

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5154949号  
(P5154949)

(45) 発行日 平成25年2月27日 (2013. 2. 27)

(24) 登録日 平成24年12月14日 (2012. 12. 14)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 P 31/12 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 31/18 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 V

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 31/18

請求項の数 23 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2007-549894 (P2007-549894)  
 (86) (22) 出願日 平成18年1月6日 (2006. 1. 6)  
 (65) 公表番号 特表2008-526812 (P2008-526812A)  
 (43) 公表日 平成20年7月24日 (2008. 7. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/050071  
 (87) 国際公開番号 W02006/072624  
 (87) 国際公開日 平成18年7月13日 (2006. 7. 13)  
 審査請求日 平成20年12月3日 (2008. 12. 3)  
 (31) 優先権主張番号 PA200500027  
 (32) 優先日 平成17年1月6日 (2005. 1. 6)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

微生物の受託番号 CNCM 1-3224

(73) 特許権者 509091848  
 ノヴォ ノルディスク アー／エス  
 デンマーク、ハウスヴェア ディーケー  
 2880、ノヴォ アレー  
 (73) 特許権者 505473891  
 イネイト・ファルマ  
 フランス国、エフー13009 マルセイ  
 ユ、アンシャン・シュマン・ドウ・カッシ  
 ス 121、インムーブル・グラン・プレ  
 (74) 代理人 100088683  
 弁理士 中村 誠  
 (74) 代理人 100108855  
 弁理士 蔵田 昌俊  
 (74) 代理人 100075672  
 弁理士 峰 隆司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ウイルス感染を治療するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

HIVによって生じるウイルス疾患を、その必要があるヒト対象において治療するための医薬組成物の調製のためのナチュラルキラー（NK）細胞の抑制性受容体を遮断する化合物の使用方法であって、ヒト対象が、高活性の抗レトロウイルス治療（HAART）で治療され、および前記化合物は、KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3に結合し、かつKIR2DL1-、KIR2DL2-およびKIR2DL3を媒介したNK細胞障害性の阻害を遮断する抗体である方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、前記抗体は、HLA-C分子のKIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3受容体への結合を特異的に遮断する方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法であって、前記抗体は、KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3の少なくとも1つに対する結合の際に登録番号CNCM 1-3224として寄託されたハイブリドーマにより製造された抗体DF200と競合する方法。

【請求項 4】

請求項1に記載の方法であって、前記抗体は、KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3の少なくとも1つに対する結合の際に配列番号1に対応するアミノ酸配列を有する可変重（VH）鎖領域および配列番号2に対応するアミノ酸配列を有する可変軽（VL）鎖領域を含む抗体と競合する方法。

【請求項 5】

請求項4に記載の方法であって、前記抗体は配列番号1に対応するアミノ酸配列を有する可変重（VH）鎖領域および配列番号2に対応するアミノ酸配列を有する可変軽（VL）鎖領域を含む抗体である方法。

【請求項6】

請求項1に記載の方法であって、前記ヒト対象は、前記第1の化合物を投与する前に、所定レベル以下のHIV血漿レベルを達成するために十分な期間HAARTで治療されている方法。

【請求項7】

請求項1～5のいずれか1項に記載の方法であって、CD3、CD28、CD4、CCR5、gp120およびgp41から選択される抗原に結合し、Fc領域を通じてCD16と結合する治療抗体またはFc融合タンパク質である第2の化合物を前記対象に投与することをさらに含む方法。

10

【請求項8】

請求項7に記載の方法であって、前記第2の化合物は、治療抗体である方法。

【請求項9】

ウイルス疾患を、その必要があるヒト対象において治療するための医薬組成物の調製のためのNK細胞の抑制性受容体を遮断する第1の化合物とCD3、CD28、CD4、CCR5、gp120およびgp41から選択される抗原に結合する治療抗体またはFc融合タンパク質である第2の化合物の使用であって、第1の化合物が、KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3受容体の共通の決定因子に結合して、KIR2DL1-、KIR2DL2-、KIR2DL3を媒介したNK細胞細胞障害性の障害を遮断する抗体であり、第2の化合物は、Fc領域を通じてCD16と結合する方法。

20

【請求項10】

請求項9に記載の方法であって、前記ウイルス疾患は、HIV（ヒト免疫不全症ウイルス）、RSV（呼吸器合胞体ウイルス）、CMV（サイトメガロウイルス）、エボラウイルス、A型肝炎ウイルス（HAV）、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）、ヒトヘルペスウイルス8（HHV-8）、ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）またはパルボウイルスによって生じる方法。

【請求項11】

請求項10に記載の方法であって、前記ウイルス疾患は、HIVによって生じる方法。

30

【請求項12】

請求項10に記載の方法であって、前記ウイルス疾患は、C型肝炎ウイルスによって生じる方法。

【請求項13】

請求項9～12のいずれか1項に記載の方法であって、前記第2の化合物は、治療抗体である方法。

【請求項14】

請求項9～13のいずれか1項に記載の方法であって、前記第2の化合物は、ヒトIgG1またはIgG3抗体のFc部分を含む抗体または融合タンパク質である方法。

【請求項15】

40

請求項9～14のいずれか1項に記載の方法であって、前記第1の化合物は、HLA-C分子のKIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3受容体への結合を特異的に遮断する方法。

【請求項16】

請求項15に記載の方法であって、前記第1および第2の化合物は、モノクローナル抗体である方法。

【請求項17】

請求項15～16のいずれか1項に記載の方法であって、前記第1および第2の化合物の少なくとも1つは、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である方法。

【請求項18】

請求項9～17のいずれか1項に記載の方法であって、前記第1の化合物は、CD94、NKG2A / C

50

、KIR2DLおよびKIR3DLヒト受容体の少なくとも1つに結合し、かつそれが結合するヒト受容体によって媒介されるNK細胞細胞障害性の阻害を遮断する方法。

【請求項 19】

請求項18に記載の方法であって、前記第1の化合物は、少なくとも2つのKIR2DLヒト受容体の共通の決定因子に結合し、かつそれが結合するKIR2DLヒト受容体によって媒介されるNK細胞細胞障害性の阻害を遮断する方法。

【請求項 20】

請求項9に記載の方法であって、前記第1の化合物は、KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3の少なくとも1つに結合する際に登録番号CNCM 1-3224として寄託されたハイブリドーマにより製造された抗体DF200と競合する抗体である方法。

10

【請求項 21】

請求項9に記載の方法であって、前記第1の化合物は、KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3の少なくとも1つに結合する際に前記抗体は配列番号1に対応するアミノ酸配列を有する可変重（VH）鎖領域および配列番号2に対応するアミノ酸配列を有する可変軽（VL）鎖領域を含む抗体と競合する抗体である方法。

【請求項 22】

請求項9～21のいずれか1項に記載の方法であって、前記第1および第2の化合物は、同時に対象に投与される方法。

【請求項 23】

請求項9～22のいずれか1項に記載の方法であって、前記第2の化合物は、第1の化合物の投与の4週以内に対象に投与される方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、HIV（ヒト免疫不全症ウイルス）およびHCV（C型肝炎ウイルス）などのウイルス感染の治療のための方法および組成物に関する。より詳細には、本発明は、これらの治療およびその他のウイルス疾患のための1つまたは複数のヒトキラーIg様受容体（KIR）に対して特異的なモノクローナル抗体（mAb）の使用に関する。特定の態様において、本発明は、HAART療法を受けたHIV患者の治療におけるこのようなmAbの使用に関する。もう一つの詳細な態様において、本発明は、特にウイルス感染した細胞の根絶に導く抗体依存性細胞障害作用（ADCC）メカニズムの増大を介して、ヒト対象における治療効率を増強するために、ナチュラルキラー細胞の抑制性KIR受容体に結合して遮断し、かつ哺乳動物対象におけるナチュラルキラー細胞細胞障害性を増強することができるmAb（またはその他の化合物）と組み合わせた、ウイルス感染細胞に発現された表面分子に特異的な治療抗体の使用に関する。

30

【発明の背景】

【0002】

ヒトにおける種々の治療戦略は、治療抗体の使用に基づく。これには、たとえば、標的細胞、特にウイルス感染細胞、腫瘍細胞またはその他の病原性細胞などの病気にかかった細胞を減少させるために開発された治療抗体の使用を含む。このような抗体は、典型的には免疫グロブリン（IgG）種のモノクローナル抗体、典型的にはヒトIgG1またはIgG3 Fc部分である。これらの抗体は、天然の、または組換え抗体であることができ、ヒト化マウス抗体（すなわち、種々の種に由来する機能的ドメイン、典型的にはヒトまたは非ヒト霊長類起源のFc部分とマウス起源の可変領域または相補性決定領域（CDR）とを含む）をする。あるいは、モノクローナル抗体は、ヒトIg座位トランスジェニックマウスにおける免疫化を介してか、またはヒト細胞に由来するcDNAライブラリーを介して得られる、完全にヒトのものであることができる。このような治療抗体の特定の例には、CD20特異性を与えるマウス可変ドメインに連結されたヒトガンマ1およびカッパ定常領域（従って、ヒトIgG1 Fc部分で）で作製されたキメラ抗CD20モノクローナル抗体であるリツキシマブ（マブテロール（登録商標）、リツキサン（登録商標））がある。ここ数年において

40

50

、リツキシマブは、Bリンパ球増殖性の悪性腫瘍、特に非ホジキンリンパ腫（NHL）に対する治療ストラテジーをかなり変更させた。ヒト化IgG1抗体のその他の例には、B細胞悪性腫瘍の治療に使用されるアレムツズマブ（Campath-1H（登録商標））または乳癌治療に使用されるトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））を含む。開発中の治療抗体のさらなる例が当技術分野において開示されている。

#### 【0003】

治療抗体の作用機序により、抗体によって特異的に認識される抗原を有する細胞の枯渇が発生する。この枯渇は、少なくとも4つのメカニズム：ADCC、補体依存的溶解、食作用および直接の抗癌効果、たとえば増殖受容体シグナリングのmAbを媒介した遮断による腫瘍成長の阻害を媒介することができる。

10

#### 【0004】

これらの抗体は、ヒト療法に対し、特に新生物の治療において新規アプローチになるが、これらは、必ずしも強力な有効性を示さない。たとえば、リツキシマブは、単独で、または化学療法との組み合わせにおいて、低～中間グレードのNHLの両方の治療に有効性を示したが、低グレードのNHLである30～50%の患者は、リツキシマブに対する臨床効果を有さない。リンパ種細胞でのCD20発現レベル、治療時の高腫瘍量の存在または低血清リツキシマブ濃度は、一部の患者においてリツキシマブの有効性を欠くことの説明となり得ることが示唆された。それにもかかわらず、治療不全の実際の原因は、ほとんど未知のままである。本発明者らは、ナチュラルキラー（NK）細胞によってADCCをブーストすることによってリツキシマブの腫瘍細胞死滅有効性を増強することができることを以前に発見した。NK細胞が標的細胞を死滅させることができる1つのメカニズムは、mAbが標的細胞上の抗原に特異的な抗原部分と結合し、かつ同時に、mAbのFc部分がNK細胞上のFc受容体（CD16と呼ばれる）と結合するときは、ADCCによる。これにより、NK細胞上のCD16の活性化が生じて、NK細胞細胞溶解機構の活性化をトリガーする。しかし、NK細胞は、また、NK細胞にネガティブシグナルを送達するKIRなどの抑制性受容体を発現し、これにより、たとえばCD16を経て伝達されるポジティブシグナルのバランスをとっている。本発明者らは、KIRと結合してその機能を防げるmAbを用いて抑制性KIR受容体を遮断することより、標的上の抗原に、およびNK細胞上のCD16に同時に結合することができるmAbの存在下において、CD16を介した刺激シグナリングを増強して、腫瘍標的細胞のNK死滅の増大を導くことができることを見いだした。

20

30

#### 【0005】

国際公開公報第2005003168号および国際公開公報第2005003172号は、たとえば、癌、感染症または免疫不全を治療するための交差反応性抗KIR抗体の使用を記述する。

#### 【0006】

国際公開公報第2005009465号は、癌、感染性疾患または免疫不全を治療するための、NK細胞抑制性受容体を遮断する抗体およびCD16に結合することができる治療抗体の使用を記述する。

#### 【0007】

本発明は、ウイルス感染症、たとえばHIV感染症の治療として、ウイルスに感染した細胞に発現される抗原に対して特異的な治療的mAbの存在下において、ウイルス感染細胞に向けたNKを媒介したADCC反応を増強する方法を提供する。

40

#### 【発明の開示】

#### 【0008】

本発明は、HIVを治療するための、およびウイルス感染の治療のための治療抗体の有効性を増強するための新規アプローチを開示する。これらのアプローチは、NK細胞抑制性受容体をターゲットする化合物での治療に適したHIV患者の特定のサブグループに基づき、および治療抗体が注射されるときにインビボでのADCCメカニズムを増大することに基づく。実際に、本発明は、今回、ウイルス感染の治療における治療抗体の有効性が低いことに関連した現在の困難を克服する新規組成物および方法を提供する。本発明において、個体のNK細胞では、治療的mAb（モノクローナル抗体）を媒介したADCCが少なく、これNK細胞

50

条の抑制性受容体によって阻害されるためであることを示す。好ましくは、ADCCメカニズムの増大は、ナチュラルキラー細胞の抑制性受容体を遮断し、かつ哺乳類対象におけるナチュラルキラー細胞の細胞障害性を増強することができる化合物の投与によって達成される。好ましくは、化合物は、抗体またはこれらの断片である。抗体は、NK細胞の抑制性受容体、すなわちNK細胞上のキラー抑制性受容体（KIRまたはCD94 / NKG2A / C）分子と反応し、これらの抑制性シグナルを中和することにより、これらのADCC活性を増大させる。

【 0 0 0 9 】

したがって、一つの側面において、本発明は、HIVによって生じるウイルス疾患を、その必要があるヒト対象において治療する方法であって、ヒト対象に対してNK細胞の抑制性受容体を遮断する第1の化合物を投与することを含み、ヒト対象は、高活性抗レトロウイルス療法（HAART）で治療されている方法を提供する。一つの態様において、化合物は、KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3に対する抗体に結合し、かつKIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3を媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を遮断する。もう一つの態様において、抗体は、KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3の少なくとも1つに対する結合の際にモノクローナル抗体DF200と競合し、またはKIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3の少なくとも1つに対する結合の際にモノクローナル抗体1-7F9と競合する。特定の態様において、抗体は、モノクローナル抗体1-7F9である。もう一つの態様において、ヒト対象は、第1の化合物を投与する前に、所定レベル以下のHIV血漿レベルを達成するために十分な期間HAARTで治療されていてもよい。もう一つの態様において、本方法は、HIV感染細胞上に発現された抗原に結合する治療抗体または融合タンパク質である第2の化合物を前記対象に投与することをさらに含む。特定の態様において、第2の化合物は、治療抗体である。

【 0 0 1 0 】

もう一つの側面において、本発明は、ウイルス疾患を、その必要があるヒト対象において治療する方法であって、（a）NK細胞の抑制性受容体を遮断する第1の化合物を対象に投与することと、および（b）ウイルス感染細胞に発現された抗原に結合する治療抗体または融合タンパク質である第2の化合物を対象に投与することを含む方法を提供する。一つの態様において、ウイルス疾患は、HIV（ヒト免疫不全症ウイルス）、RSV（呼吸器合胞体ウイルス）、CMV（サイトメガロウイルス）、エボラウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エプスタインバーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス（HSV）、ヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）、ヒトヘルペスウイルス8（HHV-8）、ヒト乳頭腫ウイルスまたはパルボウイルスによって生じる。別の詳細な態様において、ウイルス疾患は、HIVによって、またはC型肝炎ウイルスによって生じる。

【 0 0 1 1 】

一つの態様において、第2の化合物は、治療抗体である。もう一つの態様において、第2の化合物は、ヒトIgG1もしくはIgG3抗体のFc部分を含む抗体または融合タンパク質である。一つの態様において、第1の化合物は、抗体またはこれらの断片である。特定の態様において、第1および第2の化合物の少なくとも1つは、モノクローナル抗体である。もう一つの詳細な態様において、第1および第2の化合物のうちの少なくとも1つは、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体である。

【 0 0 1 2 】

第1の化合物は、たとえば、CD94、NKG2A / C、KIR2DLおよびKIR3DLヒト受容体のうちの少なくとも1つに結合して、それが結合するヒト受容体によって媒介されるNK細胞細胞障害性の阻害を減少させてもよい。一つの態様において、第1の化合物は、少なくとも2つのKIR2DLヒト受容体の共通の決定因子に結合して、それが結合するKIR2DLヒト受容体によって媒介されるNK細胞細胞障害性の阻害を減少させる。たとえば、第1の化合物は、KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3ヒト受容体の共通の決定因子に結合して、KIR2DL1-、KIR2DL2-、KIR2DL3を媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を防げてよい。

【 0 0 1 3 】

第1の化合物は、たとえばKIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3の少なくとも一つに結合する

際にモノクローナル抗体DF200またはモノクローナル抗体1-7F9と競合する抗体であってもよい。

【0014】

一つの態様において、第1および第2の化合物は、同時に対象に投与される。もう一つの態様において、第2の化合物は、第1の化合物の投与の4週以内に対象に投与される。

【0015】

抗原は、たとえばCD3、CD28、CD4、CCR5、gp120およびgp41からなる群より選択してもよい。

【0016】

もう一つの側面において、本発明は、またヒトウイルス疾患をその必要がある対象において治療する方法であって、対象に対してNK細胞の抑制性受容体を遮断する化合物を投与することを含む方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

発明の詳細な説明

本発明は、部分的には、HAARTで治療されたHIV患者が、非常に活性な疾患をもつ患者よりも、抗KIR抗体での治療に適しているであろうという発見に基づいている（実施例5を参照されたい）。また、本発明は、部分的には、NK細胞抑制性受容体に対する抗体が、このような治療抗体に対するADCC反応を増強することによって、ウイルス抗原、特にCD16に結合することができる治療抗体に対する治療抗体の有効性を改善するであろうという発見に基づいている。

【0018】

実施例5のデータに基づいて、2つの重要な結論を引き出すことができる：

1) 機能的な抑制性KIRを発現する機能的な、活性化可能なNK細胞をもち、前記NK細胞の死滅活性を調節し、これらのKIRを抗KIR mAbによって遮断することができ、これによりHLA-Cを発現する標的に対するこれらのNK細胞による溶解を誘導する一群のHIV感染患者、すなわちHAARTで治療された患者が存在する。対照的に、以前に報告された1つのHIV感染細胞の特徴は、これらがHLA-Aおよび-Bの発現をダウンレギュレートし（または無くし）、T細胞による死滅を回避するが、HLA-Cの発現を保持して、これによりNK細胞による死滅を回避することである。

【0019】

2) HIVによる標的細胞の感染は、NK細胞上の活性化受容体をトリガーすることが必要とされる活性化リガンドの発現の減少を生じさせない。

【0020】

これらの新知見と共に、少なくともHAART患者における内因性NK細胞は、たとえばKIRを媒介したNK細胞細胞障害性の遮断を減少させることができる抗体を使用してKIRまたは別のNK細胞抑制性受容体が遮断されたときに、HIV感染細胞を死滅させるであろうことを示唆する。

【0021】

一つの態様において、たとえば、患者は、所定の期間、たとえば少なくとも1、2、4、8または20週間、ウイルス負荷が所定レベルを下回り、または検出レベルを下回るまで、できる限り早期にHAARTで治療されることが認識される。所定レベルは、たとえば検出レベルを下回るウイルス負荷、約50RNAコピー/mlを下回るウイルス負荷、約100RNAコピー/mlを下回るウイルス負荷または約200RNAコピー/mlを下回るウイルス負荷であることができる。一旦ウイルス負荷が所定レベルを下回ったか、または一旦ウイルス負荷が所定の期間所定レベルを下回っていたならば、NK細胞抑制性受容体のNK細胞抑制活性を減少させることができる化合物での治療が開始される。このような化合物は、本明細書に記述されている。

【0022】

また、本発明は、治療抗体の効率を増大するための手段を提供する。本発明は、より具

10

20

30

40

50

体的には、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物の使用により、治療抗体の効率を有意に増大することができることを開示する。実際に、本発明者らは、ウイルス感染細胞のNKを媒介した死滅は、NK細胞抑制性受容体に向けられた抗体の存在下において、非常に増強することができることを証明する。

【0023】

したがって、本発明は、疾患をその必要な対象において治療する方法であって：

a) 1つまたは複数のNK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物を対象に投与することと；および、

b) ウイルス感染細胞上に発現された抗原に特異的な治療抗体を対象に投与することと

、

を含む方法に関する。

【0024】

治療抗体は、好ましくはそのFc領域を介してNK細胞上のCD16と結合することができる。

【0025】

好ましくは、治療抗体は、ヒトIgG1またはIgG3 Fc部分、特にモノクローナル抗体またはこれらの断片、好ましくはさらにヒト化抗体、ヒト抗体もしくはキメラ抗体またはこれらの断片を有する。

【0026】

NK細胞の抑制性受容体を遮断する化合物、好ましくは抗体またはこれらの断片は、治療抗体の投与と同時に、または後に、対象に投与することができる。種々の抗体の投与様式は、これらの生物学的利用能および薬物動態 (pharmacokinetics) に依存する。本発明の一つの側面において、治療抗体は、NK細胞の抑制性受容体を遮断する化合物、好ましくは抗体またはこれらの断片の投与の0~4週以内に、もう一つの側面において2週以内に、または1週以内に、およびさらなる側面において5または2日以内に投与される。一つの側面において、治療抗体は、NK細胞の抑制性受容体を遮断する化合物、好ましくは抗体またはこれらの断片の前に、またはと同時に投与される。

【0027】

さらなる側面において、本発明は、治療抗体治療を受けている対象におけるADCCを増大する方法であって：治療抗体を投与する前に、と同時に、または後に、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物のADCCを増大するために十分な量を対象に投与することを含む方法に関する。治療抗体は、好ましくはそのFc領域を介してNK細胞上のCD16に結合することができる。好ましくは、治療抗体は、ヒトIgG1またはIgG3 Fc部分、特にモノクローナル抗体またはこれらの断片、好ましくはさらにヒト化抗体、ヒト抗体もしくはキメラ抗体またはこれらの断片を有する。

【0028】

さらなる側面において、本発明は、対象における治療抗体治療の効率を増大する方法であって、治療抗体を投与する前に、と同時に、または後に、治療抗体の有効性を増大するために十分なNK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物の有効量を対象に投与することを含む方法に関する。治療抗体は、好ましくはそのFc領域を介してNK細胞上のCD16に結合することができる。好ましくは、治療抗体は、ヒトIgG1またはIgG3 Fc部分、特にモノクローナル抗体またはこれらの断片、好ましくはさらにヒト化抗体、ヒト抗体もしくはキメラ抗体またはこれらの断片を有する。

【0029】

本発明の状況の範囲内において、対象または患者は、哺乳類対象または患者、より好ましくはヒト対象または患者のいずれをも含む。

【0030】

より具体的には、本発明は、対象の治療方法であって、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物が治療抗体と同時に対象に投与される方法を開示する。本発明は、ウイルス感染に対して特異的に向けられた治療抗体と共に同時投与することを提供する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 1 】

本発明は、治療抗体とNK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物とを含む医薬組成物に関する。また、本発明は、ウイルス感染細胞に対する治療抗体とNK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物とを含むキットに関する。

## 【 0 0 3 2 】

本発明は、ウイルス感染された細胞に対して向けられた治療抗体での治療の有効性を増大するための、または治療抗体での治療を受けた対象におけるADCCを増大するための、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物の使用に関する。

## 【 0 0 3 3 】

また、本発明は、疾患を治療するための薬物の製造のための、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物の使用に関する。より詳細には、疾患の治療は、ターゲットされた細胞の枯渇を必要とし、疾患は、ウイルス感染である。

## 【 0 0 3 4 】

特定の側面において、本発明は、治療の必要な対象の治療の方法であって：

a) NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物を対象に投与することと；および、

b) HIV感染症のための特異的な治療抗体を対象に投与することと、を含む方法に関する。

## 【 0 0 3 5 】

治療抗体は、免疫複合体を形成することができる。好ましくは、治療抗体は、好ましくはそのFc領域を介してNK細胞に存在するCD16受容体に結合することができる。好ましい態様において、治療抗体は、ヒトもしくは非ヒト霊長類IgG1またはIgG3 Fc部分を有する。好ましくは、治療抗体は、モノクローナル抗体またはこれらの断片もしくは誘導体、より好ましくは、ヒト化抗体、ヒト抗体もしくはキメラ抗体またはこれらの断片である。

## 【 0 0 3 6 】

NK細胞は、CD16 ( IgGに対して低親和性の受容体 ) を保持する。標的細胞上の抗原およびNK細胞上のCD16に対するIgGの同時結合により、NK細胞の活性化および抗体に結合した標的の死滅を生じる。抗CD4 mAbなどのHIV感染された標的の受容体に対して特異的なmAbと抗KIR mAbの同時投与は、NKを媒介したADCCを増強する。本発明に使用するための例示的な抗CD4 mAbは、trx 1 ( TolerRx ) およびHuMax CD4 ( Genmab ) を含むが、これらに限定されるわけではない。その他のCD4 mAbは、当技術分野において公知の方法に従って生産することができ、または市販の供与源から得ることができる。

## 【 0 0 3 7 】

本発明のある態様において、HIV感染細胞上の抗原に対して特異的な好ましい治療的mAbは、T細胞上の表面分子に対して特異的な、またはHIVウイルスによってコードされ、かつ感染細胞上に選択的に発現されるリガンドに対して特異的なmAbを含む。このような治療的mAbは、CD3、CD28、CD4、CCR5、gp120、gp41などの表面分子に対して特異的である。本発明に使用するための例示的抗CD3、CD28、CD4、CCR5、gp120およびgp41 mAbは、trx4 ( TolerRx )、Science, 1994, vol 266, p1024-1027に記述された抗HIV-1 gp120抗体；およびAIDS Res Hum Retroviruses 1994, vol 10, p 1651-1658に記述された抗HIV-1 gp41抗体を含むが、これらに限定されるわけではない。その他の適切な抗体は、当技術分野において公知の方法に従って生産することができるか、または市販の供与源から得ることができる。

## 【 0 0 3 8 】

本発明のもう一つの態様において、好ましい治療抗体は、その他のウイルスによってコードされる抗原に対して特異的なものを含む。これらのウイルスには、RSV ( 呼吸器合胞体ウイルス )、CMV ( サイトメガロウイルス )、エボラウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エプスタインバーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス ( VZV )、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス ( HSV )、

10

20

30

40

50



ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス8 (HHV-8) ヒト乳頭腫ウイルスおよびパルボウイルスを含む。

【0039】

本発明のもう一つの態様において、好ましい治療抗体は、ウイルス感染細胞によって発現される細胞の抗原に対して特異的なものを含む。HCVについては、これらには、感染した肝細胞によって発現される細胞の抗原に対して特異的な抗体を含む。

【0040】

RSVのFおよびGタンパク質、HCVのE1およびE2タンパク質、エボラウイルスのgp1およびgp2抗原、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) のL1タンパク質。

【0041】

一つの側面において、本発明は、HIV (ヒト免疫不全症ウイルス)、RSV (呼吸器合胞体ウイルス)、CMV (サイトメガロウイルス)、エボラウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、エプスタインバーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、ハンタウイルス、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス (HSV)、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6)、ヒトヘルペスウイルス8 (HHV-8) ヒト乳頭腫ウイルスおよびパルボウイルスを治療する方法であって、NK細胞の抑制性受容体を遮断する抗体またはこれらの断片の治療的に有効量をこれらの必要における患者に投与することを含む方法を提供する。

【0042】

一つの側面において、前述のウイルスのうちの1つによって引き起こされるウイルス疾患を治療する方法は、さらなる抗ウイルス薬の治療的に有効量を同じ患者に投与することを含む。このような薬剤の例は、以下の通りである：

単純ヘルペス、水痘帯状疱疹ウイルス (VSV) 感染に対して：アシクロビル、ファムシクロビル、バラシクロビル、ペンシクロビル。

【0043】

CMV感染に対して：ガンシクロビル、バルガンシクロビル。

【0044】

レトロウイルス感染症 (たとえば、HIV-1) に対して：ラミブジン、ジドブジン、エムトリシタビン、アバカビル、テノフォビル、ジダノシン、スタブジン、エファビレンツ、ネビラピン、アンブレナビル、インジナビル、サキナビル、リトナビル、ロピナビル、アタザナビル、ネルフィナビル、エンフビルチド (enfuvirtid)。

【0045】

インフルエンザウイルス感染に対して：オセルタミビル。

【0046】

B型慢性肝炎ウイルス感染に対して：アデフォビル、ラミブジン。

【0047】

C型慢性肝炎ウイルス感染に対して：リバビリン、インターフェロン、ペグ化インターフェロン。

【0048】

一つの態様において、患者は、NK細胞の抑制性受容体を遮断する抗体の投与 (administration) 前にHAARTで治療されている。HAART療法は、抗ウイルス薬のカクテルからなる。本クラスには、たとえばヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NRTI)、非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) およびプロテアーゼ阻害剤 (PI) を含む。通常、ほぼ検出不可能なレベルにウイルス負荷を減少させるために、優先して複数のクラスから2~4種の薬物が組み合わせられる。HAART療法は、2つ以上の抗レトロウイルス薬の組み合わせまたは「カクテル」であることが多い。R. M. Gulick, "Current antiretroviral therapy: an overview", Qual. Life Res. 6:471-474 (1997); K. Henry et al., "Antiretroviral therapy for HIV infection. Heartening Successes mixed with continuing challenges", Postgrad. Med. 102:100-107 (1997); C. B. Hicks, "Update on antiretroviral therapy", Radiol. Clin. North Am. 35:995-1005 (1997); R. H. Goldschmidt, "Antire

10

20

30

40

50

troviral drug treatment for HIV/AIDS", Am. Fam. Physician, 54 : 574-580 (1996)。HAART処方計画に使用される薬物には、ヌクレオシド (nucleoside) 類似体AXT、スタブジン (d4T) および3TC；ネビラピン (非核酸系逆転写酵素阻害剤、これは、NVPと省略しも多い) 並びにRTV、SQV、IDVおよびネルフィナビルなどのプロテアーゼ阻害剤を含む。これらの治療を使用するHAARTは、明らかにHIVの耐性菌を発生する脅威を伴わずに、HIV-1溶性患者における活性なHIVウイルスの血漿負荷を検出不可能な量 (約50コピー/mlを下回る) に減少させ得る。M. Balter, "HIV Survives Drug Onslaught by Hiding Out in T Cells," Science 278 : 1227 (Nov. 14, 1997)。この文書および本明細書で引用した全ての文書は、下記に完全に複製されたかのように、参照によって本明細書に援用される。また、HAART製品、投薬スケジュールおよび共通の副作用は、米国特許出願公報第20050191702号の表I~IIIに添付して示されており、参照によりその全体が本明細書に援用される。

10

#### 【0049】

本発明のある態様において、ADCC反応の誘導は、受容体Fc融合タンパク質により、この場合、Fc部分は、CD16と結合し、受容体は、T細胞上のリガンドに結合する。このリガンドは、T細胞上のLFA-3に結合するCd-2-Fcタンパク質であることができる。

#### 【0050】

好ましくは、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物は、KIRまたはCD94またはNKG2A/Cヒト受容体の少なくとも一つに結合し、NK細胞の細胞障害性に関連したKIR2DL、KIR3DLおよび/またはNKG2A/Cを媒介した阻害を阻害する。好ましくは、KIR2DLヒト受容体は、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3ヒト受容体からなる群より選択され、KIR3DLヒト受容体は、KIR3DL1およびKIR3DL2からなる群より選択される。好ましい態様において、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物は、2つ以上のKIR2DLヒト受容体の共通の決定因子に結合し、KIR2DLを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を防げる。より好ましくは、抗体は、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3ヒト受容体の共通の決定因子に結合し、KIR2DL1-、KIR2DL2-、KIR2DL3を媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を防げる。特定の態様において、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物は、位置80にLys残基を有するHLA-C対立遺伝子分子のヒトKIR2DL1受容体に対する結合および位置80にAsn残基を有するHLA-C対立遺伝子分子のヒトKIR2DL2およびKIR2DL3受容体に対する結合を阻害する。もう一つの詳細な態様において、NK細胞の抑制性受容体を遮断する抗体またはこれらの断片は、ハイブリドーマDF200によって産生されるモノクローナル抗体DF200と同じエピトープと結合する。任意に、この抗体またはこれらの断片は、ヒトNK細胞の表面におけるKIR受容体に対する結合について、ハイブリドーマDF200によって産生されるモノクローナル抗体DF200と競合する。一つの好ましい態様において、この抗体は、ハイブリドーマDF200によって産生されるモノクローナル抗体DF200である。ハイブリドーマ産生抗体DF200、登録番号CNCM I-3224は、2004年6月10日にCollection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Franceに登録した。

20

30

#### 【0051】

もう一つの詳細な態様において、NK細胞の抑制性受容体を遮断する抗体またはこれらの断片は、たとえば国際公開公報第2005003168号に記載されているように、KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR2DL3と結合し、KIRを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を減少させ、または遮断するヒトモノクローナル抗体であるモノクローナル抗体1-7F9と同じエピトープに結合する。1-7F9のVHおよびVL配列は、それぞれ配列番号：1および2に記述してある。任意に、抗体またはこれらの断片は、ヒトNK細胞の表面におけるKIR受容体に対する結合について、1-7F9 (すなわち、1-7F9の重(H)鎖および軽(L)鎖配列を含む抗体) と競合する。一つの好ましい態様において、この抗体は、1-7F9 (すなわち、1-7F9のHおよびL配列を含むモノクローナル抗体) である。

40

#### 【0052】

好ましい態様において、NK細胞の抑制性受容体を遮断する抗体またはこれらの断片は、モノクローナル抗体、これらの断片または誘導體である。より好ましくは、抗体は、ヒト

50

化抗体、ヒト抗体もしくはキメラ抗体またはこれらの断片である。断片またはこれらの誘導体は、好ましくはFab断片、Fab'<sub>2</sub>断片、CDRおよびScFvから選択される。

#### 【0053】

##### 治療抗体

本発明の状況の範囲内において、「治療抗体」という用語は、より具体的には、患者における標的細胞を減少させるように機能する任意の抗体を称する。このような標的細胞の具体例には、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、同種細胞、アレルギー、自己免疫疾患、同種間反応、その他に關与する病理学的免疫担当細胞（たとえば、Bリンパ球、Tリンパ球、抗原提供細胞、その他）またはさらに健康な細胞（たとえば、抗血管形成の治療ストラテジーにおける内皮細胞）を含む。本発明の状況の範囲内の大部分の好ましい標的細胞は、腫瘍細胞およびウイルス感染細胞である。治療抗体は、たとえば、特に抗体依存的な細胞を媒介した細胞障害性（ADCC）による細胞毒性または細胞溶解を媒介してもよい。ADCCには、IgGのFc部分（Fc R）のための白血球受容体が必要である。その機能は、IgG感作抗原を、Fc Rを有する細胞障害性細胞に連結させて、細胞活性化機構をトリガーすることである。したがって、治療抗体は、免疫複合体を形成することができる。たとえば、免疫複合体は、治療抗体によってカバーされた腫瘍標的（すなわち、細胞）であることができる。より詳細には、抗体は、好ましくはそのFc領域を介してCD16に結合することができる。治療抗体は、ポリクローナルまたは好ましくはモノクローナルによってもよい。これらは、所望の可変ドメインおよび定常ドメインを発現するように操作されたハイブリドーマによって、または組換え細胞によって産生してもよい。抗体は、単鎖抗体または抗原特異性を保持するその他の抗体誘導体およびこれらの低部ヒンジ領域または変異体であってもよい。これらは、多機能性抗体、組換え抗体、ヒト化抗体、これらの断片または変異体であってもよい。これらの断片または誘導体は、好ましくはFab断片、Fab'<sub>2</sub>断片、CDRおよびScFvから選択される。治療抗体は、表面抗原、たとえば膜抗原に特異的である。本発明において、好ましい膜抗原は、HIV感染細胞上に発現されるものである。これらには、CD4、CD3およびCD28を含む。治療抗体は、好ましくはヒトもしくは非ヒト霊長類IgG1またはIgG3 Fc部分、より好ましくはヒトIgG1を有する。

#### 【0054】

##### NK細胞調節抗体

NK細胞活性は、刺激および抑制性シグナルを含む複合体メカニズムによって調節される。したがって、有効なNK細胞媒介療法は、これらの細胞の刺激または抑制性シグナルの両方の中和によって達成することができる。

#### 【0055】

NK細胞は、主要組織適合複合体（MHC）クラスI特異的抑制性受容体によってネガティブに調節される（Karre et al., 1986; Ohlen et al., 1989; その開示は、参照により本明細書に援用される）。これらの特異的受容体は、主要組織適合複合体（MHC）クラスI分子またはHLAの多形決定因子と結合し、ナチュラルキラー（NK）細胞溶解を阻害する。ヒトでは、キラーIg様受容体（KIR）と呼ばれる一群の受容体が、HLAクラスI対立遺伝子群を認識する。

#### 【0056】

KIR受容体には、KIR2DL、KIR2DS、KIR3DLおよびKIR3DSを含むいくつかの群がある。2つのIgドメイン（KIR2D）を有するKIR受容体は、HLA-Cアロタイプ：KIR2DL2（以前に、p58.1と命名した）を同定し、または密接に関連した遺伝子産物KIR2DL3は、グループ2HLA-Cアロタイプ（Cw1、3、7および8）によって共有されるエピトープを認識するが、KIR2DL1（p58.2）は、逆のグループ1HLA-Cアロタイプ（Cw2、4、5および6）によって共有されるエピトープを認識する。KIR2DL1による認識は、HLA-C対立遺伝子の位置80におけるLys残基の存在によって指示される。KIR2DL2およびKIR2DL3認識は、位置80におけるAsn残基の存在によって指示される。重要なことに、HLA-C対立遺伝子の大多数は、位置80にAsnまたはLys残基を有する。3つのIgドメインをもつ1つのKIRであるKIR3DL1（p70）は、HLA-Bw4対立遺伝子によって共有されるエピトープを認識する。最後に、3つのIgドメインをもつ分子K

IR3DL2 (p140) のホモ二量体は、HLA-A3および-A11を認識する。

【 0 0 5 7 】

KIRおよびその他のクラスI抑制性受容体 (Moretta et al, 1997 ; Valiante et al, 1997 ; Lanier, 1998 ; これらの開示は、参照により本明細書に援用される) は、所与の個体のNKレパートリーのいずれにおいても、NK細胞によって同時発現され得るが、単一のKIRを発現する細胞が存在し、したがって、対応するNK細胞は、特異的なクラスI対立遺伝子基を発現する細胞のみによって遮断される。

【 0 0 5 8 】

本発明において、「NK細胞の抑制性受容体を遮断する化合物、好ましくは抗体または抗体またはこれらの断片」という用語は、少なくとも1つのNK細胞抑制性受容体、すなわちNK細胞のKIRまたはNKG2A/Cに対して特異的で、かつKIRまたはNKG2A/Cの抑制性シグナルを中和する、抗体またはこれらの断片などの化合物をいう。好ましくは、抗体またはこれらの断片などの化合物は、HLAとNK細胞の抑制性受容体との間の相互作用を遮断することができる。抗体は、ポリクローナルまたは好ましくはモノクローナルによってもよい。これらは、所望の可変ドメインおよび定常ドメインを発現するように操作されたハイブリドーマによって、または組換え細胞によって産生してもよい。抗体は、単鎖抗体または抗原特異性を保持するその他の抗体誘導体、並びにFab断片、Fab'2断片、CDRおよびScFvなどのこれらの低部ヒンジ領域または変異体であってもよい。これらは、多機能性抗体、組換え抗体、ヒト化抗体またはこれらの変異体であってもよい。

【 0 0 5 9 】

好ましくは、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物は、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DL1、KIR3DL1、KIR3DL2、NKG2AおよびNKG2Cからなる群内で選択される少なくとも1つの抑制性受容体の抑制性シグナルを中和する、抗体またはこれらの断片などの化合物である。より好ましくは、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物は、KIR2DL2、KIR2DL3および/またはKIR2DL1の抑制性シグナルを中和する、抗体またはこれらの断片などの化合物である。

【 0 0 6 0 】

また、本発明は、NK細胞の異なる抑制性受容体を遮断するいくつかの化合物、好ましくは抗体またはこれらの断片の組み合わせの使用を想定する。好ましくは、NK細胞の抑制性受容体を遮断する化合物、好ましくは抗体またはこれらの断片は、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2、NKG2AおよびNKG2Cから選択される抑制性受容体に特異的であり、かつ関連したKIR-またはNKG2A/Cを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を阻害することができる。たとえば、NK細胞の抑制性受容体を遮断する化合物は、KIR2DL1に対して特異性を有する抗体およびKIR2DL2および/またはKIR2DL3に対して特異性を有するその他を含むことができる。より好ましくは、NK細胞の抑制性受容体を遮断する化合物の組み合わせは、KIR2DL1-、KIR2DL2-およびKIR2DL3を媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を阻害することができる。

【 0 0 6 1 】

たとえば、KIR2DL1に対して特異的なモノクローナル抗体は、KIR2DL1とHLA-Cw4アロタイプ、並びにCw4と同じ群に属する同様のHLA-Cアロタイプとの間の相互作用を遮断することが示された (Moretta et al., J Exp Med. 1993 ; 178(2) : 597-604、その開示は、参照により本明細書に援用される)。その他の例において、KIR2DL2/3に対するモノクローナル抗体も、HLACw3 (またはその他) アロタイプとKIR2DL2/3の相互作用を遮断することが記述されている (Moretta et al., 1993、上記)。抗NKG2A抗体は、NKG2AとHLA-Eとの間の抑制性相互作用を遮断することが示された。

【 0 0 6 2 】

任意に、抗体は、GL183 (KIR2DL2/3/S2特異的、Immunotech, France and Beckton Dickinson, USAから入手可能) ; EB6 (KIR2DL1/s1特異的、Immunotech, France and Beckton Dickinson, USAから入手可能な) ; AZ138 (KIR3DL1特異的、Moretta et al, Univ. Genova, Italyから入手可能な) ; Q66 (KIR3DL2-特異的、Immunotech, Franceから入手可能

10

20

30

40

50

); Z270 (NKG2A-特異的、Immunotech, Franceから入手可能); P25 (NKG2A/C特異的、Moretta et al, Univ. Genova, Italyから入手可能); およびDX9 (Z27 (KIR3DL1特異的、Immunotech, France and Beckton Dickinson, USAから入手可能) からなる群より選択することができる。

【0063】

好ましい側面において、本発明は、抗体、断片または誘導体が、NK細胞の表面にて幾つかのKIRまたはNKG2A/C受容体と交差反応し、これらの抑制性シグナルを中和するモノクローナル抗体、並びにこれらの断片および誘導体を使用する。より好ましくは、本発明は、ヒトKIR2DL受容体の共通の決定因子に結合し、かつ対応する阻害経路を阻害するモノクローナル抗体を使用する。より詳細には、本発明は、ヒトNK細胞の表面にてKIR2DL1およびKIR2DL2/3受容体に結合し、KIR2DL1-およびKIR2DL2/3を媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を阻害するモノクローナル抗体を使用する。抗体は、KIR2DL1およびKIR2DL2/3受容体に対するHLA-C分子の結合を特異的に阻害する。より好ましくは、抗体は、インビボにおけるNK細胞活性を促進する。

【0064】

KIR2DL1およびKIR2DL3 (またはKIR2DL2) は、大部分のHLA-Cアロタイプ、それぞれグループ1 HLA-Cアロタイプおよびグループ2HLA-Cアロタイプと分子複合体を形成するため、KIR2DL1およびKIR2DL3に対する抗体は、大部分のヒト個体における、典型的には約90%以上のヒト個体における治療抗体の効率を増大するために使用してもよい。

【0065】

本発明の特定の目的においてにおいて、NK細胞の抑制性受容体を遮断する抗体は、モノクローナル抗体であって、抗体がKIR2DLヒト受容体の共通の決定因子に結合し、KIR2DLを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を阻害する抗体である。抗体は、より具体的にはハイブリドーマDF200によって産生されるモノクローナル抗体DF200と同じエピトープに結合し、および/またはヒトNK細胞の表面におけるKIR受容体に対する結合について、ハイブリドーマDF200によって産生されるモノクローナル抗体DF200と競合する。

【0066】

具体的態様において、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマDF200によって産生されるモノクローナル抗体DF200である。

【0067】

本発明の状況の範囲内において、「共通の決定因子」は、ヒトKIR2DL受容体群の幾つかのメンバーによって共有される抗原決定基またはエピトープを示す。決定因子またはエピトープは、該メンバーによって共有されるペプチド断片または高次構造上のエピトープを表してもよい。具体的態様において、共通の決定因子は、モノクローナル抗体DF200によって認識されるエピトープを含む。

【0068】

本発明の状況の範囲内において、共通の決定因子に「結合する」抗体という用語は、特異性および/または親和性をもって決定因子に結合する抗体を示し、たとえばそれは、本質的にヒトNK細胞の表面にてその他の無関係なモチーフまたは決定因子または構造に高親和性または特異性で結合しない。より詳細には、本発明に従ったモノクローナル抗体の決定因子に対する結合は、別のエピトープまたは決定因子に対する抗体の結合から区別することができる。

【0069】

したがって、これらの化合物、好ましくは抗体は、これらが、少なくとも部分的には、NK細胞抑制性受容体、すなわちKIRまたはNKG2A/C受容体によって媒介される阻害シグナリング経路を遮断するという意味において、「中和」または「抑制性」化合物、好ましくは抗体である。さらに重要なことに、この抑制活性は、数種類のKIRまたはNKG2A/C受容体に関して示すことができ、その結果、これらの化合物、好ましくは抗体は、高い有効性で種々の対象に使用され得る。KIR-またはNKG2A/Cを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害の阻害は、結合アッセイ法もしくは細胞アッセイ法などの種々のアッセイ法または試験によ

って評価することができる。具体的変形例において、抑制活性は、抗体などの化合物が、それぞれHLA-CまたはHLA-E陽性標的に対する、KIRまたはNKG2A / C陽性NKクローンの溶解を再構成する能力によって例証される。もう一つの特定の態様において、抗体などの化合物は、KIR2DL1およびKIR2DL3（または密接に関連したKIR2DL2）受容体に対するHLA-C分子の結合を阻害するものとして、さらに好ましくは、これが：

Cw1、Cw3、Cw7およびCw8から選択されるHLA-C分子の（または位置80にAsn残基を有するHLA-c分子の）KIR2DL2/3に対する結合；および、

Cw2、Cw4、Cw5およびCw6（から選択されるHLA-C分子のまたは位置80にLys残基を有するHLA-c分子の）KIR2DL1に対する結合、  
を変化させる能力として定義される。

10

【0070】

その他の変形例において、抗体などの本発明の化合物の抑制活性は、実施例にて開示したように、細胞に基づいた細胞障害性アッセイ法で評価することができる。

【0071】

もう一つの変形例において、抗体などの本発明の化合物の抑制活性は、サイトカイン-放出アッセイ法で評価することができる。

【0072】

本発明の化合物、好ましくは抗体は、部分的な抑制活性を示してもよく、たとえば部分的に、KIR2DLを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を減少させる。大部分の好ましい化合物は、KIR2DLを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害の、好ましくはKIR-またはNKG2A/Cを媒介したNK細胞障害性の阻害の少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、40%または50%以上を阻害することができる。あるいは、本発明の好ましい化合物、好ましくは抗体は、適合したか、またはHLA適合性が、または自己の、標的細胞集団、すなわち抗体の非存在下でNK細胞によって効率的に溶解されない細胞集団の溶解を誘導することができる。したがって、本発明の化合物は、また、インビボにおいてNK細胞活性を促進するものとして定義してもよい。

20

【0073】

また、本発明は、NK細胞の抑制性受容体を遮断する化合物が、実質的に同じ抗原特異性を有するこのようなモノクローナル抗体の断片および誘導体である態様を想定し、Fab断片、Fab'2断片、CDRおよびScFvを含むが、これらに限定されるわけではない。さらにまた、モノクローナル抗体は、ヒト化しても、ヒトでも、またはキメラ（たとえば、二特異的抗体または機能的にした抗体）であってもよい。

30

【0074】

本発明に従ったNK細胞の抑制性受容体を遮断する抗体は、当技術分野においてそれ自体既知の種々の技術によって產生してもよい。典型的には、これらは、KIRまたはNKG2A / Cポリペプチドを含む免疫原でヒト以外の動物を免疫化すること、および（適切な株化細胞との融合によってハイブリドーマを產生するために）脾細胞を収集することによって產生される。種々の種からモノクローナル抗体を產生する方法は、Harlowら（Antibodies： A laboratory Manual, CSH Press, 1988；その開示は、参照により本明細書に援用される）において見いだし得る。これらの方法は、ヒト以外の動物を抗原で免疫し、続いて脾細胞を回収し、次いでこれを骨髓腫細胞などの不死化された細胞と融合させることを含む。生じるハイブリドーマは、モノクローナル抗体を產生し、個々のクローンを単離するために限界希釈によって選択することができる。また、抗体は、たとえばWard et al（1989）；その開示は、参照により本明細書に援用されるに開示されているように、免疫グロブリンのコンビナトリアルライブラリーの選択によって產生してもよい。

40

【0075】

本発明にしたがったNK細胞の抑制性受容体を遮断する好ましい抗体は、KIR2DLポリペプチド、より好ましくはヒトKIR2DLポリペプチドを含む免疫原での免疫化によって調製される。KIR2DLポリペプチドは、ヒトKIR2DLポリペプチドの全長配列またはこれらの断片もしくは誘導体、典型的には免疫原性断片、すなわちエピトープ、好ましくはTまたはB細胞エ

50

ピトープを含むポリペプチドの一部を含んでいてもよい。このような断片は、典型的には成熟ポリペプチド配列の少なくとも7つの連続したアミノ酸、さらに好ましくはこれらの少なくとも10個の連続したアミノ酸を含む。これらは、本質的に受容体の細胞外ドメインに由来する。

【0076】

最も好ましい態様において、免疫原は、脂質膜の、典型的には細胞表面の野生型ヒトKIR2DLポリペプチドを含む。具体的態様において、免疫原は、無処置のNK細胞、特に無処置のヒトNK細胞、任意に治療されたか、または溶解されたものを含む。

【0077】

NK細胞のKIR2DL受容体を遮断する抗体は、以下を含む方法によって産生することができる：

KIR2DLポリペプチドを含む免疫原で非ヒト哺乳類を免疫すること；

免疫された動物から、KIR2DLポリペプチドに結合するモノクローナル抗体を調製すること；

KIR2DLポリペプチドの少なくとも2つの異なる血清型と交差反応する（b）のモノクローナル抗体を選択すること、

KIR2DLを媒介したNK細胞の阻害を阻害する（c）のモノクローナル抗体を選択すること。

【0078】

工程（c）と（d）の順序は変更することができる。任意に、本方法は、下に開示したように、モノクローナル抗体の断片または誘導体を作製するさらなる工程をさらに含んでいてもよい。好ましい態様において、ヒト以外の動物は、齧歯類（たとえば、マウス、ラット、その他）、ウシ、ブタ、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、その他などの哺乳類である。また、非ヒト哺乳類は、遺伝的に修飾してもよく、または「ヒト」抗体を産生するように操作してもよい。

【0079】

もう一つの変形例において、本方法は、

ライブラリーまたはレパートリーから、KIR2DLポリペプチドの少なくとも2つの異なる血清型と交差反応するモノクローナル抗体またはこれらの断片もしくは誘導体を選択することと、および、

KIR2DLを媒介したNK細胞の阻害を阻害する（a）の抗体を選択することと、を含む。

【0080】

レパートリーは、抗体またはこれらの断片の任意の（組換え）レパートリーであってもよく、任意に適切な構造のいずれ（たとえば、ファージ、細菌、合成の複合体、その他）によって提示されてもよい。阻害抗体の選択は、上に開示し、および実施例においてさらに例証したように行ってもよい。

【0081】

同様の方法は、NK細胞のKIR3DLまたはNKG2A/C受容体を遮断する抗体の調製のためにも使用することができる。

【0082】

交差反応性抗体および/または中和抗体との競合

もう一つの側面において、本発明は、同族KIRに対する結合について、本発明にしたがったNK細胞の抑制性受容体を遮断する交差反応性抗体および/または中和抗体と競合する能力、および/または本発明の方法に使用するための、このような公知の抗体と同じ抗原決定基領域/エピトープに対して結合する能力によって特徴づけられるNK細胞の抑制性受容体を遮断する抗体を提供する。たとえば、一つの側面において、本発明は、それが抗体NKVSF1、1-7F9および/または抗体DF200と競合する能力によって特徴づけられる抗KIR抗体を提供する。

【0083】

「競合する」という句は、抗特異的モノクローナル抗体（たとえば、DF200、NKVSF1、その他）をいう場合、KIR抗体が組換えKIR分子または表面に発現されたKIR分子のいずれかを使用する結合アッセイ法において参照抗体またはその他の分子と競合することがを意味する。たとえば、抗KIR抗体が結合アッセイ法においてDF200が通常結合するKIR分子に対するDF200の結合を検出可能的に減少させる場合、抗KIR抗体は、DF200と「競合する」と言うことができる。DF200と「競合する」抗KIR抗体は、KIR2DL1ヒト受容体、KIR2DL2/3ヒト受容体またはKIR2DL1およびKIR2DL2/3ヒト受容体の両方に対する結合について、DF200と競合し得る。

【0084】

DF200、1-7F9および/またはNKVSF1と競合する抗体は、公知のスクリーニングアッセイ法を使用して同定することができる。多くのこのようなアッセイ法がルーチンで行われており、当該技術分野において周知である（たとえば、米国特許第5,660,827号を参照されたい、これは、参照により本明細書に具体的に援用される）。

【0085】

たとえば、ELISA、放射免疫アッセイ法、ウエスタンブロット法およびBIACORE解析の使用に基づいたプロトコルは、このような競合研究に使用するために適している。

【0086】

KIR抗原試料に適用する前のしばらくの間に、たとえば対照抗体（たとえば、DF200、NKVSF1または1-7F9）を試験抗体の種々の量と予混合することができる（たとえば、約1:1、1:2、1:10または約1:100の比で）。あるいは、対照および様の量々の試験抗体を単に別々に添加して、KIR抗原試料に曝露する間に混合することができる。結合した抗体を遊離抗体から（たとえば、分離または洗浄する技術使用することにより結合していない抗体を除去することによる）、また対照抗体を試験抗体から（たとえば、種特異的またはアイソタイプ特異的二次抗体使用することにより、または検出可能なラベルで特異的に標識することにとる）区別することができる限り、試験抗体が異なるKIR2DL抗原に対する対照抗体の結合を減少させ、試験抗体が対照抗体と実質的に同じエピトープを認識することを示しているかどうかを決定することができる。完全に無関係な抗体（これは、KIRに結合しない）の存在下における（標識された）対照抗体の結合は、対照高値として役立てることができる。対照低値は、標識された対照抗体を同じだが標識されていない対照抗体とインキュベートすることによって得ることができるが、この場合、競合により、標識された抗体の結合が生じ、減少される。試験アッセイ法では、試験抗体の存在下における標識された抗体反応性における有意な減少は、実質的に同じエピトープを認識する試験抗体、すなわち標識された対照抗体と競合するものを指し示す。たとえば、KIR2DL1およびKIR2DL3抗原の一方または両方に対する対照抗体の結合を少なくとも約50%、少なくとも約60%など、またはより好ましくは少なくとも約70%（たとえば、約65~100%）まで、約1:1または1:10~約、1:100の間の対照:試験抗体の任意の比率にて減少させるいずれの試験抗体も、対照と競合する抗体であるとみなされる。

【0087】

また、競合は、たとえばフローサイトメトリーによって評価することができる。このような試験において、所与のKIRを有する細胞を最初に対照抗体とインキュベートし、次いで試験抗体を蛍光色素またはビオチンで標識することができる。抗体は、飽和量の対照抗体とのプレインキュベーションにより得られた結合は、対照抗体とのプレインキュベーションなしで試験抗体によって得られた結合の約80%、好ましくは約50%、約40%の以下（たとえば、約30%）と蛍光平均値によって測定される場合に、対照抗体と競合すると言われる。あるいは、抗体は、試験抗体の飽和量とプレインキュベートした細胞について標識された対照抗体（蛍光色素またはビオチンによる）で得られる結合が試験抗体とのプレインキュベーションなしで得られる結合の、約80%、好ましくは約50%、約40%以下（たとえば、約30%）である場合、対照抗体と競合すると言われる。

【0088】

試験抗体を事前に吸着させて、KIR2DL1もしくはKIR2DL2/3のいずれかまたは両方を固定



された表面に対して飽和濃度で適用する単純な競合アッセイ法を、都合よく使用してもよい。単純な競合アッセイ法における表面は、好ましくはBIACOREチップ（または表面プラスモン共鳴解析のために適したその他の媒体）である。KIR-コーティング表面に対する対照抗体の結合が測定される。対照抗体単独のKIR含有表面に対するこの結合を試験抗体の存在下において対照抗体の結合と比較する。試験抗体の存在下における、対照抗体によるKIR2DL1およびKIR2DL2/3含有表面に対する結合の有意な減少は、試験抗体が実質的に対照抗体と同じエピトープを認識し、その結果、試験抗体が対照抗体と「競合する」ことを示す。対照抗体のKIR2DL1およびKIR2DL2/3抗原の両方に対する結合を、少なくとも約20%以上、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約70%以上まで減少させるいずれの試験抗体も、対照抗体と競合する抗体であるとみなすることができる。好ましくは、このような試験抗体は、少なくともKIR2DL1、2、および3抗原のそれぞれに対する対照抗体の結合を、少なくとも約50%（たとえば、少なくとも約60%、少なくとも約70%以上まで減少させるであろう。対照抗体と試験抗体の順序を逆転することができること；すなわち、競合アッセイ法において、試験抗体を最初に表面に結合させ、次いでその後に対照抗体を表面と接触させることができることが認識されるであろう。好ましくは、二次抗体について見られる結合の減少は（抗体が競合する場合）、より大きくなるであろうことが予想されるため、KIR2DL1およびKIR2DL2/3抗原に対してより高い親和性を有する抗体を最初にKIR2DL1およびのKIR2DL2/3含有表面と結合させる。このようなアッセイ法のさらなる例は、本明細書に実施例において、およびたとえばSaunal and Regenmortel, (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41（この開示は、参照により本明細書に援用される）において提供される。

10

20

#### 【0089】

抗体またはその他の薬剤がたとえばDF200、NKVSF1または1-7F9と同じか、または実質的に同じエピトープ領域に結合するかどうかの決定は、当業者に既知の方法を使用することによって実施することができる。エピトープマッピング/特徴付け法の例において、抗KIR抗体のためのエピトープ領域は、KIR2DL1またはKIR2DL2/3タンパク質の曝露されたアミン/カルボキシルの化学修飾を使用するエピトープ「フットプリント法」によって決定してもよい。このようなフットプリント技術の1つの具体例は、HXMS（質量分析によって検出される水素重水素交換）の使用であり、この場合、受容体およびリガンドタンパク質アミドプロトンの水素/重水素交換、結合および逆交換が生じ、タンパク質結合に関与するバックボーンアミド基が、逆交換から保護されており、したがって重水素化のままである。関連した領域は、現時点で、消化セリタンパク質分解、高速ミクロボア高速液体クロマトグラフィー分離および/またはエレクトロスプレーイオン化質量分析によって同定することができる。たとえば、Ehring H, Analytical Biochemistry, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) and/or Engen, J.R. and Smith, D.L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265Aを参照されたい。適切なエピトープ同定技術のもう1つの例は、核磁気共鳴エピトープマッピング（NMR）であり、この場合、典型的には、遊離抗原および抗体などの抗原結合ペプチドと複合体形成した抗原の二次元NMRスペクトルのシグナルの位置が比較される。抗原は、典型的にはNMRスペクトルにおいて抗原に対応するシグナルだけが見られ、抗原結合ペプチドからのシグナルは見られないように、選択的に<sup>15</sup>Nで同位体標識されている。抗原結合ペプチドとの相互作用に関与するアミノ酸から生じる抗原シグナルは、典型的には遊離抗原のスペクトルと比較して複合体のスペクトルの位置が変化すると考えられ、結合に関与したアミノ酸をこのように同定することができる。たとえば、Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang et al, Journal of Molecular Biology, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); and Saito and Patterson, Methods. 1996 Jun; 9(3): 516-24を参照されたい。

30

40

#### 【0090】

また、エピトープマッピング/特性付けは、質量分析方法を使用して行うことができる。たとえば、Downard, J Mass Spectrom. 2000 Apr; 35(4): 493-503 and Kiselar and Downard, Anal Chem. 1999 May 1; 71(9): 1792-801を参照されたい。また、エピトー

50

ブマッピングおよび同定の状況において、プロテアーゼ消化技術も有用であろう。抗原決定基に関連した領域 / 配列は、プロテアーゼ消化によって、たとえば37 およびpH 7-8でのKIR2DL1またはKIR2DL2/3 o/n消化のために約1 : 50の比率でトリプシンを使用し、続いてペプチド同定のために質量分析 (MS) 解析することによって決定することができる。続いて、抗KIR抗体によりトリプシン切断から保護されたペプチドをトリプシン消化に供した試料と抗体と共にインキュベートし、次いでたとえばトリプシンによる消化に供した試料との比較によって同定することができる (これにより、抗体に対するフットプリントを明らかにする)。また、または代わりに、キモトリプシン、ペプシン、その他のようなその他の酵素を同様のエピトープ特性付け法に使用することができる。さらに、酵素消化により、潜在的抗原性決定因子配列がKIR結合因子と会合したKIR2DL1の領域内にあるかどうかについて解析するための迅速な方法を提供することができる。ポリペプチドが表面に曝露されていない場合は、免疫原性 / 抗原性に関して関連がない可能性が高い。同様の技術の考察については、たとえば、Manca, Ann Ist Super Sanita. 1991 ; 27 ( 1 ) : 15-9を参照されたい。

#### 【 0 0 9 1 】

部位特異的変異誘発は、結合エピトープの解明のために有用なもう一つの技術である。たとえば、「アラニンスキャニング」では、タンパク質セグメント内のそれぞれの残基をアラニン残基で置換し、結合親和性についての結果を測定する。突然変異が結合親和性の有意な減少 (resuction) を引き起こす場合、結合に関与している可能性が高い。構造的エピトープに特異的なモノクローナル抗体 (すなわち、折りたたまれていないタンパク質を結合しない抗体) は、アラニン置換がタンパク質の全体の折り畳みに影響しないことを検証するために使用することができる。たとえば、Clackson and Wells, Science 1995 ; 267 : 383-386 ; および Wells, Proc Natl Acad Sci USA 1996 ; 93 : 1-6を参照されたい。

#### 【 0 0 9 2 】

また、エピトープ「フットプリント法」のために電子顕微鏡法を使用することができる。たとえば、Wang et al., Nature 1992 ; 355 : 275-278では、天然のササゲモザイクウイルスのキャプシド表面に対するFab断片の物理的フットプリントを決定するために低温電子顕微鏡観察、三次元イメージ再構成およびX線結晶学を連繫した適用を使用した。

#### 【 0 0 9 3 】

エピトープ評価のための「標識なし」アッセイ法のその他の形態には、表面プラスモン共鳴 (SPR、BIAcore) および反射光測定干渉分光法 (RifS) を含む。たとえば、Fagerstrom et al., Journal Of Molecular Recognition 1990 ; 3 : 208-14 ; Nice et al., J. Chromatogr. 1993 ; 646 : 159-168 ; Leipert et al., Angew. Chem. Int. Ed. 1998 ; 37 : 3308-3311 ; Kroger et al., Biosensors and Bioelectronics 2002 ; 17 : 937-944を参照されたい。

#### 【 0 0 9 4 】

関連していることが多いが、タンパク質が参照タンパク質と同じか、または実質的に同じエピトープに結合する能力に対して、参照結合タンパク質との競合に関するタンパク質の記述では、一部の場合に、有意に異なる生物学および生理化学的特性を意味する。結合タンパク質間の競合では、抗KIR抗体が結合したエピトープと少なくとも部分的に重複するか、またはこのようなエピトープに対して十分な近くに位置し、その結果、このような抗KIR抗体が立体障害のために既知の抗KIR抗体と競合するエピトープに結合する試験抗KIR抗体を意味する。たとえば抗体からなるか、または抗体を含む抗KIR抗体などの大きな抗KIR抗体は、大きな抗体サイズのために、同じかまたは類似するエピトープに結合することなく、参照抗KIR抗体と競合し得る。このような競合抗KIR抗体は、それが異なる抗原決定基に結合するにもかかわらず、参照抗KIR抗体と同じ抗原決定基領域と会合する相互作用を遮断するのに有用であり得る。

#### 【 0 0 9 5 】

組成物および投与

本発明は、NK細胞の抑制性受容体を遮断する抗体またはこれらの断片などの少なくとも

10

20

30

40

50

1つの化合物と治療抗体とを含む組成物に、治療抗体の効率を増大するための、治療抗体で治療した対象におけるADCCを増大するための、または疾患、特にターゲットされた細胞、好ましくはウイルス感染した細胞、腫瘍細胞またはその他の病原性細胞などの病気にかかった細胞の枯渇を必要とする疾患を有する対象を治療するための組成物の使用に関する。好ましくは、疾患は、癌、自己免疫疾患、炎症性疾患、ウイルス疾患からなる群より選択される。また、疾患は、移植片拒絶、特に同種異系移植片拒絶反応および移植片対宿主病（GVHD）に関する。

【0096】

治療抗体は、好ましくはそのFc領域を介してCD16に結合することができる。好ましくは、治療抗体は、ヒトIgG1またはIgG3 Fc部分、特にモノクローナル抗体またはこれらの断片、さらに好ましくはヒト抗体、ヒト化抗体もしくはキメラ抗体またはこれらの断片を有する。

10

【0097】

NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物は、少なくとも一つのKIRまたはNKG2A/Cヒト受容体に結合し、関連したKIR2DL、KIR3DLおよび/またはNKG2A/Cを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を阻害する。好ましくは、KIR2DLヒト受容体は、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3ヒト受容体からなる群より選択され、KIR3DLヒト受容体は、KIR3DL1およびKIR3DL2からなる群より選択される。

【0098】

好ましい態様において、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物は、KIR2DLヒト受容体の少なくとも一つにて結合し、関連したKIR2DLを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を阻害する。好ましくは、KIR2DLヒト受容体は、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3ヒト受容体からなる群より選択される。好ましい態様において、NK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物は、KIR2DLヒト受容体の共通の決定因子に結合し、KIR2DLを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を阻害する。より好ましくは、抗体などの化合物は、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3ヒト受容体の共通の決定因子に結合し、KIR2DL1-、KIR2DL2-、KIR2DL3を媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を阻害する。特定の態様において、抗体などの化合物は、ヒトKIR2DL1受容体の位置80にてLys残基を有するHLA-C対立遺伝子分子の結合およびヒトKIR2DL2およびKIR2DL3受容体の位置80にてAsn残基を有するHLA-C対立遺伝子分子の結合を阻害する。もう一つの詳細な態様において、この抗体は、ハイブリドーマDF200によって産生されるモノクローナル抗体DF200と同じエピトープと結合する。任意に、この抗体は、ヒトNK細胞の表面におけるKIR受容体に対する結合について、ハイブリドーマDF200によって産生されるモノクローナル抗体DF200と競合する。好ましい態様において、抗体は、ハイブリドーマDF200によって産生されるモノクローナル抗体DF200である。

20

30

【0099】

本発明に従った組成物は、NK細胞の異なる抑制性受容体を遮断する、いくつかの化合物の組み合わせ、好ましくは抗体またはこれらの断片を含むことができる。好ましくは、NK細胞の抑制性受容体を遮断する化合物、好ましくは抗体またはこれらの断片は、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR3DL1、KIR3DL2、NKG2AおよびNKG2Cから選択される抑制性受容体に特異的であり、関連したKIR-またはNKG2A/Cを媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を阻害することができる。より好ましくは、「中和」化合物の組み合わせは、KIR2DL1-、KIR2DL2-およびKIR2DL3を媒介したNK細胞細胞障害性の阻害を阻害することができる。

40

【0100】

本発明の組成物は、任意の薬学的に許容される担体または賦形剤、典型的には任意に安定剤、防腐剤などを補った緩衝液、等張液、水性懸濁液を含んでもよい。典型的な製剤は、食塩水および任意に、高分子量タンパク質（たとえば、ヒト血清アルブミン）などの保護分子または安定化分子を含む。

【0101】

本発明の方法および組成物によれば、NK細胞の抑制性受容体を遮断する抗体またはこれ

50

らの断片などの化合物および治療抗体は、有効量で投与される。レシピエントに投与される治療抗体の有効量は、約0.1mg/kg～約20mg/kgの間であることができる。しかし、抗体の有効量は、抗体の形態（Ig全体または断片）、mAbの親和性および薬物動態パラメータに依存し、これらは、それぞれの特定の抗体について決定しなければならない。

#### 【0102】

レシピエントに投与されるNK細胞の抑制性受容体を遮断する、抗体またはこれらの断片などの化合物の有効量は、約0.1mg/kg～約20mg/kgの間であることができる。抗体の有効量は、抗体の形態（Ig全体または断片）、mAbの親和性および薬物動態パラメータに依存し、これらは、それぞれの特定の抗体について決定しなければならない。典型的には、全長抗体は、2週ごとに1回、3週ごとに1回、また4週ごとに1回投与されるが、抗体断片は、典型的には、より多いことが多く、たとえば週に1回、または週に1回以上投与することができる。

10

#### 【0103】

本発明に従った組成物は、対象に直接注射することによって、典型的には静脈内、腹腔内、動脈内、筋肉内または経皮の経路によって与えられてもよい。リツキサン（リツキシマブ）またはゾレア（オマリズマブ）などのいくつかのモノクローナル抗体は、臨床状況において効率的なことが示されており、同様の投与処方計画（すなわち、製剤および/または用量および/または投与プロトコル）を本発明の組成物に使用してもよい。

#### 【0104】

さらにまた、本発明の組成物は、その他の活性薬剤または化学療法もしくはその他の免疫療法などの治療プログラムを、同時に、もしくは連続してさらに含んでもよく、または組み合わせて使用してもよい。

20

#### 【実施例】

#### 【0105】

実施例1：全KIR2DL抗体の産生

本実施例は、マウスモノクローナル抗KIR抗体の産生およびKIR2DLヒトNK受容体の共通の決定因子に対する新規のモノクローナル抗体であるDF200の同定を記述する。

#### 【0106】

PBLの精製およびポリクローナルまたはクローンNK株化細胞の産生

PBLは、フィコールHypaque勾配およびプラスチック接着細胞の枯渇により、健康なドナーに由来した。濃縮されたNK細胞を得るために、PBLを抗CD3、抗CD4および抗HLA-DRmAbs（4の30mns）と、続いてヤギ抗マウス磁気ビーズ（DynaI）（4にて30mns）と共にインキュベートし、当該技術分野において既知の方法によって免疫磁気選択した（Pende et al., J Exp Med. 1999; 190(10): 1505-16）。CD3マイナス、CD4マイナス、DRマイナス細胞を照射支持細胞、100U/mlのインターロイキン2（Proleukin, Chiron Corporation）および1.5ng/mlの植物性血球凝集素A（Gibco BRL）上で培養し、ポリクローナルNK細胞集団を得る。NK細胞を限界希釈によってクローニングし、NK細胞のクローンを細胞表面受容体の発現についてフローサイトメトリーによって特徴づける。

30

#### 【0107】

以下のクローンをこの研究に使用した：

40

CP11、CN5およびCN505は、KIR2DL1陽性クローンであり、EB6またはXA-141抗体によって染色される。

#### 【0108】

CN12およびCP502は、KIR2DL3陽性クローンであり、GL183抗体によって染色される。

#### 【0109】

フローサイトメトリー解析

使用するmAbは、研究室で産生したJT3A（IgG2a、抗CD3）、EB6およびGL183（それぞれIgG1抗KIR2DL1およびKIR2DL3）、XA-141 IgM抗KIR2DL1（EB6、抗CD4（HP2.6）、抗DR（D1.12、IgG2a）と比較して同じ特異性）であった。JT3A、HP2.6およびDR1.12の代わりに、同じ特異性の市販のmAbをたとえばBeckman coulter Inc, Fullerton, CAから使用すること

50

ができる。EB6およびGL183は、Beckman Coulter Inc, Fullerton, CAで市販されている。XA-141は、市販されていないが、EB6は、Moretta (1993、上記)に記載されているように溶解の対照再構成のために使用することができる。

#### 【0110】

##### フローサイトメトリー

細胞を適切な抗体 (4 にて30mns) で、続いてPEまたはFITC抱合ポリクローナル抗マウス抗体 (Southern Biotechnology Associates Inc) で染色した。試料をFACSの装置 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) での細胞蛍光測定解析法によって解析した。

#### 【0111】

##### 細胞障害性実験

NKクローンの細胞溶解活性は、標準的な4時間<sup>51</sup>Cr放出アッセイ法によって評価し、エフェクターNK細胞をCw3またはCw4陽性株化細胞 (これらはNK細胞溶解に感受性であることが知られている) で試験した。全ての標的は、マイクロタイテーションプレートあたり5000細胞で使用し、標的に対するエフェクターの比率は、通常、標的細胞あたり4エフェクターである。1/2希釈の示されたモノクローナル抗体の上清の有無において細胞溶解アッセイ法を行う。手順は、本質的にMoretta et al. (1993、上記)に記載されているのと同じである。

#### 【0112】

##### 新たなmAbの産生

mAbは、Moretta et al. (J Exp Med. 1990; 171(3): 695-714および1990; 172(6): 1589-98、それぞれの開示は、参照により本明細書に援用される)に記載されているように、5週間目のBalb Cマウスを活性化されたポリクローナルまたはモノクローナルNK株化細胞で免疫することによって産生させた。異種細胞融合の後、mAbは、最初にこれらがEB6およびGL183陽性NK株化細胞と交差反応する能力について選択して、クローン化した。陽性モノクローナル抗体を、これらがそれぞれCw4またはCw3陽性標的のEB6陽性またはGL183陽性NKクローンによる溶解を再構成する能力についてさらにスクリーニングした。

#### 【0113】

##### 結果

モノクローナル抗体 (DF200 mAb) のうちの1つは、KIR2DL1、KIR2DL2/3を含むKIRファミリーの種々のメンバーと反応することが見いだされた。DF200mAbでのNK細胞の染色に関して、KIR2DL1+およびKIR2DL2/3+細胞は、明るく染色された。

#### 【0114】

これらのHLAクラスI特異的抑制性受容体の一方またはもう一方の (またはさらに両方) を発現するNKクローンを、1つまたは複数のHLA-C対立遺伝子を発現する標的細胞に対するエフェクター細胞として使用した。予想通り、KIR2DL1+ NKクローンは、もしあってもHLA-Cw4を発現する標的細胞に対してほとんど細胞溶解活性を示さず、KIR2DL3+ NKクローンも、Cw3陽性 (positive) 標的に対してほとんど活性を示さなかった。しかし、DF200mAb (これらのKIR2DL受容体をマスキングするために使用した) の存在下では、NKクローンは、これらのHLA-Cリガンドを認識することができなくなり、HLA-Cw3またはHLA-Cw4陽性標的に対して強力な細胞溶解活性を示した。

#### 【0115】

たとえば、C1R株化細胞 (Cw4+ EBV株化細胞、ATCC n° CRL 1993) は、KIR2DL1+NK (CN5 / CN505) によって殺されなかったが、DF200または従来の抗KIR2DL1 mAbのいずれかの使用によって、効率的に阻害に転じさせることができる。一方で、KIR2DL2/3+ KIR2DL1-表現型 (CN12) を発現するNKクローンは、C1Rを効率的に死滅させ、この死滅は、DF200mAbによる影響を受けなかった。同様の結果は、Cw3陽性標的に対するKIR2DL2-またはKIR2DL3-陽性NKクローンでも得ることができる。

#### 【0116】

##### 実施例2: DF200 mAb / KIR 2DL1およびDF200 mAb / KIR 2DL3相互作用のBiacore解析

本実施例は、KIR2DL1およびKIR2DL3に対する結合の際のDF200のそれぞれの親和性の評

10

20

30

40

50

価を記述する。

#### 【0117】

組換えタンパク質の産生および精製

KIR 2DL1およびKIR 2DL3組換えタンパク質は、大腸菌 (*E. coli*) において産生した。KIR 2DL1およびKIR2DL3の全細胞外ドメインをコードするcDNAは、以下のプライマーを使用して、それぞれpCDM8クローン47.11ベクター (Biassoni et al, Eur J Immunol. 1993; 23(5):1083-7; その開示は、参照により本明細書に援用される) およびRSV (gpt) 183クローン6ベクター (Wagtmann et al., Immunity 1995 May; 2(5):439-49; その開示は、参照により本明細書に援用される) からPCRによって増幅した:

センス: 5'-GGAATTCAGGAGGAATTTAAATGCATGAGGGAGTCCACAG-3' (配列番号: 3)

アンチセンス: 5'-CCCAAGCTTGGGTATGTGACAGAAACAAGCAGTGG-3' (配列番号: 4)。

#### 【0118】

これらは、ビオチン化シグナルをコードする配列をもつpML1発現ベクターにインフレームでクローン化した (Saulquin et al, 2003; その開示は、参照により本明細書に援用される)。

#### 【0119】

タンパク質発現は、Invitrogenから得た大腸菌BL21 (DE3) 菌株中で行った。トランスフェクト細菌をアンピシリン (100  $\mu$ g/ml) を補った培地中で37 °CにてOD<sub>600</sub>=0.6まで培養し、1mM IPTGで誘導した。

#### 【0120】

タンパク質を変性条件 (8Mの尿素) 下で封入体から回収した。組換えタンパク質の再折りたたみは、L-アルギニン (400mM、Sigma) および  $\beta$ -メルカプトエタノール (1mM) を含む Tris 20mM、pH 7.8、NaCl 150mM緩衝液中で、RTにて、6工程の透析 (それぞれ4、3、2、1、0.5および0Mの尿素) で尿素濃度を減少させることによって行った。還元グルタチオンおよび酸化グルタチオン (それぞれ、5mMおよび0.5mM、Sigma) を0.5および0Mの尿素透析工程の間に添加した。最後に、タンパク質をTris 10mM、pH 7.5、150mM NaCl緩衝液に対して十分に透析した。可溶性の再び折りたたまれたタンパク質を濃縮し、次いで、Superdex 200サイズ排除カラム (Pharmacia; AKTA system) で精製した。

#### 【0121】

Biacore解析

表面プラズモン共鳴測定は、Biacore装置 (Biacore) で行った。

#### 【0122】

全てのBiacore実験において、0.05%の界面活性物質P20を補ったHb緩衝液を、泳動緩衝液として使用した。

#### 【0123】

タンパク質固定化

組換えKIR 2DL1およびKIR 2DL3タンパク質をセンサチップCM5 (Biacore) 上のデキストラン層のカルボキシル基に共有結合で固定した。センサチップ表面は、EDC / NHS (N-エチル-N'--(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドヒドロクロリドおよびN-ヒドロキシスクシンイミド、Biacore) で活性化した。タンパク質のカップリング緩衝液 (10mMアセテートpH 4.5) 溶液を注入した。100mMエタノールアミンpH8 (Biacore) を使用して残りの活性化された基の非活性化を行った。

#### 【0124】

親和性測定

動力学的測定のためには、種々の濃度の可溶性抗体 ( $4 \times 10^{-7} \sim 10^{-10}$ M) を固定された試料に適用した。測定は、20  $\mu$ l / 分連続流速にて行った。それぞれのサイクルについて、センサチップの表面を5  $\mu$ lの10mM NaOH pH 11の注入によって再生した。

#### 【0125】

BIAlogue動態評価プログラム (BIAevaluation 3.1、Biacore) をデータ分析のために使用した。

## 【 0 1 2 6 】

結果

表1

固定されたKIR 2DL1およびKIR 2DL3に対するDF200 mAb結合の BIAcore解析

抗原 Kd (  $10^{-9}$  M )

KIR 2DL1 10.9 +/- 3.8

KIR 2DL3 2.0 +/- 1.9

Kd : 解離定数。

## 【 0 1 2 7 】

可溶性分析物 ( 種々の濃度にて40  $\mu$  l ) を20  $\mu$  l / 分の流速で、それぞれ500または540反  
射率ユニット ( RU ) および1000または700RUのKIR 2DL1およびKIR 2DL3を含むデキストラ  
ン層上のHb緩衝液中に注入した。データは、6回の独立した実験を表す。

10

## 【 0 1 2 8 】

実施例3：リツキサンおよび抗KIR mAbの組み合わせを使用することによるADCCの増強

本実験は、リツキサン単独では、KIR2DL1-陽性NKクローンによるCw4-陽性標的細胞に対  
するADCCを本質的に媒介しないが、KIR2DL1-陽性クローンのADCCが、抗KIR2DL1抗体の存  
在下において非常に増強されることを示す。

## 【 0 1 2 9 】

ヒトNKクローンの調製

ネガティブ抗CD3免疫磁気選択 ( Miltenyi ) によってT細胞を枯渇させた血液単核細胞を  
限界希釈条件下でプレートにまき、植物性血球凝集素 ( PHA ) ( Biochrom KG, Berlin, Ge  
rmany ) で活性化して、インターロイキン ( IL ) -2 ( Chiron B.V., Amsterdam, Netherlan  
ds ) および照射支持細胞と共に培養する。クローン生存効率は、全てのドナーにおいて同  
等であり、5プレートのNK細胞において1つ~10プレートのNK細胞において1つの間の範囲  
である。クローン化したNK細胞をエプスタインバーウイルスで形質転換されたHLA型が既  
知のBリンパ芽球腫株化細胞に対する標準的な $^{51}$ Cr放出細胞障害性によってアロ反応性につ  
いて、10 : 1の標的に対するエフェクターの比率にてスクリーニングする。 30%溶解を  
示すクローンをアロ反応性と記録した。概して、クローンは、<5%または>40%の溶解を  
示す。

20

## 【 0 1 3 0 】

KIR2DL1陽性NK細胞クローンによるリツキサンによって媒介されるADCCの増強

NKクローンの細胞溶解活性は、標準的な4時間 $^{51}$ Cr放出アッセイ法によって評価し、エ  
フェクターNK細胞を、NK細胞溶解に対するそれらの感受性について既知であるHLA-Cw3ま  
たはHLA-Cw4陽性EBV株化細胞 ( CD20陽性 ) に対して試験した。全ての標的は、マイクロタ  
イトレーションプレートウェルあたり5000細胞にて一定の標的に対するエフェクター ( NK  
細胞クローン ) 比で使用する。一定の実験において、治療的キメラ抗CD20 リツキシマブ  
 ( リツキサン、Idc ) を5  $\mu$  g/mlにてエフェクター標的混合物に添加する。一定の実験に  
おいて、EB6抗体 ( 抗KIR2DL1 ) を10  $\mu$  g/mlにてエフェクター標的混合物に添加する。

30

## 【 0 1 3 1 】

本実験は、リツキサン単独では、Cw4陽性標的に対するKIR2DL1陽性NKクローンによるAD  
CCを本質的に媒介しないことを示した。KIR2DL1陽性クローンのADCCは、抗KIR2DL1抗体の  
存在下において非常に増強される。

40

## 【 0 1 3 2 】

実施例4：ウイルス感染細胞のNKを媒介した死滅の増強

抗KIR mAbを、標準的クロム51 (  $^{51}$ Cr ) 放出アッセイ法 ( 細胞障害性アッセイ法 ) によ  
って、これらがウイルス感染細胞のNKを媒介した死滅を増強する能力について試験した。

## 【 0 1 3 3 】

$^{51}$ Crアッセイ法は、当技術分野において周知である。本発明の状況において、 $^{51}$ Cr放出  
アッセイ法は、一般に目的が：1) 抗KIR mAbsがそれ自体によってNKを媒介したウイルス  
感染細胞の死滅を増強するかどうか、または2) 抗KIR mAbsがその他の治療的mAbの有効性

50

を増強して、別の治療的mAbのリガンドを発現する標的細胞の死滅を誘導するかどうかを試験するためのものであるかどうかに応じて、2つの形態のうち的一方で行われる。これらの2つの一般的な形態間の唯一の相違は、正確なNK細胞集団および標的細胞集団の選択に関する。例として、以下の方法には、HIV治療のために開発されている抗CD4 mAbのこの場合に、抗KIR mAbが抗ウイルス療法に使用されるその他の治療的mAbの有効性を増強することができるかどうかを試験する方法を記述する。抗CD4 mAbは、HIVに感染したか否かにかかわらずT細胞上のCD4と結合し、同時に、NK細胞上の活性化Fc受容体であるCD16に結合し、これによりNK細胞を刺激してCD4を発現する標的細胞を死滅させることができる。しかし、この刺激効果は、HLA-Cの係合によるKIRを経た抑制性シグナリングによって平衡する。抗CD4および抗KIR mAbが同時に $^{51}\text{Cr}$ -アッセイに添加されると、抗CD4が単独で添加されるよりも死滅のレベルが高い。HLA-Cw4は、KIRを経てNK細胞へと抑制性シグナリングを送達することによって保護をもたらすので、本実験は、HLA-CおよびCD4をトランスフェクトしたB株化細胞721.221を溶解しないYTS-2DL1と呼ばれるNK株化細胞で行う。

10

#### 【0134】

種々の数のNK細胞と共に、標的細胞を37℃にて1時間 $^{51}\text{Cr}$ で標識し、洗浄して、96ウェル底プレートに5000細胞/ウェルで、0,3:1、1:1、3:1および9:1のエフェクター:標的比を与えるようにまいた。次いで、抗CD4 mAbをそれ自体によって1~50  $\mu\text{g/ml}$  (終濃度)の種々の濃度にてまたは同じ濃度にて1  $\mu\text{g/ml}$ の抗KIR mAbと共に添加する。プレートを37℃にて4時間インキュベートし、遠心して、上清を収集し、計数する。上清中の $^{51}\text{Cr}$ の量は、生じた標的細胞死滅の量に比例する。この実験では、50  $\mu\text{g/ml}$ の抗CD4とのインキュベーション後に、同じレベルの死滅が得られ、2  $\mu\text{g/ml}$ の抗CD4さらに1  $\mu\text{g/ml}$ の抗KIR mAbでも同様であり、抗KIR mAbが、有意に抗CD4 mAbの有効性を増強することを示している。抗CD4 mAbが細胞死滅を誘導する能力の同様の増強は、標的としてHIV感染細胞を使用するときにも予想される。メカニズムは、同じであるが、安全性の懸念のため、実験は非感染細胞で優先して行われるためである。

20

#### 【0135】

実施例5: 抗KIR抗体で促進されるHIV感染標的細胞の死滅

NK細胞は、ウイルス感染の制御時に重要である。HIV感染したAIDS患者において、NK細胞の数および機能の減少が報告されていた。以前の研究において、キラーIg様受容体(KIR)の発現増加は、疾患が制御されているHIV患者において見られた。KIRは、NK細胞およびT細胞に発現し、標的細胞上のMHCクラスI分子を認識する。標的細胞上のKIRとこれらのリガンドとの間の相互作用は、KIR分子の型に応じて、NK細胞の阻害または活性化のいずれかを引き起こしうる。KIR-リガンドが不適合なNK細胞は、腫瘍標的を死滅させることができることが以前に示された。

30

#### 【0136】

本実施例では、抑制性KIRがHIV感染標的のNK死滅を制御するかどうか、およびmAbを使用するKIRの遮断によって死滅が増大されるかどうかを試験するために、KIRとMHCクラスI分子との間の相互作用を抗KIR抗体で遮断した。本処置の効果は、その発現レベルがNK細胞による死滅に比例するCD107aと呼ばれる脱顆粒マーカーのNK細胞での発現によって測定した。脱顆粒の増大は、NK細胞とHLA-C発現株化細胞との間のKIR相互作用が抗KIR抗体1-7F9を使用して遮断したときに、健康な個体およびHIV感染患者の両者からのNK細胞において観察されたことから、KIRが遮断されるときに、この患者群(population)からのNK細胞が機能的で活性化されることを示している。これらの結果は、抑制性KIRを遮断することによるNK細胞の活性化が、潜在的にHIV感染患者のための新たな免疫療法治療であり得ることを示す。

40

#### 【0137】

血液試料

血液は、ストックホルムのSodersjukhusetのVenhalsanから、11人の健康な個体(individuals)並びに10人のHIV-1感染患者から受けとった。患者全員が男性であり、健康な対照のうち3人が男性で7人が女性であった。患者全員が、高活性抗レトロウイルス療法(HAAR

50



T) 治療中で、<50RNAのウイルス負荷を有する患者のうちの6人でウイルス血症が制御され、残りは、77コピー/ml～200RNA コピー/mlの間のウイルス負荷を有した。HIV-1感染患者についての平均CD4+カウントは、582CD4+細胞/μl(248～1043の範囲)であった。PBMCは、密度遠心分離によって精製した。

#### 【0138】

##### 抗体

以下の抗体をBD Biosciencesから購入して、FACS染色に使用した、IgG2b抗ヒトCD56 (NCAM 16.2) FITC、IgG1抗ヒトCD3 (SK7) PerCP、IgG1抗ヒトCD56 (B159) APC、抗ヒトCD56 (leu-19) PE、抗ヒトKIR (NKB1) FITC、精製したIgG1マウス抗ヒトCD107a (H4A3) およびIgG1マウス抗ヒトCD107a (H4A3) FITC。抗ヒトKIR2DL1 (CD158a) および抗ヒトKIR2DL2 (CD158b) は、Immunotechから。KIR2DL1、2および-3に対して特異的なヒト抗KIR (1-7F9) mAb、並びにKIR2DS1および-2は、国際公開公報第号2005003168号および国際公開公報第号2005003172号に記述されていた。Southern Biotechからの抗ヒトのIgG4 FITCを1-7F9の検出のための二次抗体として使用した。

#### 【0139】

##### NK受容体染色

500000個の新鮮なPBMCを非標識抗体で4 にて30分間染色した。細胞を1%、PBS +FCS中で洗浄し、次いで4 にて10分間二次Abで染色した。洗浄後、細胞をPBS +1%マウス血清でブロックした。次いで、細胞を種々のNK受容体およびCD56およびCD3に対する抱合抗体で4 にて10分間染色した。細胞を1%のFCSおよび1%のパラホルムアルデヒドを含むPBS中で固定して、4色FACS Caliburにおいて解析するまで4 にて保存した。結果は、Cell Quest Proによって解析した。

#### 【0140】

##### CD107aアッセイ法

新鮮なPBMCをPESTを補ったRPMI培地中において200U/ml IL-2 (Peprotech) で一晩を刺激して、10%のウシ胎児血清 (Fc) を96ウェルプレートに添加した。細胞を5 μg/mLの標識のない精製したCD107a mAb (BD) を添加することによって、CD107aのバックグランド発現を遮断した。室温で15分インキュベーション後、細胞を完全なRPMI培地で3回洗浄した。いくつかの場合では、PBMCを100g/mLの抗KIR抗体と共にRTにて30分間ブレインキュベートした。標的細胞 (K562、721.221、721.Cw3、721.Cw4、721.Cw6、CEMまたは自己のCD4+細胞) を2:1のエフェクター:標的比にてウェルあたり500.000エフェクター細胞および250.000標的細胞で添加した。ネガティブ対照として、PBMCを完全培地と共にインキュベートした。250 μlの総容積に対して、4 μl抗ヒトCD107a FITC標識したmAbGolgiStop (BD) を添加した。細胞をエフェクターおよび標的細胞接触を促進するために500rpmにて1分間迅速にスピンドウンした。37 にて4時間インキュベーション後、細胞を1% PBS +FCSを中で洗浄し、次いで4 にて10分間表面マーカーCD56およびCD3を染色した。細胞を洗浄して、1%のパラホルムアルデヒドで固定して、次いでFACS Calibur機器で解析した。

#### 【0141】

##### 標的細胞

CD107aアッセイ法のために使用した標的細胞は、ポジティブ対照としてのMHCクラスI欠陥患者株化細胞K562および721.221、並びに異なるHLA-C対立遺伝子でトランスフェクトした株化細胞721.Cw3、721.Cw4および721.Cw6を発現するMHCクラスIであった。T株化細胞CEMは、HIV-1感染に感受性であったため、これを標的細胞として使用した。全ての株化細胞は、PESTおよび10%のFCSを補ったRPMI培地中で培養した。

#### 【0142】

自己CD4+ T細胞は、StemSep (登録商標) Human CD4+ T-cell Enrichment Cocktail and Magnetic Colloidsによって製造業者の記述 (StemCell Technologies) に従って新鮮なPBMCから精製した。Miltenyi BiotecからのLS 分離カラムおよびMidMACSを分離工程のために使用した。CD4+ T細胞を20U/mlのIL-2 (Peprotech) および5 μg/mLのPHA (Oxoid, Sollentuna, Sweden)、PEST並びに10%のFCSを補ったRPMI培地中で3日間刺激した。細胞を

培地中で洗浄し、次いでCD107aアッセイ法における標的細胞として使用する前にさらに12日間10U/mlのIL-2で刺激した。

#### 【0143】

##### 標的細胞のHIV-1感染

CEM細胞には、37℃にて4時間、ゆっくりと100rpmにて振動しながら細胞とウイルスとをインキュベーションすることによって1000×TCID<sub>50</sub>にてHIV-1 IIIB (LAI) で感染させた。細胞を暖かい培地に懸濁して、1000rpmにて8分間遠心し、洗浄を一度繰り返し、次いで細胞を37℃にて12日間24穴プレート中に保持した。3～4日毎に新鮮な培地を培養に添加した。細胞が感染したかどうかを決定するために、細胞を細胞内p24発現について染色した。500000細胞をPBS +1% FCSに洗浄し、4℃にて10分間抗ヒトCD4 APCで染色した。洗浄後、細胞を100 µl BD Cytofix/Cytoperm溶液と共に4℃にて20分間インキュベーションすることによって固定し、次いで細胞をBD Perm / 洗浄溶液中で2回洗浄した。BD Perm / 洗浄溶液に1/20希釈したIgG1マウス抗p24 Ab、KC57 FITC (Beckman Coulter) またはアイソタイプ対照を添加した。4℃にて45分インキュベーション後、細胞を再びBD Perm / 洗浄溶液中で洗浄し、次いで1%のPFAおよび1%のFCSを含むPBS中で固定した後にFACS Caliburで解析した。

10

#### 【0144】

##### 統計

健康な対照およびHIV-1感染患者からの結果を、母数によらないマン-ホイットニー-U検定 (ウィルコクソン順位和検定) によって統計学的に比較した。

20

#### 【0145】

##### 結果

##### HIV-1感染個体におけるNK細胞受容体の発現の変化

NK細胞上の受容体発現に対するHIV-1感染の効果を調査するために、新たに精製したPBMCをCD56およびCD3 (図1a) について、並びにいくつかの異なるNK受容体について染色した。CD56+CD3-NK細胞の比率は、HAART治療したHIV-1感染患者と健康な対照との間に有意な相違はなかったが、(P=0.06)、中央値は、HIV-1感染患者において減少した (図1b)。NK細胞は、CD56brightおよびCD56dim細胞 (図1a) に分けることができる。この研究において、HIV-1感染患者について、健康な対照と比較してCD56dimCD3-細胞のわずかな減少を見ることができたが、相違は有意ではなかった。

30

#### 【0146】

CD56+CD3-NK細胞上の種々NK受容体のパネルの発現を解析した。有意ではないが、KIR受容体の発現の中央値の増大が、HIV-1感染患者において見られた (図2)。KIRに対する4つの異なるmAbを使用し、そのうちの3つが単一のKIR (KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR3DL1) に特異的で、1つの1-7F9が、KIR2DL / S1、KIR2DL / S2およびKIR2DL3と交差反応性であった。

#### 【0147】

##### CD107a発現によって測定されるNK細胞の活性

脱顆粒マーカーCD107aの細胞表面密度の増大を引き起こしてNK細胞によるK562標的細胞の死滅を反映するNK感受性K562標的細胞でHIV-1感染患者および健康な対照からのPBMCを刺激した (図3 a、b)。CD107a+ CD56+CD3-細胞の割合の中央値は、K562細胞での刺激後のHIV-1感染患者についてよりも健康な対照についてわずかに高いだけであり、HIV-1感染患者におけるNK細胞の機能のわずかな減少のみを示したが、相違は、統計学的に有意でなかった (図3c)。

40

#### 【0148】

##### KIRの遮断は、CD107a発現を増大する

HLA-C発現細胞において、抑制性KIR受容体を遮断することに応答して、NKを媒介した死滅の増大を検出するためにCD107aアッセイ法を使用することができかどうかを調査するために、本発明者らは、全ての抑制性KIR2DL受容体と結合するヒト1-7F9抗体 (IgG4) でKIR受容体を遮断して、HLA-C陽性腫瘍株に応答してCD107aのアップレギュレーションを測

50

定した。本アッセイ法をKIR受容体の遮断の有無において行った。種々のHLAクラスI分子をトランスフェクトした721.221細胞を標的細胞として使用したときに、CD107aの発現増加をKIR受容体が遮断されるときに見ることができる。

【0149】

NK細胞上のCD107aの発現増加は、HIV-1感染患者と健康な対照との間で異なっておらず、0.5～13.6%の範囲であった（図4a）。

【0150】

HIV感染細胞は、NK受容体を活性化するためのリガンドの発現が低レベルであり、およびNKを媒介した死滅に対して非感染細胞よりも感受性でない可能性であったので、本発明者らは、標的細胞がHIV-1感染したときにKIRを遮断する効果を得ることができたかどうかを検査した。HIV-1感染に感受性であるCEMと呼ばれるT株化細胞に、HIV-1 IIIB株を感染させた。非感染および70%の感染CEM細胞（p24 FACS染色によって決定される）をCD107aアッセイ法における標的として使用して、健康な個体からのPBMCをエフェクター細胞として使用した。図4bで分かるように、1-7F9抗体を使用するKIRの遮断により、非感染性およびHIV感染細胞の両者において、CD107a発現の同様の増大を誘導した。これらの結果は、HIV感染細胞が、NK受容体を活性化するためのリガンドの発現を保持すること、およびHLA-Cの発現が溶解からの保護をもたらすことを示唆する。抗KIR mAbは、この保護を妨害して、HIV感染細胞をするためにNK死滅に感受性にするために使用することができる。

【0151】

また、NK細胞のKIR遮断が、自己の健康なCD4+細胞に対して効果を生じさせることができるかどうかを見いだすために、本発明者らは、標的としてIL-2で膨張させてPHAで活性化した非感染自己CD4+細胞を使用した。NK細胞を1-7F9とブレインキュベートすることによるKIRの遮断は、健康な個体からのリンパ球での2回の独立した実験において約10%のNK細胞上のCD107aの発現を増大した（図4c）。健康な標的細胞に対するこの低レベルの細胞障害性は、一般に健康な標的には存在しない標的細胞上のストレス誘導性の活性化リガンドによる、活性化NK受容体の係合のための要求と一致する。しかし、PHAさらにIL-2中でのCD4芽球の培養により、いくつかの標的細胞上にいくつかの活性化リガンドの低レベルの発現を引き起こすことができる。

【0152】

この研究の結果は、HAARTで治療したHIV患者からのNK細胞が、表現型および活性に関して、健康なドナーからのNK細胞とほぼ同じであることを示す。最も重要なことに、本発明に記述した実験は、HAARTで治療した患者におけるNK細胞が、抑制性KIRによるネガティブ調節の下にあり、このようなNK細胞の活性は、抗KIR mAbでKIRを遮断することによって増強することができることを示す。したがって、この患者群は、抗KIR mAbでの治療のための優れた標的集団である。対照的に、非常に活性な疾患をもつ患者は、NK細胞が損なわれており、たとえばあなたが抗KIR抗体で「KIRブレーキを除去する」場合であっても、これは活性化されないかもしれない。

【0153】

本明細書に引用された、刊行物、特許出願および特許を含む全ての参照文献は、これらの全体が、あたかもそれぞれの参照文献が参照により個々に、および具体的に援用され、かつ本明細書にその全体が記載されたのと同じ範囲に参照として本明細書に援用される。

【0154】

全ての見出しおよび小見出しは、便宜のためにのみ本明細書において使用されており、いかなる形であれ本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0155】

上記の要素の、これらの全ての可能なバリエーションのいずれの組み合わせも、特に明記しない限り、またま明らかに状況によって否定されない限り、本発明に包含される。

【0156】

本発明の記述に関連して使用される「ある」および「その」という用語、並びに同様の指示対象は、本明細書に特に明記しない限り、または明らかに状況によって否定されない

10

20

30

40

50

限り、単数および複数を包含すると解釈される。

【0157】

値の範囲の説明は、他に本明細書に示されない限り、範囲に入るそれぞれの別々の値を個々にいう簡略法として使用されることが単に意図され、それぞれの別々の値が、あたかもそれが本明細書に個々に詳述されるかのように本明細書に援用される。

【0158】

特に明記しない限り、本明細書に提供される全ての正確な値は、対応する近似値を表す（たとえば、特定の因子または測定に関して提供される全ての正確な例示的値は、対応する近似測定も提供するとみなすることができ、必要に応じて「約」によって修飾される）。

10

【0159】

本明細書に記述された全ての方法は、他に本明細書に示してあるか、またはさもなければ状況によって明らかに否定されない限り、いずれの適切な順序で行うこともできる。

【0160】

本明細書に提供されるいずれのおよび全ての実施例または例示的な言語（たとえば「などの」）の使用は、単に本発明をよりよく説明することのみを意図し、他に主張されない限り、本発明の範囲の限定を主張するわけではない。明細書の語は、さらに同じだけ明確に述べられていない限り、本発明の実施に必須な請求していない要素を示すものとして解釈されるべきではない。

【0161】

20

本明細書における特許文献の引用および援用は、便宜のためのみで行われ、このような特許文献の妥当性、特許性および／または施行のいずれの点も反映しない。

【0162】

要素に関して「含む」、「有する」、「含む」または「含有する」という用語を使用する本明細書の任意の側面または態様の本明細書における記述は、特に明記しない限り、または明らかに状況によって否定されない限り、その特定要素を「からなる」、「本質的になる」または「実質的に含む」本発明の同様の側面または態様についての補助を提供することを意図する（たとえば、本明細書において特定要素を含むと記述された組成物は、特に明記しない限り、または明らかに状況によって否定されない限り、その要素からなる組成物も記述するものとして理解されるべきである。

30

【0163】

本発明は、適用される法律によって許容される最大範囲で、本明細書に提示した側面または請求の範囲に詳述した主題の全ての修飾および均等物を含む。

【図面の簡単な説明】

【0164】

【図1】(A) NK細胞は、リンパ球ゲート内の全てのCD56+CD3-細胞として定義した。箱は、CD56dim細胞（下段の箱）並びにCD56bright細胞（上段の箱）を示す。(B) 健康な対照およびHAART治療したHIV-1感染患者についての全てのリンパ球のうちのNK細胞の比率を中央値を示す線と共に示してある。有意差は見られなかった。

【図2】健康な対照（白い箱）およびHIV-1に感染した患者（灰色の箱）におけるKIR発現NK細胞の割合。全てのKIRについて $P>0.05$ 。KIR2DL1、KIR2DL2およびKIR3DL1に対する抗体は、異なるKIR受容体を認識し、全KIR抗体1-7F9は、KIR2DL / S1、KIR2DL / S2およびKIR2DL3を認識する。

40

【図3】刺激なし(A)およびNK感受性K562株化細胞で刺激後(B)のCD56+CD3-NK細胞ゲート内の脱顆粒マーカーCD107aの発現。(C) K562細胞で刺激の後のCD107aのパーセント発現を健康な対照について、並びにHIV-1感染患者について示してある。群間に有意差はなかった。それぞれの群についての中央値を示してある。

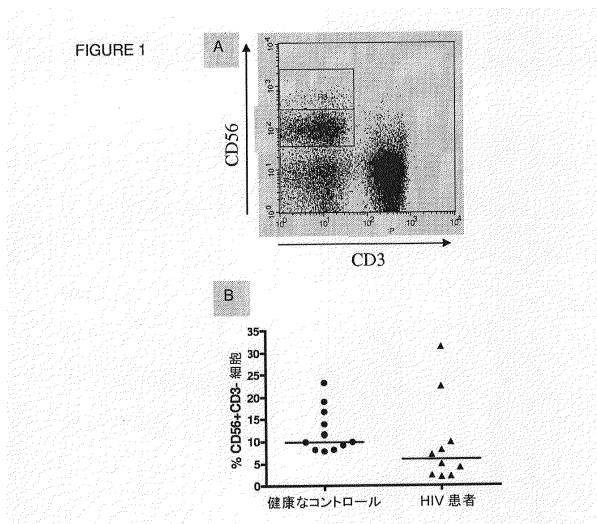
【図4】(A) 種々のHLA-C対立遺伝子をトランスフェクトした721.221細胞で刺激後の、および抗KIR mAb 1-7F9で全てのKIRを遮断後の、NK細胞におけるCD107aのパーセント発現増加を示してある。抗KIR mAbは、(1) KIR2DL2を発現し、かつHLA-Cw3でトランスフェク

50

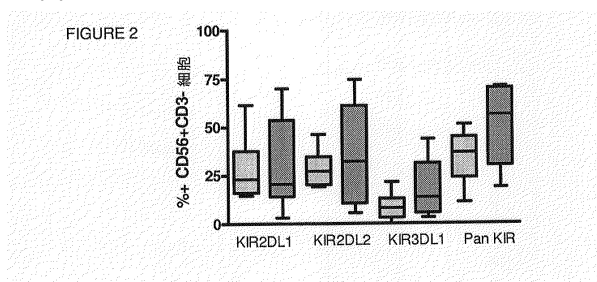
トした細胞で刺激したNK細胞と同様の範囲でCD107を誘導し、(2) KIR2DL1を発現し、かつHLA-Cw4またはHLA-Cw6（両方ともKIR2DL1に結合する）をトランスフェクトした標的細胞に曝露したNK細胞でも同様である。また、健康な個体（円）とHIV-1感染患者（三角形）との間の有意差を見いだすことはできなかった。それぞれの群についての中央値を示してある。(B) 非感染CEM株化細胞（白棒）または70%がHIV-1感染したCEM細胞（灰色棒）で刺激したNK細胞上の全てのKIRの遮断は、CD107a発現を増大させる。健康な対照PBMCで一度行ったこの実験において、非感染細胞とHIV-1感染細胞との間の差を見いだすことはできなかった。(C) IL-2およびPHAで膨張され、かつ活性化された自己CD4+細胞を標的として使用し、抗KIR（1-7F9）mAbでのNK細胞上のKIRの遮断により、健康な個体由来の血液での2回の独立した実験で、10%CD107a発現の増加を生じた。

10

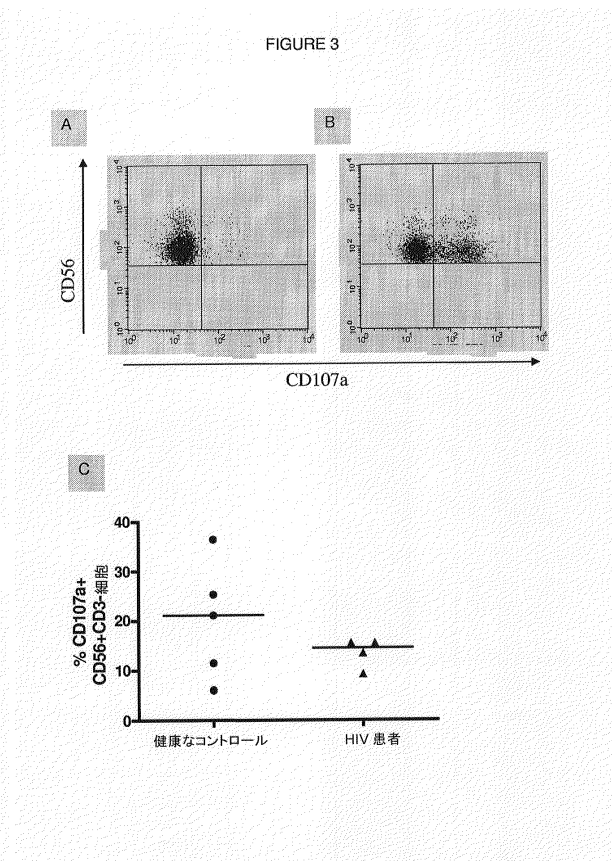
【図1】



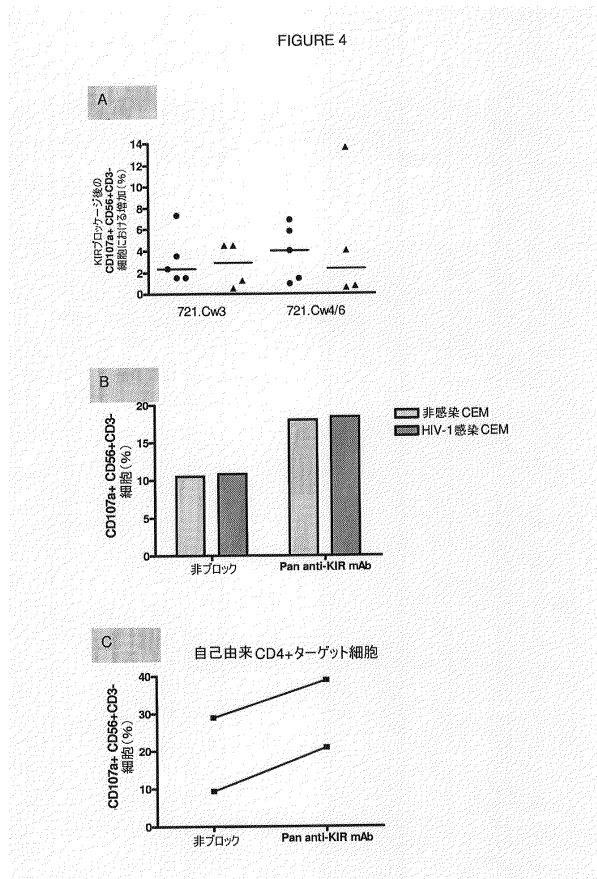
【図2】



【図3】



## 【図 4】



## 【配列表】

0005154949000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100109830  
弁理士 福原 淑弘
- (74)代理人 100095441  
弁理士 白根 俊郎
- (74)代理人 100084618  
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034  
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100140176  
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100092196  
弁理士 橋本 良郎
- (74)代理人 100100952  
弁理士 風間 鉄也
- (72)発明者 ワグトマン、ペテル・アンドレアス・ニコライ・レウメルト  
デンマーク国、ディーケー - 2 9 6 0 ルングステド・キスト、バレロド・バネベイ 3 4
- (72)発明者 ロマーニュ、フランソワ  
フランス国、エフ - 1 3 6 0 0 ラ・シオタ、レ・オート・ドゥ・フォンサン、バ・エー 3
- (72)発明者 グラマン、ジョアキム  
デンマーク国、ディーケー - 2 8 2 0 ゲントフテ、イブストルブベイ 6 0

審査官 横田 倫子

- (56)参考文献 特表 2 0 0 6 - 5 2 8 6 2 6 ( J P , A )  
AHMAD , CURRENT HIV RESEARCH , 2 0 0 3 年 7 月 , V1 N3 , P295-307  
SIRIANNI MARIA CATERINA , HUMAN IMMUNOLOGY , 2 0 0 1 年 1 2 月 , V62 N12 , P1328-1334  
WARD J P , AIDS , 英国 , 2 0 0 4 年 9 月 3 日 , V18 N13 , P1769-1779  
Proc Natl Acad Sci U S A. , 100[25] (2003) p.15011-6.  
エイズ医薬品等開発研究重点研究報告書 平成15年度 (2004) 国際研究グラント事業研究報告書  
、 p.75-83  
Nat Genet. , 31[4] (2002) p.429-434

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 39/395  
A61K 38/00-38/58  
A61P 31/18  
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed