

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7053479号

(P7053479)

(45)発行日 令和4年4月12日(2022.4.12)

(24)登録日 令和4年4月4日(2022.4.4)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

請求項の数 41 (全47頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-545380(P2018-545380)

(86)(22)出願日 平成29年2月28日(2017.2.28)

(65)公表番号 特表2019-515648(P2019-515648
A)

(43)公表日 令和1年6月13日(2019.6.13)

(86)国際出願番号 PCT/IB2017/000293

(87)国際公開番号 WO2017/149394

(87)国際公開日 平成29年9月8日(2017.9.8)

審査請求日 令和2年2月27日(2020.2.27)

(31)優先権主張番号 62/301,271

(32)優先日 平成28年2月29日(2016.2.29)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 516371254

オセ イムノセラピューティクス
フランス 4 4 2 0 0 ナンテ ボウレバ
ルド ベノニ ゴウリン 2 2

(74)代理人 100097456

弁理士 石川 徹

(72)発明者 ニコラス ポイリエル

フランス 4 4 1 1 9 トレイリエレス
チェミン ドゥ パセ テムプス 1

(72)発明者 カロリネ マリ

フランス 4 4 6 8 0 サインテ パザン
ネルエ ドゥ ブイソン 7

審査官 川合 理恵

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 I L 7 受容体細胞外ドメイン 鎖に対する非拮抗性抗体及び癌治療におけるそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体又はその抗原結合性断片であって、以下のCDR：

- そのアミノ酸配列が、配列番号：14のEffi3-VH3-CDR1である、VH-CDR1；
- そのアミノ酸配列が、配列番号：16のEffi3-VH3-CDR2である、VH-CDR2；
- そのアミノ酸配列が、配列番号：18のEffi3-VH3-CDR3配列である、VH-CDR3；
- そのアミノ酸配列が、配列番号：22のEffi3-VL3-CDR2である、VL-CDR2；
- そのアミノ酸配列が、配列番号：24のEffi3-VL3-CDR3である、VL-CDR3；並びに、
- そのアミノ酸配列が、配列番号：20のEffi3-VL3-CDR1であるか、又はそのアミノ酸配列が、配列番号：26のEffi3-VL4-CDR1である、VL-CDR1：を含み、

ここで、この抗体又はその抗原結合性断片が、ヒトCD127の細胞外ドメインへ特異的に結合し、且つCD127のアンタゴニストではない、前記抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 2】

下記の特徴の一つ以上：

- 該抗体又は断片は、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のヒトIL-7誘導したリン酸化を阻害しないこと；
- 該抗体又は断片は、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのヒトTSLP-刺激した分泌を阻害しないこと；
- 該抗体又は断片は、ヒトCD127のアゴニストではないこと；
- 該抗体又は断片は、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のヒトIL-7誘導したリン

酸化を増大しないこと；

- 該抗体又は断片は、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのヒトTSLP-刺激した分泌を増大しないこと：を有する、請求項1記載の抗体又は断片。

【請求項3】

前記抗体又はその抗原結合性断片が、重鎖及び軽鎖を含み、ここで：

- 該重鎖は、配列番号：14のVH-CDR1、配列番号：16のVH-CDR2、配列番号：18のVH-CDR3を含み；並びに

- 該軽鎖は、配列番号：20又は26のVL-CDR1、配列番号：22のVL-CDR2、配列番号：24のVL-CDR3を含む、請求項1又は2記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項4】

前記重鎖及び／又は軽鎖が、それらのフレームワーク内に、1又は複数の下記のアミノ酸残基を、又は下記のアミノ酸残基の全てを：

- VH配列において：位置3に残基Q、位置15に残基G、位置16に残基G、位置21に残基T、位置80に残基T、位置87に残基S、位置91に残基E、位置95に残基T、位置118に残基L、及び／又は

- VL配列において：位置7に残基S、位置9に残基S、位置11に残基L、位置12に残基P、位置18に残基P、位置47に残基Q、位置50に残基K、位置68に残基S、位置73に残基Gもしくは残基E、位置82に残基R、位置85に残基A、位置90に残基T；

Kabat付番体系に関して同定された位置を含む、請求項3記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項5】

請求項3又は4記載の抗体又はその抗原結合性断片であって、それが：

(i)前記軽鎖が、配列番号：26のVL4-CDR1を含み、且つKabat付番体系に関して同定された位置73に残基Gであるアミノ酸残基を有する、前記重鎖及び軽鎖、又は

(ii)前記軽鎖が、配列番号：20のVL3-CDR1を含み、且つKabat付番体系に関して同定された位置73に残基Eであるアミノ酸残基を有する、前記重鎖及び軽鎖：を含む、前記抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項6】

前記重鎖及び／又は軽鎖が、それらのフレームワーク内に、下記のアミノ酸残基の全て：

- VH配列において：位置3に残基Q、位置15に残基G、位置16に残基G、位置21に残基T、位置80に残基T、位置87に残基S、位置91に残基E、位置95に残基T、位置118に残基L、及び／又は

- VL配列において：位置7に残基S、位置9に残基S、位置11に残基L、位置12に残基P、位置18に残基P、位置47に残基Q、位置50に残基K、位置68に残基S、位置73に残基E、位置82に残基R、位置85に残基A、位置90に残基T；

を含む、請求項4記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項7】

請求項1～4のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片であって、それが：

- そのアミノ酸配列が配列番号：2の配列であるEffi3-VH3の配列を含むか又はこれからなる重鎖；並びに

- そのアミノ酸配列が配列番号：4の配列であるEffi3-VL3の配列、又はそのアミノ酸配列が配列番号：6の配列であるEffi3-VL4の配列を含むか又はこれからなる軽鎖；

を含むか又はこれらからなる、前記抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項8】

CD127-陽性細胞に対し、細胞傷害活性を有する、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項9】

ADCC活性を有する請求項8記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項10】

ヒトCD127-陽性細胞に対し細胞傷害活性及び／又はADCC活性を有する、請求項8又は9

10

20

30

40

50

記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 1 1】

前記抗体又はその抗原結合性断片のCD127への結合後にFc受容体を発現しているエフェクター免疫細胞を動員し、該動員がFc-依存性である、請求項8～10のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 1 2】

下記の断片の一つ：

- 疎水性相互作用により一緒に会合された、VL鎖及びVH鎖からなるFv断片；
 - VH：VLヘテロ二量体が、ジスルフィド結合によって安定化されている、dsFv断片；
 - VL鎖及びVH鎖が、可動性ペプチドリンカーにより互いに接続され、その結果一本鎖タンパク質を形成している、scFv断片；
 - ジスルフィド結合を介して一緒に結合された、全L鎖、及びH鎖のVH-CH1断片を含む単量体断片である、Fab断片；
 - Fab'断片；
 - 2個のFab'断片、及び追加的に抗体のヒンジ領域の一部を含む、F(ab')₂断片；
- である、請求項1～11のいずれか一項記載の抗体の抗原結合性断片。

10

【請求項 1 3】

配列番号：55の配列を持つエピトープからなるか又はこれを含むポリペプチドを認識し、且つ任意に該ポリペプチドに対して生じる、請求項1～12のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片。

20

【請求項 1 4】

前記抗体が、以下を含むか又はこれらからなるヒト化モノクローナル抗体：

- そのアミノ酸配列が配列番号：28の配列であるIgG1m-E333Aの定常領域を含む重鎖；及び
 - そのアミノ酸配列が配列番号：34の配列であるCL 定常領域を含む軽鎖；
- である、請求項1～13のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項 1 5】

前記重鎖が、そのアミノ酸配列が配列番号：42の配列であるEffi3-VH3-IgG1m-E333Aの配列を有する、請求項14記載の抗体。

【請求項 1 6】

前記軽鎖が、そのアミノ酸配列が配列番号：50の配列であるEffi3-VL3-CL、又はそのアミノ酸配列が配列番号：48の配列であるEffi3-VL4-CLの配列を有する、請求項14又は15記載の抗体。

30

【請求項 1 7】

前記抗体が、以下を含むか又はこれらからなるヒト化モノクローナル抗体：

- そのアミノ酸配列が配列番号：30の配列であるIgG4m-S228Pの定常領域、又はそのアミノ酸配列が配列番号：32の配列であるIgG2bの定常領域を含む重鎖；並びに
 - そのアミノ酸配列が配列番号：34の配列であるCL 定常領域、又はそのアミノ酸配列が配列番号：36の配列であるCL 定常配列を含む軽鎖；
- である、請求項1～16のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片。

40

【請求項 1 8】

請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片を含むキメラ分子であって、それが、

該分子へ、認識、結合、アンカリング、シグナル伝達の機能を集合的に提供する、複数の機能性ドメインを有する複合分子である、前記キメラ分子。

【請求項 1 9】

前記複合分子が、(i)請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又は抗原結合性断片のscFv断片由来である、エクドメイン、(ii)細胞膜へのアンカリングのための、膜貫通ドメイン、及び(iii)少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、エンドドメインを含む、キメラ抗原受容体(CAR)であり、

50

(i)、(ii)及び(iii)が、1以上の関係づけられた組換え分子(複数可)、又は、1以上の融合タンパク質(複数可)である、請求項18記載の抗体又はその抗原結合性断片を含むキメラ分子。

【請求項20】

下記の特徴の少なくとも一つ：

- T細胞活性化の開始；
- T細胞媒介性細胞傷害性；
- T細胞活性化シグナルの増幅、又は該シグナルの同時刺激、を集合的に可能にする、少なくとも2、又は少なくとも3のシグナル伝達ドメインを含む、請求項19記載のキメラ抗原受容体。

10

【請求項21】

請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又は抗原結合性断片をコードしている、ポリヌクレオチド、又はその単離されたポリヌクレオチド。

【請求項22】

配列番号：13、15、17、19、21及び23の配列、又は配列番号：13、15、17、25、21及び23の配列を含む、請求項21記載のポリヌクレオチド。

【請求項23】

配列番号：1及び3の配列又は配列番号：1及び5の配列を含む、請求項22記載のポリヌクレオチド。

【請求項24】

配列番号：41及び47の配列又は配列番号：41及び49の配列を含む、請求項22又は23記載のポリヌクレオチド。

20

【請求項25】

請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又は抗原結合性断片、請求項18又は19記載のキメラ分子、請求項20記載のキメラ抗原受容体、又は請求項21～24いずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

【請求項26】

T細胞である、請求項25記載の細胞。

【請求項27】

キメラ抗原受容体(CAR)の調製の方法であって、それが：

- a. 請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片をコードしているポリヌクレオチドを提供する工程；
- b. 工程a)の該ポリヌクレオチドをそのC-末端で、膜貫通ドメイン、及び細胞又はT細胞、又はヒトT細胞へ、刺激シグナル(複数可)を提供するのに適した少なくとも1つの又は2つの細胞内シグナル伝達ドメイン(複数可)を、N-からC-末端へコードしているポリヌクレオチドにより組換える工程；及び
- c. 工程b)において得られた組換え分子を、該細胞において発現させる工程を含む、前記方法。

30

【請求項28】

前記生成されたキメラ抗原受容体を、ヒトCD127を発現している細胞と接触させた後、これをその特性について選択する工程をさらに含む、請求項27記載の方法。

40

【請求項29】

活性成分として、請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、請求項18又は19記載のキメラ分子、請求項20記載のキメラ抗原受容体、請求項25又は26記載の細胞、あるいは請求項21～24いずれか一項記載のポリヌクレオチドを含有する、医薬組成物。

【請求項30】

活性成分として：

- 請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、請求項18～19記載のキメラ分子、請求項20記載のキメラ抗原受容体、請求項25又は26記載の細胞、あるい

50

は請求項21～24いずれか一項記載のポリヌクレオチド、並びに

- 化学療法薬、放射線治療薬、手術用薬剤、免疫治療薬、プロバイオティクス及び抗生物質の群から選択された、少なくとも1種の更なる治療薬：

を含む、治療組み合わせ製品であって、

ここで該活性成分が、個別治療、同時治療又は併用治療のために製剤化される、前記治療組み合わせ製品。

【請求項31】

組合せ使用又は逐次使用のための、請求項30記載の治療組み合わせ製品。

【請求項32】

それを必要とするヒト患者への投与に適しており、且つ活性成分として：(i)請求項1～17

のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、請求項18又は19記載のキメラ分子

、請求項20記載のキメラ抗原受容体、請求項25又は26記載の細胞、あるいは、請求項21

～24いずれか一項記載のポリヌクレオチド、並びに、(ii)追加の免疫治療薬、T細胞に關与

する免疫治療薬、CAR分子を保持するT細胞、あるいは、細胞受容体又は抗原を標的化する

CAR分子を含有する、請求項31記載の治療組み合わせ製品。

【請求項33】

癌、CD127+細胞に関連した癌、CD127陽性細胞の増殖及び/又はCD127陽性細胞の浸潤に関連した癌の治療における使用のための、請求項29記載の医薬組成物、あるいは請求項30又は31記載の治療組み合わせ製品。

【請求項34】

乳癌、腎臓癌、膀胱癌、肺癌、膵臓癌の群から選択された癌の治療における使用のための、又はT細胞皮膚リンパ腫、セザリーリンパ腫の治療のための、又はIL7-R/TSLP経路の獲得型変異を有する急性リンパ芽球様白血病及び中皮腫の治療のための、請求項33記載の医薬組成物。

【請求項35】

配列番号：55の配列を持つエピトープからなるポリペプチドに対し、非-ヒト動物、又は非-ヒト哺乳動物を免疫化することを含み、

CD127の細胞外ドメインに特異的に結合し、且つ下記の特徴の少なくとも一つ：

- これは、CD127のアンタゴニストではなく、且つIL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を阻害しない、並びに/又は

- これは、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を阻害しない、並びに/又は

- これは、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を増大しない、並びに/又は

- これは、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を増大しない；

を示す抗体を選択する工程を含む、請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片の製造方法。

【請求項36】

前記免疫化した非-ヒト動物から得られる血清を収集し、前記ポリペプチドに対する抗体を得る工程をさらに含む、請求項35記載の抗体の製造方法。

【請求項37】

前記抗体が、下記の特徴：

- これは、CD127の細胞外ドメインに特異的に結合する、並びに

- これは、CD127のアンタゴニストではない、並びに

- これは、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を阻害しない、並びに

- これは、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を阻害しない、並びに

- これは、CD127のアゴニストではない、並びに

10

20

30

40

50

- これは、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を増大しない、並びに

- これは、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を増大しない：

を有する、請求項35又は36記載の方法。

【請求項38】

請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、請求項18又は19記載のキメラ分子、又は請求項20記載のキメラ抗原受容体が、先に対象から得られた試料中のCD127+細胞の検出及び/又は定量化のために使用される、インビトロ又はエクスピボ診断のためにデータを取得する方法。

10

【請求項39】

診断試験における使用、又は個別化医療における又はコンパニオン診断試験における使用に適した医薬品の製造における、請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、あるいは請求項18又は19記載のキメラ分子、あるいは請求項20記載のキメラ抗原受容体の使用。

【請求項40】

治療に対する対象の反応を予測するバイオマーカーとしてCD127の存在を決定することを含む、先に対象から得られた試料中のCD127+細胞の存在を決定する、インビトロ又はエクスピボ方法であって

- 請求項1～17のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、あるいは請求項18又は19記載のキメラ分子、あるいは請求項20記載のキメラ抗原受容体を使用し、対象の腫瘍試料中のCD127の発現レベルを決定すること、並びに

20

- このCD127の発現レベルを、無反応対象集団におけるCD127の発現レベルの代表値と比較すること：を含み、

ここで該対象の腫瘍試料中のより高いCD127の発現レベルは、該治療に反応する対象の指標である、前記方法。

【請求項41】

治療を受ける対象が癌に対する診断を受ける、請求項40記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、インターロイキン7(IL-7)の受容体の、特にヒト細胞上で発現され且つIL-7もしくはTSLPシグナル伝達経路と干渉しないヒトIL-7の受容体の鎖(同じくヒトIL-7Rアルファ又はIL-7Ra又はCD127とも記される)の細胞外ドメインに対するヒト化抗体に関する。本発明の抗体は、IL-7受容体に対するアンタゴニスト作用を有さないが、依然CD127陽性細胞に対する細胞傷害活性は提示し得る。特定の実施態様において、本抗体は、IL-7受容体に対するアゴニスト作用は有さない。本発明は、例として、表6の配列番号：55の配列を含む、ヒトCD127エピトープを認識する抗体を提供する。

【0002】

従って、本発明の抗体は、寛容状態における免疫系をブロックする、CD127陽性細胞の増殖に、又はCD127陽性細胞の浸潤に関連した癌を治療するための使用に適している。本発明はまた、治療薬、特に免疫治療薬の調製のための、本抗体の断片、特にこれらの抗体の抗原結合性断片、又はそのような抗体もしくはそのような断片を含む分子にも関する。

40

【背景技術】

【0003】

(IL-7Rシグナル伝達)

IL-7のIL-7Rへの結合は、Janusキナーゼ(JAK)-1及び-3、シグナル伝達兼転写活性化因子5(STAT5)、及びホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3-k)を含む、いくつかのシグナル伝達経路の活性化を誘発する。STAT1及びSTAT3経路が活性化されることが報告されているが、それらは主要な経路ではないように思われる。STAT5経路の活性化は、抗ア

50

ポトースタンパク質Bcl-2の誘導及びアポトース促進性タンパク質Baxのミトコンドリアへの侵入の防止に必要とされ、従って、胸腺で発生するT細胞前駆細胞の生存に必要とされる。PI3-k経路の活性化は、アポトース促進性タンパク質Badのリン酸化及び細胞質保持をもたらす。

【0004】

本発明において使用される「CD127-陽性細胞」は、その細胞表面でCD127を発現する細胞、特にヒトCD127を発現するヒト細胞を示す。ほとんどの場合、CD127-陽性細胞は、IL-7Rを形成する複合体(IL-7R-陽性細胞)中に及び/又はTSLPRを形成する複合体(TSLPR-陽性細胞)中に、CD127を発現する。CD127は、様々な細胞によって発現され、これには、メモリーT細胞とナイーブT細胞の両方によるものが含まれる。CD127は、特に、休止期T細胞及びメモリーT細胞を含むエフェクターT細胞(Teff)によって、並びに未成熟B細胞によって発現され、並びにまた休止期ナチュラル制御性T細胞(ナチュラルTreg)によっても、かなり低いレベルであるが、発現される。IL-7R は、胸腺細胞の分化及びリンパ球のクローン性増殖の促進に不可欠である。

10

【0005】

ナイーブT細胞の恒常性にとってのIL7-CD127経路の重要性は、従来型CD4+ T細胞上での膜結合型IL-7R の発現レベルが、健常個体及びHIV-感染患者並びに多発性硬化症(MS)患者における新胸腺移出細胞(RTE)-CD4+ T細胞の頻度と相関することを示すいくつかの最近の研究によって強調されている(Albuquerqueらの文献、2007)(Brouxらの文献、2010)。

20

【0006】

本発明において明らかにされたアンタゴニスト特性は、とりわけ、IL-7により、特にヒトIL-7により誘導されたIL-7Rシグナル伝達に対するアンタゴニスト性であってよい。IL-7により誘導されたIL-7Rシグナル伝達のアンタゴニストは、本実施例において説明されたように、STAT5リン酸化の阻害を測定することにより同定され得る。STAT5のIL7-誘導性リン酸化は、IL7R活性化のマーカーであり、並びにIL7-IL7R 相互作用を拮抗する抗体は、STAT5のIL7-誘導性リン酸化を減少すると予想される。

【0007】

胸腺間質性リンホポイエチン(TSLP)は、リンパ球産生に活性があり、特に、免疫系の細胞の発生の調節に関与する上皮細胞サイトカインであり、該調節は、特に、該細胞の成熟に影響を及ぼす。ヒトTSLP(寄託番号AF338732)は、樹状細胞の分極化を働かせ、T細胞及びB細胞の増殖及び分化を促進する因子であり、且つ皮膚及び肺の疾患において役割を果たすことが示されている(He及びGehaの文献、2010)。従って、TSLPは、ヒト及びマウスの気道炎症疾患及びアトピー性皮膚炎を含む様々な病理と関連することが示されている(Yingらの文献、2008)(Jariwalaらの文献、2011)。加えて、TSLPは、腸管免疫及び炎症の調節と関連することが示されている(Taylorらの文献、2009)。TSLPシグナル伝達経路は、分子レベルで、IL-7-誘導性シグナル伝達とは異なることが示されている(Rochmanらの文献、2010)。

30

【0008】

特定の実施態様において、本発明は、恐らくしかし独占的でなくADCC(抗体依存性細胞傷害)を介し、及び任意にCDC(補体依存性細胞傷害)を介した本抗体の細胞傷害作用の結果として、リンパ球垂集団、又は他のCD127を発現する細胞集団、特にヒトCD127を発現する細胞集団(正常及び病的Tリンパ球及びBリンパ球、NK細胞、樹状細胞及び上皮細胞を含む他の細胞型を含む)を枯渇するための、本明細書に定義された抗体の使用に関する。従って、本発明は、CD127陽性細胞の関与するドミナント寛容状態に加え、血液癌などの、悪性CD127-陽性細胞の破壊に繋がる、ヒト患者における免疫応答の変化に関与する病態の治療における、抗体の使用に関する。

40

【0009】

従って本発明は、これらの病理がCD127陽性細胞に関連した場合の、自己免疫疾患、移植片拒絶反応、アレルギー性疾患、呼吸性疾患、慢性ウイルス感染症、リンパ腫、白血病、

50

又は固形癌(例えば乳癌)から生じるものを含む他の癌疾患など(Ujiiらの文献、OncoImmunology 4:6, e1009285 ; 2015年6月に説明されたものなど)の、病理における使用に適した手段を提供する。ナイーブT細胞は、移植された臓器及び組織の急性拒絶の部分的な原因である。これらの細胞は、現在の免疫抑制薬(カルシニューリン阻害剤)によって、及び共刺激を遮断するモノクローナル抗体(抗接着、CD80/86阻害剤)によって制御することができる。メモリーT細胞も移植拒絶反応の原因である。メモリーT細胞は、獲得免疫歴、主にウイルスに対するかつての反応が原因でヒトに蓄積する。メモリーT細胞は、我々の抗ウイルス防御と同種抗原との交差反応である「異種免疫」の結果として同種抗原によって再活性化され得ることが示されている(Adamsらの文献、2003)。メモリーT細胞は、ナイーブT細胞とは対照的に、共刺激シグナルの必要性が低下して、素早く活性化するようにプログラムされているので、異種免疫は、寛容誘導に対する強力な障壁となる。メモリーT細胞は、慢性拒絶にも関与し得る。ナイーブT細胞及びメモリーT細胞は、臓器移植及び組織移植におけるそれらの役割の他に、多くの自己免疫疾患の共通の原因でもある。これは、潰瘍性大腸炎(Shinoharaらの文献、2011)、関節リウマチ、乾癬、又は移植片対宿主病の場合である。

10

【0010】

さらにいくつかの悪性細胞は、IL-7Rを提示することが示されている。これは、セザリール皮膚リンパ腫(そのうちの60%)、又は小児急性リンパ芽球性白血病の場合であり、小児急性リンパ芽球性白血病では、その症例の約15%がCD127の機能獲得型突然変異を発現し、これらの腫瘍を部分的にIL-7依存性の状態にする(Shochatらの文献、2011)。

20

【0011】

Tリンパ球の枯渇は、同種移植拒絶に対抗し又は自己免疫に抵抗するための明白な免疫抑制アプローチとなっている。しかしながら、全体的なT細胞枯渇は、免疫寛容の誘導に有利ではない場合がある。T細胞の亜集団又は選択的に活性化された(エフェクター)T細胞の標的化は、Treg細胞を修飾しなければ、免疫寛容促進アプローチとなり得る(Haudebourgらの文献、2009)。それゆえ、CD127は、免疫応答を調節することを目的としたモノクローナル抗体(Mab)の魅力的な潜在的治療標的と考えることができ、なぜなら、そのようなモノクローナル抗体ならば、エフェクターリンパ球を枯渇させる可能性を有し得るが、制御性リンパ球を枯渇させる可能性を有し得ないからである。従って、該モノクローナル抗体は、IL-7Rに対するIL-7の接近に拮抗し、それにより、T細胞及びB細胞の機能及び成長を制限することによって、移植、自己免疫(Michelらの文献、2008)、及び悪性腫瘍において効力を示す可能性があると考えられる。

30

【0012】

IL-7経路及びTSLP経路を妨害することのないCD127+細胞に対するモノクローナル抗体による治療ならば、ナイーブT細胞及びメモリーT細胞を除去/中和する一方で、Treg細胞を維持することによるか、又はCD127-陽性の悪性細胞を除去することによって、その目的を果たすことができる。

【0013】

これとの関連において、IL-7R に対するアンタゴニスト特性を有するIL-7R に対するモノクローナル抗体がWO2010/017468に開示されており、多発性硬化症のような自己免疫疾患を治療する目的で、そのヒト化バージョンがWO2011/094259に開示されている。記載されている抗体は、IL-7のその受容体への結合に対するアンタゴニストであり、かつIL-7のそのCD127受容体との相互作用を必要とすると言われていたT_H17細胞及びT_H1細胞の増殖及び生存に対して活性があるとされている。同様に、糖尿病、狼瘡、関節リウマチ、及び他の自己免疫疾患の治療での使用が企図されている、WO2011/104687又はWO2013/056984に報告された抗-CD127抗体は、それらの相互作用に対するそれらの可能性のある作用に関して論じられておらず、TSLP-誘導性シグナル伝達とのその相互作用は報告されていない。

40

【0014】

刊行物(Racapeらの文献、2009)において、著者らは、移植における潜在的治療標的とし

50

でのIL-7受容体の利益を解析した。様々なT細胞及びIL-7応答性細胞上でのIL-7Rの発現を再検討して、著者らは、IL-7Rを発現するメモリーT細胞を標的とすることにより、マウスにおける同種移植生存が延長され得るかどうかを決定し、IL-7又はIL-7Rを標的とすることにより、Treg細胞が有利に存続すると結論付けている。将来の展望の中で、著者らは、治療的処置においてIL-7又はIL-7Rのいずれかを標的とすることにより、CD127を発現する細胞の生存に対して異なる結果をもたらされる可能性があり、異なるタイプのリンパ球減少が誘発される可能性があることを指摘した。IL-7Rに対する抗体の効果は、それらがブロッキング抗体であるのか又は中和抗体であるのか又は細胞傷害性抗体であるのかによるという問題も概念的な観点から提起された。それにもかかわらず、著者らは、そのような抗体を取得し、そのような抗体をアッセイしたことを示すのではなく、むしろ、仮説の妥当性を評価するためのさらなる研究の必要性を表明した。免疫関連疾患及びIL-7/IL-7Rが関与する他の疾患、例えば、一部の乳癌を含む様々なタイプの癌における利用可能な治療アプローチの欠点を考慮すると、さらなる薬物候補、特に、ヒト患者の免疫活性化を制御する、例えば、調節することを目的とした、より選択的な標的に対して活性のある候補が依然として必要とされている。

10

【0015】

そのような抗体は、ファーストライン治療である放射線治療、化学療法、特に抗-CTLA4抗体又は抗-PDL1抗体又は抗-Sirp抗体などのチェックポイント阻害剤による免疫療法による、癌療法の併用アプローチにおいて有効である。

【0016】

本発明者らは、移植における寛容を誘導することが可能である、制御性T細胞を維持しながら、エフェクターT細胞を認識し且つ除去する能力を有し、且つ悪性のCD127+白血病細胞を除去する能力が示されている抗体を提供するというこの必要性を満たしている。

20

【0017】

国際公開公報WO2013056984は、リンパ球の亜集団又は他のCD127を発現している細胞集団を枯渇するために、アンタゴニスト活性及び細胞傷害活性を伴う、ヒトIL7-Rの鎖の細胞外ドメインに対する抗体を開示している。この開示されたMD707-3抗体は、本抗体を誘導するために役立つ、VH鎖及びVL鎖(表6の配列56及び57)を含む。MD707-3抗体は、IL7-Rのアンタゴニストであり、且つ特にIL7により誘導されたStat5のリン酸化を阻害する。対照的に、MD707-3から誘導された本発明のヒト化抗体は、驚くべきことに、IL7-Rアンタゴニストではなく、CD127の細胞外ドメインへの良好な結合を保持し、且つCD127を発現している細胞に対する細胞傷害作用を媒介する可能性がある。更にMD707-3抗体は、本明細書の図3.bに示したように、TSLPRアンタゴニストであるが、それから誘導されたヒト化抗体は、本明細書においてはEffi3と称されるが、これはアンタゴニストではない。

30

【発明の概要】

【0018】

本発明者らは、本発明の抗体の親であるMD707-3抗体によって本発明者らが認めたこととは対照的に、TSLP経路により妨害されない、IL-7Raに対するモノクローナル抗体を入手し、この状況に適した手段を提供する。MD707-3は、TSLPアンタゴニスト特性を示し、且つCD80及びCD86の細胞表面での発現により特徴付けられる樹状細胞成熟を増大した(データは示さず)。本発明の抗体は、枯渇作用を伴い、且つIL7経路もTSLP経路も拮抗も活性化もしない、CD127+細胞の標的化の治療的利益を評価するための新しい製品となる。

40

【0019】

従って本発明は、(i)IL-7の受容体の鎖(CD127と称される)の、特にヒトCD127陽性細胞により発現されたIL-7受容体の鎖の細胞外ドメインに特異的に結合し、且つ任意にCD127を発現しているヒトT細胞(CD127+細胞)に対する細胞傷害活性を示し、並びに(ii)IL7-R又はTSLP-Rアンタゴニストではなく、特にヒトIL-7又はヒトTSLPアンタゴニストではなく、且つ特にIL7により誘導されたSTAT5リン酸化を阻害せず、及び/又はTSLPによ

50

り刺激された血液誘導されたヒト樹状細胞によるTARC(胸腺及び活性化制御ケモカイン、CCL17とも称される)産生を阻害しない：抗体又はその抗原結合性断片に関する。

【発明を実施するための形態】

【0020】

表現「特異的に結合する」又は任意の同等語句は、CD127と相互作用し、且つCD127、好ましくはヒトCD127に結合するが、他の分子、特に他のタンパク質には結合しないか又は有意に弱い結合親和性で結合する、本発明の抗体又は抗原結合性断片の能力を指す。結合及び結合特異性は、SPR(表面プラズモン共鳴、例えばBiacore)、ELISA又はウェスタンブロット解析により、アッセイすることができる。特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合性断片又は該抗体もしくは抗原結合性断片を含むキメラ分子は、解離定数(Kd) 5E-10M未満で、特に3E-10M未満で、単離されたタンパク質としてのCD127を標的化し且つ結合する。

10

【0021】

各々開示された実施態様において特定されてはいないが、抗体及びその抗原結合性断片の定義された特性又は特徴、並びにこれらの抗体又はその抗原結合性断片を用いて製造された製品の定義された特性又は特徴は、例証された分子がヒト分子(CD127、IL-7、TSLP・・・・など)の場合、これらの分子に関して特に定義されている。

【0022】

本発明は、特に、以下を含む、Effi3と称される抗体の2種の変異体を提供する：

- Effi3-VH3又はVH3又はEffi3-VHvar3又はVHvar3と称される、重鎖可変ドメイン(表6の配列番号：2の配列、又はシグナルペプチドを含む配列番号：8の配列)であって、VH3-CDR1、VH3-CDR2、VH3-CDR3と称されるCDRを含むもの、又はEffi3-VH3、Effi3-VHvar3もしくはVHvar3の接頭辞を持つ同等の呼称；並びに

20

- Effi3-VH3VL3と称される変異体に関して、Effi3-VL3又はVH3又はEffi3-VLvar3又はVLvar3と称される軽鎖可変ドメイン(表6の配列番号：4の配列、又はシグナルペプチドを含む配列番号：10の配列)であって、VL3-CDR1、VL3-CDR2、VL3-CDR3と称されるCDRを含むもの、又はEffi3-VL3、Effi3-VLvar3もしくはVLvar3の接頭辞を持つ同等の呼称；あるいは

- Effi3-VH3VL4と称される変異体に関して、Effi3-VL4又はVH3又はEffi3-VLvar4又はVLvar4と称される軽鎖可変ドメイン(表6の配列番号：6の配列、又はシグナルペプチドを含む配列番号：12の配列)であって、VL4-CDR1、VL4-CDR2、VL4-CDR3と称されるCDRを含むもの、又はEffi3-VL4、Effi3-VLvar4もしくはVLvar4の接頭辞を持つ同等の呼称：のいずれか。

30

【0023】

VL-CDR2及びVL-CDR3は、VL3及びVL4軽鎖については同一であるので、これらは、それぞれ、無頓着にVL3-CDR2、VL4-CDR2又はVL3/4-CDR2及びVL3-CDR3、VL4-CDR3又はVL3/4-CDR3と称される。

【0024】

このEffi3抗体は、特に、重鎖及び軽鎖について、各々、定常ドメインIgG1m E333A(配列番号：28の配列)及びCL (配列番号：34の配列)を伴い提供される。本発明の抗体は、ヒト化されている。従って、本明細書に開示されたCDR配列における置換に加え、本発明の抗体は、それらのVH配列及び/又はVL配列のフレームワーク残基において、ラットMD707-3抗体に対するアミノ酸残基の置換により修飾されており、特にそのような残基は、天然のヒト抗体により密接に合致するように修飾されている。ヒト化は、公知の技術に従う、リサーフェンシングによるか、又はCDRグラフト化により、実行することができる。置換の例は、「実施例」セクションにおいて明らかにされている。リサーフェンシングは、特に齧歯類残基をヒトアミノ酸残基に置換することにより達成される。この置換は、当初の抗体のフレームワーク構造及び同じくCDR提示を維持する方式で実行され、これによりリサーフェンシングされた抗体におけるフレームワークとCDRの相互作用が、抗原と接触する表面の未変性の立体構造を維持し、抗原結合親和性を保持することが可能になる。

40

50

【 0 0 2 5 】

下記のCDR内の置換が、MD707-3ラット抗体(その配列は、重鎖について配列番号：56、及び軽鎖について配列番号：57として明らかにされており、これにより置換されたアミノ酸残基の位置に関する参照を提供する)に対して、本抗体において導入された：VH-CDR1におけるS30T及びVH-CDR2におけるE64D、これら2つの置換は、Effi3-VH3のCDRを規定し；VL-CDR2におけるL59R及びVL-CDR2におけるA60D、これら2つの置換は、Effi3-VL3のCDRを規定する。Effi3-VL3鎖の置換に加え、Effi4-VL4鎖のCDRは、VL-CDR1において追加のS28D置換を有する。

【 0 0 2 6 】

特に好ましい実施態様において、本抗体又はその抗原結合性断片は、以下を含むか又はこれらからなる：

- 特に表6の配列番号：2の配列として本明細書において開示されたVH3重鎖のCDRを伴う、各々、表6の配列番号：14、16及び18の配列を有するVH3-CDR1、VH3-CDR2及びVH3-CDR3を伴う、重鎖；並びに
- 各々、配列番号：4及び6の配列として本明細書において開示されたVL3軽鎖もしくはVL4軽鎖のCDRを伴う、特に各々、配列番号：20、22及び24の配列を有するVL3-CDR1、VL3-CDR2及びVL3-CDR3を伴うか、又は各々、配列番号：26、22及び24の配列を有するVL4-CDR1、VL3-CDR2及びVL3-CDR3を伴う、軽鎖。

【 0 0 2 7 】

特定の実施態様において、本抗体又は抗原結合性断片は、追加的に、VH-CDR3(重鎖のCDR3)において、V101T及び/又はV102Tの置換(複数可)を有する。

別の実施態様において、本抗体又は抗原結合性断片は、追加的に、VH-CDR3(重鎖のCDR3)において位置V101及び/又はV102に置換を有さないか、あるいはV101又はV102置換を有さない。

【 0 0 2 8 】

本発明の特定の実施態様において、ヒト化抗体は、MD707-3のVH配列及びVL配列に関して、それらの鎖のフレームワーク領域内のKabat付番体系に関して同定された位置に、1又は複数の下記の追加のアミノ酸残基置換が、それらのVH鎖及び/又はVL鎖内に存在することにより特徴付けられる(指定された残基は、置換から生じたものであり、MD707-3の当初のラット残基は、例えば、「実施例」の表1から4において明らかにされている)：

- VH配列において：位置3に残基Q、位置15に残基G、位置16に残基G、位置21に残基T、位置80に残基T、位置87に残基S、位置91に残基E、位置95に残基T、位置118に残基L、及び/又は
- VL配列において：位置7に残基S、位置9に残基S、位置11に残基L、位置12に残基P、位置18に残基P、位置47に残基Q、位置50に残基K、位置68に残基S、位置73に残基G、位置82に残基R、位置85に残基A、位置90に残基T。

【 0 0 2 9 】

本発明の抗体がVL-CDR1にS28D置換を有する(すなわち、配列番号：26の配列を伴うVL4のVL-CDR1を有する)特定の実施態様において、抗体は、少なくとも先に明らかにされたE73Gフレームワーク置換を有する。

【 0 0 3 0 】

特に好ましい実施態様において、本発明の抗体は、重鎖において先に明らかにされたフレームワーク残基置換の全てを有する。特に好ましい実施態様において、本発明の抗体は、軽鎖において先に明らかにされたフレームワーク残基置換の全てを有するか、又はE残基として保存される、位置73におけるG以外の、先に明らかにされたフレームワーク残基置換の全てを有する。特定の実施態様において、本抗体又はその抗原-断片は、配列番号：20の配列を持つVL3-CDR1を有し、且つ位置73において保存されたE残基を有する。

【 0 0 3 1 】

特に好ましい実施態様において、本発明の抗体は、下記を有する(又は本抗原結合断片は以下を含む)：

10

20

30

40

50

- VH3の配列、すなわち配列番号：2の配列を伴う、重鎖；並びに
- VL3の配列(配列番号：4の配列)又はVL4の配列(配列番号：6の配列)を伴う、軽鎖。

【0032】

いわゆる「ヒト化された位置」に関係するこれらの特徴は、本発明の抗体の定義のいずれか又は全ての実施態様と組合せることができる。

【0033】

本発明の特定の実施態様において、IL-7受容体に存在するCD127分子に対する本発明の抗体又はその抗原結合性断片は、更にヒト細胞に対する、特に該受容体を発現しているヒトT細胞に対する、及び好ましい実施態様において、腫瘍性T細胞に対する、細胞傷害特性を有する。

10

【0034】

本発明の特定の実施態様において、本抗体又はその抗原結合性断片は、これがTSLPの受容体としてTSLP-受容体(CCRF2としても公知；寄託番号AF338733)と組合せられる場合に、同じIL7-R鎖を標的化し且つ結合する(Reche P.A.らの文献、2001)。

【0035】

本発明の抗体の「抗原結合性断片」は、抗体の一部、すなわち、おそらくはその未変性形態で、ヒトIL-7のためのIL-7受容体の鎖に対する抗原結合能を示す、本発明の抗体の構造の一部に対応する分子であり；そのような断片は、特に、対応する4本鎖抗体の抗原結合特異性と比較して、該抗原に対する同じ又は実質的に同じ抗原結合特異性を示す。好都合なことに、該抗原結合性断片は、対応する4本鎖抗体と同様の結合親和性を有する。しかしながら、対応する4本鎖抗体に対して低下した抗原結合親和性を有する抗原結合性断片も本発明の範囲内に包含される。該抗原結合能は、抗体の親和性及び検討される断片の親和性を測定することによって決定することができる。これらの抗原結合性断片は、抗体の機能的断片と呼ぶこともできる。抗体の抗原結合性断片は、抗原(すなわち、ヒトIL-7のIL-7Ra)の認識部位を包含し、それにより、抗原認識特異性を規定する、CDR(相補性決定領域)と呼ばれるそれらの超可変ドメイン又はその部分(複数可)を含む断片である。4本鎖免疫グロブリンの各々の軽鎖及び重鎖(それぞれ、VL及びVH)は、それぞれ、VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3及びVH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3と呼ばれる、3つのCDRを有する。

20

【0036】

従って、本発明は、とりわけ、それぞれ、VL3又はVL4の及びVH3の、VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3及びVH-CDR1、VH-CDR2及びVH-CDR3の中のCDRの全てを含むか又はこれらかなる本発明の抗体の断片に関する。

30

【0037】

当業者は、基準付番体系(Martinの文献、2001、「抗体可変ドメインのタンパク質配列及び構造解析(Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains)」、Antibody Engineering Lab Manual、編集Duebel, S.及びKontermann, R.、Springer-Verlag、ハイデルベルグ)を含む、記載されているこの点に関する標準的な定義を参照することによるか、又はKabatの付番体系(「免疫学的関心のあるタンパク質の配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)」、第4版、米国立衛生研究所(NIH)、1987)を参照することによるか、又はIMGTの「真珠の首輪(collier de perle)」アルゴリズム(<http://www.imgt.org/IMGTindex/Colliers.html>)を適用することによって、抗体の様々な領域/ドメインの位置を決定することができるであろう。この点に関して、本発明の配列の定義については、領域/ドメインの境界が参照体系毎に異なり得るということに留意されたい。従って、本発明で定義される領域/ドメインは、長さにおいて±10%の変動を示す配列を包含し、且つ抗体の完全長配列内の考慮される配列の局在は、±10%だけ変動し得る。

40

【0038】

本発明の特定の実施態様において、ヒト化抗体又はその抗原結合性断片は、本明細書において定義されたCDR配列(すなわち、VH3の及びVL3又はVL4のCDR配列、恐らくVH-CD

50

R3において追加のV101T及び/又はV102T置換(複数可)を伴う)を有し、更にそのフレームワーク領域内に、Kabat付番に従い決定された位置で、下記のアミノ酸残基の1又は複数を含む：

- VH配列において：位置3に残基Q、位置15に残基G、位置16に残基G、位置21に残基T、位置80に残基T、位置87に残基S、位置91に残基E、位置95に残基T、位置118に残基L

、
- VL配列において：位置7に残基S、位置9に残基S、位置11に残基L、位置12に残基P、位置18に残基P、位置47に残基Q、位置50に残基K、位置68に残基S、位置73に残基Gもしくは残基E、特に残基E、位置82に残基R、位置85に残基A、位置90に残基T。

【0039】

抗体又はその抗原結合性断片のフレームワーク内の先に言及した残基の位置はまた、配列番号：56(VH)及び配列番号：57(VL)で開示された重鎖及び軽鎖のMD707可変ドメインの配列から検索することもできる。

【0040】

別の実施態様において、ヒト化抗体又はその抗原結合断片は、本明細書において定義されたCDR配列(すなわち、VH3の及びVL3又はVL4のCDR配列)を有し、更にそのフレームワーク領域内に、Kabat付番に従い決定された位置で、下記のアミノ酸残基の1又は複数、特にそれらの全てを含む：

- VH配列において：位置3に残基Q、位置15に残基G、位置16に残基G、位置21に残基T、位置80に残基T、位置87に残基S、位置91に残基E、位置95に残基T、位置118に残基L

、
- VL配列において：位置7に残基S、位置9に残基S、位置11に残基L、位置12に残基P、位置18に残基P、位置47に残基Q、位置50に残基K、位置68に残基S、位置73に残基Gもしくは残基E、特に残基E、位置82に残基R、位置85に残基A、位置90に残基T。

【0041】

ヒト化抗体又はその抗原結合性断片が位置28にD残基を含む(VL4-CDR1におけるように、VL-CDR1において)特定の実施態様において、該抗体又は断片は、位置73にG残基を含む(VLフレームワーク残基において)。

ヒト化抗体又はその抗原結合性断片が位置28にS残基を含む(VL3-CDR1におけるように、VL-CDR1において)特定の実施態様において、該抗体又は断片は、位置73にE残基を含む(VLフレームワーク残基において)。

【0042】

特に好ましい実施態様において、本抗体又はその抗原結合性断片は、その重鎖内の指定したフレームワーク位置に、先に指定した残基の全てを有する。特に好ましい実施態様において、本抗体又はその抗原結合性断片は、その軽鎖内の指定したフレームワーク位置に、先に指定した残基の全てを有するか、あるいは指定したフレームワーク位置に、先に指定した残基の全てを有するが、その軽鎖の位置73についてはE残基が認められる。

【0043】

4本鎖免疫グロブリンの構造に基づいて、フレームワーク及び定常ドメインの位置が、様々なクラスの抗体について、とりわけIgGについて、特に哺乳動物のIgGについて十分に定義されていることに留意しながら、抗原結合性断片を、利用可能なデータベース中の抗体の配列との比較及び従来技術(Martinの文献、2001)によって、特に、これらの配列における機能ドメインの位置の比較によって、定義することができる。そのような比較は、抗体の3次元構造に関するデータも含む。

【0044】

本発明の具体的な実施態様を説明する目的で、該抗体のCDRを含む可変ドメインを含有する抗体の抗原結合性断片は、Kabatの文献(NIH、1987)、Martin A.C.R.らの文献及び同じくRoitt I.らの文献(Fundamental and Applied Immunology MEDSI/McGraw-Hill)を参照することにより十分に定義される、Fv、dsFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')₂を包含している。Fv断片は、疎水性相互作用によって1つに会合した抗体のVLドメインとVH

10

20

30

40

50

ドメインからなり；dsFv断片において、VH：VLヘテロ二量体は、ジスルフィド結合によって安定化されており；scFv断片において、VLドメインとVHドメインは、可動性ペプチドリンカーを介して互いに接続され、それにより、1本鎖タンパク質を形成している。Fab断片は、抗体のパイン消化によって得られる単量体の断片であり；これらは、ジスルフィド結合を介して1つに結合されたL鎖全体とH鎖のVH-CH1断片とを含む。F(ab')₂断片は、ヒンジジスルフィドの下部での抗体のペプシン消化によって生じさせることができ；これは、2つのFab'断片、及びさらに免疫グロブリン分子のヒンジ領域の一部を含む。Fab'断片は、ヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することにより、F(ab')₂断片から得ることができる。F(ab')₂断片は二価である、すなわち、これらは、未変性の免疫グロブリン分子のように、2つの抗原結合部位を含み；他方、Fv(Fabの可変部分を構成するVHVL二量体)、dsFv、scFv、Fab、及びFab'断片は一価である、すなわち、これらは、単一の抗原結合部位を含む(総説については、Chan及びCarterの文献、2010を参照されたい)。

10

【0045】

従って本発明は、本明細書に開示され、且つ抗原認識に関して一価又は二価の断片である配列を包含している抗原結合性断片に関し、これらの断片は、下記である：

- 疎水性相互作用により一緒に会合された、VL鎖及びVH鎖からなるFv断片；
- VH：VLヘテロ二量体が、ジスルフィド結合によって安定化されている、dsFv断片；
- VL鎖及びVH鎖が、可動性ペプチドリンカーにより互いに接続され、その結果1本鎖タンパク質を形成している、scFv断片；
- ジスルフィド結合を介して一緒に結合された、全L鎖、及びH鎖のVH-CH1断片を含む単量体断片である、Fab断片；
- Fab'断片；
- 2個のFab'断片、及び追加的に抗体のヒンジ領域の一部を含む、F(ab')₂断片。

20

【0046】

本発明のこれらの基本的な抗原結合性断片を1つに組み合わせて、ダイアボディ、トリボディ、又はテトラボディなどの多価抗原結合性断片を得ることができる。これらの多価抗原結合性断片も本発明の一部である。

【0047】

治療用抗体を開発するために数名の研究者は、それらに必要とされる薬理活性により良く適する分子を作製することを可能にする抗体特性を最適化するために、Fc領域の操作を試みた(Strohlの文献、2009)。抗体のFc領域は、その血清半減期並びに補体依存性細胞傷害(CDC)、抗体依存性細胞傷害(ADCC)及び抗体依存性細胞貪食(ADCP)などの、エフェクター機能を媒介する。CH2ドメインとCH3ドメインの間の境界に位置したいくつかの突然変異、例えばT250Q/M428L(Hintonらの文献、2004)及びM252Y/S254T/T256E+H433K/N434F(Vaccaroらの文献、2005)などは、FcRnへの結合親和性及びIgG1のインピボ半減期を増大することが示されている。しかし、増大したFcRn結合と改善された半減期の間に直接の関係が、常に存在するわけではない(Datta-Mannanらの文献、2007)。治療用抗体の有効性を改善する一つのアプローチは、その血清中の持続を増大し、これにより、より高い循環レベル、より少ない投与頻度及び低下した投与量を可能にすることである。Fc領域の操作は、抗体のエフェクター機能の減少又は増大のいずれかのために望ましいことがある。細胞-表面分子を、特に免疫細胞上のものを標的化する抗体については、エフェクター機能の抑制が必要である。反対に、腫瘍学的用途が意図された抗体については、エフェクター機能の増大が、治療的活性を改善することがある。4種のヒトIgGアイソタイプは、活性化Fc受容体(FcRI、FcRIIa、FcRIIIa)、阻害性FcRIIb受容体、及び補体第一成分(C1q)へ、異なる親和性で結合し、非常に異なるエフェクター機能を生じる(Bruhnsらの文献、2009)。IgGのFcR又はC1qへの結合は、ヒンジ領域及びCH2ドメインに位置した残基によって左右される。CH2ドメインの2つの領域は、FcR及びC1q結合に重要であり、且つIgG2及びIgG4に独自の配列を有する(Armourらの文献、1999)(Shieldsらの文献、2001)(Idusogieらの文献、2000)(Steurerらの文献、1995)(Lazarらの文献、2006)(Ryanらの文献、2007)(Richardsらの文献、2008)(Labrijnらの

30

40

50

文献、2009)。

【0048】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、下記の定常ドメインを有する：
重鎖に関して、IgG1m-E333A定常ドメイン(表6の配列番号：28の配列)又はIgG4m-S228P(配列番号：30の配列)又はIgG2b(配列番号：32の配列)のドメイン；
軽鎖に関して、CL 定常ドメイン(配列番号：34の配列)又はCL (配列番号：36の配列)のドメイン。

【0049】

本発明の抗体、特にヒト化抗体は、モノクローナル抗体である。本発明の抗体及びその断片の標的である、IL-7受容体の鎖としてCD127を発現しているヒト細胞は、主にTリンパ球であり、且つより正確には、ナイーブT細胞及びメモリーT細胞を含むが、制御性T細胞ではない、特に休止期ナチュラルTregでない、エフェクターTリンパ球の亜集団である。メモリーT細胞は、抗原刺激の結果として生成され、且つ二次エフェクター細胞及びメモリー細胞への再活性化及び分化時に、増殖をリコールする能力を含む、それらの機能的特徴により主に定義される。

10

【0050】

本発明の実施態様に従い、「T細胞に対する細胞傷害活性」又は細胞傷害特性を有する抗体及びその抗原結合性断片(細胞傷害性抗体)は、これらの細胞を死滅させることによってエフェクターT細胞集団の枯渇を生じさせ、従って、投与したとき、これらの細胞の数を減少させる。これとは反対に、これらの抗体は、制御性T細胞の亜集団を改変しないか、又はそれを相当な程度にまでは改変せず、Treg細胞がその機能を果たすのを可能にする。

20

【0051】

本発明の特定の実施態様に従い、細胞傷害性抗体は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を示す。抗体のADCC能は、比細胞傷害性が5%を上回る場合に、陽性とみなされる。

【0052】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、E333A突然変異を伴う、ヒトIgG1の定常ドメイン、すなわち配列番号：28の配列(表6)を持つ重鎖を含む。特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号：34の配列である、ヒトIgG1のCL 定常ドメインを持つ軽鎖を含む。

30

【0053】

特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号：42の配列を持つ、Effi3_VH3_IgG1m(E333A)として本明細書において明らかにされた重鎖を有する。特定の実施態様において、本発明の抗体は、配列番号：50の配列を持つ、Effi3_VL3_CI として本明細書において明らかにされた軽鎖、又は配列番号：48の配列を持つ、Effi3_VL4_CI として本明細書において明らかにされた軽鎖を有する。

【0054】

ADCC特性は、実施例において説明された試験などの、ADCCアッセイにおいて、評価することができる。抗体がラット抗体である場合、ADCCアッセイにおいて使用されるエフェクター細胞は、ラットのLAK(リンホカイン-活性化キラー)細胞である。抗体がヒト化されている場合、ADCCアッセイは、ヒトNK細胞上で実行することができる。

40

【0055】

別の実施態様に従い、本発明のフレーム内の抗体又はその抗原結合性断片は、IL7のアンタゴニストではなく、及び/又はTSLPRのアンタゴニストでもない。「IL-7Rのアンタゴニスト」とは、本発明の抗体又はその抗原結合性断片は、IL-7R を標的化する場合に、その結合パートナーIL-7、特にヒトIL-7に関して、CD127細胞上、特にヒトエフェクターT細胞上、特にヒトメモリーT細胞上に発現されたIL-7受容体の接近可能性を妨害する作用を有する一方で、該抗体又はその断片は、IL7-R受容体によるシグナル伝達の引き金をひかないことを意味する。同じ定義を、TSLPRに結合し、このリガンドの結合を妨害し、且つそれら自身シグナル伝達の引き金を引かない、「TSLPRのアンタゴニスト」にも同様

50

に適用する。本発明の特定の実施態様に従い、本発明のフレーム内の抗体又はその抗原結合性断片は、「CD127のアンタゴニスト」ではなく、このことは、これがIL-7のアンタゴニストでもTSLPのアンタゴニストでもないことを意味する。この観点において、IL-7及びTSLPに関する非アンタゴニスト作用は、IL-7Rのアンタゴニストではない又はTSLPのアンタゴニスト性ではないという定義の特定の実施態様として、以下に提供される任意の実施態様と組合せて定義されてよい。IL-7受容体のアンタゴニストではないことの結果として、先行技術の抗体とは対照的に、本発明の抗体又はその機能性断片は、IL-7-依存性胸腺T細胞の生成の妨害に起因した強力なリンパ球減少症へと繋がらない。本発明の抗体又はそれらの機能性断片のアンタゴニスト特性の測定のための試験は、「実施例」において説明されている。特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合性断片は、CD127のアンタゴニストである。特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合性断片は、IL7-Rのアンタゴニストである。特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合性断片は、TSLPRのアンタゴニストである。

10

【0056】

特定の実施態様において、本抗体及びその抗原結合性断片は、投与された場合に、TSLP刺激した樹状細胞のTARC産生を減少しない。特定の実施態様において、TSLP-刺激樹状細胞におけるTARC産生は、特に「実施例」セクションにおいて明らかにされた条件下、濃度5 µg/mL以上の抗体の存在(又は抗原結合性断片の同等の濃度の存在)で、わずか20%、好ましくはわずか10%、及び更により好ましくはわずか5%だけ減少され、並びに/又は、濃度25 µg/mL以上の抗体の存在(又は抗原結合性断片の同等の濃度の存在)で、わずか80%、好ましくはわずか50%、より好ましくはわずか25%及び更により好ましくはわずか10%だけ減少される。

20

【0057】

特定の実施態様において、本抗体又はその抗原結合性断片は、IL-7により誘導されたIL7-RのSTAT-5シグナル伝達を阻害しない。特定の実施態様において、IL-7刺激された細胞におけるSTAT-5リン酸化は、特に「実施例」セクションにおいて明らかにされた条件下、濃度0.1 µg/mL以上で及び好ましくは濃度0.5 µg/mL以上の抗体の存在(又は抗原結合性断片の同等の濃度の存在)で、わずか30%だけ、好ましくはわずか25%だけ及び更により好ましくはわずか20%だけ減少されるか、並びに/又は、濃度1 µg/mL以上の抗体の存在(又は抗原結合性断片の同等の濃度の存在)で、わずか50%だけ、好ましくはわずか35%だけ、及び更により好ましくはわずか20%だけ減少されるか、並びに/又は、濃度5 µg/mL以上の又はより好ましくは濃度10 µg/mL以上の抗体の存在(又は抗原結合性断片の同等の濃度の存在)で、わずか90%だけ、好ましくはわずか70%だけ、より好ましくはわずか50%だけ、及び更により好ましくはわずか20%だけ減少される。

30

【0058】

IL7-受容体(又はTSLPR)の、特にCD127の細胞外ドメインに対する抗体は、IL7-R(又はTSLPR)のアゴニストとして働くことができ、すなわち、これらはこのリガンドの結合と競合する一方で、それらの結合は、リガンドの非存在下でのIL7-R(又はTSLPR)のシグナル伝達経路の全てもしくは一部の活性化、及び/又はリガンドの存在下の増大した活性化につながり得る。特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合性断片は、CD127のアゴニストではない。特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合性断片は、IL7-Rのアゴニストではない。特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合性断片は、TSLPRのアゴニストではない。特定の実施態様において、本発明の抗体又は抗原結合性断片は、IL-7経路のアゴニストでも、TSLPR経路のアゴニストでもない。

40

【0059】

特定の実施態様において、本抗体及びその抗原結合性断片は、投与された場合に、TSLP-刺激した樹状細胞のTARC産生を増大しない。特定の実施態様において、TSLP-刺激した樹状細胞におけるTARC産生は、特に「実施例」セクションに明らかにされた条件下、濃度0.2 µg/mL以上、好ましくは濃度1 µg/mL以上の抗体の存在で、及びより好ましくは25 µg/mL以上の存在(又は同等の濃度の抗原結合性断片の存在)で、わずか60%、より好ま

50

しくはわずか50%だけ増大される。特定の実施態様において、本発明の抗体及び抗原結合性断片は、TSLPの非存在下での細胞におけるTARC産生を誘導せず、特に前記濃度の抗体もしくは抗原結合性断片の存在下、並びに、TSLPの非存在下でのTARC産生は、TSLPの存在下及び該抗体又は抗原結合性断片の非存在下での産生の、35%以下、好ましくは20%以下、及びより好ましくは10%以下である。

【0060】

特定の実施態様において、本抗体又はその抗原結合性断片は、IL-7により誘導されたIL7-RのSTAT-5シグナル伝達を増大しない。特定の実施態様において、IL-7刺激した細胞におけるSTAT-5リン酸化は、特に「実施例」セクションに明らかにされた条件下、濃度0.1 µg/mL以上、好ましくは濃度1 µg/mL以上及び更により好ましくは濃度10 µg/mL以上の抗体の存在(又は同等の濃度の抗原結合性断片の存在)で、わずか20%、好ましくはわずか10%及び更により好ましくはわずか5%だけ増大される。特定の実施態様において、IL-7の非存在下及び前述の濃度の抗体又は抗原結合性断片の存在下での、STAT-5のリン酸化は、IL-7の存在下及び抗体(又は抗原-結合性断片)の存在下での、該リン酸化の20%以下、好ましくは10%以下及び更により好ましくは5%以下である。

10

【0061】

CD127陽性細胞に関する細胞傷害性及びアングニスト特性の両方を有する先行技術の抗体は、エフェクターT細胞、特にメモリーT細胞の枯渇に関するこれらの特性の蓄積効果を可能にし、特にこれにより、より強い枯渇(CD127+細胞のプールの消尽)並びに対応する標的T細胞の数の減少が可能になる。本発明の抗体は、CD127 T細胞のより少ない枯渇を誘導し、このことは一部の状況において有害作用となり得るリンパ球減少症を誘導しない。

20

【0062】

本発明はまた、本発明の抗体(及び断片)をコードしているポリヌクレオチドも提供する。そのようなポリヌクレオチドは、特に表6において明らかにされている。これらは、単離されたポリヌクレオチドとして提供されてよい。当業者は、遺伝暗号の縮重のために、明確に明らかにされたものとは異なるポリヌクレオチド配列が、同じアミノ酸配列をコードすることができ；そのようなポリヌクレオチド配列もまた、本発明に包含されることを認めるであろう。

【0063】

特定の実施態様において、本ポリヌクレオチドは、配列番号：13、15、17、19、21及び23の配列、あるいは配列番号：13、15、17、25、21及び23の配列を含み、特に配列番号：1及び3の配列又は配列番号：1及び5の配列を含む、特に配列番号：41及び47の配列又は配列番号：41及び49の配列を含む。

30

【0064】

特定の実施態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターに関する。このベクターは、ウイルスペクターなどの、細胞トランスフェクションに適したプラスミド、又は細胞の形質導入に適したベクターであってよい。

【0065】

本抗体又はその抗原結合性断片は、特に、DNA合成により得ることができる。特に、所望の抗体のcDNAを合成すること、及び好適なベクター内の該cDNAをクローニングすることが可能である。抗体(又は抗原結合性断片)の合成、クローニング及び発現は、当該技術分野において一般的であり且つ当業者に容易に入手可能である方法に従い、実行されてよい。

40

【0066】

本発明の抗体又はその抗原結合性断片は、特に、ヒトT細胞によって発現されるCD127である分子に対して好都合に作出され、場合により、未変性ポリペプチド又は組換え分子という形態での免疫から作出される。好ましくは、本抗体は、配列

【化1】

ESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLE

50

(表6の配列番号55)を伴うエピトープからなる又はこれを含むポリペプチドに対して作出される。

【0067】

免疫化は、下記「実施例」に明らかにされたプロトコールに従って実施することができ：組換えCD127 Fcキメラ(10975-H03H、Sino Biological社、北京、中国)を用いて、ラット、例えば、ベルギーのルーヴァン大学(University of Louvain)で入手可能なLOU/C IgkIA系統のラットを免疫化した。ハイブリドーマは、先に説明された手順(Chassouxらの文献、Immunology, 1988 65 623-628)に従って、脾臓単核細胞を、非分泌性かつアザグアニン耐性細胞株のLOUラット免疫細胞腫IR983Fと融合させることにより得られた。ハイブリドーマは最初に、組換えCD127分子(CD127 Fcキメラ；10975-H03H、Sino Biological社、北京、中国)に結合する分泌モノクローナル抗体の能力によってスクリーニングした。次にハイブリドーマを、ヒトT細胞によって発現されるCD127に結合するそのモノクローナル抗体の能力についてスクリーニングした。

10

【0068】

本発明による「ハイブリドーマ細胞」は、選択された免疫原で予め免疫化しておいた動物由来の抗体産生細胞(Bリンパ球)と、得られた融合細胞に不死性を提供することが可能な骨髓腫細胞である融合パートナーの融合から作製される細胞である。骨髓腫細胞及び抗体産生細胞(脾細胞などのB細胞)は、同じ起源のものであることができ、真核細胞、特に、同じ動物の哺乳動物細胞である。あるいは、これらは、異なる起源のものであり、そのため、ヘテロハイブリドーマを生じることができる。非分泌性かつアザグアニン耐性細胞株であるLOUラット免疫細胞腫IR983Fなどの骨髓腫細胞は、調製したハイブリドーマが所望の特異性のモノクローナル抗体のみを分泌することを可能にするために、免疫グロブリンを産生することができない細胞の中から選択される。ADCCを促進するのに好適な他の細胞、例えば、組換え細胞での発現による抗体の調製のための以下のページに記載されている細胞を、ラット免疫細胞腫の代わりに使用することができる。そのような細胞は、低いフコシル化能を有するか又はフコシル化能を全く有しない細胞であることが好都合である。本発明を実施するのに好適なハイブリドーマの調製は、従来法によって行われる。実施態様は、特定の開示された特徴を融合パートナーとして使用される他の細胞に適合させることができる本出願の「実施例」において詳細に記載されている。本発明において開示された特定のハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に従い、仏国微生物寄託機関(CNCM)(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes、パリ、仏国)に、2011年9月28日に、寄託番号I-4532で寄託されたMD707-3である。該ハイブリドーマは、ヒト化抗体Effi3を提供するように本発明に従い修飾されている、MD707-3と称されるラット抗体の産生が可能である。

20

30

【0069】

抗体の抗原結合性断片は、抗体から出発して、とりわけ、パパイン消化もしくはペプシン消化を含む、周知の技法による酵素消化を用いることによるか、又は任意の適当な切断法を用いることによって得ることができる。あるいは、これらは、該断片のアミノ酸配列をコードする核酸配列による組換えによって修飾された宿主細胞で発現させることができるか、又は合成、とりわけ、化学合成することができる。従って、本発明の抗体は、修飾抗体及び該抗体の抗原結合性断片を含め、古典的な遺伝子工学技法、例えば、Sambrookらの文献[「分子クローニング、実験マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、コールドスプリングハーバー、NY、(1989)、及び改訂版]に記載されている技法によって調製することもできる。

40

【0070】

本発明によれば、IL-7Raタンパク質への「結合」は、抗原-抗体型相互作用を指し、かつ抗体又はその抗原結合性断片の「特異的結合」特性を包含し、この特異的結合は、該抗体又は抗原結合性断片がIL-7Raタンパク質に結合する一方で、それらが他のタンパク質(例えば、共通のサイトカイン受容体 鎖)に結合しないか又はそれに顕著により弱い親和性で結合することを意味する。結合特異性及び結合は、「実施例」に明らかにされた試験に

50

従ってアッセイすることができ、特に、ELISA、又はウェスタンブロット解析によってアッセイすることができる。

【0071】

従って、本発明は、シグナルペプチドを包含するか又は包含しない、先に明らかにされたVHポリペプチド及びVLポリペプチドの型に関する。シグナルペプチドは、細胞内でポリペプチドを調製するときに必要な場合がある。

【0072】

治療用抗体の最も重大な特性は活性であるので、リサーフェシング及び脱免疫化時に提唱される置換は、抗体の親和性又は安定性に影響を及ぼさないことは重要である。ヒト化及びCDRグラフト(Jonesらの文献、1986)(Ewertらの文献、2003)、抗体の生物物理特性(Ewertらの文献、2003)、CDR-ループの高次構造(Chothia及びLeskの文献、1987)(Al-Lazikaniらの文献、1997)(Northらの文献、2011)、並びにフレームワーク(Vargas-Madrado及びPaz-Garciaの文献、2003)(Honeggerらの文献、2009)に関する大量の情報が、最近20年間に集められており、それらは、タンパク質モデリングにおける進歩(Desmetらの文献、2002)(Almagroらの文献、2014)と共に、結合親和性及び安定性を保持している抗体を予測しヒト化し且つ脱免疫化することを可能にする。しかし一般に、修飾された配列を持つ抗体の所望の特性を試験することは、依然必要とされている。抗体(又は抗原結合性断片)の特徴の試験は、本明細書において、特に「実施例」セクションにおいて明らかにされている。

【0073】

例えばEffi3_VH3VL3及びEffi3_VH3VL4に関して本明細書において明らかにされた具体的配列は、大規模にヒト化され、且つ更なるヒト化は、一般に必須とは考えられないが、当初のラット残基を回復するために一部の置換を復帰(reverting)することは、少なくともヒト化抗体が特にヒトでの投与のために求められる場合には、一般に有利であるとは考えられない。特定の実施態様において、この抗体は、ヒト化され及び/又は脱免疫化されている。特定の実施態様において、抗体又は抗原結合性断片は、ヒトにおける投与に適しており、且つ特に非-ヒト配列の存在に起因するヒトにおける有害な免疫反応を誘導しないか、又はそのような反応を臨床上許容できないレベルでは誘導しない。

【0074】

当業者は、もし何らかの特徴の改善が、表6に明らかにされた配列に対する変異体ドメインにおける置換により求められる場合、限定された数の置換のみが、そのような改善を提供する一方で、他の特徴を(該置換が、ラットMD707-3配列の当初のアミノ酸を回復する作用を有するかどうかにかかわらず)維持すると予想されることを知っている。従って、少数の変異体は、抗体の重要な特徴に関して、特にCD127の細胞外ドメインへの結合、任意にIL-7及び/又はTLSPとの競合、CD127、IL7-R及び/もしくはTSLPRに対するアンタゴニスト作用、任意にこれらの受容体に対するアゴニスト作用、STAT-5リン酸化及び/もしくはTARC産生に対する作用、並びに任意に細胞傷害性、特にADCC-媒介性作用に関して、試験されることが必要であり、且つ本明細書の方法及び当業者に公知の方法を用い、迅速に試験され得る。そのような変異体配列は、本発明に包含され、且つ特に以下を含み：

- VH3及びVL3又はVL4のCDR配列を有する、変異体であって、ここで該配列に対する置換は、フレームワーク残基に限定され、特にここで20%未満(又は25残基未満)、好ましくは10%未満(又は12残基未満)、より好ましくは5%未満(又は6残基未満)及び更により好ましくは3、2もしくは1フレームワーク残基(複数可)が、該配列に対して置換されているもの；

- VH3及びVL3又はVL4のCDRに対して、それらのCDRの各々において、わずか2及び好ましくはわずか1つの置換(複数可)を有する、変異体であって、好ましくはここで、少なくとも3、より好ましくは少なくとも4及び更により好ましくは5のCDRが、修飾されず(修飾されたCDRは、各々2以下の置換及び好ましくはただ1つの置換を有する)；そのような変異体は、先の好ましい制限により、任意に追加的に、フレームワーク残基中に置換を有す

10

20

30

40

50

るもの；

- VH-CDR3にV101T及び/又はV102T置換(複数可)を、並びに先の好ましい制限により、CDR及び/又はフレームワーク残基に任意に追加の置換を有する変異体；
- V101T又はV102T置換を有する変異体、並びに特にV101及びV102置換を有さない変異体；

ここで好ましい変異体は、VL-CDR1の位置28にS残基(すなわち、配列番号：20の配列を持つVL3のVL-CDR1を有する)、並びにVLフレームワーク配列の位置73にE残基(配列番号：4の配列を持つVL3を有するように)、又はVL-CDR1の位置28にD残基(すなわち、配列番号：26の配列を持つVL4のVL-CDR1を有する)並びにVLフレームワーク配列の位置73にG残基(配列番号：6の配列を持つVL4におけるように)のいずれかを有する。

10

【0075】

本発明はまた、本明細書に定義された抗体又はその断片を含むキメラ分子にも関し、ここで該キメラ分子は：

- 該抗体又は抗原結合性断片の抗原結合能を保持し、且つ抗原結合性抗体模倣物である、キメラタンパク質、特に人工タンパク質；又は
- 該分子へ、認識、結合、アンカリング、シグナル伝達の機能を集合的に提供する、複数の機能性ドメインを有する複合分子、特に、組換え分子に、特に融合タンパク質に関連して、(i)本明細書において定義した該抗体又は抗原結合性断片のscFv断片に由来するか又はそのようなscFv断片である、エクストドメイン、(ii)細胞膜へのアンカリングのための、膜貫通ドメイン、並びに(iii)少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、エンドドメイン；を含む、キメラ抗原受容体(CAR)：である。

20

【0076】

特定の実施態様において、本キメラ分子は、少なくとも2つ、有利には少なくとも3つのシグナル伝達ドメインを含むCAR分子であり、ここでシグナル伝達ドメインは、下記の特徴の少なくとも一つ：

- CD3 細胞質ドメインにより提供されるような、T細胞活性化の開始；
- T細胞媒介性細胞傷害性；
- T細胞活性化シグナルの増幅、又は4-1BB、CD28もしくはICOSもしくはOX40などの受容体から誘導された同時刺激エレメントにより提供されるような、該シグナルの同時刺激；

30

を集合的に可能にする。

【0077】

本発明はまた、本明細書に明らかにされた抗体又はその抗原結合性断片を含むか、もしくは本明細書に定義されたキメラ分子を含む、細胞にも関し、ここで該抗体又はその抗原結合性断片は、その細胞の表面でエクストドメインとして発現される。この細胞は有利なことに、T細胞、例えば患者の自家T細胞又は同種異系T細胞であってよい。

【0078】

このキメラ分子に包含されたシグナル伝達ドメインは、有利なことに、CD3 に、又はFc受容体 鎖に由来してよい。

【0079】

本発明はまた、CD127+ T細胞、特に腫瘍性CD127+ T細胞を標的化するために、模倣物又はCAR分子などの、これらのキメラ分子の使用にも関する。

40

【0080】

本発明はまた、以下の工程を含む、キメラ抗原受容体(CAR)の方法又は調製：

- a. 抗体又はその抗原結合性断片、特にscFv断片をコードしているポリヌクレオチドを提供する工程；
- b. 工程a)の該ポリヌクレオチドをそのC-末端で、膜貫通ドメイン、及び細胞、特にT細胞、より特定するとヒトT細胞へ、刺激シグナル(複数可)を提供するのに適した少なくとも1つの、特に2つの細胞内シグナル伝達ドメイン(複数可)を、N-からC-末端へコードしているポリヌクレオチドにより組換える工程；

50

c. 工程b)において得られた組換え分子を、細胞において、特にT細胞において、より特定するとヒトT細胞において、発現させる工程；

d. 任意にその特性のために生成されたキメラ抗原受容体を、ヒトCD127を発現している細胞と接触させた後、これを選択する工程；

にも関する。

【0081】

キメラ分子の中でも、本発明は、特に、抗原結合性抗体模倣物、すなわち、抗体の抗原結合能を模倣する抗原結合能を有する人工タンパク質も含む。そのようなタンパク質は、アフィチン及びアンチカリンを含む。アフィチンは、抗原に選択的に結合する能力を有する人工タンパク質である。これらは、古細菌ドメインに属する微生物であるスルホロブス・アシドカルダリウス(*Sulfolobus acidocaldarius*)で見出されたDNA結合タンパク質Sac7dに構造的に由来している。例えば、Sac7dの結合面の11個の残基の無作為置換に対応する変異体を作製することによって、Sac7dの結合表面のアミノ酸を無作為化することにより、アフィチンライブラリーを作製することができ、得られたタンパク質ライブラリーを次々とリボソームディスプレイに供して、親和性を、ペプチド、タンパク質、ウイルス、及び細菌などの様々な標的に対するものとする事ができる。アフィチンは抗体模倣物であり、バイオテクノロジーにおけるツールとして開発されているところである。これらは、様々な酵素の特異的阻害剤としても使用されている(Krehenbrinkらの文献、*J. mol. Biol.*, 383:5, 2008)。当業者は、当該技術分野で公知の方法、特に、特許出願WO2008068637号及び上に引用された刊行物に開示されている方法、特に、ファージディスプレイ及び/又はリボソームディスプレイライブラリーの作製、並びに本明細書に開示されている抗原を用いたそのスクリーニングを用いて、必要とされる結合特性を有するアフィチンを容易に開発することができる。アンチカリンは、タンパク質か又は小分子かのいずれかの抗原に結合することができる人工タンパク質である。これらは、天然結合タンパク質のファミリーであるヒトリポカリンに由来する抗体模倣物である。アンチカリンは、約8倍小さく、約180アミノ酸のサイズ及び約20kDaの質量を有する(Skerraの文献、*Febs J.*, 275:11, 2008)。特に、特異的結合特性を有するアンチカリンのスクリーニング及び選択を可能にするアンチカリンファージディスプレイライブラリーが作製されている。当業者は、当該技術分野で公知の、特に、EP特許EP1270725 B1号、米国特許US8536307 B2号(Schlehuber及びSkerraの文献、*Biophys. Chem.*, 96:2-3, 2002)、及び上に引用された刊行物に開示されている方法、特に、ファージディスプレイ及び/又はリボソームディスプレイライブラリーの作製、並びに本明細書に開示されている抗原を用いたそのスクリーニングを用いて、所要の結合特性を有するアフィチンを容易に開発することができる。アンチカリンとアフィチンはどちらも、細菌発現系を含むいくつかの発現系で産生することができる。従って、本発明は、アフィチン、アンチカリン、並びに特に、IL7及び/又はTSLPシグナル伝達経路に作用しない、CD127への結合に関して、本明細書に記載の抗体の特徴を有する他の同様の抗体模倣物を提供するものであり、これらは全て、本発明の巨大分子として企図されている。

【0082】

本発明はまた、配列番号：55の配列を有するポリペプチドに対し、非-ヒト動物、特に非-ヒト哺乳動物を免疫化する工程、並びに特に該免疫化した非-ヒト動物から得られる血清を収集し、該ポリペプチドに対する抗体を得る工程を含む、本発明の抗体の製造方法にも関する。

【0083】

本発明の抗体の製造方法の特定の実施態様において、追加の工程は、調製された抗体の特性を評価するために実行されてよい。工程は、特に以下の工程を互いに独立して実行することを含む：

a. 抗体、抗原結合性断片又はそのような抗体の模倣物の、CD127の細胞外ドメインへ、特に配列番号：55の配列を持つエピトープを含むか又はこれからなるポリペプチドへ結合する能力を(例えば、「サイトフルオロメトリーによるIL7R結合アッセイ」及び「ELISA

10

20

30

40

50

により評価された抗-h-CD127 MabのrCD127認識」と題する「実施例」セクションにおいて説明された方法に従い)試験する工程；

b. IL-7シグナル伝達経路に対する、抗体、抗原結合性断片又はそのような抗体の模倣物の作用を(例えば、「ホスホStat5活性アッセイ」と題する「実施例」セクションにおいて説明された方法に従い)試験する工程；

c. TSLPシグナル伝達経路に対する、抗体、抗原結合性断片又はそのような抗体の模倣物の作用を(例えば、「TARC分泌アッセイ」と題する「実施例」セクションにおいて説明された方法に従い)試験する工程；

d. 抗体、抗原結合性断片又はそのような抗体の模倣物の細胞傷害活性、特にADCC活性を(例えば、「抗体依存性細胞傷害」と題する「実施例」セクションにおいて説明された方法に従い)試験する工程。

10

【0084】

本発明の抗体又はその抗原結合性断片又は抗原結合性抗体模倣物の製造方法は更に、以下の特性の少なくとも1つを示す、CD127の細胞外ドメインへ特異的に結合する、抗体、抗原結合性断片又はそのような抗体の模倣物を選択する下記工程を含んでよい：

- これは、CD127のアンタゴニストではなく、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7が誘導したリン酸化を阻害しない；並びに/又は

- これは、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を阻害しない；並びに/又は

- これは、CD127のアゴニストではない；並びに/又は

- これは、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を増大しない；並びに/又は

- これは、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激された分泌を増大しない。

20

【0085】

本方法の特定の実施態様は、CD127の細胞外ドメインに特異的に結合するが、CD127のアンタゴニストではなく、並びにIL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を阻害せず、並びにTSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を阻害せず、並びにCD127のアゴニストではなく、並びに/又はIL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を増大せず、並びにTSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を増大しない、抗体又はその抗原結合性断片又は模倣物を提供する。別の本発明の目的は、本発明に従い、抗体又はその抗原結合性断片又はキメラ分子を、医薬ビヒクルと共に含有する医薬組成物であり、ここで該医薬組成物は任意に様々な活性成分を更に含む。

30

【0086】

本発明はまた、ヒト患者に投与されたときに、ヒトCD127陽性細胞の生存又は増殖、特に、ヒトCD127陽性エフェクター細胞、とりわけ、CD127+メモリーT細胞、とりわけ、CD127+及びCD8+の両方のメモリーT細胞、又はCD127+及びCD4+細胞の両方であるメモリーT細胞の生存又は増殖を制御するのに好適な製剤中に、活性成分として本明細書に提供される定義に従う抗体又はその抗原結合性断片又はキメラ分子又は細胞又はポリヌクレオチドを含有する組成物、もしくは医薬組成物にも関する。

40

【0087】

本発明の組成物は、特に、アレルギー又は自己免疫に関与する細胞に対する治療的免疫モジュレーター作用を有する追加の化合物を更に含んでよい。説明のために、関心対象の免疫モジュレーターは、T細胞を標的とする他のモノクローナル抗体、例えば、抗-CD3抗体、抗-ICOS抗体もしくは抗-CD28抗体、又は補助細胞を標的とする組換えタンパク質もしくは抗体、例えば、CTLA4Igもしくは抗-CD40抗体である。

【0088】

別の実施態様に従い、本発明の組成物は更に、治療的ワクチン(DNAワクチン、RNAワクチン又はペプチドワクチン)、免疫チェックポイントのブロッカー又はアクチベーター、又

50

は抗体-薬物複合体などの免疫複合体からなる群から選択される、本発明の状況において有用な免疫治療薬を含んでもよい。

【0089】

興味深い生物学的現象から効果的な治療薬までの癌ワクチンとなり得る免疫治療薬は、下記を含む：ナイーブT細胞の数及びレパトアを増大するためのT細胞増殖因子、樹状細胞(DC)の数を増大するための増殖因子、DC及び他の抗原提示細胞(APC)を活性化するためのアゴニスト、癌ワクチンを可能にし且つ増強するアジュバント、T細胞を活性化し且つ刺激するアゴニスト、T細胞チェックポイントブロックのインヒビター、免疫T細胞の増殖及び生存を増大するためのT細胞増殖因子、癌細胞及び免疫細胞-由来の免疫抑制性サイトカインを阻害、遮断、又は中和する物質。

10

【0090】

数多くの標的及び免疫チェックポイントのブロッカー又はアクチベーターは、当該技術分野において公知である。本発明の状況において、標的、特に有用である免疫チェックポイントのブロッカー又はアクチベーターの例は、抗-PDL1、抗-PD1、抗-CTLA4、抗-CD137、抗-Her2、抗-EGFR、抗-CD20、抗-CD19、抗-CD52、抗-CD-137、抗-CD2、抗-CD28、抗-CD40、HVEM、BTLA、CD160、TIGIT、TIM-1/3、LAG-3、2B4及びOX40である。

【0091】

従って本発明は、活性成分として：

- 本明細書に定義された、抗体又はその抗原結合性断片、キメラ分子、細胞、もしくはポリヌクレオチド、

20

- 化学療法薬、放射線治療薬、手術用薬剤、免疫治療薬、プロバイオティクス及び抗生物質の群から選択された、少なくとも1種の更なる治療薬：

を含む、組み合わせ治療手段であって、

ここで該活性成分が、個別治療、同時治療又は併用治療のために、特に組合せ使用又は逐次使用のために、製剤化される、組み合わせ治療手段に関する。

【0092】

本発明は、実施態様において、それを必要とするヒト患者への投与に適しており、且つ活性成分として：(i)本明細書に定義された、抗体又はその抗原結合性断片、キメラ分子、細胞又はポリヌクレオチド、並びに、(ii)追加の免疫治療薬、特に本明細書に定義されたCAR分子、又は細胞受容体もしくはCD19、CD20、CD52もしくはHer2などの抗原を標的化するCAR分子を生じるT細胞などの、T細胞に関与する免疫治療薬：を含有する、組み合わせ製品に関する。特定の実施態様において、使用される抗体は、IgG1抗体であり、且つ細胞傷害性物質として使用される。

30

【0093】

本発明は、それを必要としている患者における併用治療レジメン又は追加治療レジメンにおいて活性成分として使用するための、本明細書に定義又は例示されているような抗体もしくはその抗原結合性断片又はキメラ分子又は細胞又はポリヌクレオチドにも関する。

【0094】

本発明の抗体もしくはその抗原結合性断片又はキメラ分子又は細胞又はポリヌクレオチド、本明細書に定義された医薬組成物又は組成物は、特に、免疫応答によって、とりわけ、メモリーT細胞応答によって影響を受ける病理学的状態を治療するためのヒト患者における使用のために提案されている。従って、本発明者らは、抗体もしくはその抗原結合性断片、本発明によるキメラ分子、本明細書に定義される医薬組成物又は組成物を、自己免疫又はアレルギー疾患、特にアレルギー性皮膚障害、腸障害の治療に、又は移植片拒絶反応に、又は白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病(例えば、T-ALL)もしくはリンパ腫、例えばホジキンリンパ腫の治療、又は癌疾患、例えばCD127+細胞と関連する乳癌、腎臓癌、膀胱癌、肺癌、膵癌の治療に、又はT細胞皮膚リンパ腫、例えばセザリーリンパ腫の治療に、又はIL7-R/TSLP経路の獲得型突然変異を有する急性リンパ芽球様白血病、中皮腫の治療に使用することを提案した。

40

50

【0095】

CD127陽性細胞及び細胞傷害活性を標的化するそれらの特定の活性を考慮し、本発明の抗体又はその抗原結合性断片は、呼吸器系疾患、例えば喘息、嚢胞性線維症、好酸球性咳喘息、気管支炎、サルコイドーシス、肺線維症、鼻炎、静脈洞炎、慢性ウイルス感染、例えばHIV、乳頭腫ウイルス、肝炎ウイルスに起因した感染症など、アレルギー性疾患、例えばアレルギー喘息、アレルギー性鼻副鼻腔炎、アレルギー性結膜炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなど、リンパ腫もしくは白血病(例えば、プレ-B細胞性ALL)、並びにTh2型有害反応に関与する自己免疫疾患、例えば狼瘡、乾癬、シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎など、リウマチ性多発関節炎、1型糖尿病などにおける使用に、特に適している。

【0096】

本発明の組成物又は組み合わせ治療手段はまた、先に列記したものなどの、CD127+細胞に関与した疾患を呈している患者の治療における使用に適している。特に本発明の組成物又は組み合わせ治療手段は、CD127陽性腫瘍細胞を伴う癌、特に肺癌又は中皮腫におけるように、CD127+細胞が予後不良のマーカーを構成している癌を呈している患者の治療に適している。

【0097】

「治療」又は「治療的処置」とは、実施される投与工程が、IL-7経路及びTSLP経路と関連する、すなわち、CD127陽性細胞の増殖もしくは蓄積又はTSLPに対し反応する細胞の分化/成熟/増殖と関連する障害(複数可)に罹患している、それを必要としている動物又はヒト患者の臨床状態の改善をもたらすことを意味する。そのような治療は、これらの細胞の存在に関連する、すなわち、CD127陽性細胞の増殖及び/もしくは蓄積又はTSLPに反応する細胞の分化/成熟/増殖に関連する障害(複数可)と関連する症状を消失させ又は緩和することによって、動物又はヒト患者の臨床状態を改善することを目的とし、並びに/又は好ましい実施態様において、本発明の治療は健康を回復することを可能にする。

【0098】

本発明はまた、本明細書に定義された、抗-CD127抗体又はその抗原結合性断片又は抗原-結合性抗体模倣物の、診断試験、特に個別化医療に関する診断試験、より特定するとコンパニオン診断試験における使用に関する。

【0099】

本発明はまた、診断のインビトロ又はエクスピボ方法、特に個別化医療における、より特定するとコンパニオン診断における使用に適した診断方法にも関し、ここで本発明の抗-CD127抗体又はその抗原結合性断片又はその抗原結合性模倣物は、先に対象から得られた試料中のCD127+細胞の検出のために、及び任意にCD127の発現の定量的のために使用される。

【0100】

特定の実施態様において、本発明はまた、診断試験における使用、特に個別化医療における、又はコンパニオン診断試験における使用に適した医薬品の製造における、本発明の抗-CD127抗体又はその抗原結合性断片又はその抗原結合性模倣物の使用にも関する。

【0101】

本発明の別の態様において、本発明の抗-CD127抗体又はその抗原結合性断片又はその抗原結合性模倣物は、先に対象から得られた試料中のCD127+細胞の存在を決定する、インビトロ又はエクスピボの方法において使用される。

【0102】

特定の実施態様において、本方法は、本発明の抗-ヒトCD127抗体又はその抗原結合性断片又は抗原結合性抗体模倣物を使用し、該対象の生物学的試料中の、CD127の発現及び/又は発現のレベルをインビトロにおいて決定することを含む。

【0103】

別の実施態様において、本方法は、治療に対する対象の反応、特に癌と診断された対象の反応を予測するバイオマーカーとしてCD127の存在を決定することを決定することを含み、該方法は：

10

20

30

40

50

- 特に本発明の抗-CD127抗体又はその抗原結合性断片又はその抗原結合性抗体模倣物により、対象の腫瘍試料中のCD127の発現レベルを決定すること、並びに
 - このCD127の発現レベルを、無反応対象集団におけるCD127の発現レベルの代表値と比較すること：を含み、
 ここで対象の腫瘍試料中のより高いCD127の発現レベルは、該治療に反応する対象の指標である。

本方法に従う発現レベルの決定は、試料の細胞上のCD127分子を定量することを包含してよい。

【0104】

本発明のさらなる特徴及び特性は、以下の実施例及び図面から明白であろう。

10

【図面の簡単な説明】

【0105】

図の説明：

(図面の簡単な説明)

【図1】Facs及びELISAによるCD127へのEffi3結合アッセイ。Aは、Effi3染色の投与量反応にわたる、CD127陽性細胞の割合を示す。Bは、Effi3結合活性である。Aは、結合活性アッセイで、抗-CD127抗体は、サンドイッチELISAで試験した：MD707-3(星印(star t)ライン)、Effi3変異体VH3VL3(三角ライン)及びEffi3変異体VH3VL4(四角ライン)。

【図2】異なる温度での時間にわたる、ELISAによる安定性アッセイ：図面は、0日目(D0)から28日目までの、RT(三角ライン)、4 (四角ライン)、37 (十字ライン)、-80 (星印(stare)ライン)、又は3回解凍した-80 (バーライン)の、Effi3抗体の吸光度を示す。

20

【図3】IL7又はTSLP刺激後の、Effi3のCD127に対する結合の作用。Aは、IL-7誘導したpSTAT5+ Tリンパ球の、MD707-3 mAbに対する投与量反応性の阻害(黒塗り四角)、IL7-依存性P-STAT5に対するEffi3 mAbの作用なし(白ぬき四角)。Bは、抗-ヒトCD127抗体によるTSLP-誘導したTARC産生への作用。TSLPの15ng/ml及び異なる濃度の抗-ヒトCD127抗体と共に24時間培養されたヒト血液CD1C+樹状細胞の上清中のTARC産生のELISAによる定量：阻害の陽性対照としてMD707-3、Effi3又は抗-TSLP抗体。

【図4】異なる濃度及びエフェクター細胞と標的細胞の間の異なる比での、Effi3変異体、MD707-3のヒト化クローンの細胞傷害性試験。異なる比：(E:T = 30:1 ; 10:1及び3:1)での、⁵¹Cr-標識したLAL-T DND41(CD127+)ヒトT細胞性急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)細胞株に対する、Effi3 H3L3及びEffi3 H3L4のエフェクター(E)細胞としてのNKヒトとインキュベーション後の抗体-依存性細胞傷害(ADCC)。比細胞傷害の割合は、⁵¹Cr放出により決定した。

30

【図5】ヒトCD127アミノ酸配列：太字のアミノ酸は、Effi3抗体により認識される線状エピトープ配列である。

【図6】IgG1mアイソタイプを伴うEffi3 VH3のアミノ酸(aa)配列：灰色のaa：シグナルペプチド；太字の斜体のaa：CDR1、CDR2及びCDR3；下線付きaa：IgG1m定常領域；縦長の太字(taller bold)のaa：ヒト化aa。

【図7】アミノ酸(CL 定常領域を伴うEffi3 VL4のaa配列：灰色のaa：シグナルペプチド；太字の斜体のaa：CDR1、CDR2及びCDR3；下線付きaa：CL 定常領域；細長の太字のaa：ヒト化aa。

40

【実施例】

【0106】

(実施例 / 材料及び方法 / 結果)

(ヒト化)

MD707-3クローンは、先に説明したインシリコ法における脱免疫化及びリサーフェシングにより、ヒト化した。

【0107】

抗体MD707-3は、軽鎖(表6の配列番号：57の配列)及び重鎖(表6の配列番号：56の配列)からなる。MD707-3のドメイン成分の分析は、これは、恐らく完全長IgG1抗体由来の、

50

Fvであることを示した。これらの可変ドメインを、単離し、且つKabatのCDR定義及び付番により注釈を付けた。MD707-3可変ドメインを、ヒト生殖系列と比較する配列アラインメントを作製した。全体の配列同一性を基に、境界位置及び同様にクラス化されたCDR基準位置を合致させ、生殖系列ファミリーを、各鎖について同定した。MD707-3は、軽鎖生殖系列KK2-A3及び重鎖VH3-3-73に類似していることがわかった。親の構造モデル及び脱免疫化された配列を、構築した。

【 0 1 0 8 】

表1. リサーフェシング残基

【 表 1 】

鎖	領域	置換	説明
L	FR1	A7S	セリンへのアラニンの保存的置換は、最も近いヒト生殖系列に一致した位置をもたらす。
L	FR1	L9S	突出しているロイシンのセリンへのリサーフェシング。ロイシンはこの位置に生じるが、これは置換され得る完全に露出された疎水性残基である。
L	FR1	V11L	位置11でのロイシンへのバリンの置換は、位置12及び18を含む、FR1の大きいリサーフェシング及びリシェーピングの一部である。3つの置換は、表面を、最も近いヒト生殖系列の表面に似るように変更する。位置12でのセリンのプロリンへと組み合わせさせた、バリンのロイシンへのリサーフェシング。
L	FR1	S12P	位置11でのバリンのロイシンへのものと組み合わせさせた、セリンのプロリンへのリサーフェシング。
L	FR1	S18P	セリンのプロリンへのリサーフェシング。
L	L2	L59R	ロイシン及びアルギニンの両方が、その位置で可能である。しかし最も類似しているヒト生殖系列は全て、アルギニンを有する。この位置はCDR L2内にあるので、例えばこれが結合に関与しないと、ロイシンは第一のリサーフェシングされた鎖内に維持された。アルギニンは第二のリサーフェシングされた鎖内で評価された。
L	FR3	R68S	突出している外来アルギニンのセリンへのリサーフェシング。
L	FR3	K82R	アルギニンへのリジンの保存的置換は、最も近いヒト生殖系列に一致した位置をもたらす。
L	FR3	T85A	アルギニンへのトレオニンの保存的置換は、最も近いヒト生殖系列に一致した位置をもたらす。
H	FR1	H3Q	ヒスチジンは、外来残基であり、グルタミンにリサーフェシングされる。
H	FR1	K15G	アルギニンへの外来の突出しているリジンのリサーフェシング。電荷中和のための位置16でのグルタミン酸と協調した置換。
H	FR1	E16G	グリシンへの外来の突出しているグルタミン酸のリサーフェシング。電荷中和のための位置15でのリジンと協調した置換。
H	H2	E64D	アスパラギン酸へのグルタミン酸の保存的置換は、最も近いヒト生殖系列に一致した位置をもたらす。
H	FR3	M80T	露出した疎水性メチオニンのトレオニンへのリサーフェシング。
H	FR3	N87S	アスパラギンのセリンへのリサーフェシング。
H	FR3	D91E	グルタミン酸へのアスパラギン酸の保存的置換は、最も近いヒト生殖系列に一致した位置をもたらす。
H	FR3	M95V	表面露出したメチオニンのバリンへのリサーフェシング。トレオニンも、この位置に頻繁に認められる。しかし最も近いヒト生殖系列は、バリンを含む。
H	FR4	M118L	露出した疎水性メチオニンのロイシンへのリサーフェシング。この位置はロイシン又はメチオニンでなければならず、且つロイシンは酸化することができない。
リサーフェシング置換は、この特異的状況を基に指定されており、且つ一部の他の配列状況において実行される場合、異なる作用を有することがある。			

10

20

30

40

【 0 1 0 9 】

50

表2. 脱免疫化置換

【表2】

鎖	領域	置換	説明
L	L1	S28D	アスパラギン酸への置換は、2つのでたらめなエピトープを完全に除去する。このCDR置換は、予測された免疫原性の低下時のその有効性に起因し、企図される。この位置は、おそらく結合境界の外側である。ここでの電荷の導入は、位置73の空間的に密接な電荷の喪失の代わりとなる。L.E. 73G。
L	FR2	K47Q	リジンのグルタミンへの脱免疫化置換で、これは8つのHLA-DRB1アロタイプに関する結合を除去する。置換Q50Kが行われた場合、置換は、保持された電荷中和を維持する。
L	FR2	Q50K	リジンへのグルタミンの脱免疫化置換で、これは予測された免疫原性の低下には効果がないが、VKドメインの下側半分に位置した電荷クラスター中の予想される残基セットに一致したドメインをもたらす。電荷の導入は、位置47でのリサーフェンシング置換により補償される。
L	L2	A60D	位置60は、ループの底であり、結合境界から離れている。アスパラギン酸は、この位置で許容することができ、且つ予測される免疫原性の低下に有効である。
L	FR3	E73G	位置73は、ヒト抗体においては通常グリシンであり、且つCDRに密接している。グルタミン酸は、リサーフェンシング及び脱免疫化の両方の理由で、除去されなければならない。しかしCDRへの近接のために、この置換は、空間的に近い位置28の電荷の再導入と一緒にのみ実行される。この置換は、4つのでたらめなエピトープを除去する。
L	FR3	V90T	溶媒に曝露されたバリンのトレオニンへの脱免疫化置換。置換は、7つのHLA-DRB1アロタイプへの結合を除去する。
H	FR1	S21T	FR1での脱免疫化置換であって、これは9つのHLA-DRB1アロタイプへの結合を除去する。
H	FR1	S30T	この位置は、結合境界に近い。しかし位置及び方向が与えられるならば、これは、評価されるべきセリンのトレオニンへの保存的脱免疫化置換に直面する。この置換は、共通のDRB1 03:01アロタイプを含む、4つのHLA-DRB1アロタイプへの結合を除去する。
H	FR3	M95T	メチオニンからトレオニンへの置換は、バリンと比べ、予測される免疫原性の低下により有効であり、追加の19のHLA-DRB1アロタイプへの結合を除去する。
H	H3	V101T	位置101及び102での置換は、FR3とH3から広がるエピトープクラスターの除去を目的としている。この置換は、26のHLA-DRB1アロタイプへの結合の除去と共に、予想される免疫原性の低下に有効である。慎重な構造解析は、その類似のベータ分枝側鎖を持つトレオニンへの置換は、容認できることを指摘した。
H	H3	V102T	容認できる有効な脱免疫化置換。
脱免疫化置換は、リサーフェンシングされた配列を基に設計され、且つ一部の他の配列状況において実行される場合、異なる作用を有することがある。			

10

20

30

40

【0110】

合計4つのリサーフェンシング/脱免疫化された軽鎖及び4つのリサーフェンシング/脱免疫化された重鎖が、提唱されている。15種の変異体が設計され、且つインビトロにおいて発現され且つ特徴付けられることが推奨されている。

【0111】

表3. VH/VL境界への保存された位置

50

【表 3】

ドメイン	位置
VL	34, 36, 38, 43, 44, 46, 87, 88, 89, 91, 96, 98
VH	35b*, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95 100-100k**, 101, 103
全ての位置は、Kabat付番に従う。 * 位置36までの位置1のN-末端の付番は、CDR H1の長さによって左右される。 ** 位置101までの位置1のN-末端の付番は、CDR H3の長さによって異なる。	

【0112】

10

表4. CDR基準クラスを決定する位置

【表 4】

CDR	重要な残基
L1	2, 25, 27b, 27c, 28, 33, 71
L2	34
L3	90, 94, 95, 97
H1	24, 26, 29, 35a**, 94
H2	54, 55, 71
全ての位置は、Kabat付番に従う。 * 位置36までの位置2のN-末端の付番は、CDR H1の長さによって左右される。	

20

【0113】

(抗-ヒトCD127 Mabのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列)

Effi3クローンのVH領域及びVL領域を、RACE PCR技術を用いてシーケンシングした。簡潔に述べると、全RNAを抽出し、逆転写し、得られたcDNAを、dATP及びターミナルトランスフェラーゼ酵素を用いて、分子の3'末端でポリアデニル化させた。1回目の35サイクルのPCR反応は、オリゴdTアンカープライマー及びHerculease酵素(Stratagene社)を用いて行った。2回目の35サイクルのPCRは、ネステッドPCRアンカープライマーを用いて行った。その後、得られたPCR産物を大腸菌(E. Coli)内でTAクローニングし、アンピシリンで選択した後、得られたコロニーを制限酵素プロファイリングによってスクリーニングし、挿入されたcDNAをシーケンシングした。

30

【0114】

ヒト化したEffi3変異体は、pFuse-CHiGプラスミド又はpFuse-CLiGプラスミドへクローニングした。

【0115】

(pFuseCHiG-hG1e4発現プラスミドにおけるVH Effi3のヒト化突然変異の配列のクローニング)

pFuseCHiG-hG1e4発現プラスミド(Invivogen社)は、ヒトIgG1のCH1 + ヒンジ + CH2 + CH3定常ドメインを含み、これは、ADCC及びCDC細胞傷害作用を改善するように修飾された。開始するために、ヒト化MD707変異体のWT、VH3及びVH4(最もヒト化された抗体)の配列のみを、Genscriptにより合成し、EcoRV 5'及び3'末端(extremities)並びにATGの前に追加のKozak配列(GCCACC)を持つクローニングベクター(pUC57)内に挿入し、本発明者らに送付し(凍結乾燥された4 µg)、かつ20 µl H₂O中に再懸濁させた。各プラスミドを、EcoRV制限酵素により消化し、挿入断片VH(400bp)を抽出した。

40

【0116】

精製した挿入断片を、EcoRV中で開環され且つ脱リン酸化された発現プラスミドであるpFuseCHiG-hG1e4発現プラスミドにライゲーションさせた。ヒト定常ドメインの前に右方向にVH断片が挿入された陽性クローンを、トランスフェクション工程のために、Midipre

50

p-エンドトキシンプリー(Macherey-Nagel社)により、増幅及び精製した。

【0117】

(pFuseCLlg-hk発現プラスミドにおけるVL Effi3のヒト化突然変異の配列のクローニング)

pFuseCLlg-hk発現プラスミド(Invivogen社)は、ヒトIgG1のCL 定常ドメインを含んだ。開始するために、ヒト化MD707変異体VLwt、VL3及びVL4の配列のみを、Genscriptにより合成し、BsiWI 5'及び3'末端並びにATGの前に追加のKozak配列(GCCACC)を持つクローニングベクター(pUC57)内に挿入し、本発明者らに送付し(凍結乾燥された4 µg)、かつ20 µl H₂O中に再懸濁させた。各プラスミドを、BsiWI制限酵素により消化し、挿入断片VL(400bp)を抽出した。精製した挿入断片を、BsiWI中で開環され且つ脱リン酸化された発現プラスミドであるpFuseCLlg-hk発現プラスミドにライゲーションさせた。ヒト定常ドメインの前に右方向にVL断片が挿入された陽性クローンを、トランスフェクション工程のために、Midiprep-エンドトキシンプリー(Macherey-Nagel社)により、増幅及び精製した。

10

【0118】

(哺乳動物細胞におけるヒト化Effi3(VH3又はVH4及びVL3又はVL4)変異体の同時-トランスフェクション)

トランスフェクションの前日: COSを、完全培地(DMEM SVF10% (Hyclone社) + PS 1% + Glu 1%)の入ったP12プレート中に、100000個細胞/ウェルで播種し、37 °C、5%CO₂でインキュベーションした。

20

【0119】

トランスフェクション当日: COS細胞は、集密度50~90%でなければならない。これらを、PBSで洗浄し、完全培地500 µl中で維持した。VH変異体0.6 µg + VL変異体0.4 µgを、OptiMEM培地200 µl中で混合し、Plus Reagent(Invitrogen社)1 µlを添加した(室温で15分間インキュベーション)。3.5 µlのリポフェクタミンLTX(Invitrogen社) + 100 µlを、この混合物に添加し、室温で25分間インキュベーションした。全混合物を、COS細胞上に滴下することにより、液滴を沈着させ、37 °C、5%CO₂で48時間インキュベーションした。48時間後、上清を収集し、遠心分離した(1500rpm、10分間、4 °C)。サンドイッチELISAのために、ロバ抗-ヒトIgG(Fc特異性)抗体を、P96-プレート上に1.2 µg/mlでコーティングし、上清の希釈物を添加し、標準範囲に応じて濃度を測定した。インキュベーション及び洗浄後、マウス抗-ヒト軽鎖(特異的) + ペルオキシダーゼ-標識した抗-マウス抗体を添加し、従来法により顕示させた。活性ELISAアッセイのために、組換えhCD127(Sino Biologicals社、北京、中国; 照会番号10975-H08H)を、プラスチック上に1 µg/mlで固定し、上清の希釈物を添加し、結合を測定した。インキュベーション及び洗浄後、マウス抗-ヒト軽鎖(特異的) + ペルオキシダーゼ-標識した抗-マウス抗体を添加し、従来法により顕示させた。トランスフェクションの陽性対照として、ウェルを、1 µg DN Aを含むGFP-pcDNA3.1(1 µg/µl)によりトランスフェクションした。全ての上清を収集する前に、このGFP-ウェルの蛍光顕微鏡による視覚対照が、陽性であることをチェックした。古典的に、本発明者らは、およそ10%のCOS細胞でトランスフェクションされた細胞及び25%のCHO細胞でトランスフェクションされた細胞を得た。2つの実験は、COS細胞上でを行い、最後の1つはCHO細胞(Plus Reagent非含有)上で行った。

30

40

【0120】

(ヒト化変異体によるトランスフェクションの上清中に分泌されたEffi3変異体の特徴決定)

同時-トランスフェクションの各上清中の、分泌されたMD707-3(VH + VL)の濃度を、ヒトIvlgG標準に応じて、サンドイッチELISAアッセイ(抗-hFc抗体 / 抗-h 抗体)により測定した。各同時-トランスフェクションにおけるMD707-3のCD127への結合を、活性ELISAアッセイ(CD127Fc組換えタンパク質 / 抗-h 抗体)により決定し、精製したキメラMD707-3標準の活性と比較した。プラスミドVH又はVLのみを伴う陰性対照は、抗-CD127活性を有さなかった。

50

【0121】

結果は、軽鎖について、VLvar3及びVLvar4は、VLwtと比較して、結合活性の修飾を誘導しなかったことを示した(データは示さず)。それにもかかわらず、重鎖に関しては、VHvar4(最もヒト化)は、CD127タンパク質へのEffi7hの結合を修飾し、その理由はこの鎖によるED50活性は、他の鎖VHvar3又はVHwtによるものよりもはるかに良くないからであった。VHvar3突然変異は、受容体へのその結合を修飾しなかった。

【0122】

最後に、最もヒト化された(VHvar4 + VLvar4)の組合せは、その結合活性を完全に喪失した。それにもかかわらず、その結合活性を維持している最もヒト化された配列は、VHvar3 + VLvar3であった。

【0123】

これら2種の保持されたEffi3変異体である、それらの結合活性を維持している最もヒト化された配列は、下記である：

・VHvar3 + VLvar3、配列番号：2の配列及び配列番号：4の配列(又は、シグナル配列を伴う、配列番号：8及び10の配列)。この抗体は、本明細書においてVH3VL3と称される。

・VHvar3 + VLvar4、配列番号：2の配列及び配列番号：6の配列(又は、シグナル配列を伴う、配列番号：8及び12の配列)。この抗体は、本明細書においてVH3VL4と称される。

【0124】

(サイトフルオロメトリーによるIL7R結合アッセイ)

ヒトPBMCへの抗-IL7Rの結合を測定するために、抗体を、ヒトPBMCと一緒に、4 で30分間インキュベーションし、洗浄し、その後、APC-標識した抗-CD3(クローンHIT3a、BD Bioscience社、照会番号555342)に加え、Effi7抗体とは交差反応しないPE-標識した抗-CD127(クローンhIL7R-M21、BD Bioscience社、照会番号557938)により4 で30分間染色した。試料を分析し、BD LSRIIサイトフルオロメーター上でCD3+細胞をゲートした。

【0125】

(ELISAにより評価した抗-h-CD127 MabのrCD127認識)

抗hCD127抗体の結合活性を、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)により評価した。ELISAアッセイのために、組換えhCD127(Sino Biologicals社、北京、中国；照会番号10975-H08H)を、プラスチック上に1 µg/mlで固定し、精製した抗体を添加し、結合を測定した。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ-標識マウス抗-ラット 鎖(AbdSerotec社)を添加し、従来法により顕示させた。

【0126】

図1Bに示したように、Effi3抗体のELISAにより測定した結合活性は高く、Effi3 H3L4及びEffi3 H3L3抗-hCD127抗体についてED50 = 4ng/mL、及びMD707-3キメラ抗体についてED50 = 3.4ng/mlであった。

【0127】

(安定性アッセイ)

ヒト化Effi3抗体(クローンVH3VL4)を、4 、37 、-80 又は室温で、28日間インキュベーションした。結合活性を、ELISAアッセイにより試験し、組換えhCD127(Sino Biologicals社、北京、中国；照会番号10975-H08H)を、プラスチック上に1 µg/mlで固定し、上清の希釈物を添加して、結合を測定した。インキュベーション及び洗浄の後、マウス抗ヒト軽鎖(特異的)+ペルオキシダーゼ標識ロバ抗マウス抗体を添加し、従来法により顕示させた。増加する投与量のMabを添加し、結合を測定した。インキュベーション及び洗浄後、ペルオキシダーゼ-標識マウス抗-ラット 鎖(AbdSerotec社)を添加し、従来法により顕示させた。

図1Bの結果は、精製したEffi3は、長期間、及び様々な温度で貯蔵した後、安定していることを示している。

【0128】

(ホスホStat5活性アッセイ)

10

20

30

40

50

健康志願者由来のフィコール勾配により収集したヒト末梢血単核細胞(PBMC)を、異なる濃度の関心対象の抗体を含む血清-非含有培地において、室温で15分間インキュベーションし、その後0.1又は5ng/mlの組換えヒトIL-7(rhIL-7; AbD Serotec社、照合番号PHP 046)と共に、37℃で15分間インキュベーションした。rhIL-7で未処理のPBMCを、バックグラウンドシグナルとして分析し、他方抗体を含まないIL-7処理細胞を、陰性対照として設定した。その後PBMCを、急速冷却し、FACS緩衝液で洗浄し、反応を停止した。次に細胞を、冷Cytotfix / Cytoperm溶液(BD Bioscience社、照合番号554722)と共に15分間インキュベーションし、Perm/Wash緩衝液(Bd Bioscience社)により2回洗浄し、抗-ヒトCD3 FITC抗体(Bd Bioscience社、照合番号557694)により氷上で30分間染色した。その後PBMCを、Perm/Wash緩衝液により2回洗浄し、BD Perm緩衝液III(Bd Bioscience社、照合番号558050)中で30分間透過性上昇させた。次に細胞を、FACS緩衝液(及び/又は1%BSA及び0.1%アジドを含むPBS)中で2回洗浄し、抗-ヒトpSTAT5 Alexa 647抗体(BD Bioscience社、照合番号612599)と共に、室温で30分間インキュベーションした。試料を、BD CANTO II FACS装置上で分析した。図3Aに示したように、MD707-3抗体から誘導されたEffi3抗体(変異体VH3VL4)は、親抗体MD707-3と比べ、STAT5リン酸化の阻害活性を有さなかった。

10

【0129】

(TARC分泌アッセイ)

骨髄樹状細胞(DC)を、健康志願者の血液から、CD1c(BDCA-1)+樹状細胞単離キット(Miltenyi Biotec社、ベルギッシュ・グラートバッハ、独国)により単離した(Etablissement Francais du Sang、ナント、仏国)。骨髄樹状細胞を、10%牛胎仔血清、1%ピルビン酸、1%Hepes、1%L-グルタミン及び1%ペニシリン-ストレプトマイシンを含有するRPMIにおいて培養した。細胞を、平底-96-ウェルプレート中、TSLP(15ng/ml)、LPS(1µg/ml)の存在下又は培養培地のみで、5.104個細胞/ウェルで播種し、異なるヒトCD127抗体(MD707-3、Effi3-VH3VL4)又は抗-TSLP抗体を異なる濃度で添加した。24時間培養した時点で、上清を収集し、ELISAアッセイ(R&D systems社、ミネアポリス、米国)により、TARC産生について分析した。

20

【0130】

TARCのTSLP-誘導した産生の阻害は、抗体の非存在下又はMD707-3もしくはEffi3もしくは市販の抗-TSLPR抗体(R&Dsystems社、照合番号AF981)の0.2、1、5もしくは25µg/mlでの存在下で、該産生を先に説明したように測定することにより、評価した。図3Bに示したように、Effi3は、その親抗体MD707-3及び陽性対照抗-TSLP抗体と比べ、TSLP-誘導したTARC産生をもはや阻害しなかった。

30

【0131】

(抗体依存性細胞傷害(ADCC))

抗-ヒトCD127 MabのADCCであるADCCとは、標的細胞上に発現するエピトープに対する抗体の結合、並びにその後の、主にグランザイム/パーフォリン系機構による標的細胞の死滅をもたらす、Fc受容体を発現するエフェクター免疫細胞(本質的にNK細胞及び活性化リンパ球)のFc依存性動員を指す。

【0132】

その当初の(ラット)フォーマットでの抗体の使用に関して、エフェクター細胞は、組織培養フラスコ(Corning Glass Works社、コーニング、NY)中で、1000 UI/mlのIL-2(Roch社、バーゼル、スイス)と共に培養された脾細胞により生成されたラットリンホカイン-活性化キラー(LAK)細胞であった。

40

【0133】

抗体がヒト化された場合、エフェクター細胞は、磁気ビーズ(NK単離キット、Miltenyi Biotec社、ベルギッシュ・グラートバッハ、独国)を使用し、AutoMACS細胞選別装置を用いた陰性選択によって末梢血単核細胞から単離された新鮮な初代ヒトNK細胞であった。NK細胞は、10%FBS(Life Technologies社)、100IU/mlペニシリン(Life Technologies社)、0.1mg/mlストレプトマイシン(Life Technologies社)、2mM L-グルタミン(Life

50

Technologies社)及び150IU/mlヒトIL-2(Roche社、バーゼル、スイス)が補充されたRPMI 1640培地(Life Technologies社、カールスバッド、CA)中、5%CO₂、37℃で一晩インキュベートした。

【0134】

標的細胞は、100µCi(3.7MBq)の⁵¹Cr(PerkinElmer社)により、37℃で1時間標識し、培養培地で3回洗浄した。標的細胞を、希釈した抗体又は添加剤(excipient)(培養培地)と共に、室温で15分間インキュベーションし、10000個細胞を、96-ウェルU底プレートに配置した。エフェクターT細胞を、37℃で4時間のインキュベーション期間、指定されたE:T(エフェクター:標的)細胞比(最終容積:200µl)で添加した。次に合計25µlの上清を回収し、ガンマカウンター(Packard Instrument社)でカウントした。比細胞傷害の割合を、⁵¹Cr放出により決定した。

10

【0135】

図4に示された結果は、Effi3 H3L4及びH3L3変異体抗体は、投与量依存様式で、ADCCを誘導したことを示している。

【0136】

(ペプチドマイクロアレイを用いた抗体プロファイリング)

Peptide Technologies PepStar(商標)ペプチドマイクロアレイは、ガラス表面に化学選択的かつ共有結合的に固定されている、抗原又は他の給源に由来する精製合成ペプチドを含む。立体障害によって生じる偽陰性を回避するために、最適化された親水性リンカー部分がガラス表面と抗原因由来ペプチド配列の間に挿入されている。技術的な理由で、全てのペプチドがC-末端グリシンを含む。試料のプロファイリング実験を52種のペプチドからなるペプチドライブラリーに対して行った。ペプチドの完全なリストを下に示す：

20

【0137】

表5. ペプチドマイクロアレイアッセイにおいて使用したペプチドのリスト

【表5】

配列番号	配列	配列番号	配列	配列番号	配列
58	ESGYAQNGDLEDAEL	76	FIETKKFLLIGKSNI	94	HDVAYRQEKDENKWT
59	AQNGDLEDAELDDYS	77	KKFLLIGKSNICVKV	95	YRQEKDENKWTHTVNL
60	DLEDAELDDYSFSCY	78	LIGKSNICVKVGEKS	96	KDENKWTHTVNLSSSTK
61	AELDDYSFSCYSQLE	79	SNICVKVGEKSLTCK	97	KWTHVNLSSSTKLTL
62	DYSFSCYSQLEVNGS	80	VKVGEKSLTCKKIDL	98	VNLSSSTKLTLQRKL
63	SCYSQLEVNGSQHSL	81	EKSLTCKKIDLTIV	99	STKLTLQRKLQPAA
64	QLEVNGSQHSLTCAF	82	TCKKIDLTIVKPEA	100	TLLQRKLQPAAMYEI
65	NGSQHSLTCAFEDPD	83	IDLTIVKPEAPFDL	101	RKLQPAAMYEIKVRS
66	HSLTCAFEDPDVNTT	84	TIVKPEAPFDLSVIY	102	PAAMYEIKVRSIPDH
67	CAFEDPDVNTTNLEF	85	PEAPFDLSVIYREGA	103	YEIKVRSIPDHYFKG
68	DPDVNTTNLEFEICG	86	FDLSVIYREGANDFV	104	VRSIPDHYFKGFWSE
69	NTTNLEFEICGALVE	87	VIYREGANDFVTFN	105	PDHYFKGFWSEWSPS
70	LEFEICGALVEVKCL	88	EGANDFVTFNTSHL	106	FKGFWSEWSPSYFR
71	ICGALVEVKCLNFRK	89	DFVTFNTSHLQKKY	107	WSEWSPSYFRTPEI
72	LVEVKCLNFRKLQEI	90	TFNTSHLQKKYVKVL	108	SPSYFRTPEINNSS
73	KCLNFRKLQEIYFIE	91	SHLQKKYVKVLMHDV	109	YFRTPEINNSSGEMD
74	FRKLQEIYFIETKKF	92	KKYVKVLMHDVAYRQ		
75	QEIYFIETKKFLLIG	93	KVLMHDVAYRQEKDE		

30

40

【0138】

合計9つの試料を、マルチウェルフォーマットを用いて、マイクロアレイスライド上でインキュベーションした。N13B2抗体及び他の試料について、4つの異なる濃度を適用した(10、1、0.1及び0.01µg/ml)。1つの陰性対照インキュベーション(二次抗体のみ)を並

50

行して実施した。アッセイ対照としての役割を果たすために、ヒト及びマウスIgGタンパク質を各ペプチドセットと並べて共固定した。全てのインキュベーションを2つのスライドを用いて並行して実施した。蛍光標識検出抗体のみを適用してペプチドに対する偽陽性結合を評価することにより、各スライド上の2つのペプチドミニアレイを対照インキュベーションとして用いた。スライドを洗浄し、乾燥させた後、それらを635nmで高解像度レーザーสキャナーでスキャンして、蛍光強度の画像を取得した。これらの画像を定量して、各ペプチドの平均ピクセル値を得た。二次抗体の抗ラットIgG(JIR 212-175-082)は、1 µg/mlのCy5で標識した。緩衝液及び溶液。使用した緩衝液は、0.05% Tween20(JPT)を含むTBS-緩衝液とアッセイ緩衝液T20(Pierce社、SuperBlock TBS T20、#37536)とであった。獲得及び解析は、ペプチドマイクロアレイ(JPT Peptide Technologies社、ベルリン、独国；バッチ#2668)、マルチウェルインキュベーションチャンバー、Axon Genepix Scanner 4200AL、スポット認識ソフトウェアGenePix、及びMicrosoft Excelを用いて行った。

10

【 0 1 3 9 】

図5に提示した結果は、CD127上のEffi3抗体により認識される線状エピトープの配列を示している。

【 0 1 4 0 】

下記表(表6)は、本明細書に説明された配列を明らかにしている。「Nb」は、各配列の配列番号を表し；「Type」はDNA配列又はアミノ酸配列(PRT)のいずれかの配列の特徴を表し、並びに「len」は、配列の長さを表す。

20

【表 6】

Nb	名称	Type	配列	Len
1	Effi3 VHvar3	DNA	GCTGTGCAGCTGGTCAATCTGGGGGGGGCTGGTCCAGCCCGCGGGTCTCTGAAAATCACTTGCGCCGCTAGTGGGTT CACCTTTACAACGCAGCCATGACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGGATCAGAACA AAGGCTAACAACTACGCAACTTACTATGCCGACTCAGTGAAGGGCAGGTTACCATTAGCCCGACGATAGCAAATCCA CAGTCTACCTGCAGATGGACTCTGTGAAGACAGAAGATACTGCCACCTACTATTGTATTGTGGTCTGCTGACTACTACAC GGGATTACTTTGACTATTGGGGACAGGGAGTCTGGTGACAGTGAGTTCA	369
2	Effi3 VHvar3_aa	PRT	AVQLVESGGGLVQPGGSLKITCAASGFTFTNAAMYVWRQAPGKLEWVARIRTKANNYATYYADSVKGRFTISRDDSKSTV YLQMDSVKTEDTATYYCIVVLTITRDYFDYWGQGVLVTVSS	123
3	Effi3 VLvar3	DNA	GACATCGTCTGACTCAGTCCCCCTCTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCAG TCACTGCTGACTGTCAAGGGAATTACCAGCCTGACTGTTCTCTGCAGAAGCCCGCCAGTCCCCTAAACTGCTGATCTAT CGGATGTCTAACAGAGACAGTGGGGTCCCGATAGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTTACACTGAAAATTT CTCGCGTGGAGGCTGAAGATGTCGGAACCTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAATACCCTCACACTTCGGGGCAGGCACT AAGCTGGAGCTGAAGCGT	339
4	Effi3 VLvar3_aa	PRT	DIVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQLLTVKGITSLYWFLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDRFSGSGSEDTFLKISRVEAED VGTYYCAQFLEYPHTFGAGTKLELR	113

30

40

50

Nb	名称	Type	配列	Len
5	Effi3-VLvar4	DNA	GACATCGTGCTGACACAGAGTCCCTCCCTCCCTGCCAGTACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCCA GGACCTGCTGACTGTCAAGGGCATTACCTCACTGACTGTTCTGCGAGAACCCGGGAGAGCCCTAAACTGCTGATCT ATCGGATGTCTAACAGAGACAGTGGAGTGCCTGATAGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACCGACTTACACTGAAAT TTCTCGCTGGAGGCTGAAGATGTCGGCACCTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAGTATCCCCACACCTTTGGAGCAGGCAC TAAGCTGGAGCTGAAGCGT	339
6	Effi3-VLvar4_aa	PRT	DIVLTQSPSSLVPTVPGEPASISCRSSQDLLTVKGITSLYWFLLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDRFSGSGSDFTLTKISRVEAE DVGTYYCAQFLEYPHTFGAGTKLELKR	113
7	Effi3 VHvar3 (+シグナルペプチド)	DNA	ATGCTGGTCTGCACTGGGCTCTGCTACCGCTCTGTTTCAGGGGTCATTGTGCTGTCAGCTGGTGAATCTGGGGGG GGGCTGGTCCAGCCCGCGGGTCTGAAATCACTTGCAGGCTAGTGGGTTCCACCTTACAAACGACGACATGACTG GGTCCGACAGGCTCTGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGGATCAGAACAAAGGCTAACAACTACGCAACTACTACT GCCGACTCAGTGAAGGGCAGGTTCCACATTAGCCGCGACGATAGCAAATCCACAGTCTACTCGCAGATGGACTCTGTGA AGACAGAAAGATACTGCCACCTACTATTGTTGTTGCTGCTGACTACTACACGGGATTACTTTGACTATTGGGGACAG GGAGTCTGGTACAGTGAAGTCA	423
8	Effi3 VHvar3_aa (+シグナルペプチド)	PRT	MLVLQWVLTALFQGVHCAVQLVESGGGLVQPGGSLKITCAASGFTFTNAAMYWVRQAPKGLEWVARIRTKANNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKSTVYLQMDSVKTEDTATYYCIVVLLTTRDYFDYWGQGVLVTVSS	141
9	Effi3 VLvar3 (+シグナルペプチド)	DNA	ATGAAGTTTCTGCTCAGTTCTGGGCTGATTGTGCTGTGATTCTGCGGCTACCCGAGACATCGTCTGACTCAGTCCC CCTCTCCCTGCCAGTGACACTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCAGGACCTGCTGACTGTCAAGGG ATTACCAGCTGTACTGTTCTGCGAGAAGCCCGCCAGTCCCCTAAACTGCTGATCTATCGGATGTCTAACAGAGACAG TGGGGTCCCGATAGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTACACTGAAATTTCTCGCTGGAGGCTGAAGATG TCGGAACCTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAATACCTCACACTTTCCGGGCGAGCCTAAAGCTGGAGCTGAAGCGT	399
10	Effi3 VLvar3_aa (+シグナルペプチド)	PRT	MKFPAQFLGLIVLCPGATGDIVLTQSPSSLVPTVPGEPASISCRSSQDLLTVKGITSLYWFLLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDR FSGSGSEDTFLTKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHTFGAGTKLELKR	133
11	Effi3-VLvar4 (+シグナルペプチド)	DNA	ATGAAGTTCCCTGCTCAGTTCTGGGCTGATTGTGCTGTCATTCTGGGGCAACCCGCGACATCGTCTGACACAGAGT CCCTCTCCCTGCCAGTGACACTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCAGGACCTGCTGACTGTCAAGGG CATTACCTCACTGTACTGGTCTCAGAGAAGCCCGGGCAGAGCCCTAAACTGCTGATCTATCGGATGTCTAACAGAGACA GTGGAGTCCCGATAGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTACACTGAAATTTCTCGCTGGAGGCTGAAGAT GTGCGCACCTACTATTGCGCACAGTTTCTGGAGTATCCCCACACTTTGGAGCAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAGCGT	399
12	Effi3-VLvar4_aa (+シグナルペプチド)	PRT	MKFPAQFLGLIVLCPGATGDIVLTQSPSSLVPTVPGEPASISCRSSQDLLTVKGITSLYWFLLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDR FSGSGSEDTFLTKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHTFGAGTKLELKR	133
13	Effi3 VHvar3_CDR1	DNA	TTCACCTTACAAACGACGACCATGTAC	27
14	Effi3 VHvar3_CDR1_aa	PRT	FIFTNAAMY	9
15	Effi3 VHvar3_CDR2	DNA	CGGATCAGAACAAAGGCTAACAACTACGCAACTACTATGCCGACTCAGTGAAGGGC	57
16	Effi3 VHvar3_CDR2_aa	PRT	RIRTKANNYATYYADSVKG	19
17	Effi3 VHvar3_CDR3	DNA	GTCGTGCTGACTACTACACGGGATTACTTTGACTAT	36
18	Effi3 VHvar3_CDR3_aa	PRT	VVLTTRDYFDY	12
19	Effi3 VLvar3_CDR1	DNA	CGAAGCTCCAGTCACTGCTGACTGTCAAGGGAATTACCAGCTGTAC	48
20	Effi3 VLvar3-CDR1_aa	PRT	RSSQSLTVKGITSLY	16
21	Effi3 VLvar3/4_CDR2	DNA	CGGATGTCTAACAGAGACAGT	21
22	Effi3 VLvar3/4_CDR2aa	PRT	RMSNRDS	7
23	Effi3 VLvar3/4_CDR3	DNA	GCACAGTTTCTGGAATACCTCACACT	27
24	Effi3 VLvar3/4_CDR3aa	PRT	AQFLEYPHT	9
25	Effi3-VLvar4_CDR1	DNA	CGAAGCTCCAGGACCTGCTGACTGTCAAGGGCATTACCTCACTGTAC	48
26	Effi3-VLvar4_CDR1_aa	PRT	RSSQSLTVKGITSLY	16
27	IgG1m (E333A)	DNA	GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAAGACACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTCCCGAACCCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCACCCTGACAGCGGCTGACACCTTCC CGGCTGCTCAGTCTCAGGACTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCCCAGCAGCTGGGACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTGTGACAAAAC CACATGCCACCCTGCCAGCACTGAACCTCTGGGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCTGTTGTTGAGCTGAGCCAGAACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAATATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGT AGCGTCTCACCGTCTGCACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTTCCAAACAAAGCCCTCCAG CCCCATCGCGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTACCGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTATCCAGCGACATCCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGACGCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGCTCCTTCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCA TACACGAGAAAGAGCCTCTCCCTGCTCCGGGTAATGA	993
28	IgG1m (E333A)_aa	PRT	ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSDKHTHTPCPPAPELGGPSVFLPFPKPKDMLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHLEALHNHYTQKLSLSLSPGK	330

10

20

30

40

50

Nb	名称	Type	配列	Len
46	Effi3_VH3_IgG2b_aa	PRT	MLVLQWVVLVTFALFQGVHCAVQLVESGGGLVQPGGSLKITCAASGFTFTNAAMYVVRQAPGKLEWVARIKTKANNYATYY ADSVKGRFTISRDDSKSTVYVQMDSVKTEDTATYVICVVLVLTTRDYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTA ALGCLKVDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVSVVTPSSNFGTQTYTCNVHDHKPSNTKVDKTVERRKCCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTV VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTSIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPMLDSDGSFQSLYKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	467
47	Effi3_VL4_Cl kappa	DNA	ATGAAGTTCCTGCTCAGTTCTGGGGCTGATTGCTGTGCATTCTGGGGCAACCGCGACATCGTGTGACACAGAGT CCCTCTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCAGGACTGTGACTGTCAAGGG CATTACCTCACTGACTGTTCTCGCAGAAGCCCGGGCAGAGCCCTAACTGCTGATCTATCGGATGTCTAACAGAGACA GTGGAGTGCCCGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGGAACCGACTTACACTGAAAATTTCTCGCGTGGAGGCTGAAGAT GTCGGCACCTACTATTGCGCACAGTTCTGGAGTATCCCCACACCTTTGGAGCAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAGCGTAC GGTGGCTGCACCATCTGTTCTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATCGCTCTGTTGTGTGCTGCTG AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTTGATAACGCCCTCAATCGGTAACCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTGCCCGTACAAAAGAGCTCAACAGGGGAGAGTGTTA G	720
48	Effi3_VL4_Cl kappa_aa	PRT	MKFPAQFLGLIVLIPGATGDIVLTQSPSLPVTGPEPASISCRSSQDLLTVKGITSLYWFLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDR FSGSGSETDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHFTFAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTSTYLSSTLTLTKADYEHKHYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	239
49	Effi3_VL3_Cl kappa	DNA	ATGAAGTTCCTGCTCAGTTCTGGGGCTGATTGCTGTGATTCTGGCGCTACCGGAGACATCGTCTGACTCAGTCCC CCTCTTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCAGTCACTGCTGACTGTCAAGGGA ATTACACGCTGTACTGTTCTCGCAGAAGCCCGGGCAGTCCCCTAACTGCTGATCTATCGGATGTCTAACAGAGACAG TGGGGTGCCGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTACACTGAAAATTTCTCGCGTGGAGGCTGAAGATG TCGGAACCTACTATTGCGCACAGTTCTGGAATACCTCACACTTTCGGGGCAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAGCGTACG GTGGCTGCACCATCTGTTCTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATCGCTCTGTTGTGTGCTGCTGA ATAACCTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTTGATAACGCCCTCAATCGGTAACCCAGGAGAGTG TACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC ACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTGCCCGTACAAAAGAGCTCAACAGGGGAGAGTGTTA G	720
50	Effi3_VL3_Cl kappa_aa	PRT	MKFPAQFLGLIVLIPGATGDIVLTQSPSLPVTGPEPASISCRSSQDLLTVKGITSLYWFLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDR FSGSGSETDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHFTFAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDTSTYLSSTLTLTKADYEHKHYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	239
51	Effi3_VL4_Cl lambda	DNA	ATGAAGTTCCTGCTCAGTTCTGGGGCTGATTGCTGTGATTCTGGCGCTACCGGAGACATCGTCTGACTCAGTCCC CCTCTTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCAGGACTGTGACTGTCAAGGGA ATTACACGCTGTACTGTTCTCGCAGAAGCCCGGGCAGTCCCCTAACTGCTGATCTATCGGATGTCTAACAGAGACAG TGGGGTGCCGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTACACTGAAAATTTCTCGCGTGGAGGCTGAAGATG TCGGAACCTACTATTGCGCACAGTTCTGGAATACCTCACACTTTCGGGGCAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAGCGTGGT CAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACCTGTTCCCGCCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCAACAAGGCCACACTGGTGTG TCTATAAGTGACTTCTACCGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGGCGGAGTGGAG ACCACCACACCTCCAAACAAGCAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGT CCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGTACGATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGCAGTGGCCCTACAGAATGTTTCAT AG	720
52	Effi3_VL4_Cl lambda_aa	PRT	MKFPAQFLGLIVLIPGATGDIVLTQSPSLPVTGPEPASISCRSSQDLLTVKGITSLYWFLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDR FSGSGSETDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHFTFAGTKLELKRQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	239
53	Effi3_VL3_Cl lambda	DNA	ATGAAGTTCCTGCTCAGTTCTGGGGCTGATTGCTGTGATTCTGGCGCTACCGGAGACATCGTCTGACTCAGTCCC CCTCTTCCCTGCCAGTGACACCTGGAGAGCCAGCATCTATCAGTTGCCGAAGCTCCAGTCACTGCTGACTGTCAAGGGA ATTACACGCTGTACTGTTCTCGCAGAAGCCCGGGCAGTCCCCTAACTGCTGATCTATCGGATGTCTAACAGAGACAG TGGGGTGCCGATAGGTTCTCAGGCAGCGGGTCCGAAACCGACTTACACTGAAAATTTCTCGCGTGGAGGCTGAAGATG TCGGAACCTACTATTGCGCACAGTTCTGGAATACCTCACACTTTCGGGGCAGGCACTAAGCTGGAGCTGAAGCGTGGT CAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACCTGTTCCCGCCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCAACAAGGCCACACTGGTGTG TCTATAAGTGACTTCTACCGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGGCGGAGTGGAG ACCACCACACCTCCAAACAAGCAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGT CCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGTACGATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGCAGTGGCCCTACAGAATGTTTCAT AG	720
54	Effi3_VL3_Cl lambda_aa	PRT	MKFPAQFLGLIVLIPGATGDIVLTQSPSLPVTGPEPASISCRSSQDLLTVKGITSLYWFLQKPGQSPKLLIYRMSNRDSGVPDR FSGSGSETDFTLKISRVEAEDVGTYYCAQFLEYPHFTFAGTKLELKRQPKAAPSVTLPFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	239
55	CD127 ペプチド	PRT	ESGYAQNGLEDAELDDYSFSCYSQLE	27
56	MD707-3 VH	PRT	AVHLVESGGGLVQPKESLKISCAASGFTFSNAAMYVVRQAPGKLEWVARIKTKANNYATYYAESVKGRFTISRDDSKSMYV LQMDNVKTDDTAMYYCIVVLLTTRDYFDYWGQVMMTVSS	123
57	MD707-3 VL	PRT	DIVLTQAPLSVSVTPGESASISCRSSQDLLTVKGITSLYWFLQKPGKSPKLLIYRMSNLASGVPDRFRSGSETDFTLKISKVETED VGVYYCAQFLEYPHFTFAGTKLELKR	113

10

20

30

40

【 0 1 4 1 】
(参考文献)

【化 2】

Adams, A.B., Pearson, T.C., and Larsen, C.P. (2003). Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol. Rev.* *196*, 147–160.

Albuquerque, A.S., Cortesão, C.S., Foxall, R.B., Soares, R.S., Victorino, R.M.M., and Sousa, A.E. (2007). Rate of increase in circulating IL-7 and loss of IL-7R α expression differ in HIV-1 and HIV-2 infections: two lymphopenic diseases with similar hyperimmune activation but distinct outcomes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 3252–3259.

Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* *273*, 927–948. 10

Almagro, J.C., Teplyakov, A., Luo, J., Sweet, R.W., Kodangattil, S., Hernandez-Guzman, F., and Gilliland, G.L. (2014). Second antibody modeling assessment (AMA-II). *Proteins* *82*, 1553–1562.

Armour, K.L., Clark, M.R., Hadley, A.G., and Williamson, L.M. (1999). Recombinant human IgG molecules lacking Fc γ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur. J. Immunol.* *29*, 2613–2624.

Broux, B., Hellings, N., Venken, K., Rummens, J.-L., Hensen, K., Van Wijmeersch, B., and Stinissen, P. (2010). Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants. *Genes Immun.* *11*, 326–333. 20

Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daëron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* *113*, 3716–3725.

Chan, A.C., and Carter, P.J. (2010). Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 301–316.

Chothia, C., and Lesk, A.M. (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* *196*, 901–917. 30

Datta-Mannan, A., Witcher, D.R., Tang, Y., Watkins, J., Jiang, W., and Wroblewski, V.J. (2007). Humanized IgG1 variants with differential binding properties to the neonatal Fc receptor: relationship to pharmacokinetics in mice and primates. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *35*, 86–94.

Desmet, J., Spriet, J., and Lasters, I. (2002). Fast and accurate side-chain topology and energy refinement (FASTER) as a new method for protein structure optimization. *Proteins* *48*, 31–43.

Ewert, S., Honegger, A., and Plückthun, A. (2003). Structure-based improvement of the biophysical properties of immunoglobulin VH domains with a generalizable approach. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 1517–1528. 40

Haudebourg, T., Poirier, N., and Vanhove, B. (2009). Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation. *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 22, 509–518.

Hinton, P.R., Johlfs, M.G., Xiong, J.M., Hanestad, K., Ong, K.C., Bullock, C., Keller, S., Tang, M.T., Tso, J.Y., Vásquez, M., et al. (2004). Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J. Biol. Chem.* 279, 6213–6216.

Honegger, A., Malebranche, A.D., Röthlisberger, D., and Plückthun, A. (2009). The influence of the framework core residues on the biophysical properties of immunoglobulin heavy chain variable domains. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS* 22, 121–134. 10

Idusogie, E.E., Presta, L.G., Gazzano-Santoro, H., Totpal, K., Wong, P.Y., Ultsch, M., Meng, Y.G., and Mulkerrin, M.G. (2000). Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 164, 4178–4184.

Jariwala, S.P., Abrams, E., Benson, A., Fodeman, J., and Zheng, T. (2011). The role of thymic stromal lymphopoietin in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 41, 1515–1520.

Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522–525. 20

Labrijn, A.F., Buijsse, A.O., van den Bremer, E.T.J., Verwilligen, A.Y.W., Bleeker, W.K., Thorpe, S.J., Killestein, J., Polman, C.H., Aalberse, R.C., Schuurman, J., et al. (2009). Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat. Biotechnol.* 27, 767–771.

Lazar, G.A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J.S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H.S., Eivazi, A., Yoder, S.C., et al. (2006). Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4005–4010.

Martin, A.C.R. (2001). Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In *Antibody Engineering*, D.R. Kontermann, and D.S. Dübel, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 422–439. 30

Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soullou, J.-P., and Laplaud, D.-A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.* 118, 3411–3419.

North, B., Lehmann, A., and Dunbrack, R.L. (2011). A new clustering of antibody CDR loop conformations. *J. Mol. Biol.* 406, 228–256.

Racapé, M., Vanhove, B., Soullou, J.-P., and Brouard, S. (2009). Interleukin 7 receptor alpha as a potential therapeutic target in transplantation. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 57, 253–261. 40

Richards, J.O., Karki, S., Lazar, G.A., Chen, H., Dang, W., and Desjarlais, J.R. (2008). Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2517–2527.

Rochman, Y., Kashyap, M., Robinson, G.W., Sakamoto, K., Gomez-Rodriguez, J., Wagner, K.-U., and Leonard, W.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19455–19460.

Ryan, M.C., Hering, M., Peckham, D., McDonagh, C.F., Brown, L., Kim, K.M., Meyer, D.L., Zabinski, R.F., Grewal, I.S., and Carter, P.J. (2007). Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells. *Mol. Cancer Ther.* 6, 3009–3018.

Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., et al. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγRI. *J. Biol. Chem.* 276, 6591–6604.

Shinohara, T., Nemoto, Y., Kanai, T., Kameyama, K., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nakamura, T., Totsuka, T., Ikuta, K., and Watanabe, M. (2011). Upregulated IL-7 receptor α expression on colitogenic memory CD4+ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 2623–2632.

Steurer, W., Nickerson, P.W., Steele, A.W., Steiger, J., Zheng, X.X., and Strom, T.B. (1995). Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 1165–1174.

Strohl, W.R. (2009). Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 685–691.

Taylor, B.C., Zaph, C., Troy, A.E., Du, Y., Guild, K.J., Comeau, M.R., and Artis, D. (2009). TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *J. Exp. Med.* 206, 655–667.

Vargas-Madrado, E., and Paz-García, E. (2003). An improved model of association for VH-VL immunoglobulin domains: asymmetries between VH and VL in the packing of some interface residues. *J. Mol. Recognit. JMR* 16, 113–120.

Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Fang, C., Cousins, D., Zhang, G., Gu, S., Gao, Z., Shamji, B., et al. (2008). Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 2790–2798.

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

(構成 1)

抗体又はその抗原結合性断片であって、以下のCDR：

- そのアミノ酸配列が、配列番号：14のEffi3-VH3-CDR1である、VH-CDR1；

- そのアミノ酸配列が、配列番号：16のEffi3-VH3-CDR2である、VH-CDR2；

- そのアミノ酸配列が、配列番号：18のEffi3-VH3-CDR3配列である、VH-CDR3；

- そのアミノ酸配列が、配列番号：22のEffi3-VL3-CDR2である、VL-CDR2；

- そのアミノ酸配列が、配列番号：24のEffi3-VL3-CDR3である、VL-CDR3；並びに、

- そのアミノ酸配列が、配列番号：20のEffi3-VL3-CDR1であるか、又はそのアミノ酸配列が、配列番号：26のEffi3-VL4-CDR1である、VL-CDR1；を含み、

ここで、この抗体又はその抗原結合性断片が、ヒトCD127の細胞外ドメインへ特異的に結合し、且つCD127のアンタゴニストではない、前記抗体又はその抗原結合性断片。

10

20

30

40

50

(構成2)下記の特徴の一つ以上：- 該抗体又は断片は、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のヒトIL-7誘導したリン酸化を阻害しないこと；- 該抗体又は断片は、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのヒトTSLP-刺激した分泌を阻害しないこと；- 該抗体又は断片は、ヒトCD127のアゴニストではないこと；- 該抗体又は断片は、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のヒトIL-7誘導したリン酸化を増大しないこと；- 該抗体又は断片は、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのヒトTSLP-刺激した分泌を増大しないこと；を有する、構成1記載の抗体又は断片。

10

(構成3)前記抗体又はその抗原結合性断片が、重鎖及び軽鎖を含み、ここで：- 重鎖は、配列番号：14のVH-CDR1、配列番号：16のVH-CDR2、配列番号：18のVH-CDR3を含み；並びに- 軽鎖は、配列番号：20又は26のVL-CDR1、配列番号：22のVL-CDR2、配列番号：24のVL-CDR3を含む、構成1又は2記載の抗体又はその抗原結合性断片。(構成4)前記重鎖及び/又は軽鎖が、それらのフレームワーク内に、1又は複数の下記のアミノ酸残基を、並びに特に下記のアミノ酸残基の全て：

20

- VH配列において：位置3に残基Q、位置15に残基G、位置16に残基G、位置21に残基T、位置80に残基T、位置87に残基S、位置91に残基E、位置95に残基T、位置118に残基L、及び/又は- VL配列において：位置7に残基S、位置9に残基S、位置11に残基L、位置12に残基P、位置18に残基P、位置47に残基Q、位置50に残基K、位置68に残基S、位置73に残基Gもしくは残基E、好ましくは残基E、位置82に残基R、位置85に残基A、位置90に残基T；を、Kabat付番体系に関して同定された位置に含む、構成3記載の抗体又はその抗原結合性断片。(構成5)構成3又は4記載の抗体又はその抗原結合性断片であって、それが：

30

(i)前記軽鎖が、配列番号：26のVL4-CDR1を含み、且つ位置73に残基Gであるアミノ酸残基を有する、重鎖及び軽鎖、又は(ii)好ましくは、前記軽鎖が、配列番号：20のVL3-CDR1を含み、且つ位置73に残基Eであるアミノ酸残基を有する、重鎖及び軽鎖；を含む、抗体又はその抗原結合性断片。(構成6)前記重鎖及び/又は軽鎖が、それらのフレームワーク内に、下記のアミノ酸残基の全て：- VH配列において：位置3に残基Q、位置15に残基G、位置16に残基G、位置21に残基T、位置80に残基T、位置87に残基S、位置91に残基E、位置95に残基T、位置118に残基L、及び/又は- VL配列において：位置7に残基S、位置9に残基S、位置11に残基L、位置12に残基P、位置18に残基P、位置47に残基Q、位置50に残基K、位置68に残基S、位置73に残基E、位置82に残基R、位置85に残基A、位置90に残基T；を含む、構成4記載の抗体又はその抗原結合性断片。

40

(構成7)構成1～4のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片であって、それが：- そのアミノ酸配列が配列番号：2の配列であるEffi3-VH3の配列を含むか又はこれからなる重鎖；並びに- そのアミノ酸配列が配列番号：4の配列であるEffi3-VL3の配列、又はそのアミノ酸配列が配列番号：6の配列であるEffi3-VL4の配列を含むか又はこれからなる軽鎖；を含むか又はこれらからなる、抗体又はその抗原結合性断片。

50

(構成 8)

CD127-陽性細胞、特にヒトCD127-陽性細胞に対し、細胞傷害活性、特にADCC活性を有する、構成1～7のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片。

(構成 9)

下記の断片の一つ：

- 疎水性相互作用により一緒に会合された、VL鎖及びVH鎖からなるFv断片；
 - VH：VLヘテロ二量体が、ジスルフィド結合によって安定化されている、dsFv断片；
 - VL鎖及びVH鎖が、可動性ペプチドリンカーにより互いに接続され、その結果一本鎖タンパク質を形成している、scFv断片；
 - ジスルフィド結合を介して一緒に結合された、全L鎖、及びH鎖のVH-CH1断片を含む単量体断片である、Fab断片；
 - Fab'断片；
 - 2個のFab'断片、及び追加的に抗体のヒンジ領域の一部を含む、F(ab')₂断片；
- である、構成1～8のいずれか一項記載の抗体の抗原結合性断片。

10

(構成 10)

配列番号：55の配列を持つエピトープからなるか又はこれを含むポリペプチドを認識し、且つ任意に該ポリペプチドに対して生じる、構成1～9のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片。

(構成 11)

前記抗体が、以下を含むか又はこれらからなるヒト化モノクローナル抗体：

- そのアミノ酸配列が配列番号：28の配列であるIgG1m-E333Aの定常領域を含む重鎖、特にそのアミノ酸配列が配列番号：42の配列であるEffi3-VH3-IgG1m-E333Aの重鎖；並びに
 - そのアミノ酸配列が配列番号：34の配列であるCL 定常領域を含む軽鎖、特にそのアミノ酸配列が配列番号：50の配列であるEffi3-VL3-CL、又はそのアミノ酸配列が配列番号：48の配列であるEffi3-VL4-CL の軽鎖；
- である、構成1～10のいずれか一項記載の抗体。

20

(構成 12)

前記抗体が、以下を含むか又はこれらからなるヒト化モノクローナル抗体：

- そのアミノ酸配列が配列番号：30の配列であるIgG4m-S228Pの定常領域、又はそのアミノ酸配列が配列番号：32の配列であるIgG2bの定常領域を含む重鎖；並びに
 - そのアミノ酸配列が配列番号：34の配列であるCL 定常領域、又はそのアミノ酸配列が配列番号：36の配列であるCL 定常配列を含む、軽鎖；
- である、構成1～11のいずれか一項記載の抗体。

30

(構成 13)

構成1～8のいずれか一項記載の抗体の断片であり、且つ以下の一つ：

- そのアミノ酸配列が配列番号：14の配列であるEffi3-VH3-CDR1のVH-CDR1；
 - そのアミノ酸配列が配列番号：16の配列であるEffi3-VH3-CDR2のVH-CDR2；
 - そのアミノ酸配列が配列番号：18の配列であるEffi3-VH3-CDR3のVH-CDR3；
 - そのアミノ酸配列が配列番号：22の配列であるEffi3-VL3-CDR2のVL-CDR2；
 - そのアミノ酸配列が配列番号：24の配列であるEffi3-VL3-CDR3のVL-CDR3；
 - そのアミノ酸配列が配列番号：20の配列であるEffi3-VL3-CDR1又はそのアミノ酸配列が配列番号：26の配列であるEffi3-VL4-CDR1のVL-CDR1；
 - そのアミノ酸配列が配列番号：2の配列であるEffi3-VH3の配列を含む重鎖；
 - そのアミノ酸配列が配列番号：4の配列であるEffi3-VL3の配列を含む軽鎖；又は
 - そのアミノ酸配列が配列番号：6の配列であるEffi3-VL4の配列；
- にある、ポリペプチド。

40

(構成 14)

構成1～13のいずれか一項記載の抗体又はその断片を含むキメラ分子であって、それが：

- 該抗体又は抗原結合性断片の抗原-結合能を保持し、且つ抗原-結合性抗体模倣物である

50

キメラタンパク質、特に人工タンパク質；又は

- 該分子へ、認識、結合、アンカリング、シグナル伝達の機能を集合的に提供する、複数の機能性ドメインを有する複合分子、特に、1以上の組換え分子(複数可)に、特に1以上の融合タンパク質(複数可)に関連して、(i)構成1~15のいずれか一項記載の該抗体又は抗原結合性断片のscFv断片由来であるか又はそのようなscFv断片である、エクドメイン、(ii)細胞膜へのアンカリングのための、膜貫通ドメイン、並びに(iii)少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、エンドドメイン；を含む、キメラ抗原受容体(CAR)；である、キメラ分子。

(構成15)

下記の特徴の少なくとも一つ；

- CD3 細胞質ドメインにより提供されるような、T細胞活性化の開始；

- T細胞媒介性細胞傷害性；

- T細胞活性化シグナルの増幅、又は4-1BB、CD28もしくはICOSもしくはOX40などの受容体から誘導された同時刺激エレメントにより提供されるような、該シグナルの同時刺激；

を集合的に可能にする、少なくとも2、有利には少なくとも3のシグナル伝達ドメインを含む、構成14記載のキメラ抗原受容体。

(構成16)

構成1~13のいずれか一項記載のポリペプチドをコードしている、ポリヌクレオチド、特に単離されたポリヌクレオチド、特に構成1~13のいずれか一項記載のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを挿入断片として含むベクターである、前記ポリヌクレオチド。

(構成17)

配列番号：13、15、17、19、21及び23の配列、又は配列番号：13、15、17、25、21及び23の配列を含む、特に配列番号：1及び3の配列又は配列番号：1及び5の配列を含む、特に配列番号：41及び47の配列又は配列番号：41及び49の配列を含む、構成16記載のポリヌクレオチド。

(構成18)

構成1~13のいずれか一項記載の抗体又は抗原結合性断片、もしくは構成14又は15記載のキメラ分子、もしくは構成16又は17記載のポリヌクレオチドを含む、細胞、特にT細胞。

(構成19)

キメラ抗原受容体(CAR)の方法又は調製であって、それが；

a. 構成1~13のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、特にscFv断片をコードしているポリヌクレオチドを提供する工程；

b. 工程a)の該ポリヌクレオチドをそのC-末端で、膜貫通ドメイン、及び細胞、特にT細胞、より特定するとヒトT細胞へ、刺激シグナル(複数可)を提供するのに適した少なくとも1つの、特に2つの細胞内シグナル伝達ドメイン(複数可)を、N-からC-末端へコードしているポリヌクレオチドにより組換える工程；

c. 工程b)において得られた組換え分子を、細胞において、特にT細胞において、より特定するとヒトT細胞において、発現させる工程；

d. 任意に、生成されたキメラ抗原受容体を、ヒトCD127を発現している細胞と接触させた後、これをその特性について選択する工程；

を含む、前記方法。

(構成20)

活性成分として、構成1~13のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、構成14又は15記載のキメラ分子、構成18記載の細胞、もしくは構成16又は17記載のポリヌクレオチドを含有する、医薬組成物。

(構成21)

活性成分として；

10

20

30

40

50

- 構成1～13のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、構成14又は15記載のキメラ分子、構成18記載の細胞、もしくは構成16又は17記載のポリヌクレオチド、並びに

- 化学療法薬、放射線治療薬、手術用薬剤、免疫治療薬、プロバイオティクス及び抗生物質の群から選択された、少なくとも1種の異なる治療薬：

を含む、組み合わせ治療手段、特に組み合わせ製品であって、

ここで該活性成分が、個別治療、同時治療又は併用治療のために、特に組合せ使用又は逐次使用のために、製剤化される、組み合わせ治療手段。

(構成22)

前記製品を必要とするヒト患者への投与に適しており、且つ活性成分として：(i)構成1～13のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、構成14又は15記載のキメラ分子、構成18記載の細胞、あるいは、構成16又は17記載のポリヌクレオチド、並びに、(ii)追加の免疫治療薬、特に構成14又は15記載のCAR分子、又は細胞受容体もしくはCD19、CD20、CD52又はHer2などの抗原を標的化するCAR分子を生じるT細胞などの、T細胞に關与する免疫治療薬：を含有する、構成21記載の組み合わせ製品。

10

(構成23)

医薬品として使用するための、構成1～13のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、構成14又は15記載のキメラ分子、構成18記載の細胞、もしくは構成16又は17記載のポリヌクレオチド。

(構成24)

癌、特にCD127+細胞に関連した癌、より特定するとCD127陽性細胞の増殖及び/又はCD127陽性細胞の浸潤に関連した癌の治療における使用のための、構成1～13のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、構成14又は15記載のキメラ分子、構成16又は17記載のポリヌクレオチド、もしくは構成18記載の細胞もしくは構成23記載の医薬品。

20

(構成25)

乳癌、腎臓癌、膀胱癌、肺癌、膵臓癌の群から選択された癌の治療における構成24記載の使用のための、又はセザリーリンパ腫などのT細胞皮膚リンパ腫の治療のための、又はIL7-R/TSLP経路の獲得型変異を有する急性リンパ芽球様白血病及び中皮腫の治療のための、構成1～13のいずれか一項記載の抗体又はその抗原結合性断片、構成14又は15記載のキメラ分子、構成16又は17記載のポリヌクレオチド、もしくは構成18記載の細胞。

30

(構成26)

配列番号：55の配列を持つエピトープからなるポリペプチド。

(構成27)

構成23記載のポリペプチドに対し、非-ヒト動物、特に非-ヒト哺乳動物を免疫化し、並びに特に該免疫化した非-ヒト動物から得られる血清を収集し、該ポリペプチドに対する抗体を得ることを含む、構成1～13のいずれか一項記載の抗体の製造方法。

(構成28)

CD127の細胞外ドメインに特異的に結合し、且つ下記の特徴の少なくとも一つ：

- これは、CD127のアンタゴニストではなく、且つIL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を阻害しない、並びに/又は

40

- これは、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を阻害しない、並びに/又は

- これは、CD127のアゴニストではない、並びに/又は

- これは、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を増大しない、並びに/又は

- これは、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を増大しない；

を示す抗体、そのような抗体の抗原結合性断片又は模倣物を選択する工程を更に含む、構成27記載の方法。

(構成29)

50

前記抗体又はその抗原結合性断片又は模倣物が、下記の特徴：

- これは、CD127の細胞外ドメインに特異的に結合する、並びに
- これは、CD127のアンタゴニストではない、並びに
- これは、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を阻害しない、並びに
- これは、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を阻害しない、並びに
- これは、CD127のアゴニストではない、並びに
- これは、IL7-Rを発現している細胞におけるSTAT5のIL-7誘導したリン酸化を増大しない、並びに
- これは、TSLP-Rを発現している細胞におけるTARCのTSLP-刺激した分泌を増大しない：

10

を有する、構成28記載の方法。

(構成30)

本発明の抗-CD127抗体又はその抗原結合性断片又はその抗原結合性模倣物が、先に対象から得られた試料中のCD127+細胞の検出のために及び任意にCD127の発現の定量のために使用される、インビトロ又はエクスピボ診断方法、特に個別化医療における、より特定するとコンパニオン診断における使用に適した診断方法。

(構成31)

診断試験における使用、特に個別化医療における又はコンパニオン診断試験における使用に適した医薬品の製造における、構成1～15のいずれか一項記載の本発明の抗-CD127抗体又はその抗原結合性断片又はその抗原結合性模倣物の使用。

20

(構成32)

治療に対する対象の反応、特に癌と診断された対象の反応を予測するバイオマーカーとしてCD127の存在を決定することを含む、先に対象から得られた試料中のCD127+細胞の存在を決定する、インビトロ又はエクスピボ方法であって、該方法が：

- 特に本発明の抗-CD127抗体又はその抗原結合性断片又はその抗原-結合性抗体模倣物を使用し、対象の腫瘍試料中のCD127の発現レベルを決定すること、並びに
- このCD127の発現レベルを、無反応対象集団におけるCD127の発現レベルの代表値と比較すること：を含み、

30

ここで対象の腫瘍試料中のより高いCD127の発現レベルは、該治療に反応する対象の指標である、方法。

【図面】

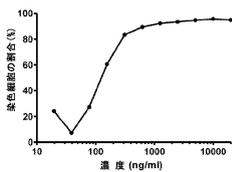
【図1】

【図2】

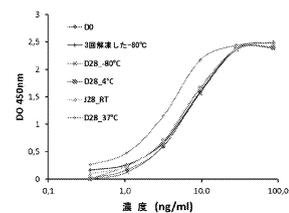
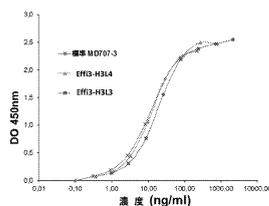
図1

図2

A.



B.

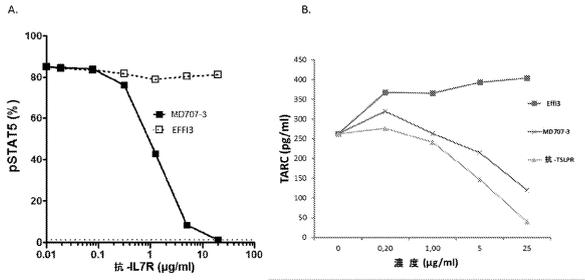


40

50

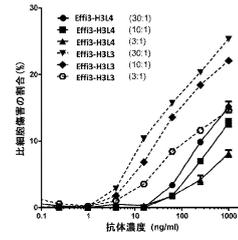
【 図 3 】

図 3



【 図 4 】

図 4



10

【 図 5 】

Figure 5

ESGVAQNGDLEDAELDDYSFSCYSOLEVNGSQHSLTCAFEDPDVNTTLEFE
 ICGALVEVKCLNFRKLQEIYFIETKKFLIGKSNICVKVGEKSLTCKKIDLTIVKPE
 APFDLSVYREGANDFVVFNTSHLQKKYVKVLMHDVAYRQEKDENKWTHV
 NLSSTKLTLLQRKLPAAAMYIEIKVRSIPDHFKGFWSEWSPSYFRPEINNSS
 GEMD

【 図 6 】

Figure 6

MLVLDWVLYTALPQGVHCAVQLVESGGGLVQPQGLKTTCAASGFTTNAAMVWVRQAPGKGLEWVARIRTK
 ANNYATYYAASVKGRTISRDDSKSTVYLOMDSVKTEDATYYICVWVLTTRDYFDYWGQGLVTVSSASTKGP
 SYFPLAPSKSTSGGTAALGCLVLDYFPEVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVPSSSLGTQYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDSVHEDPEVKFNWVY
 DQVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPRPEQVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLTKLTVDKSRWQGNVFNPSCSVMHEA
 LHNHYTQKSLSPGK

20

【 図 7 】

Figure 7

MKFPACFLSLVLCIPGATGDMVLTQSPSSLPVTPGEPASISCRSSQDILLTVKGTISLWFLQKPGQSPKLLIYRMSW
 #DPSGVPDRFSGSGSTDFTLKISIVEAEEDVGTIYCAQFLEYVPIFGAGTKLEKRTVAAPSVRIFFPSDEQLKSSSTAS
 VVCLLNFIYPREAKYQWIKVDNALGSGNSQESVTEDDSDISYLSLSTLTLSKADYEKIKVYACEVTHOGLSSPPTKS
 FNRGEC

30

【 配列表 】

0007053479000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	D
		C 1 2 Q	1/02	

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 3 / 0 5 6 9 8 4 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 1 1 / 0 9 4 2 5 9 (W O , A 2)
 国際公開第 2 0 1 0 / 0 1 7 4 6 8 (W O , A 1)
 CHUNG B. et al. , Blood , 110(8)(2007) , p.2803-2810

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
 N)