunogenicity Of A Humanized Therapeutic CD3 Monoclonal Antibody,」Transplantation 60(8):847-53; Elliott, S. et al. (2003)「Enhancement Of Therapeutic Protein In Vivo Activities Through Glycoengineering,」Nature Biotechnol. 21:414-21; Shields, R. L. et al. (2002)「Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fcγ<sub>3</sub> RIIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity.」, J. Biol. Chem. 277(30):26733-26740)を参照されたい。

#### 【0087】

いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は誘導体である。こうしたヒト化抗体は、1つまたは複数の非ヒトCDRにアミノ酸残基の置換、欠失または付加を含む。ヒト化抗体誘導体は、非誘導体ヒト化抗体と比較すると、結合が実質的に同じでも、結合がより強くて、あるいは結合がより弱くてよい。特定の実施形態では、CDRの1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されている(すなわち、変異している)。

#### 【0088】

10

20

30

40

50

誘導体抗体または抗体フラグメントは、以下に限定されるものではないが、特異的な化学的切断、アセチル化、製剤、ツニカマイシンの代謝合成等の、当業者に公知の技術を用いて化学修飾により修飾してもよい。一実施形態では、抗体誘導体は、親抗体と類似または同一の機能を有する。別の実施形態では、抗体誘導体は、親抗体と比較して活性の変化を示す。たとえば、誘導体抗体（またはそのフラグメント）は親抗体より、そのエピトープに密接に結合してもよいし、あるいはタンパク質分解に対する耐性が強くてもよい。

【0089】

誘導体化抗体の置換、付加または欠失は抗体のFc領域にあってもよく、それにより1つまたは複数のFcRに対する抗体の結合親和性の改変に貢献することができる。抗体を修飾して1つまたは複数のFcRに対する結合を改変する方法は、当該技術分野において公知であり、たとえば、国際公開第04/029207号パンフレット、国際公開第04/029092号パンフレット、国際公開第04/028564号パンフレット、国際公開第99/58572号パンフレット、国際公開第99/51642号パンフレット、国際公開第98/23289号パンフレット、国際公開第89/07142号パンフレット、国際公開第88/07089号パンフレット、ならびに米国特許第5,843,597号明細書および同第5,642,821号明細書を参照されたい。いくつかの実施形態では、本発明は、Fc領域が欠失されている抗体（たとえば、FabまたはF(ab)<sub>2</sub>等）、またはFc受容体（FcR）結合活性の低下を示すかまたはFc受容体（FcR）結合活性を示さないように修飾されている抗体、あるいは、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性または補体依存性細胞傷害（CDC）活性の増強を示す抗体を包含する。いくつかの実施形態では、本発明は、活性化FcR、たとえば、FcRIIIIAに対する親和性が変化した抗体を包含する。好ましくは、そうした修飾は、Fcのエフェクター機能も変化させる。Fcのエフェクター機能に影響を与える修飾は、当該技術分野において周知である（米国特許第6,194,551号明細書および国際公開第00/42072号パンフレットを参照）。特定の一実施形態では、Fc領域の修飾の結果、抗体は、抗体のエフェクター機能の変化、他のFc受容体（たとえば、Fc活性化受容体）に対する結合の変化、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性の変化、C1q結合活性の変化、補体依存性細胞傷害活性（CDC）の変化、食作用活性、またはこれらの任意の組み合わせを有する。

【0090】

誘導体化抗体を用いて、哺乳動物、好ましくはヒトにおける親抗体の半減期（たとえば、血清中半減期）を変化させてもよい。好ましくは、そうした変化の結果、半減期は15日を超える、好ましくは20日を超える、25日を超える、30日を超える、35日を超える、40日を超える、45日を超える、2ヶ月を超える、3ヶ月を超える、4ヶ月を超える、または5ヶ月を超える。哺乳動物、好ましくはヒトにおける、本発明のヒト化抗体またはそのフラグメントの半減期の延長の結果、哺乳動物における前記抗体または抗体フラグメントの血清中力価が上昇し、したがって、前記抗体または抗体フラグメントの投与頻度が減少する、および/または、投与される前記抗体または抗体フラグメントの濃度が低下する。インビボ半減期を延長した抗体またはそのフラグメントは、当業者に公知の技術により作製することができる。たとえば、インビボ半減期を延長した抗体またはそのフラグメントは、FcドメインとFcRn受容体との間の相互作用に参与すると判定されたアミノ酸残基を修飾する（たとえば、置換、欠失または付加することにより作製することができる。本発明のヒト化抗体は、生物学的半減期を延長するように操作してもよい（たとえば米国特許第6,277,375号明細書を参照）。たとえば、本発明のヒト化抗体は、Fc-ヒンジドメインにおいてインビボまたは血清中半減期を延長するように操作してもよい。

【0091】

インビボ半減期を延長した抗体またはそのフラグメントは、前記抗体または抗体フラグメントにポリマー分子、たとえば高分子量ポリエチレングリコール（PEG）を結合することにより作製することができる。PEGは、多機能リンカーを用いてあるいは用いずに

10

20

30

40

50

、前記抗体または抗体フラグメントのN末端またはC末端にあるいはリジン残基上にある - アミノ基を介して、PEGを部位特異的にコンジュゲートすることにより前記抗体または抗体フラグメントに結合することができる。生物活性の低下を最小限にとどめる直鎖または分岐ポリマー誘導體化を使用する。コンジュゲーションの程度は、SDS-PAGEおよび質量分析法により詳細にモニターして、PEG分子の抗体への適切なコンジュゲーションを確かなものにする。未反応PEGは、たとえば、サイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーにより抗体-PEGコンジュゲートから分離することができる。

【0092】

また、本発明の抗体は、実質的に免疫原性反応を伴わない、哺乳動物の循環系に注入してもよい組成物を得るため、Davis et al. (米国特許第4,179,337号明細書を参照)に記載された方法およびカップリング剤により修飾してもよい。

10

【0093】

本発明は、本発明のヒト化抗体のフレームワーク残基の修飾を包含する。フレームワーク領域の残基は、抗原結合を変化させる、好ましくは向上させるため、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換してもよい。こうしたフレームワークの置換は、当該技術分野において周知の方法、たとえば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するための、CDR残基とフレームワーク残基との相互作用のモデル化、および特定の位置の特殊なフレームワーク残基を特定するための配列比較により確認される。(たとえば、米国特許第5,585,089号明細書;およびRiechmann, L. et al. (1988)「Reshaping Human Antibodies For Therapy,」Nature 332:323-327を参照)。

20

【0094】

本発明はまた、異種分子(すなわち、無関係の分子)に組換え技術で融合させたまたは化学的にコンジュゲートした(共有結合および非共有結合の両方)抗ヒトB7-H4抗体(一層好ましくは、ヒト化抗体)およびその抗原結合フラグメントも包含する。融合は、必ずしも直接でなくてもよく、リンカー配列を介して行ってもよい。

【0095】

一実施形態では、そうした異種分子は、少なくとも10個のアミノ酸、少なくとも20個のアミノ酸、少なくとも30個のアミノ酸、少なくとも40個のアミノ酸、少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも60個のアミノ酸、少なくとも70個のアミノ酸、少なくとも80個のアミノ酸、少なくとも90個のアミノ酸または少なくとも100個のアミノ酸を有するポリペプチドである。あるいは、そうした異種分子は、酵素でも、ホルモンでも、細胞表面受容体でも、薬剤部分、たとえば、マクロファージ特異的標的化試薬(細胞内カルボキシルエステラーゼ、hCE1(Needham, L. A. et al. (2011)「Drug Targeting To Monocytes And Macrophages Using Esterase-Sensitive Chemical Motif,」J. Pharmacol. Exp. Ther. DOI:10.1124/jpet.111.183640)、キチンおよびキトサン(Muzzarelli, R. A. (2010)「Chitins And Chitosans As Immunoadjuvants And Non-Allergenic Drug Carriers,」Mar Drugs 8(2):292-312)、ガラクトシル化低密度リポタンパク質(Wu, F. et al. (009)「Galactosylated LDL Nanoparticles: A Novel Targeting Delivery System To Deliver Antigen To Macrophages And Enhance Antigen Specific T Cell Responses,」Molec. Pharm. 6(5):1506-1517)、N-ホルミル-Met-Leu-Phe(fMLF)、マクロファージ特異的化学誘引物質(Wan, L. et al. (2008)「Optimizing Size And Copy Number For PEG-Fmlf(N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine) Nanocarrier

30

40

50

Uptake By Macrophages,」Bioconj. Chem. 19 (1): 28 - 38)、マレイル化もしくはマンノシル化タンパク質、たとえばマレイル化アルブミン (Anatelli, F. et al. (2006)「Macrophage-Targeted Photosensitizer Conjugate Delivered By Intratumoral Injection,」Mol Pharm. 3 (6): 654 - 664; Bansal, P. et al. (1999)「MHC Class I-Restricted Presentation Of Maleylated Protein Binding To Scavenger Receptors,」J. Immunol. 162 (8): 4430 - 4437); さらに Mukhopadhyay, A. et al. (2003)「Intracellular Delivery Of Drugs To Macrophages,」Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 84: 183 - 209を参照)、トキシン (たとえばアプリン、リシンA、シュードモナス (Pseudomonas) 外毒素 (すなわち、PE-40)、ジフテリア毒素、リシン、ゲロニンもしくはアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質)、タンパク質 (たとえば腫瘍壊死因子、インターフェロン (たとえば、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン)、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子またはアポトーシス剤 (たとえば、腫瘍壊死因子- $\alpha$ 、腫瘍壊死因子- $\beta$ ))、生物学的応答調節剤 (たとえば、リンホカイン (たとえば、インターロイキン-1 (「IL-1」)、インターロイキン-2 (「IL-2」)、インターロイキン-6 (「IL-6」))、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G-CSF」) もしくはマクロファージコロニー刺激因子 (「M-CSF」)、または増殖因子 (たとえば、成長ホルモン (「GH」))、細胞毒 (たとえば、細胞増殖抑制剤もしくは殺細胞薬、たとえばパクリタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにこれらのアナログまたはホモログ)、代謝拮抗薬 (たとえば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤 (たとえば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、BiCNU (登録商標) (カルムスチン; BSNU) およびロムスチン (CCNU)、シクロトスファミド、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびシスジクロロジアミン白金 (II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン (たとえば、ダウノルピシン (以前のダウノマイシン) およびドキシソルピシン)、抗生物質 (たとえば、ダクチノマイシン (以前のアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン (AMC))、または有糸分裂阻害薬 (たとえば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン) でもよい。

【0096】

別の実施形態では、米国特許第4,676,980号明細書でSegalにより記載されたように、本発明の分子を第2の抗体にコンジュゲートして抗体のヘテロコンジュゲートを形成してもよい。そうしたヘテロコンジュゲート抗体はさらに、ハプテン (たとえばフルオレセイン等) に結合しても、あるいは細胞マーカー (たとえば、4-1-BB、B7-H1、PD-1、CD4、CD8、CD14、CD25、CD27、CD40、CD68、CD163、CTLA4、GITR、LAG-3、OX40、TIM3、TIM4、TLR2、LIGHT、等) に結合しても、あるいはサイトカイン (たとえば、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、TGF- $\beta$ 、IFN $\gamma$ 、Flt3、Bly s) に結合しても、あるいはケモカイン (たとえば、CCL21) 等に結合してもよい。

【0097】

融合タンパク質のFc部分は、たとえばエフェクター機能、半減期の制御、組織への到達性の向上のため、安定性などの生物物理学的特徴の増強のため、さらに製造効率の改善（および費用削減）のため、アイソタイプまたはサブクラスが異なってもよいし、キメラまたはハイブリッドでもよいし、および/または、修飾してもよい。開示された融合タンパク質の構築に有用な多くの修飾、およびそれを行う方法については当該技術分野において公知であり、たとえばMueller, J. P. et al. (1997) 「Humanized Porcine VCAM-Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric IgG2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells,」Mol. Immun. 34(6):441-452、Swann, P. G. (2008) 「Considerations For The Development Of Therapeutic Monoclonal Antibodies,」Curr. Opin. Immun. 20:493-499(2008)、およびPresta, L. G. (2008) 「Molecular Engineering And Design Of Therapeutic Antibodies,」Curr. Opin. Immun. 20:460-470を参照されたい。いくつかの実施形態では、Fc領域は天然のIgG1、IgG2またはIgG4のFc領域である。いくつかの実施形態では、Fc領域はハイブリッド、たとえばIgG2/IgG4のFc定常領域からなるキメラである。Fc領域の修飾には、Fc受容体および補体への結合を防止するように修飾されたIgG4、1つまたは複数のFc受容体への結合を改善するように修飾されたIgG1、エフェクター機能を最小限に抑えるように修飾されたIgG1（アミノ酸変化）、グリカンを変化させた/含まないIgG1（典型的には発現宿主の変更による）、およびFcRnへのpH依存性結合を変化させたIgG1があるが、これに限定されるものではない。Fc領域は全ヒンジ領域を含んでも、あるいは全ヒンジ領域より小さい領域を含んでもよい。

【0098】

非ホジキンリンパ腫またはワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症用のリツキシマブ（CD20に対するキメラマウス/ヒトIgG1モノクローナル抗体）で処置した患者の治療結果は、ヒトIgG1のFcドメインに対する固有の親和性が異なるFc受容体の対立遺伝子変異体の個々の発現に相関した。特に、低親和性活性化Fc受容体CD16A（FcRIIA）の高親和性対立遺伝子を持つ患者は、より高い反応率を示し、非ホジキンリンパ腫の場合、無増悪生存期間が改善した。別の実施形態では、Fcドメインは、低親和性抑制性Fc受容体CD32B（FcRIIB）への結合を抑え、低親和性活性化Fc受容体CD16A（FcRIIA）への野生型レベルの結合を保持するまたはその結合を増強する、1つまたは複数のアミノ酸の挿入、欠失または置換を含んでもよい。

【0099】

別の実施形態は、FcRへの結合を抑制してあるIgG2-4ハイブリッドおよびIgG4ミュータントを含み、それらの半減期が延長される。代表的なIgG2-4ハイブリッドおよびIgG4ミュータントについては、Angal, S. et al. (1993) 「A Single Amino Acid Substitution Abolishes The Heterogeneity Of Chimeric Mouse/Human(IgG4) Antibody,」Molec. Immunol. 30(1):105-108; Mueller, J. P. et al. (1997) 「Humanized Porcine VCAM-Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric IgG2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells,」Mol. Immun. 34(6):441-452; および米国特許第6,982,323号明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、IgG1ドメインおよび/またはIgG2ドメインを修

10

20

30

40

50

飾する。たとえば、Angal, S. et al. は、セリン241をプロリンで置換したIgG1変異体およびIgG2変異体について記載している。

【0100】

好ましい実施形態では、Fcドメインは、CD16Aへの結合を増強するアミノ酸の挿入、欠失または置換を含む。ヒトIgG1のFcドメインにおいてCD16Aへの結合を増加させ、CD32Bへの結合を減少させる多くの置換が当該技術分野において公知であり、Stavenshagen, J. B. et al. (2007) 「Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhance Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors,」Cancer Res. 57(18): 8882-8890に記載されている。CD32Bへの結合を減少させる、および/または、CD16Aへの結合を増加させるヒトIgG1 Fcドメインの例示的な変異体として、F243L置換、R929P置換、Y300L置換、V305I置換またはP296L置換が挙げられる。これらのアミノ酸置換は、ヒトIgG1 Fcドメインにどのような組み合わせで存在してもよい。一実施形態では、ヒトIgG1 Fcドメイン変異体は、F243L置換、R929P置換およびY300L置換を含む。別の実施形態では、ヒトIgG1 Fcドメイン変異体は、F243L置換、R929P置換、Y300L置換、V305I置換およびP296L置換を含む。別の実施形態では、ヒトIgG1 Fcドメイン変異体がN297Q置換を含むため、この突然変異は、FcR結合を消失させる。

【0101】

そうした治療部分を抗体にコンジュゲートする技術は、よく知られている。たとえば、Arnon et al., 「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeld et al. (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., 「Antibodies For Drug Delivery」、in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), 1985, pp. 475-506); 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; および Thorpe et al. (1982) 「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates,」Immunol. Rev. 62: 119-158を参照されたい。

【0102】

精製しやすくするため、本発明の分子のいずれかをペプチドなどのマーカー配列に融合してもよい。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、ヘキサ-ヒスチジンペプチド、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエプトープに相当するヘマグルチニン「HA」タグ(Wilson, I. A. et al. (1984) 「The S

10

20

30

40

50

structure Of An Antigenic Determinant In A Protein,」Cell, 37:767-778)および「flag」タグ(Knappik, A. et al. (1994)「An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments,」Biotechniques 17(4):754-761)である。

【0103】

本発明はさらに、診断薬もしくは治療薬、または血清中半減期が延長されると望ましい別の分子にコンジュゲートした抗体またはその抗原結合フラグメントも包含する。この抗体は、たとえば、臨床試験手順の一部として疾患、障害または感染症の発症または進行をモニターするため診断(インビボ、インサイツまたはインビトロでの)に使用して、たとえば、特定の処置レジメンの有効性を判定しても、あるいは特定の治療に反応する患者(たとえば浸潤性TAMが高レベルの患者、特に高レベルのB7-H4を発現する患者)を選択してもよい。

10

【0104】

特に、ヒトの大部分の癌は、癌細胞からなる充実性腫瘍が腫瘍の生存、増殖および進行に必要な支持構造群(間質)と関わり合うと増殖する。腫瘍間質の主な成分は、線維芽細胞、新生血管および免疫細胞、たとえばマクロファージである。そうした腫瘍関連マクロファージは、腫瘍間質の最も重要な成分であるだけでなく、腫瘍関連抗原(TAA)特異的T細胞免疫の開始および維持に極めて重要な抗原提示細胞(APC)を含む。

20

【0105】

腫瘍環境のマクロファージは、腫瘍内に存在し、かつ充実性腫瘍のAPCの代表的な亜集団である他のAPC、たとえば樹状細胞(DC)より著しく多い(Kryczek, I. et al. (2006)「B7-H4 Expression Identifies A Novel Suppressiv Macrophage Population In Human Ovarian Carcinoma,」J. Exper. Med. 203(4):871-881)。腫瘍環境のB7-H4<sup>+</sup>のマクロファージは、T細胞活性化を著しく抑制する。B7-H4<sup>-</sup>マクロファージは、インビトロでIL-10およびIL-6によりB7-H4<sup>+</sup>マクロファージに変換することができる(Kryczek, I. et al. (2006)「Cutting Edge: Induction Of B7-H4 On APCs Through IL-10: Novel Suppressiv Mode For Regulatory T Cells,」J. Immunol. 177(1):40-44)。卵巣腫瘍環境では高レベルのIL-10およびIL-6が認められるため、そうしたサイトカインのB7-H4発現を誘導する能力が、悪性の腫瘍に見られるT細胞活性化の抑制の増加に関係していると考えられる。重要な点として、そうした抑制性活性が、B7-H4発現を阻止する働きをする2つの樹状細胞分化サイトカインGM-CSFまたはIL-4により低減され得る。また、そうした抑制性活性は、本発明の組成物によるB7-H4活性の阻止によっても低減され得る。

30

40

【0106】

腫瘍免疫における樹状細胞の表現型および役割は研究されてはきたものの、そうした研究からは、癌患者の腫瘍環境内でB7-H4<sup>+</sup>マクロファージおよびB7-H4<sup>-</sup>マクロファージが果たす役割が解明されていない。本発明の抗体は、患者の腫瘍の臨床予後を評価する手段としてB7-H4<sup>+</sup>マクロファージおよびB7-H4<sup>-</sup>マクロファージの役割の解明に有用である(すなわち、総マクロファージに対するB7-H4<sup>+</sup>マクロファージの程度は、腫瘍悪性度および癌の重症度に相関する)。そうした評価は、総マクロファージに対するB7-H1<sup>+</sup>マクロファージの程度の判定と併用すると特に有用である。腫瘍におけるB7-H1の発現および腫瘍におけるB7-H4陽性発現は、癌による死と独立に関連しているためである(Krambeck, A. E. et al. (2006)「B

50

7 - H 4 Expression In Renal Cell Carcinoma And Tumor Vasculature: Associations With Cancer Progression And Survival, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 103 (2): 10391 - 10396).  
【0107】

抗体を検出可能な物質に結合することで検出を行いやすくすることができる。検出可能な物質の例として、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性物質、ポジトロン放出金属および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。検出可能な物質は、当該技術分野において公知の技術を用いて抗体に直接結合またはコンジュゲートしても、あるいは、中間体（たとえば、当該技術分野において公知のリンカー）を介して間接的に結合またはコンジュゲートしてもよい。たとえば、本発明による診断で使用される抗体にコンジュゲートできる金属イオンに関する米国特許第4,741,900号明細書を参照されたい。そうした診断および検出は、以下に限定されるものではないが、様々な酵素、以下に限定されるものではないが、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼなどの酵素；以下に限定されるものではないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどの補欠分子族複合体；以下に限定されるものではないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンなどの蛍光材料；以下に限定されるものではないが、ルミノールなどの発光材料；以下に限定されるものではないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンなどの生物発光材料；以下に限定されるものではないが、ビスマス ( $^{213}\text{Bi}$ )、炭素 ( $^{14}\text{C}$ )、クロム ( $^{51}\text{Cr}$ )、コバルト ( $^{57}\text{Co}$ )、フッ素 ( $^{18}\text{F}$ )、ガドリニウム ( $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ )、ガリウム ( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、ゲルマニウム ( $^{68}\text{Ge}$ )、ホルミウム ( $^{166}\text{Ho}$ )、インジウム ( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、ヨウ素 ( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、ランタン ( $^{140}\text{La}$ )、ルテチウム ( $^{177}\text{Lu}$ )、マンガン ( $^{54}\text{Mn}$ )、モリブデン ( $^{99}\text{Mo}$ )、パラジウム ( $^{103}\text{Pd}$ )、リン ( $^{32}\text{P}$ )、プラセオジウム ( $^{142}\text{Pr}$ )、プロメチウム ( $^{149}\text{Pm}$ )、レニウム ( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ )、ロジウム ( $^{105}\text{Rh}$ )、ルテミウム ( $^{97}\text{Ru}$ )、サマリウム ( $^{153}\text{Sm}$ )、スカンジウム ( $^{47}\text{Sc}$ )、セレン ( $^{75}\text{Se}$ )、ストロンチウム ( $^{85}\text{Sr}$ )、硫黄 ( $^{35}\text{S}$ )、テクネチウム ( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム ( $^{201}\text{Tl}$ )、スズ ( $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ )、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、キセノン ( $^{133}\text{Xe}$ )、イッテルビウム ( $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ )、イットリウム ( $^{90}\text{Y}$ )、亜鉛 ( $^{65}\text{Zn}$ ) などの放射性物質；様々なポジトロン断層法を用いたポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンなどの検出可能な物質に抗体を結合することにより達成することができる。

【0108】

本発明の分子は、固体支持体であって、標的抗原、または支持体に固定化した標的抗原に本発明の抗体または抗原結合フラグメントへの結合を介して結合することができる他の分子のイムノアッセイまたは精製に特に有用な固体支持体に結合してもよい。そうした固体支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンがあるが、これに限定されるものではない。

【0109】

本発明は、任意のそうした抗体、融合タンパク質またはフラグメントをコードする核酸分子 (DNA または RNA) のほか、そうした核酸分子を送達または複製することができるベクター分子 (たとえばプラスミド) をさらに含む。核酸は、一本鎖でも、二本鎖でもよく、一本鎖部分と二本鎖部分の両方を含んで構わない。

【0110】

A. 本発明の好ましい B7-H4 モジュレーター

本発明の B7-H4 モジュレーターは、マクロファージの表面に配置された B7-H4 (特にそうした B7-H4 が内因性濃度で発現する場合) の活性を調節する十分な能力を

10

20

30

40

50

有する免疫特異的または生化学特異的 B 7 - H 4 結合分子（特に、抗 B 7 - H 4 抗体および抗原結合フラグメント）を含む。「内因性濃度」という用語は、分子が細胞（正常細胞でも、癌細胞でも、あるいは感染細胞でもよい）に本来（すなわち、発現ベクターまたは組換えプロモーターの非存在下で）発現するレベルをいう。

【 0 1 1 1 】

一実施形態では、そうした調節は、当該モジュレーターの本 B 7 - H 4（好ましくは内因性に発現および配置される）への結合により引き起こされる。代替の実施形態では、そうした調節は、内因性に発現および配置された B 7 - H 4 の結合を増強するか、さもなければ促進することを含む。

【 0 1 1 2 】

( 1 ) 好ましい抗ヒト B 7 - H 4 抗体およびその C D R

本発明によれば、そうした分子は、ヒト B 7 - H 4 に免疫特異的な抗体を産生する分子のハイブリドーマ系をスクリーニングし、次いでそうした系の中で調節活性（たとえば、中和活性、促進活性、変化したシグナルの伝達活性等）を示す分子を任意にスクリーニングすることにより作製することができる。本発明は特に、抗ヒト B 7 - H 4 クローン： 2 D 1、 2 E 1 1 および 2 H 9 を提供する。

【 0 1 1 3 】

抗ヒト B 7 - H 4 クローンに発現する抗体の配列を決定して、その可変ドメインを明らかにした。いくつかのクローンが変異（「 V a r 」）軽鎖または重鎖を有することが分かった。以下に各 C D R 配列を太字および下線で示す。

抗ヒト B 7 - H 4 クローン 2 D 1

軽鎖可変領域：

【 化 3 】

DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSSHSLV HSNGNTYLHW YLQKPGQSPN  
LLIYIVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP  
PTFGAGTKLE LK (配列番号:3)

重鎖可変領域：

【 化 4 】

EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFN SHGMSWVRQT PEKRLDWVAT  
ISDGGTYTY PVNVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSHLKSED TAMYYCARDG  
GGGAYWGQGT LVTVSA (配列番号:4)

抗ヒト B 7 - H 4 クローン 2 E 1 1

軽鎖可変領域：

【 化 5 】

DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT VSCKSSQSL YSTNQRTYLA WFQQKPGQSP  
KLLIYWASTR ESGVPDRFTG GSGTDFTLT ISSVKAEDLA VYYCQQYNY  
PLTFGTGTKL ELK (配列番号:5)

重鎖可変領域：

【 化 6 】

EVKLVESEGG LVQPGSSMKL SCTASGFKFT DYMAWVRQV PEKGLEWVAN  
INYGSSITY LDSLKSRFII SRDNAKNILY LQMNSLKSED TATYYCARKG  
YFDYWGQGT LTVSS (配列番号:6)

抗ヒト B 7 - H 4 クローン 2 H 9

軽鎖可変領域：

10

20

30

40

## 【化7】

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESID NYGISFMHWY QQKPGQPPKL  
 LIYRASNLES GIPARFSGSG SRTDFTLTIN PVETDDVATY FCQOSDEGRT  
 FGGGKLEIK (配列番号:7)

重鎖可変領域：

## 【化8】

EVQLVESGGN LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NSAMSWVRQT PEKRLEWVAT  
ISDGGRYTTY PDNVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSHLKSED TALYYCARDR  
PHWYFDVWGT GATVTVSS (配列番号:8)

10

## 【0114】

(2) 本発明の抗ヒトB7-H4抗体のコンセンサスCDR

コンセンサスCDR配列と、おそらく類似の結合性を与えると考えられる変異CDR配列とを特定するため、特定された抗体のCDRの解析を行った。そうした変異CDRは、表1に従いBlosum62.iiij解析を用いてコンピューター処理した。表1は、Blosum62.iiij置換スコアである。スコアが高いほど、置換はより保存的になり、したがって置換が機能に影響を与える可能性が低くなる。

## 【0115】

## 【表1】

20

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

30

40

50

## 【0116】

本発明は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つの変異CDRを有する新規な抗体および抗原結合フラグメントの形成を可能にする。本発明の方法により相当数の異なるCDRが特定されているため、本発明から、特定された個々のCDRの任意の変異体に必要とされる可能性のあるCDR残基の識別が可能になる。そうした残基を表2および表3に太字で示す。比較されたCDRの中で異なることが分かっているこれらの残基については、表1の置換スコアが、許容される置換の内容を判定する手段となる。たとえば、特定のCDRの特定の残基がRまたはSとして変化することが分かっている場合、RおよびSの置換スコアは-1であるため、置換スコアが-1以上の、RまたはSのどのような置換も、その特定のCDRの結合性に十分に類似した結合性を有する変異CDRを作り、特定のCDRの代わりに変異CDRを利用して機能的抗B7-H4抗体または抗原結合フラグメントを形成することできる可能性が、観察された変異体(RまたはS)と同様にある(あるいはRまたはSよりもある)。各位置について、より低い置換スコアを有する残基を選択するよりも、より高い置換スコアを有する残基を選択することが好ましい。

10

## 【0117】

表2は、抗B7-H4抗体の軽鎖CDRの解析結果であり、本発明の観察された変異軽鎖抗B7-H4CDR、および好ましい変異軽鎖抗B7-H4CDRのコンセンサス配列を示す。

## 【0118】

【表 2 - 1】

表 2:抗 B7-H4 軽鎖 CDR		
軽鎖 CDR1		
抗体	配列	配列番号
2D1	R S S H S L V H S N G N T Y L H	9
2E11	K S S Q S L L Y S T N Q R T Y L A	10
2H9	R A S E S I D N Y G I S F M H	11
軽鎖 CDR1 コンセンサス配列:	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> SX <sub>3</sub> SX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub>	12
<p>X<sub>1</sub>は R もしくは K または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 2</math>)の置換、すなわち R もしくは K であり</p> <p>X<sub>2</sub>は S もしくは A または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 1</math>)の置換、すなわち S もしくは A であり</p> <p>X<sub>3</sub>は Q、H もしくは E または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 0</math>)の置換、すなわち R、N、Q、E もしくは H であり</p> <p>X<sub>4</sub>は L もしくは I または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 2</math>)の置換、すなわち L もしくは I であり</p> <p>X<sub>5</sub>は V、L もしくは D または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -4</math>)の置換、すなわち任意のアミノ酸であり</p> <p>X<sub>6</sub>は H、Y もしくは N または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -2</math>)の置換、すなわち A、R、N、Q、E、H、K、M、S、T もしくは Y であり</p> <p>X<sub>7</sub>は存在しないかまたは S であり</p> <p>X<sub>8</sub>は存在しないかまたは T であり</p> <p>X<sub>9</sub>は N もしくは Y または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -2</math>)の置換、すなわち A、R、N、Q、E、H、K、M、S、T もしくは Y であり</p> <p>X<sub>10</sub>は G もしくは Q または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -2</math>)の置換、すなわち A、R、N、D、Q、E、G、H、K、P、S、T もしくは W であり</p> <p>X<sub>11</sub>は N、R もしくは I または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -3</math>)の置換、すなわち A、R、N、D、C、Q、E、H、I、L、K、M、F、P、S、T、Y もしくは V であり</p> <p>X<sub>12</sub>は T もしくは S または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 1</math>)の置換、すなわち S もしくは T であり</p> <p>X<sub>13</sub>は F もしくは Y または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 3</math>)の置換、すなわち F もしくは Y であり</p> <p>X<sub>14</sub>は L もしくは M または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 2</math>)の置換、すなわち L もしくは M であり</p> <p>X<sub>15</sub>は H もしくは A または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -2</math>)の置換、すなわち A、R、N、D、Q、E、G、H、K、M、F、P、S、T、W もしくは Y である</p>		
軽鎖 CDR2		
抗体	配列	配列番号
2D1	I V S N R F S	13
2E11	W A S T R E S	14
2H9	R A S N L E S	15
軽鎖 CDR2 コンセンサス配列:	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> SX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub>	16
<p>X<sub>1</sub>は I、W もしくは R または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -3</math>)の置換、すなわち A、R、C、Q、E、H、I、L、K、M、F、S、T、W、Y もしくは V であり</p> <p>X<sub>2</sub>は V もしくは A または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 0</math>)の置換、すなわち A もしくは V であり</p> <p>X<sub>3</sub>は N もしくは T または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 0</math>)の置換、すなわち N、S もしくは T であり</p> <p>X<sub>4</sub>は R もしくは L または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -2</math>)の置換、すなわち A、R、Q、L、K、M、S、T もしくは Y であり</p> <p>X<sub>5</sub>は F もしくは E または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -3</math>)の置換、すなわち A、R、N、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、S、T、W、Y もしくは V である</p>		
軽鎖 CDR3		
抗体	配列	配列番号
2D1	S Q S T H V P P T	17
2E11	Q Q Y Y N Y P L T	18
2H9	Q Q S D E G R T	19
軽鎖 CDR3 コンセンサス配列:	X <sub>1</sub> QX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> T	20

10

20

30

40

## 【表 2 - 2】

表 2:抗 B7-H4 軽鎖 CDR	
X <sub>1</sub> は S もしくは Q または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq 0$ ) の置換、すなわち N、D、Q、E、K もしくは S であり	
X <sub>2</sub> は S もしくは Y または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -2$ ) の置換、すなわち A、R、N、C、Q、E、H、I、L、K、M、F、S、T、Y もしくは V であり	
X <sub>3</sub> は T、Y もしくは D または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -3$ ) の置換、すなわち A、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、K、M、F、P、S、T、Y もしくは V であり	10
X <sub>4</sub> は H、N もしくは E または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq 0$ ) の置換、すなわち R、N、Q、E もしくは H であり	
X <sub>5</sub> は V、Y もしくは G または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -3$ ) の置換、すなわち A、R、N、D、C、Q、E、G、H、K、M、F、P、S、T、W、Y もしくは V であり	
X <sub>6</sub> は P または存在せず	
X <sub>7</sub> は P、L もしくは R または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -3$ ) の置換、すなわち A、R、N、D、C、Q、E、H、I、L、K、M、P、S、T、Y もしくは V である	

## 【 0 1 2 0 】

表 3 は、抗 B 7 - H 4 抗体の重鎖 C D R の解析結果であり、本発明の観察された変異抗 B 7 - H 4 重鎖 C D R、および好ましい変異体抗 B 7 - H 4 重鎖 C D R のコンセンサス配列を示す。

## 【 0 1 2 1 】

10

20

【表 3 - 1】

表 3:抗 B7-H4 重鎖 CDR		
重鎖 CDR1		
抗体	配列	配列番号
2D1	GFT FN S H G MS	21
2E11	GFK FT D Y Y MA	22
2H9	GFT FS N S A MS	23
重鎖 CDR1 コンセンサス配列:	GFX <sub>1</sub> FX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> MX <sub>6</sub>	24
<p>X<sub>1</sub>は T もしくは K または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -1</math>)の置換、すなわち A、R、N、D、Q、E、K、M、P、S もしくは T であり</p> <p>X<sub>2</sub>は T、N もしくは S または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 0</math>)の置換、すなわち N、S もしくは T であり</p> <p>X<sub>3</sub>は D、S もしくは N または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq +1</math>)の置換、すなわち N、D、H もしくは S であり</p> <p>X<sub>4</sub>は Y、H もしくは S または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -2</math>)の置換、すなわち A、R、N、Q、E、H、K、M、F、S、T もしくは Y であり</p> <p>X<sub>5</sub>は Y、A もしくは G または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -3</math>)の置換、すなわち A、R、N、D、C、Q、E、G、H、K、M、F、P、S、T、W、Y もしくは V であり</p> <p>X<sub>6</sub>は S もしくは A または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq +1</math>)の置換、すなわち S もしくは A である</p>		
重鎖 CDR2		
抗体	配列	配列番号
2D1	T IS D G GT Y TYYP V N V KG	25
2E11	N IN Y D GS S TYYL D S L KS	26
2H9	T IS D G GR Y TYYP D N V KG	27
重鎖 CDR2 コンセンサス配列:	X <sub>1</sub> IX <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> GX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> TYXX <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> KX <sub>11</sub>	28
<p>X<sub>1</sub>は T もしくは N または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq 0</math>)の置換、すなわち N、S もしくは T であり</p> <p>X<sub>2</sub>は N もしくは S または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq +1</math>)の置換、すなわち N もしくは S であり</p> <p>X<sub>3</sub>は D もしくは Y または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -3</math>)の置換、すなわち A、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、Y もしくは V であり</p> <p>X<sub>4</sub>は G もしくは D または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -1</math>)の置換、すなわち N、D、G もしくは S であり</p> <p>X<sub>5</sub>は T、S もしくは R または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -1</math>)の置換、すなわち A、R、N、Q、E、K、M、S もしくは T であり</p> <p>X<sub>6</sub>は Y もしくは S または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -2</math>)の置換、すなわち A、R、N、C、Q、E、H、I、L、K、M、F、S、T、Y もしくは V であり</p> <p>X<sub>7</sub>は P もしくは L または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -3</math>)の置換、すなわち A、R、N、C、Q、E、H、I、L、K、M、P、S、T、Y もしくは V であり</p> <p>X<sub>8</sub>は V もしくは D または置換スコア以上(すなわち、<math>\geq -3</math>)の置換、すなわち A、R、</p>		

10

20

30

40

【表 3 - 2】

表 3:抗 B7-H4 重鎖 CDR		
N, D, C, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, Y もしくは V であり X <sub>9</sub> は S もしくは N または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq +1$ ) の置換、すなわち S もしくは N であり X <sub>10</sub> は V もしくは L または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq +1$ ) の置換、すなわち I, L, M もしくは V であり X <sub>11</sub> は G もしくは S または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq 0$ ) の置換、すなわち A, N, G もしくは S である		
重鎖 CDR3		
抗体	配列	配列番号
2D1	D G G G G A Y	29
2E11	K G Y F D Y	30
2H9	D R P H W Y F D V	31
重鎖 CDR3 コンセンサス配列	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub>	32
X <sub>1</sub> は D もしくは K または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -1$ ) の置換、すなわち N, D, Q, E, H, K, P, S もしくは T であり X <sub>2</sub> は G もしくは R または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -2$ ) の置換、すなわち A, R, N, D, Q, E, G, H, K, P, S もしくは T であり X <sub>3</sub> は G, Y もしくは P または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -3$ ) の置換、すなわち A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, P, S, T, Y もしくは V であり X <sub>4</sub> は G, F もしくは H または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -3$ ) の置換、すなわち A, R, N, D, C, Q, E, G, H, K, M, F, S, T, W, Y もしくは V であり X <sub>5</sub> は存在しないかまたは D もしくは K または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -1$ ) の置換、すなわち N, D, Q, E, H, K, P, S もしくは T であり X <sub>6</sub> は存在しないかまたは Y であり X <sub>7</sub> は存在しないかまたは F であり X <sub>8</sub> は D もしくは A または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -2$ ) の置換、すなわち A, R, N, D, Q, E, G, H, K, P, S もしくは T であり X <sub>9</sub> は Y もしくは V または置換スコア以上 (すなわち、 $\geq -1$ ) の置換、すなわち I, L, M, F, Y もしくは V である		

10

20

30

40

## 【 0 1 2 3 】

以上のように、抗 B 7 - H 4 抗体 : 2 D 1、2 E 1 1 および 2 H 9 の C D R を有する抗体およびその抗原結合フラグメントに加えて、本発明はさらに、上記軽鎖および / または重鎖コンセンサス配列を有する C D R を有する抗体およびその抗原結合フラグメントも提供する。

## 【 0 1 2 4 】

50

本発明は、上記クローンのいずれかにより産生されるマウスモノクローナル抗体の可変重鎖および/または軽鎖のアミノ酸配列と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%同一であり、かつB7-H4に対して免疫特異的結合を示す、可変重鎖および/または可変軽鎖のアミノ酸配列を含む抗体またはそのフラグメントを包含する。本発明はさらに、上記のクローンのCDRのアミノ酸配列と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%同一であり、かつB7-H4に対して免疫特異的結合を示すCDRを含む抗体またはそのフラグメントも包含する。2つのアミノ酸配列の同一性パーセントの判定は、BLASTタンパク質比較により判定することができる。好ましい実施形態では、抗体は、1つ、2つまたは3つの軽鎖CDRおよび1つ、2つまたは3つの重鎖CDR（最も好ましくは3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR）を含むヒト化免疫グロブリン分子（たとえば、抗体、ダイアボディ、融合タンパク質等）であり、軽鎖CDRは、上記抗B7-H4抗体または上記のコンセンサス軽鎖配列のいずれかの

- (1) 軽鎖CDR1
- (2) 軽鎖CDR2
- (3) 軽鎖CDR3
- (4) 軽鎖CDR1および軽鎖CDR2
- (5) 軽鎖CDR1および軽鎖CDR3
- (6) 軽鎖CDR2および軽鎖CDR3

または

- (7) 軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3

を含む。別の好ましい実施形態では、ヒト化免疫グロブリン分子は、1つ、2つまたは3つの軽鎖CDRおよび1つ、2つまたは3つの重鎖CDR（最も好ましくは3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR）を含み、重鎖CDRは、上記抗B7-H4抗体または上記のコンセンサス重鎖配列のいずれかの

- (1) 重鎖CDR1
- (2) 重鎖CDR2
- (3) 重鎖CDR3
- (4) 重鎖CDR1および重鎖CDR2
- (5) 重鎖CDR1および重鎖CDR3
- (6) 重鎖CDR2および重鎖CDR3

または

- (7) 重鎖CDR1、重鎖CDR2および重鎖CDR3

を含む。特に好ましい実施形態では、抗体は、1つ、2つまたは3つの軽鎖CDRおよび1つ、2つまたは3つの重鎖CDR（最も好ましくは3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR）を含むヒト化免疫グロブリン分子であり、軽鎖CDRは、上述の抗体または上記のコンセンサス軽鎖配列のいずれかの

- (1) 軽鎖CDR1
- (2) 軽鎖CDR2
- (3) 軽鎖CDR3
- (4) 軽鎖CDR1および軽鎖CDR2
- (5) 軽鎖CDR1および軽鎖CDR3
- (6) 軽鎖CDR2および軽鎖CDR3

または

- (7) 軽鎖CDR1、軽鎖CDR2および軽鎖CDR3

を含み、かつ重鎖CDRは、上述の抗体または上記のコンセンサス軽鎖配列のいずれかの

- (1) 重鎖CDR1

10

20

30

40

50

- ( 2 ) 重鎖 C D R 2
- ( 3 ) 重鎖 C D R 3
- ( 4 ) 重鎖 C D R 1 および重鎖 C D R 2
- ( 5 ) 重鎖 C D R 1 および重鎖 C D R 3
- ( 6 ) 重鎖 C D R 2 および重鎖 C D R 3

または

- ( 7 ) 重軽鎖 C D R 1、重軽鎖 C D R 2 および重鎖 C D R 3

を含む。

【 0 1 2 5 】

特定の実施形態では、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントは、上記の好ましい抗体の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または一層好ましくは6つすべてのC D Rを含み、ヒトB 7 - H 4 に結合する能力を示す。

10

【 0 1 2 6 】

B . 本発明の好ましい組成物の治療用途および予防用途

本発明は特に、レシピエント被検体のB 7 - H 4 に免疫特異的に結合する抗体を対象とする。本明細書で使用する場合、「被検体」は、好ましくは哺乳動物、たとえば非霊長類（たとえば、雌ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラット等）または霊長類（たとえば、サルおよびヒト）、最も好ましくはヒトである。このため、本発明は特に、ヒトB 7 - H 4 に免疫特異的に結合するヒト化抗体およびその抗原結合フラグメントに関する。

【 0 1 2 7 】

好ましい実施形態では、そうした分子は、レシピエントヒトまたはヒト組織のT A M を欠乏させる（インサイトまたはエキソピボで）、またはそうしたT A M の活性を調節することができる。T A M の欠乏またはB 7 - H 4 レベルの有利な低下は、本発明の抗B 7 - H 4 抗体または別のT A M 特異的マーカーを用いて腫瘍組織のI H C により、あるいは、P C R、インサイトハイブリダイゼーションまたは当業者に公知の他の別の方法によるB 7 - H 4 のm R N A レベルの低下により、モニターすることができる。本発明の抗B 7 - H 4 抗体を用いた処置で効果が得られやすい患者は、腫瘍あるいはT A M 上に標的B 7 - H 4 タンパク質を発現するが、これは、腫瘍サンプルのI H C、F A C s、インサイトハイブリダイゼーションまたは当業者に公知の他の別の方法により評価することができる。

20

【 0 1 2 8 】

本明細書で使用する場合、「処置する」、「処置すること」、「処置」および「治療用途」という用語は、B 7 - H 4 とその受容体（単数または複数）との相互作用により、またはB 7 - H 4 の発現もしくは細胞の表面に配置されたB 7 - H 4 の存在により悪化する疾患または障害の1つまたは複数の症状が消失、減少または軽減することをいう。本明細書で使用する場合、「治療上有効な量」とは、そうした症状の臨床的意義がある消失、減少または軽減を媒介するのに十分な治療薬のそうした量をいう。ある作用は、その大きさがレシピエント被検体の健康または予後に影響を与えるのに十分な場合、臨床的意義がある。治療上有効な量とは、疾患の発症を遅延させるまたは最小限に抑える、たとえば、癌の拡散を遅延させるまたは最小限に抑えるのに十分な治療薬の量をいう場合がある。治療上有効な量はまた、疾患の処置または管理において治療上の利益をもたらす治療薬の量をいうこともある。さらに、本発明の治療薬に関する治療上有効な量は、疾患の処置または管理に治療上の利益をもたらす、たとえば、治療用抗体の薬効を増強するのに十分で、疾患を処置または管理するのに十分な、治療薬単独または他の療法薬と組み合わせたそうした量を意味する。

30

40

【 0 1 2 9 】

本明細書で使用する場合、「予防薬」という用語は、障害または疾患の任意の症状が検出される前にそうした障害または疾患の予防に使用することができる薬をいう。「予防上有効な」量は、そうした保護作用を媒介するのに十分な予防薬の量をいう。予防上有効な量はまた、疾患の予防において予防上の利益をもたらす予防薬の量もいう。さらに、本発明の予防薬に関する予防上有効な量は、疾患の予防において予防上の利益をもたらす予防

50

薬単独または他の薬と組み合わせたそうした量を意味する。

【0130】

本明細書に記載される投薬量および投与頻度は、治療上有効なおよび予防上有効なという用語により包含される。投薬量および頻度はさらに、典型的には投与される個々の治療薬または予防薬、癌の重症度および種類、投与経路のほか、患者の年齢、体重、反応および既往歴によって、各患者に特有の要因に応じて異なる。当業者であれば、そうした要因を考慮し、たとえば、文献に報告され、Physician's Desk Reference (56th Ed., 2002) に推奨されている投与量に従うことで好適なレジメンを選択することができる。

【0131】

1. 免疫系のアップモジュレーターの使用

好ましい実施形態では、そうした抗体およびフラグメントはB7-H4に結合してB7-H4とその受容体(単数または複数)との間の結合を破壊する(たとえば、B7-H4とその受容体との結合部位の近位にあり、結合部位を破壊する1つまたは複数の部位、またはそうした結合によりその立体構造が破壊されて、受容体に結合する能力が障害される領域等に結合することにより)。上記で論じたように、B7-H4とその受容体との間の相互作用は、T細胞の増殖を阻害し、複数のサイトカインの産生を含む炎症を抑制する(Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100: 10388-10392; Prasad, D.V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation, Immunity 18: 863-873)。よって、好ましい実施形態では、本発明の分子を被検体に投与すると、B7-H4のその受容体への通常の結合を拮抗することにより、被検体の免疫反応が上方調節される。

【0132】

免疫系の上方調節は、癌および慢性感染症の処置に特に望ましく、したがって本発明は、そうした障害の処置に有用である。B7-H4は、HIV感染時に過剰発現する(Carter, C.A. et al. (2008) Cell Biology Of HIV-1 Infection Of Macrophages, Ann. Rev. Microbiol. 62: 425-443; Noursadeghi, M. et al. (2006) HIV-1 Infection Of Mononuclear Phagocytic Cells: The Case For Bacterial Innate Immune Deficiency In AIDS, Lancet Infect. Dis. 6: 794-804)。このため、本発明の抗B7-H4抗体は、HIV感染症およびAIDS処置の療法剤として特に有用である。本明細書で使用する場合、「癌」という用語は、制御不能な異常な細胞増殖に起因する新生物または腫瘍をいう。本明細書で使用する場合、癌は明確に白血病およびリンパ腫を含む。この用語は、遠位部位に転移する可能性があり、非癌細胞の表現型形質と異なる表現型形質、たとえば、軟寒天などの三次元支持体におけるコロニーの形成、または三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物における管状網または網状のマトリックスの形成を示す細胞が関与する疾患をいう。非癌細胞は、軟寒天においてコロニーを形成せず、三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物において明確な球状構造を形成しない。

【0133】

本発明の方法および組成物により処置または予防することができる癌および関連する障害として、以下に限定されるものではないが、白血病、たとえば以下に限定されるものではないが、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄球性白血病、たとえば骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病白血病および骨髄異形成症候群、慢性白血病、たとえば以下に限定されるものではないが、慢性骨髄性(

10

20

30

40

50

顆粒球性)白血病、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病；真性赤血球増加症；リンパ腫、たとえば以下に限定されるものではないが、ホジキン病、非ホジキン病；多発性骨髄腫、たとえば以下に限定されるものではないが、くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌性骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞白血病、孤立性形質細胞腫および髄外性形質細胞腫；ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症；意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症；良性単クローン性免疫グロブリン血症；重鎖病；骨および結合組織の肉腫、たとえば以下に限定されるものではないが、骨の肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫、骨の線維肉腫、脊索腫、骨膜肉腫、軟部組織肉腫、血管肉腫(angiosarcoma)(血管肉腫(hemangiosarcoma))、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫；脳腫瘍、たとえば以下に限定されるものではないが、神経膠腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起膠腫、非神経膠腫瘍、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果体芽腫、原発性脳リンパ腫；乳癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腺癌、小葉(小細胞)癌、乳管内癌、乳腺髓様癌、乳腺粘液癌、乳腺管状癌、乳腺乳頭癌、パジェット病および炎症性乳癌；副腎癌、たとえば以下に限定されるものではないが、褐色細胞腫および副腎皮質癌；甲状腺癌、たとえば以下に限定されるものではないが、乳頭または濾胞性甲状腺癌、甲状腺髓様癌および甲状腺未分化癌；膵癌、たとえば以下に限定されるものではないが、インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、VIP産生腫瘍、ソマトスタチン産生腫瘍およびカルチノイドまたは島細胞腫瘍；下垂体癌、たとえば以下に限定されるものではないが、クッシング病、プロラクチン産生腫瘍、先端巨大症および尿崩症；眼癌、たとえば以下に限定されるものではないが、眼のメラノーマ、たとえば虹彩メラノーマ、脈絡膜メラノーマおよび毛様体メラノーマならびに網膜芽細胞腫；腔癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌腫、腺癌およびメラノーマ；外陰癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌腫、メラノーマ、腺癌、基底細胞癌、肉腫およびパジェット病；子宮頸癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌腫および腺癌；子宮癌、たとえば以下に限定されるものではないが、子宮内膜癌および子宮肉腫；卵巣癌、たとえば以下に限定されるものではないが、上皮性卵巣癌、境界腫瘍、胚細胞腫瘍およびストローマ腫瘍；食道癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌、腺癌、腺様嚢胞癌、粘表皮癌、腺扁平上皮癌腫、肉腫、メラノーマ、形質細胞腫、疣状癌および燕麦細胞(小細胞)癌；胃癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腺癌、菌状(ポリープ状)、潰瘍性、表在性拡大型、散在性拡大型、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫および癌肉腫；結腸癌；直腸癌；肝癌、たとえば以下に限定されるものではないが、肝細胞癌および肝芽腫、胆嚢癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腺癌；以下に限定されるものではないが、乳頭状、結節性およびまん性の胆管癌；肺癌、たとえば以下に限定されるものではないが、非小細胞肺癌、扁平上皮癌腫(類表皮癌)、腺癌、大細胞癌および小細胞肺癌；精巣癌、たとえば以下に限定されるものではないが、胚腫瘍、セミノーマ、未分化、古典的(典型的)、精母細胞性、非セミノーマ、胎児性癌、奇形腫瘍、絨毛癌(卵黄嚢腫瘍)、前立腺癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腺癌、平滑筋肉腫および横紋筋肉腫；刑罰癌；口腔癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌腫；基底癌；唾液腺癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腺癌、粘表皮癌および腺様嚢胞癌；咽頭癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌および疣状；皮膚癌、たとえば以下に限定されるものではないが、基底細胞癌、扁平上皮癌腫およびメラノーマ、表在性拡大型メラノーマ、結節性メラノーマ、悪性黒子型メラノーマ、末端黒子型メラノーマ；腎臓癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行上皮癌(腎盂およびノまたは尿管)；ウィルムス腫瘍；膀胱癌、たとえば以下に限定されるものではないが、移行上皮癌腫、扁平上皮癌、腺癌、癌肉腫が挙げられる。さらに、癌は、粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽細胞腫、上皮性癌、嚢胞腺癌、気管支原性癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌および乳頭腺癌を含む(そうした障害の概説には、Fishman et al., 1985, Medicine,

10

20

30

40

50

2d Ed., J. B. Lippincott Co., PhiladelphiaおよびMurphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of Americaを参照)。

【0134】

したがって、本発明の方法および組成物は、種々の癌または他の異常増殖性疾患、たとえば(以下に限定されるものではないが)、癌腫、たとえば膀胱、乳房、結腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、胃、頸部、甲状腺および皮膚の癌腫；扁平上皮癌腫など；リンパ系の造血器腫瘍、たとえば白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、パーケットリンパ腫；骨髄系の造血器腫瘍、たとえば急性および慢性骨髄性白血病ならびに前骨髄球性白血病；間葉系由来の腫瘍、たとえば線維肉腫および横紋筋肉腫；他の腫瘍、たとえばメラノーマ、セミノーマ、奇形癌、神経芽細胞腫および神経膠腫；中枢および末梢神経系の腫瘍、たとえば星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫およびシュワン腫；間葉系由来の腫瘍、たとえば線維肉腫、横紋筋肉腫および骨肉腫；ならびに他の腫瘍、たとえばメラノーマ、色素性乾皮症、ケラトアクタントーマ、セミノーマ、甲状腺濾胞癌および奇形癌の処置または予防にも有用である。さらに、アポトーシスの異常により引き起こされる癌も本発明の方法および組成物により処置されることを意図している。そうした癌として、以下に限定されるものではないが、濾胞性リンパ腫、p53突然変異を持つ癌腫、乳房胸、前立腺および卵巣のホルモン依存性腫瘍、ならびに前癌病変、たとえば家族性大腸腺腫症および骨髄異形成症候群を挙げることができる。特定の実施形態では、卵巣、膀胱、乳房、結腸、肺、皮膚、膵臓もしくは子宮における悪性腫瘍もしくは増殖異常への変化(化成および異形成など)または過剰増殖性障害を本発明の方法および組成物により処置または予防する。他の特定の実施形態では、肉腫、メラノーマまたは白血病を本発明の方法および組成物により処置または予防する。

【0135】

癌細胞は、その発生においてメカニズムは様々であるが、一連の特有の機能的能力を獲得する。そうした能力として、アポトーシスからの逸脱、増殖シグナルの自己充足、抗増殖シグナルに対する反応性欠如、組織浸潤/転移、無限の複製能および血管新生の維持が挙げられる。「癌細胞」という用語は、前癌細胞および悪性癌細胞の両方を包含することを意図している。いくつかの実施形態では、癌とは、局所にとどまっている良性腫瘍をいう。他の実施形態では、癌とは、浸潤して隣接する身体構造を破壊し、遠位部位に転移している悪性腫瘍をいう。なお他の実施形態では、癌は特定の癌抗原(たとえば、汎癌抗原(KS 1/4)、卵巣癌抗原(CA125)、前立腺特異的抗原(PSA)、癌胎児性抗原(CEA)、CD19、CD20、HER2/neu等)と関連している。

【0136】

本発明の抗体および抗原結合フラグメントは、上記で論じたように腫瘍への使用と同様に、単独、あるいはアジュバントとしてワクチンまたは抗菌剤と組み合わせて使用して、トキシンもしくは自己抗原または病原体(たとえば、ウイルス、たとえばHIV、HTLV、肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ワクシニアウイルス、狂犬病ウイルス；細菌、たとえばマイコバクテリア(Mycobacteria)、ブドウ球菌(Staphylococci)、連鎖球菌(Streptococci)、ニューモコクシ(Pneumococci)、髄膜炎菌(Meningococci)、コノコクシ(Conococci)、クレブシエラ(Klebsiella)、プロテウス(Proteus)、セラチア(Serratia)、シュードモナス(Pseudomonas)、レジオネラ(Legionella)、コリネバクテリウム(Corynebacteria)、サルモネラ(Salmonella)、ビブリオ(Vibrio)、クロストリジウム(Clostridia)、バチルス(Bacilli)、パストレラ(Pasteurella)、レプトスピラ症(Leptospirosis

10

20

30

40

50

)、ボルダテラ (*Bordetella*) の細菌、ならびに、特にコレラ、破傷風、ボツリヌス中毒、炭疽病、ペストおよびライム病に関連するような病原体；または真菌病原体もしくは寄生性病原体、たとえばカンジダ (*Candida*) (アルビカンス (*albicans*)、クルセイ (*krusei*)、グラブラタ (*glabrata*)、トロピカリス (*tropicalis*) 等)、クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、アスペルギルス (*Aspergillus*) (ジユミガーツス (*jumigatus*)、ニガー (*niger*) 等)、ケカビ目の属 (ムコール (*mucor*)、アブシディア (*absidia*)、リゾフス (*rhizophus*)、スポロトリクス属 (*Sporothrix*) (シェンキー (*schenkii*))、プラストミセス (*Blastomyces*) (デルマティティディス (*dermatitidis*))、パラコクシジオイデス (ブラジリエンシス (*brasiliensis*))、コクシジオイデス (*Coccidioides*) (イミチス (*immitis*)) およびヒストプラズマ (*Histoplasma*) (カプスラーツム (*capsulatum*))、エントアメーバ (*Entamoeba*)、ヒストリティカ (*histolytica*)、バランティディウム・コリ (*Balantidium coli*)、フォーラーネグレリア (*Naegleria fowleri*)、アカントアメーバ・エスピー (*Acanthamoeba* sp.)、ジアルジア・ランピア (*Giardia lamblia*)、クリプトスポリジウム・エスピー (*Cryptosporidium* sp.)、ニューモシステイス・カリニ (*Pneumocystis carinii*)、プラスモディウム・ビバックス (*Plasmodium vivax*)、バベシア・ミクロチ (*Babesia microti*)、ブルゼイトリパノソーマ (*Trypanosoma brucei*)、クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*)、トキシプラズマ・ゴンディ (*Toxoplasma gondii*) 等)、スポロトリクス属 (*Sporothrix*)、プラストミセス (*Blastomyces*)、パラコクシジオイデス (*Paracoccidioides*)、コクシジオイデス (*Coccidioides*)、ヒストプラズマ (*Histoplasma*)、エントアメーバ (*Entamoeba*)、ヒストリティカ (*Histolytica*)、バランチジウム (*Balantidium*)、ネグレリア (*Naegleria*)、アカントアメーバ (*Acanthamoeba*)、ジアルジア (*Giardia*)、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*)、ニューモシステイス (*Pneumocystis*)、プラスモディウム (*Plasmodium*)、バベシア (*Babesia*) またはトリパノソーマ (*Trypanosoma*) 等に対する免疫反応を刺激してもよい。したがって、本発明の抗体および抗原結合フラグメントは、感染症の処置に有用である。

#### 【0137】

前述の通り、本発明の抗体および抗原結合フラグメントの特に好ましい使用は、TAM に結合し、好ましくは TAM を阻止して、その免疫抑制性活性を調節するあるいは腫瘍または末梢血におけるその濃度を欠乏させるものである。一実施形態では、そうした調節または欠乏は、ある部位に結合して通常の B7 - H4 機能を障害または破壊する抗 B7 - H4 抗体を使用して達成される。そうした破壊の結果、TAM の活性は抑制 (調節) され、および/または、腫瘍におけるマクロファージの実際の濃度または有効 (機能する) 濃度が欠乏する。あるいは、そうした調節または欠乏は、トキシシンにコンジュゲートされた抗 B7 - H4 抗体を使用して、TAM への抗 B7 - H4 抗体の結合によりマクロファージの死が起こるように達成される。好ましくは、どちらの実施形態も、抗体の Fc 領域の配列は欠失 (たとえば、Fab または  $F(ab)_2$  等) または修飾されるため、その分子は、Fc 受容体 (FcR) 結合活性が減弱するかまたは存在しない、あるいは、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性または補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性が増強される。Fc 受容体結合活性が減弱または存在しない抗体は、腫瘍微小環境において TAM 上の B7 - H4 が T 細胞上の抑制性 Fc 受容体 (単数または複数) と相互作用するのを防ぐ遮断薬として働く。一方、ADCC または CDC の誘導を増強させる Fc 領域を有する抗体を使用すると、TAM が欠乏して B7 - H4 が欠乏する。

【0138】

2. 免疫系のダウンモジュレーターの使用

代替の実施形態では、受容体に直接結合するアゴニスト抗体は、内在性B7-H4（または他のリガンド）の結合と関連するシグナル伝達を行う、あるいは、そうした抗体と受容体/リガンドとの間の結合を増強するため、免疫反応を阻害するためのB7-H4シグナル伝達のアゴニストとして有用である。好ましくは、そうした分子は、本発明のB7-H4結合分子に免疫特異的に結合する。したがって、そうした分子は、炎症および自己免疫疾患の処置に有用である。同様に、本発明の抗B7-H4抗体は、B7-H4の抗イデオタイプペプチドまたは抗体（Wallmann, J. et al. (2010) 「Anti-Ids in Allergy: Timeliness of a Classic Concept,」 World Allergy Organiz. J. 3(6): 195-201; Nardi, M. et al. (2000) 「Antiidiotype Antibody Against Platelet Anti-GpIIIA Contributes To The Regulation Of Thrombocytopenia In HIV-1-ITP Patients,」 J. Exp. Med. 191(12): 2093-2100）または模倣体（Zang, Y. C. et al. (2003) 「Human Anti-Idiotypic T Cells Induced By TCR Peptides Corresponding To A Common CDR3 Sequence Motif In Myelin Basic Protein-Reactive T Cells,」 Int. Immunol. 15(9): 1073-1080; Loiarro, M. et al. (Epub 2010 Apr 8) 「Targeting TLR/IL-1R Signaling In Human Diseases,」 Mediators Inflamm. 2010: 674363）を作製するために利用してもよい。そうした分子はB7-H4の代理として働き、したがってそうした分子を被検体に投与すると、B7-H4の結合が模倣または促進されることにより、そうした被検体の免疫系が下方調節される。

10

20

【0139】

免疫系の下方調節は、炎症性疾患および自己免疫疾患、移植に対する拒絶反応、移植片対宿主病または宿主対移植片病の処置に望ましい。本発明の抗体の投与により処置される自己免疫障害の例として、以下に限定されるものではないが、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、自己免疫性血小板減少症、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、慢性疲労免疫機能障害症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、チャグ・ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、クレスト症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合性クリオグロブリン血症、線維筋痛症-線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少症紫斑病（ITP）、IgAニューロパチー、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、視神経脊髄炎（NMO）、1型または免疫性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、全身硬直症候群、全身性紅斑性狼瘡、紅斑性狼瘡、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、血管炎、たとえば疱疹状皮膚炎血管炎、白斑ならびにウェゲナー肉芽腫症がある。

30

40

【0140】

本発明の方法により予防、処置または管理することができる炎症性障害の例として、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性骨溶解、および

50

慢性のウイルス感染または細菌感染に起因する慢性炎症があるが、これに限定されるものではない。

【0141】

したがって、本発明の抗体および抗原結合フラグメントは、炎症性疾患および自己免疫疾患、移植に対する拒絶反応、移植片対宿主病および宿主対移植片病の処置に有用である。

【0142】

C. 投与方法

様々な送達系、たとえば、リポソーム、微小粒子、マイクロカプセルへの封入、抗体または融合タンパク質を発現することができる組換え細胞、受容体を介したエンドサイトーシス（たとえば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432を参照）、レトロウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての核酸の構築等が知られており、本発明の治療用または予防用組成物の投与に使用することができる。

【0143】

本発明の免疫グロブリン分子（たとえば、抗体、ダイアボディ、融合タンパク質等）の投与方法としては、非経口投与（たとえば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外投与および粘膜投与（たとえば、経鼻経路および経口経路）があるが、これに限定されるものではない。特定の実施形態では、本発明の抗体を筋肉内投与、静脈内投与または皮下投与する。本組成物は、任意の好都合な経路により、たとえば、注入またはポータル注射により、上皮層または皮膚粘膜層（たとえば、口腔粘膜、直腸および腸の粘膜等）からの吸収により投与してもよく、他の生物活性薬と一緒に投与してもよい。投与は全身性でも、あるいは局所でもよい。さらに、たとえば、吸入器またはネブライザーの使用、およびエアロゾル化剤を用いた処方により経肺投与を利用してもよい。たとえば、米国特許第6,019,968号明細書；同第5,985,20号明細書；同第5,985,309号明細書；同第5,934,272号明細書；同第5,874,064号明細書；同第5,855,913号明細書；同第5,290,540号明細書；および同第4,880,078号明細書；ならびに国際公開第92/19244号パンフレット；国際公開第97/32572号パンフレット；国際公開第97/44013号パンフレット；国際公開第98/31346号パンフレット；および国際公開第99/66903号パンフレットを参照されたい。特定の実施形態では、本発明の医薬組成物は、処置を必要とする領域に局所投与することが望ましい場合がある。これは、たとえば、以下に限定されるものではないが、局所注入、注射またはインプラントにより達成することができ、前記インプラントは、多孔性物質、非多孔性物質またはゼラチン様物質、たとえばシアラステック膜または繊維などの膜である。好ましくは、本発明の抗体を投与するときは、抗体または融合タンパク質が吸収されない物質を使用するように注意しなければならない。

【0144】

いくつかの実施形態では、本発明のヒト化またはキメラ抗体は、本発明の抗体を標的送達するためリポソームとして製剤化する。リポソームは、同心円状に重なった、内部に水相を持つリン脂質二重層からなるベジクルである。リポソームは典型的には、様々な種類の脂質、リン脂質および/または界面活性剤を含む。リポソームの成分は、二重層構造で配列しており、生体膜の脂質の配列と類似している。リポソームは、その生体適合性、低免疫原性および低毒性などのため特に好ましい送達ビヒクルである。リポソームの調製方法は、当該技術分野において公知であり、本発明内に包含される。たとえば、Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688; Hwang et al., 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4; 米国特許第4,485,045号明細書および同第4,544,545号明細書を参照されたい。

【0145】

本発明はさらに、血清中半減期が長い、すなわち、循環時間が長いリポソームの調製方

10

20

30

40

50

法、たとえば米国特許第5,013,556号明細書に開示されているものも包含する。本発明の方法に使用するのに好ましいリポソームは、すぐには循環から除去されない、すなわち、単核食細胞系(MPS)に取り込まれない。本発明は、当業者に公知の一般的な方法を使用して調製される立体安定化リポソームを包含する。特定の作用機序に拘泥するつもりはないが、立体安定化リポソームは、嵩高く非常にフレキシブルな親水性部分を持つ脂質成分を含み、この親水性部分は、リポソームと血清タンパク質との望ましくない反応を抑制し、血清成分によるオプソニン化を防ぎ、MPSによる認識を低下させる。立体安定化リポソームは、好ましくはポリエチレングリコールを使用して調製される。リポソームおよび立体安定化リポソームの調製については、たとえば、Bendas et al., 2001 *BioDrugs*, 15(4): 215-224; Allen et al., 1987 *FEBS Lett.* 223: 42-6; Klibanov et al., 1990 *FEBS Lett.*, 268: 235-7; Blum et al., 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1029: 91-7; Torchilin et al., 1996, *J. Liposome Res.* 6: 99-116; Litzinger et al., 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1190: 99-107; マルヤマ(Maruyama) et al., 1991, *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 1620-2; Klibanov et al., 1991, *Biochim Biophys Acta*, 1062: 142-8; Allen et al., 1994, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 13: 285-309を参照されたい。本発明はさらに、特定の臓器ターゲティング、たとえば、米国特許第4,544,545号明細書を参照されたい、または特定の細胞ターゲティング、たとえば、米国特許出願公開第2005/0074403号明細書を参照されたい、に適したリポソームも包含する。本発明の組成物および方法に使用するのに特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。所望の直径を有するリポソームを得るには、リポソームを規定の細孔サイズのフィルターを通して押し出す。いくつかの実施形態では、以前に記載された方法を用いて、リポソームに本発明の抗体のフラグメント、たとえば、F(ab')をコンジュゲートしてもよい。たとえば、Martin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288を参照されたい。

#### 【0146】

また、本発明のヒト化またはキメラ抗体は、イムノリポソームとして製剤化してもよい。イムノリポソームとは、本発明の抗体またはそのフラグメントがリポソーム表面に共有結合または非共有結合したリポソーム組成物をいう。リポソーム表面に抗体を結合する化学は当該技術分野において公知であり、本発明内に包含される。たとえば、米国特許第6,787,153号明細書; Allen et al., 1995, *Stealth Liposomes*, Boca Rotan: CRC Press, 233-44; Hansen et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1239: 133-144を参照されたい。最も好ましい実施形態では、本発明の方法および組成物に使用されるイムノリポソームをさらに立体安定化する。好ましくは、本発明のヒト化抗体は、リポソームの脂質二重層に安定に固定した疎水性アンカーに共有結合または非共有結合する。疎水性アンカーの例として、リン脂質、たとえば、ホソアチジエタノールアミン(PE)、ホスパーチジリンイノシトール(PI)があるが、これに限定されるものではない。抗体と疎水性アンカーとの共有結合を達成するには、当該技術分野において公知の生化学的戦略のいずれかを使用すればよい。たとえば、J. Thomas August, ed., 1997, *Gene Therapy: Advances in Pharmacology*, Volume 40, Academic Press, San Diego, CA, p. 399-435を参照されたい。たとえば、抗体分子上の官能基は、リポソームに結合した疎水性アンカー上の活性基と反応することができる。たとえば、抗体上のリジン側鎖のアミノ基は、水溶性カルボジイミドで活性化したリポソーム結合

10

20

30

40

50

N-グルタリル-ホスファチジルエタノールアミンに結合することができる。あるいは、還元抗体のチオール基は、チオール反応性アンカー、たとえばピリジルチオプロピオニルホスファチジルエタノールアミンを介してリポソームに結合することができる。たとえば、Dietrich et al., 1996, Biochemistry, 35:1100-1105; Loughrey et al., 1987, Biochim. Biophys. Acta, 901:157-160; Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:286-288; Martin et al., 1981, Biochemistry, 20:4429-38を参照されたい。特定の作用機序に拘泥するつもりはないが、本発明の抗体を含むイムノリポソーム製剤は、抗体を標的細胞、すなわち、抗体が結合する受容体を含む細胞の細胞質に送達するため、特に治療薬として効果的である。イムノリポソームは、好ましくは血液中、具体的には標的細胞において長い半減期を有しており、標的細胞の細胞質内に移行することにより、治療薬の減少またはリソソーム経路による分解を回避することができる。

10

## 【0147】

本発明のイムノリポソーム組成物は、1つまたは複数のベジクル形成脂質、本発明の抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体、および任意に親水性ポリマーを含む。ベジクル形成脂質は、好ましくは2本の炭化水素鎖、たとえばアシル鎖および極性頭部基を持つ脂質である。ベジクル形成脂質の例として、リン脂質、たとえば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリンおよび糖脂質、たとえば、セレブロシド、ガングリオシドが挙げられる。本発明の製剤に有用な別の脂質は当業者に公知であり、本発明内に包含される。いくつかの実施形態では、イムノリポソーム組成物は、親水性ポリマー、たとえば、ポリエチレングリコールと、リポソームの血清中半減期を延長するガングリオシドGM1とをさらに含む。親水性ポリマーをリポソームにコンジュゲートする方法は当該技術分野において周知であり、本発明内に包含される。イムノリポソームおよびその調製方法の概説については、たとえば、米国特許出願公開第2003/0044407号明細書；国際公開第97/38731号パンフレット、Vingerhoads et al., 1994, Immunomethods, 4:259-72；マルヤマ(Maruyama), 2000, Biol. Pharm. Bull. 23(7):791-799；Abra et al., 2002, Journal of Liposome Research, 12(1&2):1-3；Park, 2002, Bioscience Reports, 22(2):267-281；Bendas et al., 2001 BioDrugs, 14(4):215-224, J. Thomas August, ed., 1997, Gene Therapy: Advances in Pharmacology, Volume 40, Academic Press, San Diego, CA, p. 399-435を参照されたい。

20

30

## 【0148】

本発明はさらに、密封容器、たとえば抗体の量を表示するアンプルまたはサッシェ(sachette)に納められた本発明のヒト化またはキメラ抗体も提供する。一実施形態では、本発明の抗体は密封容器に、乾燥滅菌した凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として提供され、たとえば、水または食塩水で被検体への投与に適した濃度に溶解することができる。好ましくは、本発明の抗体は密封容器に乾燥滅菌凍結乾燥粉末として、少なくとも5mg、一層好ましくは少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、または少なくとも75mgの単位投薬量で提供される。本発明の凍結乾燥抗体は、その本来の容器で2~8にて保存する必要があり、抗体は、溶解後12時間以内、好ましくは6時間以内、5時間以内、3時間以内または1時間以内に投与すべきである。代替の実施形態では、本発明の抗体は、抗体、融合タンパク質またはコンジュゲートされた分子の量および濃度を表示する密封容器に液体形態で提供される。好ましくは、液体形態の抗体は、密封容器に抗体少なくとも1mg/ml、一層好ましくは少なくとも2.5mg/ml、少なくとも

40

50

5 mg/ml、少なくとも8 mg/ml、少なくとも10 mg/ml、少なくとも15 mg/kg、少なくとも25 mg/ml、少なくとも50 mg/ml、少なくとも100 mg/ml、少なくとも150 mg/ml、少なくとも200 mg/mlで提供される。

【0149】

また、処方に用いられる正確な用量は投与経路および状態の重篤度によって異なり、開業医の判断および各患者の状況に応じて決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から外挿することができる。本発明により包含される抗体の場合、患者に投与される投薬量は典型的には、0.0001 mg/kg患者体重～100 mg/kg患者体重である。好ましくは、患者に投与される投薬量は、0.0001 mg/kg患者体重～20 mg/kg患者体重、0.0001 mg/kg患者体重～10 mg/kg患者体重、0.0001 mg/kg患者体重～5 mg/kg患者体重、0.0001～2 mg/kg患者体重、0.0001～1 mg/kg患者体重、0.0001 mg/kg患者体重～0.75 mg/kg患者体重、0.0001 mg/kg患者体重～0.5 mg/kg患者体重、0.0001 mg/kg患者体重～0.25 mg/kg患者体重、0.0001～0.15 mg/kg患者体重、0.0001～0.10 mg/kg患者体重、0.001～0.5 mg/kg患者体重、0.01～0.25 mg/kg患者体重または0.01～0.10 mg/kg患者体重患者体重である。一般に、ヒト抗体は、外来ポリペプチドに対する免疫反応により人体内で他の種由来の抗体より長い半減期を有する。このため、ヒト抗体の投薬量を少なくし、投与頻度を低くすることが可能である場合が多い。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントの投薬量および投与頻度は、修飾、たとえば、脂質化などにより抗体の取り込みおよび組織移行性を高めることで抑えてもよい。

【0150】

なお別の実施形態では、本組成物は、放出制御システムまたは持続放出システムで送達してもよい。当業者に公知の任意の技術を使用して、1つまたは複数の本発明の抗体を含む持続放出製剤を製造することができる。たとえば、米国特許第4,526,938号明細書；国際公開第91/05548号パンフレット；国際公開第96/20698号パンフレット；Ning et al., 1996, 「Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel,」 *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al., 1995, 「Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions,」 *PD A Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397；Cleek et al., 1997, 「Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application,」 *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854；およびLam et al., 1997, 「Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery,」 *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760を参照されたい。一実施形態では、放出制御システムにポンプを使用してもよい(Langer, supra；Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20；Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507；およびSaudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574を参照)。別の実施形態では、高分子材料を使用して、抗体の放出制御を達成してもよい(たとえば、*Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (

10

20

30

40

50

1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61を参照; さらに、Levy et al., 1985, Science 228: 190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71: 105); 米国特許第5,679,377号明細書; 米国特許第5,916,597号明細書; 米国特許第5,912,015号明細書; 米国特許第5,989,463号明細書; 米国特許第5,128,326号明細書; 国際公開第99/15154号パンフレット; および国際公開第99/20253号パンフレットも参照)。

持続放出製剤に使用されるポリマーの例として、ポリ(2-ヒドロキシメタクリル酸エチル)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-co-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ酸無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLGA)およびポリオルトエステルがあるが、これに限定されるものではない。なお別の実施形態では、放出制御システムを治療標的(たとえば、肺)の近くに導入し、それにより必要とされるのは、全身用量のごく一部のみである(たとえば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138(1984)を参照)。

別の実施形態では、Dunn et al. (米国特許第5,945,155号明細書を参照)に従い、放出制御インプラントとして有用なポリマー組成物を使用する。この特定の方法は、ポリマーシステムからの生理活性材料のインサイツ放出制御の治療効果に基づく。移植は一般に、治療処置を必要とする患者体内のどこで行ってもよい。別の実施形態では、被検体体内の非ポリマーインプラントを薬物送達システムとして使用する、非ポリマー持続送達システムを使用する。体内に移植すると、インプラントの有機溶媒が組成物から周囲の組織液に散逸、分散または浸出し、非ポリマー材料が徐々に凝固または沈殿して固体の微孔性マトリックスを形成する(米国特許第5,888,533号明細書を参照)。

放出制御システムについては、Langer(1990, Science 249: 1527-1533)による概説で考察されている。当業者に公知の任意の技術を使用して、本発明の1つまたは複数の治療薬を含む持続放出製剤を製造することができる。たとえば、米国特許第4,526,938号明細書; 国際公開第91/05548号パンフレットおよび国際公開第96/20698号パンフレット; Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39: 179-189; Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372-397; Cleek et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854; および Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760を参照されたい。

#### 【0151】

本発明の治療用または予防用組成物が、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする核酸である特定の実施形態では、核酸を適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、たとえば、レトロウイルスベクターを使用して(米国特許第4,980,286号明細書を参照)、または直接注射により、または微小粒子銃を使用して(たとえば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクション剤でコーティングして、または核に進入することが分かっているホメオボックス様ペプチドに連結して核酸を投与して(たとえば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 186

10

20

30

40

50

4 - 1 8 6 8 を参照)、細胞内に移行するように投与することにより、核酸をインビボ投与してコードされている抗体の発現を促進してもよい。あるいは、相同組換えにより発現させるため、核酸を細胞内に導入し、宿主細胞DNAに組み込ませてもよい。

【 0 1 5 2 】

治療上または予防上有効な量の本発明の抗体を用いた被検体の処置は、単回処置を含んでもよいし、あるいは、好ましくは何回かの処置を含んでもよい。

【 0 1 5 3 】

D . 併用療法

本発明はさらに、癌、自己免疫疾患、感染症または中毒症の処置または予防のため、本発明の分子を当業者に公知の他の療法、以下に限定されるものではないが、現在の標準的および実験的化学療法、ホルモン療法、生物療法、免疫療法、放射線療法または手術と組み合わせることも包含する。いくつかの実施形態では、癌、自己免疫疾患、感染症または中毒症の処置および/または予防のため、本発明の分子を治療上または予防上有効な量の1つまたは複数の薬、治療用抗体または当業者に公知の他の薬と組み合わせることも包含する。そのような薬として、たとえば、上記の生物学的応答調節剤、細胞毒、代謝拮抗薬、アルキル化剤、抗生物質または有糸分裂阻害薬のいずれかのほか、免疫療法剤(たとえばERBITUX(商標)(IMC-C225とも呼ばれる)(ImClone Systems Inc.)、EGFRに対するキメラ化モノクローナル抗体;転移性乳癌患者の処置のためのヒト化抗HER2モノクローナル抗体であるHERCEPTIN(登録商標)(トラスツズマブ)(Genentech, CA);血栓形成の防止のための血小板上の抗糖タンパク質IIb/IIIa受容体であるREOPRO(登録商標)(アブシキシマブ)(Centocor);急性同種腎移植片拒絶の予防のための免疫抑制ヒト化抗CD25モノクローナル抗体であるZENAPAX(登録商標)(ダクリズマブ)(Roche Pharmaceuticals, Switzerland)のいずれかが挙げられる。他の例として、ヒト化抗CD18F(ab')<sub>2</sub>(Genentech);ヒト化抗CD18F(ab')<sub>2</sub>であるCDP860(Celltech, UK);CD4と融合した抗HIV gp120抗体であるPRO542(Progenics/Genzyme Transgenics);抗CD14抗体であるC14(ICOS Pharm);ヒト化抗VEGF IgG1抗体(Genentech);マウス抗CA125抗体であるOVAREX(商標)(Altarex);マウス抗17-IA細胞表面抗原IgG2a抗体であるPANOREX(商標)(Glaxo Wellcome/Centocor);キメラ抗EGFR IgG抗体であるIMC-C225(ImClone System);ヒト化抗V<sub>3</sub>インテグリン抗体であるVITAXIN(商標)(Applied Molecular Evolution/MedImmune);ヒト化抗CD52 IgG1抗体であるCampath 1H/LDP-03(Leukosite);ヒト化抗CD33 IgG抗体であるSmart M195(Protein Design Lab/Kanebo);キメラ抗CD20 IgG1抗体であるRITUXAN(商標)(IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettayu);ヒト化抗CD22 IgG抗体であるLYMPHOCIDE(商標)(Immunomedics);ヒト化抗HLA抗体であるSmart ID10(Protein Design Lab);放射標識マウス抗HLA DR抗体であるONCOLYM(商標)(Lym-1)(Techniclone);ヒト化IgG1抗体である抗CD11a(Genentech/Xoma);ヒト化抗ICAM3抗体であるICM3(商標)(ICOS Pharm);霊長類化抗CD80抗体であるIDEC-114(商標)(IDEC Pharm/Mitsubishi);放射標識マウス抗CD20抗体であるZEVALIN(商標)(IDEC/Schering AG);ヒト化抗CD40L抗体であるIDEC-131(商標)(IDEC/Eisai);霊長類化抗CD4抗体であるIDEC-151(商標)(IDEC);霊長類化抗CD23抗体であるIDEC-152(商標)(IDEC/Seikagaku);ヒト化抗CD3 IgGであるSMART抗CD3(Protein Design Lab);ヒト化抗補体因子5(C

10

20

30

40

50

5) 抗体である5G1.1(商標)(Alexion Pharm); 霊長類化抗CD4 IgG1抗体であるIDEC-151(商標)(IDEC Pharm/SmithKline Beecham); ヒト抗CD4 IgG抗体であるMDX-CD4(商標)(Medarex/Eisai/Genmab); ヒト化抗TNF-IgG4抗体であるCDP571(商標)(Celltech); ヒト化抗4-7抗体であるLDP-02(商標)(LeukoSite/Genentech); ヒト化抗CD4 IgG抗体であるOrthoClone OKT4A(商標)(Ortho Biotech); ヒト化抗CD40L IgG抗体であるANTOVA(商標)(Biogen); ヒト化抗VLA-4 IgG抗体であるANTEGREN(商標)(Elan); ヒト抗CD64(FCR)抗体であるMDX-33(商標)(Medarex/Centeon); ; ヒト化抗IgE IgG1抗体であるrhumab-E25(商標)(Genentech/Norvarthis/Tanox Biosystems); 霊長類化抗CD23抗体であるIDEC-152(商標)(IDEC Pharm); マウス抗CD-147 IgM抗体であるABX-CBL(商標)(Abgenix); ラット抗CD2 IgG抗体であるBTI-322(商標)(Medimmune/Bio Transplant); マウス抗CD3 IgG2a抗体であるOrthoclone/OKT3(商標)(Ortho Biotech); キメラ抗CD25 IgG1抗体であるSIMULLECT(商標)(Novartis Pharm); ヒト化抗 $\alpha_2$ -インテグリンIgG抗体であるLDP-01(商標)(LeukoSite); マウス抗CD18F(ab') $_2$ であるAnti-LFA-1(商標)(Pasteur-Merieux/Immunotech); ヒト抗TGF- $\beta_2$ 抗体であるCAT-152(商標)(Cambridge Ab Tech); およびキメラ抗第VII因子抗体であるCorsevin M(商標)(Centocor)等)が挙げられる。別の実施形態では、本発明の分子は、免疫調節を増強するため、別の免疫調節経路(CTLA4、TIM3、TIM4、OX40、CD40、GITR、4-1-BB、B7-H1、PD-1、LIGHTまたはLAG3など)を破壊または増強する、あるいは、エフェクター分子、たとえばサイトカイン(たとえば、IL-4、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、GF- $\gamma$ 、IFN $\gamma$ 、Flt3、Blyis)およびケモカイン(たとえば、CCL21)の活性を調節する分子と組み合わせて投与する。なお別の実施形態では、本発明の分子は、より広範な免疫反応を達成するため、免疫反応の様々な段階または局面を活性化する分子と組み合わせて投与する。たとえば、より強固な免疫反応を達成するため、抗B7-H4分子を用いた、TAMによる免疫抑制の阻害は、T細胞活性化を増強するまたはブライムする分子と組み合わせて行ってもよい。

#### 【0154】

ある種の実施形態では、本発明の1つまたは複数の分子を癌の処置に有用な1つまたは複数の他の治療薬と同時に哺乳動物、好ましくはヒトに投与する。「同時に」という用語は、予防薬または治療薬を厳密に同時に投与することには限定するものではなくて、本発明の分子と他の薬とが一緒に作用して、他の方法で投与される場合より効果が増加するような順序および時間間隔内で、本発明の分子および他の薬を哺乳動物に投与することを意図している。たとえば、各予防薬または治療薬(たとえば、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン療法薬または生物療法薬)は、同時に投与しても、あるいは様々な時点で任意の順序で連続的に投与してもよい。ただし、予防薬または治療薬は、同時に投与しない場合、所望の治療または予防効果が得られるように十分に近い間隔で、または治療上の利益が得られることが示されているレジメンで投与すべきである。各治療薬は、任意の適切な形態にて任意の好適な経路で別々に投与してもよい。種々の実施形態では、予防薬または治療薬は、1時間未満の間隔をおいて、約1時間の間隔をおいて、約1時間~約2時間の間隔をおいて、約2時間~約3時間の間隔をおいて、約3時間~約4時間の間隔をおいて、約4時間~約5時間の間隔をおいて、約5時間~約6時間の間隔をおいて、約6時間~約7時間の間隔をおいて、約7時間~約8時間の間隔をおいて、約8時間~約9時間の間隔をおいて、約9時間~約10時間の間隔をおいて、約10時間~約11時間の間隔をおいて

10

20

30

40

50

、約11時間～約12時間の間隔において、24時間以下の間隔においてまたは48時間以下の間隔において投与する。好ましい実施形態では、2つ以上の成分を1回の患者来院時に投与する。

【0155】

他の実施形態では、予防薬または治療薬は、約2～4日の間隔において、約4～6日の間隔において、約1週間の間隔において、約1～2週間の間隔において、または2週間を超える間隔において投与する。好ましい実施形態では、予防薬または治療薬は、2つの薬が依然として作用する、または薬力学的作用が認められる期間に投与する。当業者であれば、投与される薬の半減期を測定することにより、こうした期間を判定することができる。

10

【0156】

ある種の実施形態では、本発明の予防薬または治療薬を周期的に被検体に投与する。サイクリング療法では、第1の薬の投与を一定期間行い、続いて第2の薬および/または第3の薬の投与を一定期間行い、この連続的投与を繰り返す。サイクリング療法は、療法薬の1つまたは複数に対する耐性の発現を抑制する、療法薬の1つの副作用を回避または低減する、および/または、処置の有効性を高めることができる。

【0157】

ある種の実施形態では、約3週間未満、約2週に1回、約10日毎に1回または約1週に1回のサイクルで予防薬または治療薬を投与する。1サイクルは、各サイクルで約90分、各サイクルで約1時間、各サイクルで約45分にわたる注入により治療薬または予防薬を投与することを含んでもよい。各サイクルでは、少なくとも1週間の休薬、少なくとも2週間の休薬、少なくとも3週間の休薬を行ってもよい。投与されるサイクル数は、約1～約12サイクル、より典型的には約2～約10サイクル、より典型的には約2～約8サイクルである。

20

【0158】

なお他の実施形態では、本発明の治療薬および予防薬は、メトロノーム投与レジメンにて、長い休薬期間を設けずに持続注入あるいは頻回投与により投与する。そうしたメトロノーム投与は、薬期間を設けずに一定の間隔で投与することを含んでもよい。典型的には治療薬、特に細胞傷害性薬物を低用量で使用する。そうした投与レジメンは、長期間にわたる比較的低用量の長期連日投与を包含する。好ましい実施形態では、より低用量を使用することで有害な副作用を最小限に抑え、休薬期間を必要としない。ある種の実施形態では、治療薬および予防薬は、約24時間～約2日、～約1週間、～約2週間、～約3週間、～約1ヶ月間、～約2ヶ月間、～約3ヶ月間、～約4ヶ月間、～約5ヶ月間、～約6ヶ月の範囲で長期低用量または持続的な注入により送達する。そうした投与レジメンのスケジュールは、熟練した医師により最適化することができる。

30

【0159】

他の実施形態では、複数の治療薬を哺乳動物に同時に投与する、すなわち、個々の用量の療法剤を別々であっても、本発明の分子が他の薬（単数または複数）と一緒に作用し得るような時間間隔内に投与する。たとえば、週1回投与してもよいある成分を、2週毎に1回または3週毎に1回投与してもよい他の成分と組み合わせてもよい。言い換えれば、各療法剤を同時にまたは1回の患者来院時に投与しない場合でも、各療法剤の投与レジメンを同時に行う。

40

【0160】

本発明の分子を他の予防薬および/または治療薬と組み合わせる場合、本発明の分子ならびに予防薬および/または治療薬は相加的に作用しても、あるいは、一層好ましくは相乗的に作用してもよい。一実施形態では、本発明の分子は、同じ医薬組成物として1つまたは複数の治療薬と同時に投与する。別の実施形態では、本発明の分子は、別々の医薬組成物として1つまたは複数の他の治療薬と同時に投与する。さらに別の実施形態では、本発明の分子は、別の予防薬または治療薬の投与の前または後に投与する。本発明は、本発明の分子を同一または異なる投与経路で、たとえば、経口と非経口とで他の予

50

防薬または治療薬と組み合わせ投与することを意図している。ある種の実施形態では、本発明の分子を、有害な副作用を起こす、以下に限定されるものではないが、毒性を起こす可能性がある別の予防薬または治療薬と同時に投与する場合、予防薬または治療薬は、有害な副作用が誘導される閾値を下回る用量で投与すると都合がよいことがある。

【0161】

本明細書に記載される投薬量および投与頻度は、治療上有効なおよび予防上有効なという用語により包含される。投薬量および頻度はさらに、典型的には投与される個々の治療薬または予防薬、癌の重症度および種類、投与経路のほか、患者の年齢、体重、反応および既往歴によって、各患者に特有の要因に応じて異なる。当業者であれば、そうした要因を考慮し、たとえば、文献に報告され、Physician's Desk Reference (56th Ed., 2002) に推奨されている投与量に従うことで好適なレジメンを選択することができる。

10

【0162】

E. 医薬組成物

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に有用なバルク薬剤組成物（たとえば、不純物を含むまたは非無菌の組成物）、および単位剤形の調製に使用することができる医薬組成物（すなわち、被検体または患者への投与に好適な組成物）を含む。そうした組成物は、本明細書に開示された予防上または治療上有効な量の予防薬および/または治療薬、またはそうした薬と薬学的に許容されるキャリアとの組み合わせを含む。好ましくは、本発明の組成物は、予防上または治療上有効な量の本発明のヒト化抗体および薬学的に許容される

20

【0163】

特定の実施形態では、「薬学的に許容される」という用語は、米国連邦政府または州政府の規制当局により承認されている、または動物、より詳細にはヒトにおける使用について米国薬局方または他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。「キャリア」という用語は、療法剤と共に投与される希釈液、アジュバント（たとえば、フロイントアジュバント（完全および不完全）、賦形剤またはビヒクルをいう。そうした薬学的キャリアは、無菌液、たとえば水、および、たとえば石油起源、動物起源、植物起源または合成起源の油、たとえばピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油および同種のものであってもよい。医薬組成物を静脈投与する場合、水は好ましいキャリアである。また、特に注射溶液の液体キャリアとして食塩水溶液、ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液を使用してもよい。好適な医薬品賦形剤として、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールおよび同種のもの挙げられる。本組成物は、必要に応じて、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤をさらに含んでもよい。これらの組成物は、溶液剤、懸濁剤、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、持続放出製剤および同種のもの形態をとってもよい。

30

【0164】

一般に、本発明の組成物の成分は、たとえば、密封容器、たとえば有効成分の量を表示するアンブルまたはサッシェ (sachette) に乾燥凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として、別々に提供されるかあるいは単位剤形中に混ぜ合わされている。本組成物を注入により投与する場合、無菌の医薬品グレードの水または食塩水を含む輸液ボトルに組成物を混注してもよい。組成物を注射により投与する場合、無菌注射用水または食塩水のアンブルを用意して、投与前に成分を混合できるようにしてもよい。

40

【0165】

本発明の組成物は、中性形態として製剤化しても、あるいは塩形態として製剤化してもよい。薬学的に許容される塩として、アニオンとで形成される塩、たとえば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等から得られる塩、およびカチオンとで形成される塩、たとえばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミ

50

ン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等から得られる塩があるが、これに限定されるものではない。

【0166】

F. キット

本発明は、本発明のヒト化抗体の入った1つまたは複数の容器を含む医療パックまたはキットを提供する。加えて、医療パックまたはキットには、疾患の処置に有用な1つまたは複数の他の予防薬または治療薬がさらに含まれていてもよい。本発明はさらに、本発明の医薬組成物の成分の1つまたは複数の入った1つまたは複数の容器を含む医療パックまたはキットも提供する。そうした容器(単数または複数)には任意に、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関より定められた形式の注意書が添付

10

されている。注意書には、ヒト投与を目的とした製造、使用または販売に関するその機関の承認が反映される。

【0167】

本発明は、上記の方法に使用することができるキットを提供する。一実施形態では、キットは、1つまたは複数の本発明のヒト化抗体を含む。別の実施形態では、キットは、癌の処置に有用な1つまたは複数の他の予防薬または治療薬を1つまたは複数の容器にさらに含む。別の実施形態では、キットは、癌に関連する1つまたは複数の癌抗原に結合する1つまたは複数の細胞傷害性抗体をさらに含む。ある種の実施形態では、他の予防薬または治療薬は化学療法剤である。他の実施形態では、予防薬または治療薬は、生物療法剤またはホルモン療法剤である。

20

【0168】

G. 診断方法

本発明の抗体およびその抗原結合フラグメントは、B7-H4の発現に関連する疾患、障害もしくは感染症を検出、診断またはモニターする、あるいは好適な患者集団または患者プロファイルの判定もしくは特定を決定または支援するなど、診断目的に使用することができる。本発明は、疾患、障害または感染症、特に自己免疫疾患の検出法または診断法であって、(a)被検体の細胞または組織サンプルにおけるB7-H4の発現を、そうした抗原に免疫特異的に結合する1つまたは複数の抗体(またはそのフラグメント)を使用してアッセイすること;および(b)抗原のレベルを対照レベル、たとえば、正常組織サンプルのレベルと比較することを含み、抗原の対照レベルと比較して、アッセイされた抗

30

原レベルの上昇または低下から疾患、障害または感染症が示唆される、検出法または診断法を提供する。そうした抗体およびフラグメントは、好ましくはイムノアッセイ、たとえば酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)および蛍光活性化セルソーター(FACS)に利用される。

【0169】

本発明の一態様は、そうした抗体およびフラグメント、特にヒトB7-H4に結合するそうした抗体およびフラグメントの、インビトロまたはインサイツ組織サンプルの細胞、またはインビボでの細胞におけるIHC解析の試薬としての使用に関する。たとえば、B7-H4はとりわけ癌細胞に発現するが、正常組織には発現しないため(Sica, G. L. et al. (2003)「B7-H4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」Immunity 18: 849-861; Choi, I. H. et al. (2003)「Genomic Organization And Expression Analysis Of B7-H4, An Immune Inhibitory Molecule Of The B7 Family,」J. Immunol. 171: 4650-4654)、そうした細胞が当該抗体またはフラグメントに結合することで、細胞上にB7-H4の存在が検出されると、癌細胞であることが示唆され、癌細胞の診断指標となる。よって、本発明は、被検体における癌の存在を診断するための細胞学的アッセイを提供する。

40

【0170】

50

B7-H4はHIV感染時に過剰発現するため(Carter, C. A. et al. (2008)「Cell Biology Of HIV-1 Infection Of Macrophages,」Ann. Rev. Microbiol. 62:425-443; Noursadeghi, M. et al. (2006)「HIV-1 Infection Of Mononuclear Phagocytic Cells: The Case For Bacterial Innate Immune Deficiency In AIDS,」Lancet Infect. Dis. 6:794-804)、そうした細胞上でのB7-H4の発現(本発明の抗体および抗原結合フラグメントにより検出される)を使用して、ヒトのHIVを診断することができる。

【0171】

以上のように、本発明の抗体およびフラグメントは、ヒトの疾患、障害または感染症の検出および診断に有用である。一実施形態では、そうした診断は、a) B7-H4に免疫特異的に結合する有効量の標識抗体または抗原結合フラグメントを被検体に(たとえば、非経口、皮下または腹腔内)投与すること; b) 投与後、B7-H4が発現する被検体の部位に標識分子が優先的に濃縮する(および、結合していない標識分子がバックグラウンドレベルまで除去される)ことができる時間間隔を置くこと; c) バックグラウンドレベルを判定すること; およびd) 被検体の標識抗体を検出することを含み、標識抗体のバックグラウンドレベルを上回る局所的検出から、被検体が疾患、障害または感染症であることが示唆される。この実施形態では、当業者に公知のイメージングシステムを用いてインビボでの検出が可能なイメージング部分で抗体を標識する。バックグラウンドレベルは、検出された標識分子の量を個々のシステムに対して以前に判定された標準値と比較するなど様々な方法により判定することができる。

【0172】

当該技術分野においては、被検体の大きさおよび使用するイメージングシステムにより、診断画像を得るのに必要なイメージング部分の量が決定されることが理解されよう。インビボでの腫瘍イメージングについては、S. W. Burchiel et al., 「Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments,」(Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S. W. Burchiel and B. A. Rhoades, eds., Masson Publishing Inc. (1982)に記載されている。

【0173】

投与後、標識分子が被検体の部位に優先的に濃縮でき、結合していない標識分子がバックグラウンドレベルまで除去される時間間隔は、使用する標識の種類および投与モードなどいくつかの変数に応じて、6~48時間または6~24時間または6~12時間である。別の実施形態では、投与後の時間間隔は5~20日または5~10日である。

【0174】

一実施形態では、疾患、障害または感染症のモニタリングは、疾患、障害または感染症の診断方法を、たとえば、最初の診断から1ヶ月後、最初の診断から6ヶ月後、最初の診断から1年後等に繰り返すことにより行う。

【0175】

被検体における標識分子の存在は、インビボスキヤニングのための当該技術分野において公知の方法を用いて検出することができる。こうした方法は、使用する標識の種類によって異なる。当業者であれば、特定の標識を検出するのに適切な方法を決定することができる。本発明の診断方法に使用してもよい方法および装置として、コンピューター断層撮影(CT)、全身スキャン、たとえばポジション断層法(PET)、磁気共鳴イメージング(MRI)および超音波検査があるが、これに限定されるものではない。

【0176】

特定の実施形態では、分子を放射性同位元素で標識し、患者において放射線応答性手術

10

20

30

40

50

装置を用いて検出する (Thurston et al. 米国特許第 5,441,050 号明細書)。別の実施形態では、分子を蛍光性化合物で標識し、患者において蛍光応答性スキャニング装置を用いて検出する。別の実施形態では、分子をポジトロン放出金属で標識し、患者においてポジトロン断層法を用いて検出する。なお別の実施形態では、分子を常磁性標識で標識し、患者において磁気共鳴イメージング (MRI) を用いて検出する。

【0177】

これまで本発明について一般的に記載してきたが、以下の例を参照することで本発明をより容易に理解することができるであろう。以下の例は例示として提供するものであり、記載がない限り、本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0178】

実施例 1

抗ヒト B7-H4 抗体の単離および特性評価

生細胞の表面に配置された B7-H4 に免疫特異的に結合する抗体を作製するため、マウス IgG2a のヒンジおよび Fc 領域に連結したマウス B7-H4 の細胞外ドメイン (ECD) を含む B7-H4 Ig 融合体 (「B7-H4 Ig」) でマウスを免疫した。

【0179】

Fc 反応性抗体を産生するハイブリドーマの作製を最小限に抑え、ECD 反応性であったハイブリドーマを選択するため、マウス Fc 領域を有する B7-H4 Ig コンストラクト (「B7-H4 mIg」) を用いて初回免疫および追加免疫を行った。マウス Fc 領域は、マウス宿主において免疫原性が低い (ヒト Fc 領域より) ことが期待され、したがって ECD 反応性抗体を産生するハイブリドーマの作製に有利であるものとして利用した。B7-H4 mIg コンストラクトをその免疫原性を高めるため K L H にコンジュゲートした。

【0180】

初期免疫および追加免疫後に 3 匹のマウス由来の血清を、ヒト B7-H4 Ig (「B7-H4 hIg」) に結合するその能力についてスクリーニングした (図 1)。マウス 2 が抗ヒト B7-H4 hIg 抗体価が最も高いことが明らかになり、ハイブリドーマ作製に使用するためマウス 2 を選択した。ハイブリドーマはマウス 2 から脾細胞を単離し、これを不死化した骨髓腫細胞と融合した。

【0181】

B7-H4 hIg コンストラクトを使用した、プレートを用いた結合アッセイを利用して、誘導された抗体を捕捉した。次いで抗体を IgG あるいは IgM として特性評価した。さらに、特異性の対照として、抗体を B7-DC hIg コンストラクト (ヒト IgG1 のヒンジおよび Fc 領域に連結したヒト DC の細胞外ドメイン (ECD) を含む) (「B7-DC hIg」) で捕捉させ、結合できる IgG の程度を測定した。

【0182】

B7-H4 の ECD に対して特異的であった IgG を産生する 7 個のハイブリドーマおよび IgM を産生する 3 個のハイブリドーマを作製した。これらのうち、5 個の IgG1 産生クローン (2E11、2H7、2H8、2H9、2H10)、1 個の IgG2 産生クローン (2D1) および 2 個の IgM 産生クローン (1H11、2F2) をさらに解析した。これらの結合能を、市販されている抗ヒト B7-H4 抗体、eBioScience 社製 Clone H74 の結合能と比較した (図 2)。抗体濃度および結合力価について、ハイブリドーマ上清を判定した。以下のハイブリドーマ: 2D1、2H9 および 2E11 は H74 と比較すると、B7-H4 Ig コンストラクトに対して同等または上回る特異的結合活性を示すが、B7-DC hIg コンストラクトに対しては示さなかった。したがって、その後の解析のため、これらを好ましいクローンとして選択した。

【0183】

実施例 2

抗 B7-H4 抗体の単離

10

20

30

40

50

抗ヒトB7-H4抗体が細胞表面に発現したB7-H4に結合できることを証明するため、ヒト胎児腎臓293細胞(「HEK293細胞」)を安定的にトランスフェクトしてその細胞表面にヒトB7-H4を発現させた。次いで未希釈および希釈したハイブリドーマ上清について、その抗体がそうした細胞または対照B7-H4<sup>+</sup>HEK293細胞に結合できるかどうかを試験した。洗浄後、アロフィコシアニン(APC)コンジュゲート抗マウス抗体を用いて、結合した抗体を検出し、細胞の平均蛍光強度を判定した(図3)。

【0184】

その結果から、抗ヒトB7-H4抗体2D1、2E11および2H9はどれも、ヒト生細胞の表面に配置されたB7-H4に免疫特異的に結合できたことが示される。

【0185】

#### 実施例3

抗B7-H4抗体は、卵巣癌患者の腫瘍関連マクロファージ(TAM)の免疫抑制を除去する

上記で論じたように、B7-H4<sup>+</sup>である腫瘍環境のマクロファージは、T細胞活性化を著しく抑制する。B7-H4<sup>-</sup>マクロファージは、インビトロでIL-10およびIL-6によりB7-H4<sup>+</sup>マクロファージに変換することができる(Kryczek, I. et al. (2006)「Cutting Edge: Induction Of B7-H4 On APCs Through IL-10: Novel Suppressive Mode For Regulatory T Cells,」J. Immunol. 177(1):40-44)。このため、B7-H4<sup>+</sup>マクロファージとB7-H4<sup>-</sup>マクロファージとの比率、およびB7-H4<sup>+</sup>マクロファージと総腫瘍関連マクロファージとの比率は、腫瘍悪性度および癌の重症度と相関する。実験を行って、本発明の分子が、腫瘍関連マクロファージ上のB7-H4の発現と腫瘍悪性度および癌の重症度とが相関するようなそうした比率を解明できることを証明した。

【0186】

当該実験では、TAMを卵巣癌患者の腹水から単離し、蛍光活性化セルソーター(FACS)に供し、T細胞活性化マーカー、抑制マーカーおよび細胞周期マーカーを発現するそうしたマクロファージの比率を判定した。T細胞増殖は、好ましくはチミジン取り込み法により判定する。好ましくはさらに、異なる相の細胞周期の解析も行う。図4A~4Iはそれぞれ、当該卵巣腹水から単離したTAM上のCD11b<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD14<sup>+</sup>、CD123<sup>+</sup>、CD86<sup>+</sup>、CD80<sup>+</sup>、HLA-DC<sup>+</sup>、B7-H1<sup>+</sup>、B7-H4<sup>+</sup>およびB7-DC<sup>+</sup>の発現を示す。結果から、試験した腫瘍のTAMの81%がB7-H4<sup>+</sup>であったことが示される。

【0187】

#### 実施例4

B7-H4/B7-H1/PD-1遮断抗体は卵巣癌患者のTAMの免疫抑制を除去する

上記で論じたように、腫瘍環境のB7-H4<sup>+</sup>マクロファージは、T細胞活性化を著しく阻害することが分かっており、そうした抑制は、B7-H4を遮断することで抑えることができる。加えて、B7-H4<sup>-</sup>マクロファージは、腫瘍環境に見出されるサイトカイン(IL-10およびIL-6)によりインビトロでB7-H4<sup>+</sup>マクロファージに変換することもできる。実験を行って、本発明の分子がB7-H4による免疫抑制を中和できることを証明する。本研究の結果から、抗B7-H4抗体、抗B7-H1抗体または抗PD-1抗体が付いた細胞は、TAMの非存在下(対照)またはアイソタイプコントロールmAbで処理したTAMの存在下、抗CD3活性時のヒトT細胞と比較して<sup>3</sup>H-チミジン取り込みの増加を示す。そうした取り込みの増加から、抗B7-H4抗体が、B7-H4により媒介されるTAMによる抑制を遮断することができることが示される。さらに、抗B7-H1抗体および抗PD-1抗体も各々、B7-H4により媒介されるTAMによる抑制を遮断することができる。

【0188】

#### 実施例5

B7-H4 / B7-H1 / PD-1 遮断抗体は、OV TAMとの同時インキュベーション後、アロT細胞アッセイにおいてCTL応答を著しく増強する

本発明の分子が細胞傷害性リンパ球(CTL)応答を増強できることを証明するため、CD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞を卵巣腫瘍由来のTAMと、対照アイソタイプ抗体、抗B7-H4抗体、抗B7-H1抗体あるいは抗PD-1抗体との存在下でインキュベートする。そうした同時インキュベーションの結果として、T細胞がIL-17およびINF- $\gamma$ を発現する能力をFACSを用いて測定する。

#### 【0189】

本実験の結果から、アイソタイプモノクローナル抗体対照とのインキュベーション後、CD4<sup>+</sup>T細胞は、Th17(IL-17産生)T細胞の微量成分、およびINF- $\gamma$ を発現する微量成分を含む。CD8<sup>+</sup>T細胞の場合も同様の結果が得られる。これに対し、抗B7-H4抗体、抗B7-H1抗体または抗PD-1抗体の存在下でインキュベートしたCD4<sup>+</sup>T細胞は、IL-17およびINF- $\gamma$ の著しい増加を示し、抗B7-H4抗体の存在下でインキュベートしたCD8<sup>+</sup>T細胞は、INF- $\gamma$ 発現の著しい増加を示す。

#### 【0190】

##### 実施例6

B7-H4遮断抗体は単球による抑制を除去することができる

本発明の分子が免疫抑制を阻止できることを証明するため、健康なドナー由来の、INF- $\gamma$ でプライムした単球を抗B7-H4抗体、抗B7-H1抗体、抗PD-1抗体または陰性対照抗体(呼吸器合胞体ウイルス(RSV)のFタンパク質の抗原部位のエピトープに対するSYNAGIS(登録商標)パリビズマブ(Medimmune, Inc.))とインキュベートした。自家T細胞を抗CD3抗体で活性化し、抗体の存在下で1マクロファージ当たり10T細胞の比率で処理前単球と同時インキュベートした。T細胞を回収し、CD4およびCD8に対して染色し、IL-2、TNF- $\alpha$ およびIL-8に対して細胞内染色した。

#### 【0191】

本研究の結果を図5A~5Eに示す。プライムした単球の陰性対照抗体の存在下でのインキュベーションでは、単球が著しく抑制された。単球の非存在下では、T細胞活性の抑制は起こらない。

#### 【0192】

##### 実施例7

組換え抗B7-H4抗体分子の構築および作製

抗B7-H4抗体2H9、2D1および2E11を発現するハイブリドーマから得られたDNA増幅産物を全長IgG構築のための鋳型として使用した。228位(S228P)を修飾したヒトIgG4骨格を有するキメラ抗体を作製した。S228P修飾により、IgG1のヒンジ領域との類似性がより大きいヒンジ領域を持つIgG4分子が得られる(Aalberse, R.C. et al. (2002)「IgG4 Breaking The Rules,」Immunology 105:9-19; Angal, S. et al. (1993)「A Single Amino Acid Substitution Abolishes The Heterogeneity Of Chimeric Mouse/Human(IgG4) Antibody,」Molec. Immunol 30:105-108; Bloom, J.W. et al. (1997)「Intrachain Disulfide Bond In The Core Hinge Region Of Human IgG4,」Protein Sci 6:407-415; Schuurman, J. et al. (2001)「The Interheavy Chain Disulfide Bonds Of IgG4 Are In Equilibrium With Intra-Chain Disulfide Bonds,」Molec. Immunol 38:1-8)。成熟全長IgGに対応するヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、以下の通りである：

## 【 0 1 9 3 】

抗 B 7 - H 4 抗体 2 D 1 の軽鎖をコードするヌクレオチド配列 ( 配列番号 3 3 ) :

## 【 化 9 】

```
gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga
tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca cagccttgta cacagtaatg
gaaacaccta tttacattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaac
ctcctgatct acatagtttc caaccgattt tctgggggtcc cagacaggtt
cagtggcagt ggatcagggg cagatttcac actcaagatc agcagagtgg
aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct
cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaagcggg ccgtggccgc
ccccagcgtg ttcactctcc ctcccagcga cgagcagctg aagtctggca
ccgccagcgt ggtgtgcctg ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag
gtgcagtgga aggtggacaa cgcctgtcag agcggcaaca gccaggagag
cgtgaccgag caggactcca aggacagcac ctacagcctg agcagcacc
tgaccctgag caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgcgag
gtgaccacc aggactgtc tagccccgtg accaagagct tcaaccgggg
cgagtgc
```

10

## 【 0 1 9 4 】

抗 B 7 - H 4 抗体 2 D 1 の軽鎖のアミノ酸配列 ( 配列番号 3 4 ) [ 可変ドメインの配列 ( 配列番号 3 ) を下線で示す ] :

## 【 化 1 0 】

```
DVVMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSHSLV HSNGNTYLHW YLQKPGQSPN
LLIYIVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
PTFGAGTKLE LKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
```

20

## 【 0 1 9 5 】

抗 B 7 - H 4 抗体 2 D 1 の重鎖をコードするヌクレオチド配列 ( 配列番号 3 5 ) :

## 【化 1 1】

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc  
 cctgaaactc tctgtgcag cctctggatt cactttcaat agccatggca  
 tgtcttgggt tgcagact cgggaaaaga ggctggactg ggtcgcaacc  
 attagtgatg gtggtactta cacctactat ccagtcaatg taaagggccg  
 attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtac ctgcaaatga  
 gccatctgaa gtccgaggac acagccatgt attactgtgc aagagatggg  
 gggggagggg cttactgggg ccaagggact ctggctactg tctctgcagc  
 tagcaccaag ggtccatcgg tcttcccact ggcgcttgc tccaggagca  
 cctccgagag cacagccgct ctgggttgc tgggtcaagga ctacttccc  
 gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggt gccctgacca gcggcgtgca  
 caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctcagcagcg  
 tgggtgacgt gccctcagc agcttgggta cgaagaccta cacctgcaac  
 gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagtccaa  
 atatggtcct ccatgccac catgccagc acctgagttc ctgggtggac  
 catcagtctt cctgttccca ccaaaacca aggacactct catgatctcc  
 cggaccctg aggtcacgtg cgtcgtagt gacgtgagcc aggaagacc  
 cgaggtccag ttcaactggt acgtggatgg cgtggagggt cataatgcca  
 agacaaagcc gcgggaggag cagttcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc  
 gtctcaccg tcttgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg  
 caaggtctcc aacaaaggcc tcccgctctc catcgagaaa accatctcca  
 aagccaaagg gcagccacga gagccacagg tgtacacct gcctccatcc  
 caggaagaga tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tgggtcaaagg  
 cttctacct agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg  
 agaacaacta caagaccacg cctccagtgc tggactccga cggctccttc  
 ttctctaca gcaggtcac cgtggacaag agcaggtggc aggagggtaa  
 tgtcttctca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac  
 agaagagcct gagcctgagc cccggaag

## 【 0 1 9 6 】

抗 B 7 - H 4 抗体 2 D 1 の重鎖のアミノ酸配列 ( 配列番号 3 6 ) [ 可変ドメインの配列 ( 配列番号 4 ) を下線で示す ] :

## 【化 1 2】

EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFN SHGMSWVRQT PEKRLDWVAT  
ISDGGTYTY PVNVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSHLKSED TAMYYCARDG  
GGGAYWGQGT LVTVSAASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP  
 EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVTVPSL SLGTKTYTCN  
 VDHKPSNTKV DKRVESKYGP PCPPCPAPEF LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS  
 RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTYRVVS  
 VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPSSIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS  
 QEEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF  
 FLYSRLTVDK SRWQEGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK

## 【 0 1 9 7 】

抗 B 7 - H 4 抗体 2 H 9 の軽鎖をコードするヌクレオチド配列 ( 配列番号 3 7 ) :

10

20

30

40

## 【化 1 3】

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca  
 gagggccacc atctcctgca gagccagcga aagtattgat aattatggca  
 ttagttttat gcactggtac cagcagaaac caggacagcc acccaaactc  
 ctcatctatc gtgcatccaa cctagaatct gggatccctg ccaggttcag  
 tggcagtggt tctaggacag acttcaccct caccattaat cctgtggaga  
 ctgatgatgt tgcaacctat ttctgtcagc aaagtgatga gggtcggacg  
 ttcgggtggag gcaccaagct ggaaatcaag cggaccgtgg ccgccccag  
 cgtgttcac ttcctccca gcgacgagca gctgaagtct ggcaccgcca  
 gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgcgagge caaggtgcag  
 tgggaaggtg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg agagcgtgac  
 cgagcaggac tccaaggaca gcacctacag cctgagcagc accctgacct  
 tgagcaaggc cgactacgag aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc  
 caccagggac tgtctagccc cgtgaccaag agcttcaacc ggggacgagtg  
 c

10

## 【0 1 9 8】

抗 B 7 - H 4 抗体 2 H 9 の軽鎖のアミノ酸配列 (配列番号 3 8) [可変ドメインの配列  
 (配列番号 7) を下線で示す] :

## 【化 1 4】

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESID NYGISFMHWY QQKPGQPPKL  
LIYRASNLES GIPARFSGSG SRTDFLTIN PVETDDVATY FCQQSDEGRT  
FGGGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ  
 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT  
 HQGLSSPVTK SFNRGEC

20

## 【0 1 9 9】

抗 B 7 - H 4 抗体 2 H 9 の重鎖をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 3 9) :

## 【化15】

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaaac ttagtgaagc ctggagggtc  
 cctgaaactc tctgtgagc cctctggatt cactttcagt aactctgcc  
 tgtcttgggt tcgccagact ccgaaaaga ggctggagtg ggtcgcaacc  
 attagtgatg gtggctgcta cacctactat ccagacaatg taaagggccg  
 attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtac ctgcaaatga  
 gccatctgaa gtctgaggac acagcccttt attactgtgc aagagatcga  
 cccactggt acttcgatgt ctggggcaca ggggccacgg tcaccgtctc  
 ctgagctagc accaagggtc catcggtctt cccactggcg ccttgctcca  
 ggagcacctc cgagagcaca gccgctctgg gttgcctggt caaggactac  
 ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac tcaggtgcc tgaccagcgg  
 cgtgcacacc ttcccggctg tctacagtc ctgaggactc tactccctca  
 gcagcgtggg gaccgtgcc tccagcagct tgggtacgaa gacctacacc  
 tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga  
 gtccaaatat ggtcctccat gccaccatg cccagcacct gagttcctgg  
 gtggaccatc agtcttctg tcccaccaa aaccgaagga cactctcatg  
 atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtc gtagttgacg tgagccagga  
 agacccccgag gtccagttca actggtacgt ggatggcgtg gaggtgcata  
 atgccaaagc aaagccgagg gaggagcagt tcaacagcac gtaccgtgtg  
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta  
 caagtgaag gtctccaaca aaggcctccc gtcctccatc gagaaaacca  
 tctccaaagc caaagggcag ccacgagagc cacaggtgta caccctgcct  
 ccatcccagg aagagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt  
 caaaggcttc taccctagcg acatgcctg ggagtgggag agcaatgggc  
 agccggagaa caactacaag accacgcctc cagtgcctgga ctccgacggc  
 tctttctcc tctacagcag gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagga  
 gggtaatgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact  
 acacacagaa gagcctgagc ctgagccccg gaaag

10

20

## 【0200】

抗B7-H4抗体2H9の重鎖のアミノ酸配列(配列番号40)[可変ドメインの配列  
 (配列番号8)を下線で示す]:

## 【化16】

EVQLVESGGN LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NSAMSWVRQT PEKRLEWVAT  
ISDGGRYTY PDNVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSHLKSED TALYYCARDR  
PHWYFDVWGT GATVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY  
 FPEPVTVSWN SGALTSQVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTYT  
 CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM  
 ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV  
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF  
 PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG  
 SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL SLPK

30

## 【0201】

抗B7-H4抗体2E11の軽鎖をコードするヌクレオチド配列(配列番号41):

40

## 【化 1 7】

gacatcgtga tgagccagag ccctagcagc ctggccgtgt ccgtgggaga  
 gaaagtgacc gtgtcctgca agagcagcca gtccctgctg tactccacca  
 accagagaac ctacctggcc tggttccagc agaagcccgg ccagtctccc  
 aagctgctga tctactgggc cagcaccaga gaaagcggcg tgcccagacag  
 attcacaggc agcggctctg gcaccgactt caccctgaca atcagcagcg  
 tgaaggccga ggacctggct gtgtactact gccagcagta ctacaactac  
 ccctgacct tcggcaccgg caccaagctg gaactgaaga gaaccgtggc  
 cgctcccagc gtgttcatct tcccacctag cgacgagcag ctgaagtccg  
 gcacagcctc tgtcgtgtgc ctgctgaaca acttctaccc ccgcgaggcc  
 aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccttg cagagcggca acagccagga  
 aagcgtgacc gagcaggaca gcaaggactc cacctacagc ctgagcagca  
 ccctgaccct gagcaaggcc gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc  
 gaagtgaccc accagggcct gtctagcccc gtgaccaaga gcttcaacag  
 aggcgagtgc

10

## 【 0 2 0 2】

抗 B 7 - H 4 抗体 2 E 1 1 の軽鎖のアミノ酸配列 ( 配列番号 4 2 ) [ 可変ドメインの配列 ( 配列番号 5 ) を下線で示す ] :

## 【化 1 8】

DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT VSCKSSQSLI YSTNQRTYLA WFQOKPGQSP  
KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVKAEDLA VYYCQYYNY  
PLTFGTGTKL ELKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA  
 KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC  
 EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

20

## 【 0 2 0 3】

抗 B 7 - H 4 抗体 2 E 1 1 の重鎖をコードするヌクレオチド配列 ( 配列番号 4 3 ) :

## 【化 1 9】

gaagtgaagc tgggtggaatc tgagggcggc ctggtgcagc ctggcagcag  
 catgaagctg agctgtaccg ccagcggcct caagttcacc gactactaca  
 tggcctgggt gcgacaggtg cccgagaagg gactggaatg ggtggccaac  
 atcaactacg acggcagctc cacctactac ctggacagcc tgaagtccag  
 attcatcatc agcagagaca acgccaagaa catcctgtac ctgcagatga  
 actccctgaa gtctgaggac accgctacct actactgcgc cagaaagggc  
 tacttcgact actggggcca gggcaccacc ctgacagtgt ctagcgcaccg  
 caciaagggc ccagcgtgt tccctctggc ccttctgtagc agaagcacca  
 gcgagtctac agccgccctg ggctgcctcg tgaaggacta ctttcccagc  
 cccgtgaccg tgtcctggaa ctctggcgct ctgacctctg ggggtgcacac  
 ctccctgccc gtgctgcagt ctagcggcct gtactctctg agcagcgtcg  
 tgacagtgcc cagcagcagc ctgggcacca agacctacac ctgtaacgtg  
 gaccacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagtgg aatctaagta  
 cgcccctccc tgccccctt gtctgtctcc tgaatttctg ggcggaccct  
 ggtgtccaac aagggcctgc ctagcagcat cgaaaagacc atcagcaagg  
 ccaagggcca gccccgggaa ccccagggtg acacactgcc tccaagccag  
 gaagagatga ccaagaacca ggtgtccctg acctgtctcg tgaaggcctt  
 ctaccctcc gatatcgccg tggaatggga gagcaacggc cagcccagaga  
 acaactaaa gaccacccc cctgtgctgg actccgatgg ctcatctctc  
 ctgtacagca gactgaccgt ggacaagtcc aggtggcagg aaggcaacgt  
 gttcagctgc agcgtgatgc acgaggcct gcacaaccac tacaccagaga  
 agtccctgag cctgagcccc ggc

30

40

50

## 【 0 2 0 4 】

抗 B 7 - H 4 抗体 2 E 1 1 の重鎖のアミノ酸配列 ( 配列番号 4 4 ) [ 可変ドメインの配列 ( 配列番号 6 ) を下線で示す ] :

## 【 化 2 0 】

**EVKLVSEGG** **LVQPGSSMKL** **SCTASGFKFT** **DYYMAWVRQV** **PEKGLEWVAN**  
**INYDGSSTYY** **LDLKSRLFII** **SRDNAKNILY** **LQMNLSLKSED** **TATYYCARKG**  
**YFDYWGQGT** **LTVSSASTKG** PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE  
PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV  
DHKPSNTKVD KRVESKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR  
TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV  
LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ  
EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF  
LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP G

10

## 【 0 2 0 5 】

軽鎖および重鎖は、上記 2 D 1 をコードするポリヌクレオチド、2 H 9 をコードするポリヌクレオチドおよび 2 E 1 1 をコードするポリヌクレオチドと、5 ' 開始コドン ( A T G ) を含むリーダー配列および 3 ' 終止コドン ( 重鎖をコードするポリヌクレオチドには T A G、ならびに軽鎖 2 D 1 をコードするポリヌクレオチドおよび 2 H 9 をコードするポリヌクレオチドには T A A ; 重鎖 2 E 1 1 をコードするポリヌクレオチドおよび軽鎖 2 E 1 1 をコードするポリヌクレオチドには T G A ) とを融合して、当該ポリヌクレオチドから発現させた。2 D 1 および 2 H 9 の重鎖および軽鎖の発現に使用したリーダー配列をコードするポリヌクレオチドは、下記 ( 配列番号 4 5 ) であった。

20

## 【 化 2 1 】

atggagaccg acaccctgct gctctgggtg ctgctgctct gggtgcccgg  
ctccaccgga

この配列は、リーダー配列 ( 配列番号 4 6 ) : M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G をコードする。

## 【 0 2 0 6 】

2 E 1 1 軽鎖の発現に使用したリーダー配列をコードするポリヌクレオチドは、下記 ( 配列番号 4 7 ) であった。

30

## 【 化 2 2 】

atgagcgtgc ccacacaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgaccga  
cgccagatgc

この配列は、リーダー配列 ( 配列番号 4 8 ) : M S V P T Q V L G L L L L W L T D A R C をコードする。

## 【 0 2 0 7 】

2 E 1 1 重鎖の発現に使用したリーダー配列をコードするポリヌクレオチドは、下記 ( 配列番号 4 9 ) であった。

40

## 【 化 2 3 】

atggaatggt cctgggtggt cctgttcttc ctgagcgtga ccaccggcgt  
gcacagc

この配列は、リーダー配列 ( 配列番号 5 0 ) : M E W S W V F L F F L S V T T G V H S をコードする。

## 【 0 2 0 8 】

2 D 1 をコードするポリヌクレオチドおよび 2 H 9 をコードするポリヌクレオチドを含むプラスミドを、L A F E C T I N E ( 商標 ) カチオン性脂質系トランスフェクション試

50

薬 (Lake Pharma) を用いて CHO 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから 4 日後に上清を集め、Fc ELISA (商標) (Lake Pharma) を用いて上清中の総 IgG レベルを判定した (表 4)。表 5 に示すように、試験した重鎖および軽鎖の組み合わせはすべて抗体を産生した。ELISA のバックグラウンドは、1 ng/ml 未満である。

【0209】

【表 4】

重鎖	軽鎖	産生された IgG (ng/ml)
2D1	2D1	448
2D1	2H9	30
2H9	2D1	372
2H9	2H9	268

10

【0210】

ヒト B7 - H4 タンパク質抗原および対照抗原を 96 ウェル ELISA プレートにコートした。次いでプレートを 3% BSA でブロッキングし、PBS で洗浄した。

20

【0211】

次いでコンディション培地 (トランスフェクションから 4 日) について、96 ウェル ELISA で抗原結合を試験した。検出抗体として抗 Fc - HRP を使用した。プレートを PBS で洗浄し、HRP 呈色反応のため TMB (3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン) を加えた。発色したら、吸光度マイクロプレートリーダーで各ウェルの OD<sub>650</sub> を判定した。表 5 に示すように、2D1 重鎖および軽鎖または 2H9 重鎖および軽鎖から形成された抗体は、B7 - H4 抗原に対して強い結合を示し、対照に対して顕著な結合を示さなかった。1 つの 2D1 鎖および 1 つの 2H9 鎖で構成された抗体は、顕著な結合を示さなかった。

【0212】

30

【表 5】

重鎖	軽鎖	産生された IgG (ng/ml)
2D1	2D1	1.12
2D1	2H9	0.06
2H9	2D1	0.02
2H9	2H9	1.15

40

【0213】

各抗体の効力を判定するため、様々な濃度の抗体を用いて抗原結合アッセイを行った。図 6 は、標的抗原への結合における抗体の用量反応を示す。

【0214】

このデータから、配列番号 33 および配列番号 35 (それぞれ抗 B7 - H4 抗体 2D1 の軽鎖および重鎖) の配列を有するポリヌクレオチドが発現され、ヒト B7 - H4 抗原に強力かつ免疫特異的に結合することができる抗体を形成し得たことが示される。同様に、データからは、配列番号 37 および配列番号 39 (それぞれ抗 B7 - H4 抗体 2H9 の軽鎖および重鎖) の配列を有するポリヌクレオチドが発現され、ヒト B7 - H4 抗原に強力かつ免疫特異的に結合することができる抗体を形成し得たことも示される。

50

【 0 2 1 5 】

本明細書に言及した刊行物および特許はすべて、1つ1つの刊行物または特許出願を、その全体を援用するために具体的に個々に示してあるのと同じ程度に本明細書に援用する。本発明についてその特定の実施形態と共に記載してきたが、本発明はさらに修正を行うことができ、本出願は、一般に本発明の原理に従う本発明の任意の変更、使用または適合を包含することを意図しており、さらに本発明の属する技術分野において既知または一般的な慣行の範囲内にあり、上記に記載した本質的特徴に適用し得る本開示からの逸脱を含むことが理解されよう。

【 図 1 】

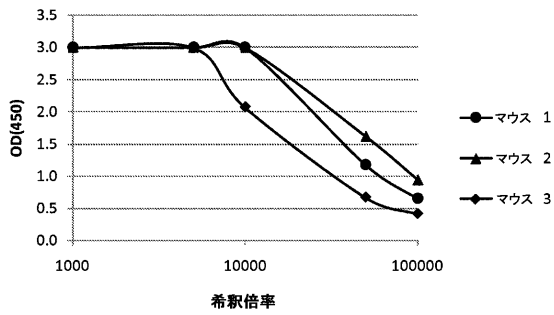


図 1

【 図 3 】

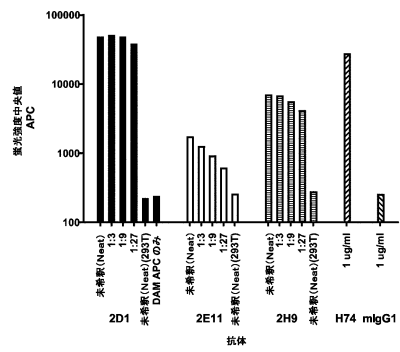


図 3

【 図 2 】

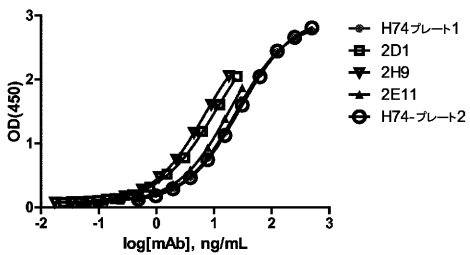


図 2

【 図 4 A 】

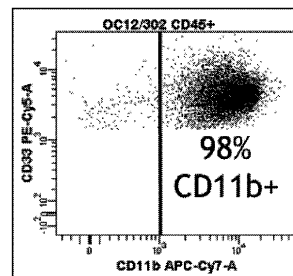


Figure 4A

【 図 4 B 】

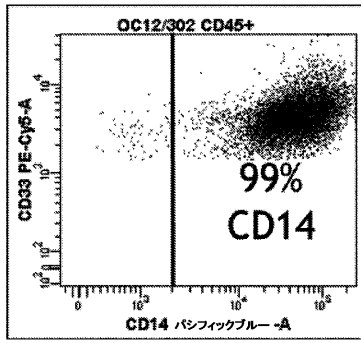


図4B

【 図 4 C 】

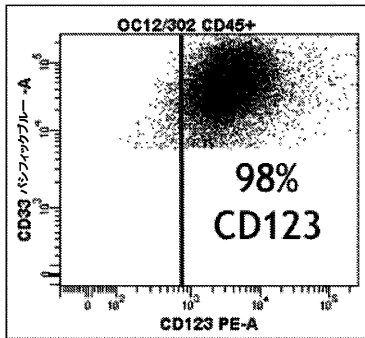


図4C

【 図 4 F 】

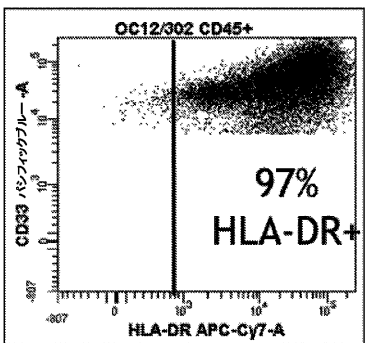


図4F

【 図 4 G 】

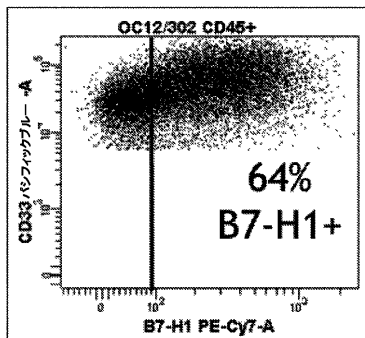


図4G

【 図 4 D 】

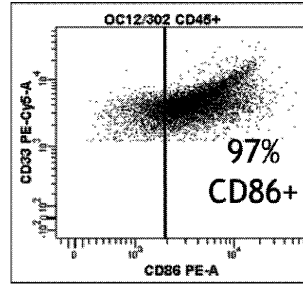


Figure 4D

【 図 4 E 】

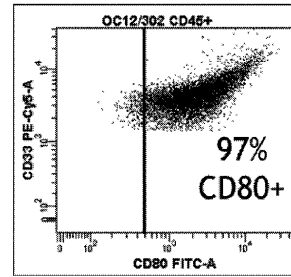


Figure 4E

【 図 4 H 】

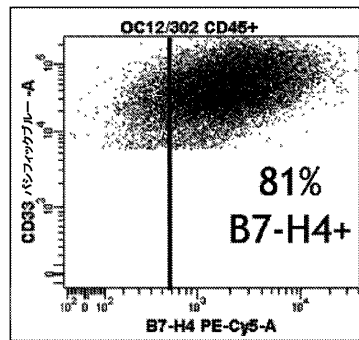


図4H

【 図 4 I 】

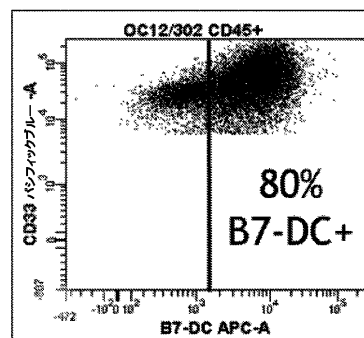


図4I

【 図 5 A 】

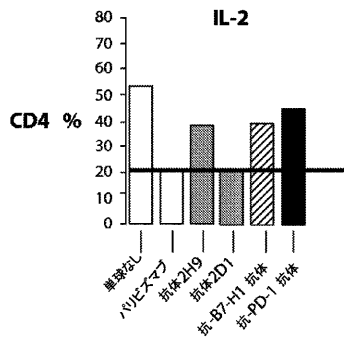


図5A

【 図 5 C 】

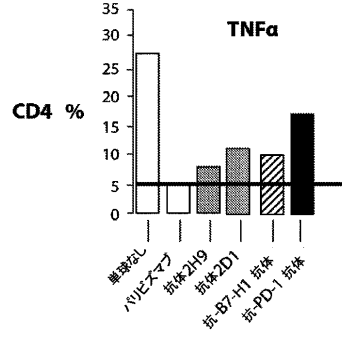


図5C

【 図 5 B 】

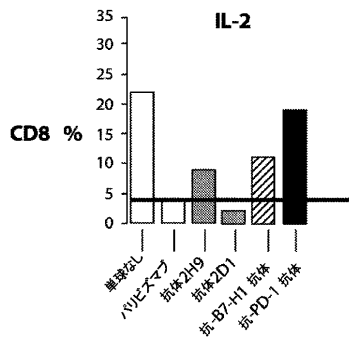


図5B

【 図 5 D 】

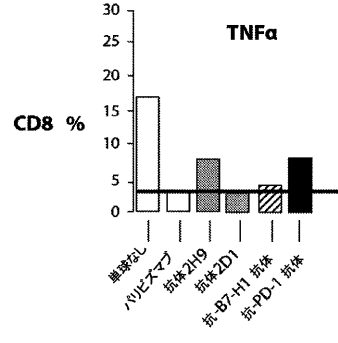


図5D

【 図 5 E 】

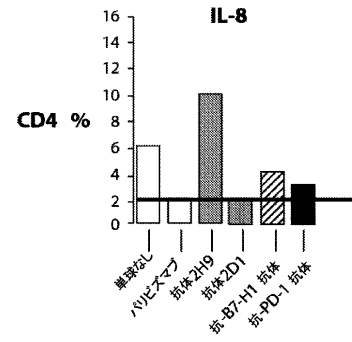


図5E

【 図 6 】

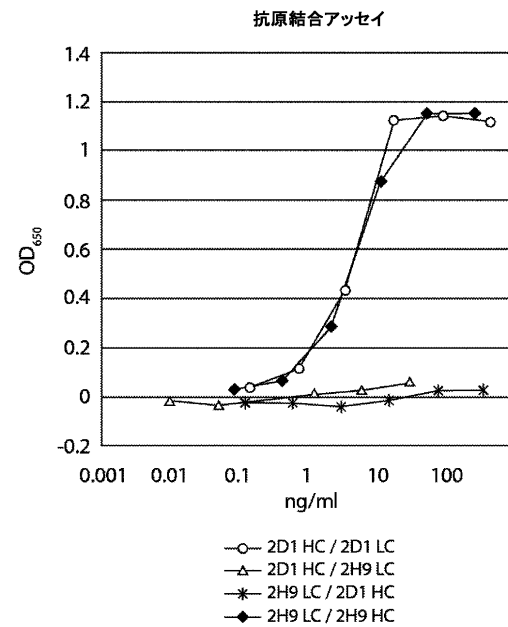


図6

【 図 5 F 】

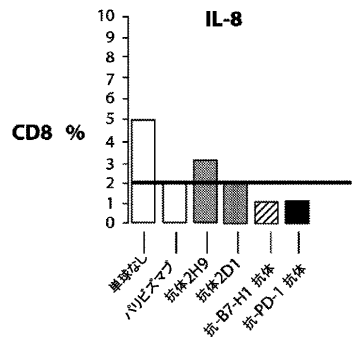


図5F

【配列表】

0006120848000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	43/00
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 Y
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/574 D
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08

- (72)発明者 リュー, リンダ  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 0 2 9, クラークスビル, ティッパラリー コート 6  
 5 1 2
- (72)発明者 マーシャル, シャノン  
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 2 8, ボルチモア, フレデリック ロード 1 5 0 3
- (72)発明者 ランガーマン, 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 ブールパー  
 ド 6 6 0 6

審査官 名和 大輔

- (56)参考文献 特表2011-505372(JP,A)  
 米国特許出願公開第2005/0202536(US,A1)  
 Eur.J.Med.Res.,2011-JUL,16(7),p.295-302

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
 C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6  
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )

专利名称(译)	抗B7-H4抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP6120848B2</a>	公开(公告)日	2017-04-26
申请号	JP2014526161	申请日	2012-08-15
[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		
当前申请(专利权)人(译)	MedImmune公司, 有限责任公司		
[标]发明人	リユーリンダ マーシャルシャノン ランゲーマンソロモン		
发明人	リユー, リンダ マーシャル, シャノン ランゲーマン, ソロモン		
IPC分类号	C07K16/28 C07K16/46 C12Q1/04 A61K39/395 A61K45/00 A61K51/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P37/02 A61P37/06 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	A61P29/00 A61P31/00 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 C07K16/2827 C07K2317/76 C07K16/30 C07K2317/565 C07K2317/77		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C07K16/46 C12Q1/04 A61K39/395.N A61K45/00 A61K43/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P37/02 A61P37/06 G01N33/53.Y G01N33/574.D C12N15/00.A C12P21/08		
代理人(译)	夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/523819 2011-08-15 US		
其他公开文献	JP2014531409A5 JP2014531409A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及抗体(包括抗B7-H4抗体)及其抗原结合片段和涉及能够免疫特异性结合B7-H4抗体的其它分子(包括结合相关抗原/受体等的融合蛋白)H4以及这些分子在诊断和治疗癌症和其他疾病中的用途。本发明特别涉及使用这些分子来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”)的活性以改变其活性和/或减少TAM介导的免疫抑制。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6120848号 (P6120848)
(45) 発行日 平成29年4月26日(2017.4.26)		(24) 登録日 平成29年4月7日(2017.4.7)
(51) Int. Cl.	F 1	
C 0 7 K 1 6 / 2 8 ( 2 0 0 6 . 0 1 )	C 0 7 K 1 6 / 2 8	Z N A
C 0 7 K 1 6 / 4 6 ( 2 0 0 6 . 0 1 )	C 0 7 K 1 6 / 4 6	
C 1 2 Q 1 / 0 4 ( 2 0 0 6 . 0 1 )	C 1 2 Q 1 / 0 4	
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 ( 2 0 0 6 . 0 1 )	A 6 1 K 3 9 / 3 9 5	N
A 6 1 K 4 5 / 0 0 ( 2 0 0 6 . 0 1 )	A 6 1 K 4 5 / 0 0	
請求項の数 12 (全 80 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2014-526161(P2014-526161)	(73) 特許権者 504333972	
(22) 出願日 平成24年8月15日(2012.8.15)	メディムン、エルエルシー	
(63) 公表番号 特表2014-531409(P2014-531409A)	アメリカ合衆国 20878	メリーラン
(43) 公表日 平成26年11月27日(2014.11.27)	ド州、グイサースパーク、ワン	メディム
(86) 国際出願番号 PCT/US2012/050903	ューン	クエイ
(87) 国際公開日 W02013/025779	(74) 代理人 100078282	弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号 61/523,819	(74) 代理人 100113413	弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日 平成27年7月29日(2015.7.29)	(74) 代理人 100181674	弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国 米国(US)	(74) 代理人 100181641	弁理士 石川 大輔
	(74) 代理人 230113332	弁理士 山本 健作
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 抗B7-H4抗体およびその使用		