

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-532074
(P2014-532074A)

(43) 公表日 平成26年12月4日(2014.12.4)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 Z N A	4B024
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 1 O 2	4B065
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4C084
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-536177 (P2014-536177)	(71) 出願人	514098632 エフィムネ フランス国 エフ - 44035 ナンテ ルエ ガストン ベイル 1
(86) (22) 出願日	平成24年10月4日 (2012.10.4)	(71) 出願人	514098654 インスティテュート ナショナル デ ラ サンテ エト デ ラ レシェルシエ メディカレ フランス国 エフ - 75654 パリ セ デク 13 ルエ デ トルビアック 10 1
(85) 翻訳文提出日	平成26年6月16日 (2014.6.16)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(86) 國際出願番号	PCT/EP2012/069670		
(87) 國際公開番号	W02013/056984		
(87) 國際公開日	平成25年4月25日 (2013.4.25)		
(31) 優先権主張番号	11306353.1		
(32) 優先日	平成23年10月19日 (2011.10.19)		
(33) 優先権主張國	歐州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL7受容体のα鎖に対する抗体 - 薬剤候補物質の製造におけるこれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、CD127に対する抗体、すなわち、インターロイキン7 (IL-7)の受容体の鎖に対する抗体に関し、特に、ヒト細胞上で発現するヒトIL-7の受容体 (ヒトIL-7R 若しくはIL-7Raとも称する。)、又はTSLP受容体に関する。本発明の抗体は、CD127陽性細胞に対して細胞傷害活性を有する。また、本発明は、ADCC、及び、場合により、CDCを介して、抗体の細胞傷害作用により、Tリンパ球の亜集団を枯渇させるための、これらの抗体の使用にも関する。したがって、本発明は、移植拒絶、自己免疫疾患、アレルギー性疾患、リンパ腫又は癌の病状が、CD127陽性細胞と関連している場合、これらの治療における抗体の使用に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

IL-7に対する受容体の鎖(CD127と称する。)に結合し、ヒトCD127陽性細胞、特にCD127を発現するヒトT細胞(CD127+細胞)に対して細胞傷害活性を示す、抗体又はその機能的断片。

【請求項 2】

インターロイキン7(IL-7)に対してアンタゴニスト特性を更に有し、これによって、IL-7がCD127陽性細胞上のCD127に接近することに拮抗する、請求項1に記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 3】

ヒト細胞、特にヒトT細胞によって発現されるCD127に対して発生する、請求項1又は2に記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 4】

抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)、及び、場合により、補体依存性細胞傷害(CDC)を示す、請求項1～3のうちのいずれかに記載の抗体又はその機能的断片。

【請求項 5】

請求項1に記載の抗体又はその機能的断片であって、該抗体又はその機能的断片は、

a) No. I-4531でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-1により產生される抗体若しくはその機能的断片、又は、

b) 該a)の抗体をコードするNo. I-4531でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-1において発現させたRNAに対応するcDNAと同一の核酸分子により組み換えられた組換え真核細胞によって発現する、抗体若しくはその機能的断片、又は、

c) その可変重鎖(VH)及び／又はその可変軽鎖(VL)において改変されたCDR領域を有する、特に、場合により、VH若しくはVLのうちのいずれか若しくは両方に少なくとも1つの同一のCDR3、CDR2及び／又はCDR1領域を保持する、及び／又は改変されたフレームワーク(FR)及び／又は定常(CH)領域を有する、該a)又はb)に対して改変された抗体であって、該改変された抗体が、そのアミノ酸配列の全長において、該a)又はb)の抗体と、70%を超える同一性、特に、75%を超える、80%を超える、85%を超える、90%を超える、95%を超える若しくは最大99%の同一性を有する、抗体若しくはその機能的断片の群から選択される、前記抗体又はその機能的断片。

【請求項 6】

請求項2に記載の抗体又はその機能的断片であって、該抗体又はその機能的断片は、

a) No. I-4532でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-3、若しくはNo. I-4533でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-13により產生される抗体若しくはその機能的断片、又は、

b) 該a)の抗体をコードする、No. I-4532でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-3若しくはNo. I-4533でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-13において発現させたRNAに対応するcDNAと同一の核酸分子により組み換えられた組換え真核細胞によって発現する、抗体若しくはその機能的断片、並びに、

c) その可変重鎖(VH)及び／又はその可変軽鎖(VL)において改変されたCDR領域を有する、特に、場合により、VH若しくはVLのうちのいずれか若しくは両方に少なくとも1つの同一のCDR3、CDR2及び／又はCDR1領域を保持する、及び／又は改変されたフレームワーク(FR)及び／又は定常(CH)領域を有する、該a)又はb)に対して改変された抗体であって、該改変された抗体が、そのアミノ酸配列の全長において、該a)又はb)の抗体と、70%を超える同一性、特に、75%を超える、80%を超える、85%を超える、90%を超える、95%を超える若しくは最大99%の同一性を有する、抗体若しくはその機能的断片の群から選択される、前記抗体又はその機能的断片。

【請求項 7】

請求項1～7のうちのいずれかに記載の抗体又はその機能的断片であって、その抗原結合部位が、次に示すポリペプチドのうちの少なくとも1つを含む、前記抗体又はその機能

10

20

30

40

50

的断片

1) MD707-1

a) 可変重鎖において、

- (i) 配列番号6のアミノ酸配列を有するVHCDR 1、
- (ii) 配列番号8のアミノ酸配列を有するVHCDR 2、
- (iii) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVHCDR 3、若しくは、
- (iv) 配列番号2の位置19から位置141のアミノ酸配列を有するVH、及び／又は、

b) 可変軽鎖において、

- (i) 配列番号12のアミノ酸配列を有するVLCDR 1、
- (ii) 配列番号14のアミノ酸配列を有するVLCDR 2、
- (iii) 配列番号16のアミノ酸配列を有するVLCDR 3、若しくは、
- (iv) 配列番号4の位置21から位置133のアミノ酸配列を有するVL、

2) MD707-3

a) 可変重鎖において、

- (i) 配列番号22のアミノ酸配列を有するVHCDR 1、
- (ii) 配列番号24のアミノ酸配列を有するVHCDR 2、
- (iii) 配列番号26のアミノ酸配列を有するVHCDR 3、若しくは、
- (iv) 配列番号18の位置19から位置141のアミノ酸配列を有するVH、及び／又は、

b) 可変軽鎖において、

- (i) 配列番号28のアミノ酸配列を有するVLCDR 1、
- (ii) 配列番号30のアミノ酸配列を有するVLCDR 2、
- (iii) 配列番号32のアミノ酸配列を有するVLCDR 3、若しくは、
- (iv) 配列番号20の位置21から位置133のアミノ酸配列を有するVL、

3) MD707-13

a) 可変重鎖において、

- (i) 配列番号38のアミノ酸配列を有するVHCDR 1、
- (ii) 配列番号40のアミノ酸配列を有するVHCDR 2、
- (iii) 配列番号42のアミノ酸配列を有するVHCDR 3、若しくは、
- (iv) 配列番号34の位置22から位置135のアミノ酸配列を有するVH、及び／又は、

b) 可変軽鎖において、

- (i) 配列番号44のアミノ酸配列を有するVLCDR 1、
- (ii) 配列番号46のアミノ酸配列を有するVLCDR 2、
- (iii) 配列番号48のアミノ酸配列を有するVLCDR 3、若しくは、
- (iv) 配列番号36の位置22から位置129のアミノ酸配列を有するVL。

【請求項 8】

ヒト化モノクローナル抗体若しくはキメラモノクローナル抗体及び／又は脱免疫抗体である、請求項1～8のうちのいずれかに記載の抗体。

【請求項 9】

標準的な定義及び数体系に従って、ヒト抗体において対応する位置を有するヒトアミノ酸残基が、請求項1～8のうちのいずれかに記載の抗体の定常領域中に存在するアミノ酸残基で置換されることにより誘導されるヒト化抗体であり、その置換レベルが、該定常領域において1%～20%、特に1%～18%の残基である、抗体又はその機能的断片。

【請求項 10】

請求項1～9のうちのいずれかに記載の抗体を含むキメラ分子であって、該モノクローナル抗体が機能的に異なる分子に結合し、該キメラ分子が、融合キメラタンパク質、又は、PEGポリマー若しくは標識化抗体などの、化学基若しくは分子との共有結合から生じた結合体のいずれかである、前記キメラ分子。

【請求項 11】

請求項1～10のうちのいずれかに記載の抗体を含む組成物若しくは化合物の集合体、又は請求項11に記載のキメラ分子であって、該組成物若しくは化合物の集合体又はキメ

10

20

30

40

50

ラ分子が、

a) CD127+細胞に対して、特にヒトCD127+ T細胞に対して細胞傷害活性を有し、ヒトIL-7に対してアンタゴニスト特性も有する抗体、又は、

b) CD127+細胞に対して細胞傷害活性を有する抗体若しくはその機能的断片の集団、及びヒトIL-7に対してアンタゴニスト特性を有する抗体若しくはその機能的断片の集団であって、これらの抗体の集団が、抗体の混合物中で組み合わされるか、又は分離され、併用投与若しくは連続投与のために製剤される集団を含む、

前記組成物若しくは化合物の集合体又はキメラ分子。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 9 のうちのいずれかに記載の抗体をコードする核酸分子。 10

【請求項 1 3】

次に示す群から選択される、請求項 1 3 に記載の核酸：

1) MD707-1

i. 配列番号1の配列を有するVH領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置55から位置423のその断片、

ii. 配列番号3の配列を有するVL領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置61から位置399のその断片、

iii. 配列番号5の配列を有するVHCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

iv. 配列番号7の配列を有するVHCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

v. 配列番号9の配列を有するVHCDR3領域をコードするポリヌクレオチド、

vi. 配列番号11の配列を有するVLCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

vii. 配列番号13の配列を有するVLCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

viii. 配列番号15の配列を有するVLCDR3領域をコードするポリヌクレオチド、

2) MD707-3

i. 配列番号17の配列を有するVH領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置55から位置423のその断片、

ii. 配列番号19の配列を有するVL領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置61から位置399のその断片、

iii. 配列番号21の配列を有するVHCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

iv. 配列番号23の配列を有するVHCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

v. 配列番号25の配列を有するVHCDR3領域をコードするポリヌクレオチド、

vi. 配列番号27の配列を有するVLCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

vii. 配列番号29の配列を有するVLCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

viii. 配列番号31の配列を有するVLCDR3領域をコードするポリヌクレオチド、

3) MD707-13

i. 配列番号33の配列を有するVH領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置64から位置405のその断片、

ii. 配列番号35の配列を有するVL領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置67から位置387のその断片、

iii. 配列番号37の配列を有するVHCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

iv. 配列番号39の配列を有するVHCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

v. 配列番号41の配列を有するVHCDR3領域をコードするポリヌクレオチド、

vi. 配列番号43の配列を有するVLCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

vii. 配列番号45の配列を有するVLCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

viii. 配列番号47の配列を有するVLCDR3領域をコードするポリヌクレオチド。 40

【請求項 1 4】

配列番号47の配列を有するVLCDR3領域をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 1 5】

ポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番

10

20

30

40

50

号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45及び／又は配列番号47の配列に対して修飾されたヌクレオチドを有し、

a) それぞれ、配列番号2のアミノ酸配列若しくは位置19から位置141のその断片、配列番号4のアミノ酸配列若しくは位置21から位置133のその断片、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18のアミノ酸配列若しくは位置19から位置141のその断片、配列番号20のアミノ酸配列若しくは位置21から位置133のその断片、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34のアミノ酸配列若しくは位置22から位置135のその断片、配列番号36のアミノ酸配列若しくは位置22から位置129のその断片、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46及び／又は配列番号48のアミノ酸配列を有するポリペプチドのいずれかをコードし、及び／又は、

b) 配列番号1の配列若しくは位置55から位置423のその断片、配列番号3の配列若しくは位置61から位置399のその断片、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17の配列若しくは位置55から位置423のその断片、配列番号19の配列若しくは位置61から位置399のその断片、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33の配列若しくは位置64から位置405のその断片、配列番号35の配列若しくは位置67から位置387のその断片、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45及び／又は配列番号47の配列を有するポリヌクレオチドのうちの1つと、これらの全長に対して、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、及び最も好ましくは少なくとも98%若しくは少なくとも99%の同一性を有するか、又は、

c) 配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45及び／又は配列番号47の配列を有するポリヌクレオチドの断片であり、それぞれ、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46及び／又は配列番号48のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的断片をコードする、

前記ポリヌクレオチド。

【請求項 1 6】

請求項 1 2 ~ 1 4 のうちのいずれかに記載のポリヌクレオチドのクローニング及び／又は発現のためのベクター、特に、哺乳動物細胞におけるクローニング及び／又は発現に適したプラスミド。

【請求項 1 7】

請求項 1 2 ~ 1 4 のうちのいずれかに記載のポリヌクレオチドにより組み換えられた細胞又は細胞系、特に、哺乳動物細胞若しくは細胞系。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 1 のうちのいずれかに記載の抗体若しくはその機能的断片又はキメラ分子とともに医薬用ビヒクルを含み、必要に応じて、別の有効成分を更に含む、医薬組成物。

【請求項 1 9】

ヒト患者に投与する場合、CD127+細胞の生存若しくは増殖、特にCD8+及びCD4+メモリーT細胞を制御するのに適した製剤中に、有効成分として、請求項 1 ~ 1 1 のうちのいずれかに記載の抗体若しくはその機能的断片又はキメラ分子、又は請求項 1 9 に記載の医薬組成物を含む、組成物。

【請求項 2 0】

特にアレルギー又は自己免疫に関する細胞上で免疫調節治療効果を有する、付加的な化合物を更に含む、請求項 1 7 又は 1 8 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

併用して有効成分としてか又はその必要のある患者の追加治療法に使用される、請求項1～11のうちのいずれかに記載の抗体若しくはその機能的断片又はキメラ分子。

【請求項 2 2】

臓器若しくは組織移植拒絶の予防、又は自己免疫疾患若しくはアレルギー性疾患の治療、又はCD127+細胞に関連する乳癌などの癌の治療、又はセザールリンパ腫などのリンパ腫の治療、又はIL7-R/TSLPシグナル伝達経路の獲得型突然変異による急性リンパ芽球性白血病の治療のためにヒト患者において使用される、請求項1～11のうちのいずれかに記載の抗体若しくはその機能的断片又はキメラ分子、請求項17に記載の医薬組成物若しくは請求項18に記載の組成物。

10

【請求項 2 3】

請求項1～10のうちのいずれかに記載の抗体又はその機能的断片を製造する方法であって、該方法は、

a) 動物、特にヒトIL-7受容体のヒト鎖を有する哺乳動物を免疫した後にハイブリドーマを得ること、及び、必要に応じて、同じ免疫原により該動物を増強させ、免疫化に応答する動物から脾臓又はリンパ節細胞を回収し、該細胞を髓腫細胞と融合させモノクローナル抗体を単離すること、

b) 抗体の回収が可能な条件下で、EB66鳥類細胞などの低いフコシル化能を提示するか又はフコシル化能を提示しない細胞の組換え形態において、該抗体をコードする遺伝子を発現させることと、

20

c) 該ヒトIL-7受容体の鎖に対して所望の結合親和性を有する抗体を回収することと、を含む、

前記方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、インターロイキン7(IL-7)の受容体の鎖に対する抗体に関し、特に、ヒト細胞上で発現するヒトIL-7の受容体(ヒトIL-7R又はIL-7Raとも称する。)に関する。また、インターロイキン7(IL-7)の受容体の鎖はCD127とも称される。

【0002】

30

本発明の抗体は、CD127陽性細胞に対して細胞傷害活性を有する。

【0003】

また、本発明は、ADCC(抗体依存性細胞媒介細胞傷害)、及び、場合により、CDC(補体依存性細胞傷害)を介して、抗体の細胞傷害作用により、リンパ球の亜集団又は(リンパ球、Bリンパ球、NK細胞及び樹状細胞を含む)CD127を発現する他の細胞集団を枯渇させるための、これらの抗体の使用にも関する。したがって、本発明は、支配的免疫寛容状態(dominant tolerogenic state)に至るヒト患者における免疫応答の改変、又は、これは逆に、悪性CD127陽性細胞の破壊とともに、免疫応答のレベルの制御が必要な免疫寛容の欠如に関する病態の治療における抗体の使用に関する。よって、本発明は、移植拒絶、自己免疫疾患、リンパ腫又は癌によって誘発されるものなどの病状が、CD127陽性細胞と関連している場合、これらの病状に用いるのに適した手段を提供する。

40

【背景技術】**【0004】**

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、現在の免疫抑制剤(カルシニューリン阻害剤)によって、及び共刺激(抗接着、CD80/86阻害剤)をブロックするモノクローナル抗体によって制御することができる。また、メモリーT細胞も移植拒絶の原因である。メモリーT細胞は、後天性免疫の病歴、主にウイルスに対する前者の反応により蓄積される。メモリーT細胞は、同種抗原との抗ウイルス防御の交差反応である、「異種免疫」により、同種抗原によって活性化できることが示されている(Adamsらの文献: Immunol Rev 2003, 196, 147-60)。ナイーブT細胞と

50

対照的に、メモリーT細胞は、共刺激シグナルの要件を低減し、急速に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、免疫寛容誘発に対して強力な障壁を表す。メモリーT細胞は、慢性拒絶にも関与し得る。臓器移植及び組織移植における役割の他に、ナイーブT細胞及びメモリーT細胞は、同時に、多くの自己免疫疾患の原因でもある。これは、潰瘍性大腸炎 (Shinoharaらの文献 : J. Immunol. 2011, 186 : 2623-32) 、関節リウマチ、乾癬又は移植片対宿主病の場合である。

【 0 0 0 5 】

さらに、複数の悪性細胞は、IL-7Rを提示することが示されている。これは、セザール皮膚リンパ腫（うち60%）又は小児急性リンパ性白血病の場合であり、これらの約15%は、これらの腫瘍を部分的にIL-7依存性の状態にして、CD127における機能獲得型突然変異を発現する (Shochatらの文献 : J Exp Med. 2011年5月 9;208(5):901-8)。

10

【 0 0 0 6 】

CD127は、メモリーT細胞及びナイーブT細胞の両方によるものを含む、種々の細胞によって発現する。具体的には、CD127は、休止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細胞によって発現するが、特に、休止内在性制御性T細胞（内在性Treg）によっては発現しない。IL-7Raは、胸腺細胞分化、及びリンパ球のクローン性増殖の促進に不可欠である。

【 0 0 0 7 】

移植拒絶におけるIL-7/CD127経路の役割は、共刺激遮断、マウスにおける長期心臓同種移植生存と関連する場合、抗IL-7 Mabの効果によって示唆されている (Wangらの文献 : Am J Transplant 2006, 6 (12), 2851-60)。また、自己免疫におけるIL-7/CD127経路の役割も、マウスにおける試験的自己免疫性脳脊髄炎を予防する、ブロッキング抗IL-7RaのMabの効果によって示唆されている (Liuらの文献 : Nature Medicine 2010, 16 (2), 191-198)。

20

【 0 0 0 8 】

Tリンパ球の枯渇は、同種移植拒絶に対抗するか又は自己免疫に抵抗する自明の免疫抑制アプローチであった。しかしながら、すべてのT細胞枯渇は、免疫寛容の誘発に有利ではない場合がある。Treg細胞を改変することなく、T細胞の亜集団又は選択的に活性化させたT細胞の標的化は、前免疫寛容アプローチ(pro-tolerogenic approach)を構成し得た (Haudebourgらの文献 : Transpl Int 2009, 22 (5), 509-18)。このように、CD127は、かかるモノクローナル抗体が、エフェクターを枯渇させる可能性があるが、制御性リンパ球を枯渇させる可能性はないため、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)の関心を惹く潜在的治療標的と考えることができる。したがって、これらが、移植、自己免疫 (Michelらの文献 : J Clin Invest. 2008 Oct;118(10):3411-9.)、並びに、IL7-Rに対するIL-7の接近に拮抗し、そのため、T細胞及びB細胞の機能と増殖を制限することによる悪性腫瘍において効能を示し得ると考えられている。

30

【 0 0 0 9 】

細胞傷害活性を有するCD127⁺細胞に対するモノクローナル抗体による治療は、Treg細胞を維持するか、又はCD127陽性悪性細胞を排除しつつ、ナイーブT細胞及びメモリーT細胞を排除／中和することによって、その目的を果たすことができた。

40

【 0 0 1 0 】

これに関連して、IL-7Raに対してアンタゴニスト特性を有したIL-7Raに対するモノクローナル抗体は、多発性硬化症のような自己免疫疾患を治療する観点から、国際公開公報第2010/017468号に開示されている。記載されている抗体は、IL-7の受容体に結合するIL-7のアンタゴニストと考えられており、IL-7とこれらのCD127受容体との相互作用が必要であると考えられているT_H17及びT_H1細胞の増殖及び生存に対して、活性を有すると考えられている。

【 0 0 1 1 】

刊行物 (Racape M.らの文献 : Arch. Immunol. Ther. Exp., 2009, 57, 253-261)において、筆者らは、移植における潜在的治療標的としての関心対象のIL-7受容体 を分析し

50

た。種々のT細胞及びIL-7応答性細胞上のIL-7R の発現を再検討したところ、筆者らは、IL-7R を発現する標的メモリーT細胞は、マウスにおける同種移植生存を延長できるか否かについて判断し、標的IL-7又はIL-7R がT_{reg}細胞を有利に存続させると結論付けている。将来の方向性において、筆者らは、治療的処置においてIL-7又はIL-7R のいずれかを標的にすることにより、CD127を発現する細胞の生存に対して異なる結果がもたらされる可能性があり、異なる型のリンパ球減少症が誘発する可能性があることを指摘した。また、ブロッキングするか若しくは中和するか否かによって異なるIL-7R に対する抗体、又は細胞傷害性抗体の影響についての問題は、概念的な観点からももたらされた。しかしながら、筆者らは、かかる抗体の入手及び分析、そして、それどころか、仮説の妥当性を評価するための更なる研究の必要性の表明を示していなかった。

10

【発明の概要】

【0012】

急性又は慢性移植拒絶を含む免疫関連疾患、及び一部の乳癌を含む種々の型の癌などのIL-7/IL-7R に関する他の疾患の利用可能な治療アプローチの欠点を考慮すると、更なる薬剤候補物質、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活性のある候補物質が依然として必要とされている。

【0013】

本発明者らは、前免疫寛容原性制御性T細胞を維持しつつ、侵襲性エフェクター細胞を枯渇させる能力を有し、かつ、CD127+リンパ腫において悪性細胞を排除する能力を示す抗体を提供して、この必要性を満たす。概して、本発明者らは、ヒトCD127+細胞、特にヒトCD127+ T又はB細胞に対して細胞傷害活性を示す抗体を提供する。

20

【0014】

また、これに関連して、本発明者らは、標的CD127+細胞に対して細胞傷害作用を発揮し、物理的にこれらの数を低減する（亜集団の収縮）IL-7Raに対するモノクローナル抗体を得たので、適切な手段も提供する。特定の実施態様において、本発明者らは、このような特性と、IL-7/IL7-R相互作用に対するアンタゴニスト活性とを組み合わせた抗体も得た。したがって、新しい作用機序を有するこれらのMabは、CD127標的化の治療上の利点を評価する新しい生成物を構成する。

【0015】

このように、本発明は、IL-7に対する受容体の鎖（CD127と称する。）、特に、ヒトCD127陽性細胞によって発現するIL-7受容体の鎖に結合し、CD127を発現するヒトT細胞（CD127+細胞）に対して、具体的にはヒトT細胞によって発現するIL-7受容体に対して細胞傷害活性を示す、抗体又はその機能的断片に関する。

30

【0016】

特定の実施態様において、本発明の抗体又はその機能的断片は、IL-7受容体中に存在するCD127分子に対するものであり、そのため、ヒト細胞、特に前述の受容体を発現するヒトT細胞に対して細胞傷害性である。

【0017】

本発明の特定の実施態様において、機能的断片の抗体は、TSLPの受容体としてTSLP受容体（CCRF2；アクセッションナンバーAF338733としても知られている。Reche P.A. らの文献：J Immunol. 167(1), 336-343 (2001)）と組み合わせる場合、同じIL7-R 鎖を標的とし、これに結合する（Reche P.A. らの文献、2001）。ヒトTSLP（アクセッションナンバーAF338732）は、樹状細胞を極性化させ、T細胞及びB細胞の増殖と分化を促進し、かつ、皮膚疾患及び肺疾患において役割を果たすことが示されている因子である（Rui らの文献：Ann NY Acad. Sci. 2010, 1183: 13-24）。したがって、TSLPは、ヒト及びマウスにおける気道炎症性疾患及びアトピー性皮膚炎を含む種々の病状に関連することが示されている（Ying S. らの文献：(2008) J Immunol 181:2790-2798；Jariwala SP. らの文献：(2011) Clin Exp Allergy 6月14日号）。さらに、TSLPは、腸の免疫及び炎症の調節に関連することが示されている（Taylor BC. らの文献：(2009) J Exp Med 206: 655-667）。

40

【0018】

50

本発明の抗体の「機能的断片」は、抗体の一部、すなわち、恐らく天然の形態で、ヒトIL-7のIL-7受容体の鎖に対して抗原結合能を示す、本発明の抗体の構造の一部に対応する分子（抗原結合断片とも称する。）であり、かかる断片は、特に、対応する4本鎖抗体の抗原結合能と比較して、前述の抗原に対して同じか又は実質的に同じ抗原結合能を示す。この抗原結合能は、抗体及び考慮される断片の親和性を測定によって決定することができる。

【0019】

抗体の機能的断片は、抗原認識部位（すなわち、ヒトIL-7のIL-7Ra）を包含し、そのため、抗原認識特異性を確定する、CDR（相補性決定領域）と称する超可変領域又はこれらの部分を含む断片である。4本鎖免疫グロブリンのそれぞれの軽鎖及び重鎖（それぞれ、VL及びVH）は、3つのCDRを有し、それぞれ、VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3及びVH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3と称される。10

【0020】

したがって、本発明は、VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3並びにVH-CDR1、VH-CDR2及びVH-CDR3若しくはこれらの機能的部分、すなわち、ヒトIL-7のIL-7Raに対して高い親和性を有することが好ましい所望の結合能を示す部分のうちのすべてか又は選択されたものを含むか又はこれからなる、本発明の抗体の断片に関する。10

【0021】

CDR3領域が、抗原認識の特異性決定因子であると考えられる場合、VH-CDR3及び／又はVL-CDR3若しくはこれらの機能的部分を含むか又はこれからなる断片が特に好ましい。20

【0022】

当業者は、この点に関して示す、標準数体系を含む、標準数体系定義（Martin, A.C.R. の文献：(2001)、Duebel, S. 及びKontermann, R. 編、抗体工学実験室マニュアル(Antibody Engineering Lab Manual)中の抗体可変領域のタンパク質配列及び構造分析。(Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains.) (Springer-Verlag, Heidelberg)）を参照することによって、又は、Kabatの数体系（免疫学の関心対象であるタンパク質配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)、第4版、米国保健社会福祉省、NIH, 1987）を参照することによって、又は、IMGT「collier de perle」アルゴリズム(<http://www.imgt.org/IMGTindex/Colliers.html>)の適用によって、抗体の種々の領域／ドメインの位置を決定することができる。この点に関して、本発明の配列の定義については、領域／ドメインの境界を別の標準体系から変更できることに留意すべきである。したがって、本発明に定義する領域／ドメインは、およそ+/-10%の抗体の可変領域の全長配列内の関連する配列の長さ又は局在性の変化を示す配列を包含する。30

【0023】

このように、4本鎖免疫グロブリンの構造に基づいて、機能的断片は、利用可能なデータベース及び従来技術（Martin A.C.R. らの文献）における抗体の配列と比較して、特に、これらの配列内の機能的領域の位置を比較することによって定義することができ、フレームワーク及び定常領域の位置が、種々の分類の抗体、特にIgG、具体的には哺乳動物のIgGを十分に定義していることに留意すべきである。

【0024】

本発明の特定の実施態様を説明する目的で、前述した抗体のCDRを含んだ可変領域を含有する抗体の抗原結合断片は、Kabat (NIH 1987), Martin A.C.R. ら及び更にRoitt I. ら（免疫学の基礎と応用(Fundamental and Applied Immunology) (MEDSI/McGraw-Hill)）を参照して十分に定義されたFv、dsFv、scFv、Fab、Fab'、F(ab')2を包含する。Fv断片は、疎水性相互作用によってともに結合された抗体のVL及びVH領域からなる。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いる。scFv断片において、VL及びVH領域は、一本鎖タンパク質を形成する柔軟なペプチドリンカーを介して相互に接続されている。Fab断片は、抗体のパパイン消化によって得られる单量体の断片であり、これらは、ジスルフィド結合を介してともに結合された全L鎖、及びH鎖のVH-CH1断片を含む。F(ab')2断片は、ヒンジジスルフィド下の抗体のペプシン消化によって生成す40

ることができ、これは、2つのFab'断片と、更に免疫グロブリン分子のヒンジ領域の付加的部分を含む。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ってF(ab')2断片から得ることができる。F(ab')2断片は二価であり、すなわち、これらは、天然免疫グロブリン分子のような2つの抗原結合部位を含み、他方では、Fv(Fabの可変部分を構成するVH-VL二量体(dimmer))、dsFv、scFv、Fab及びFab'断片は一価であり、すなわち、これらは、単一の抗原結合部位を含む。

【0025】

本発明のこれらの基本的な抗原結合断片とともに組み合わせて、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断片を得ることができる。これらの多価抗原結合断片も本発明の一部である。

10

【0026】

本発明の抗体とその断片の標的である、IL-7受容体の鎖としてのCD127を発現するヒト細胞は、主にTリンパ球であり、より正確には、ナイーブT細胞及びメモリーT細胞を含むエフェクターTリンパ球の亜集団であるが、制御性T細胞、特に天然休止Tregではない。メモリーT細胞は、抗原プライミングにより発生し、二次エフェクター及びメモリー細胞への再活性化及び分化の際にリコール増殖(recall proliferation)を受ける能力を含む、これらの機能的特性によって主に定義される。同様に、(IL7-R鎖との結合構造としての)標的TSLP受容体は、Tヘルパーリンパ球、B細胞及び樹状細胞分化の調節を支配する。

【0027】

本発明の実施態様によれば、「T細胞に対する細胞傷害活性」又は細胞傷害性を有する抗体(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、その結果、投与されると、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、相当な程度まで当該亜集団を改変せず、これによって、Treg細胞がこれらの機能を果たすことができる。

20

【0028】

これに関連して、特定の実施態様において、エフェクターT(Teff)細胞に対する制御性T(Treg)細胞の割合は、本発明の細胞傷害性抗体の投与後に上昇することが観察された。特定の実施態様において、本発明の細胞傷害性抗体は、前述の割合を約10%以上、上げることができる。特定の実施態様において、Teffに対するTregの割合は約20%である。

30

【0029】

本発明の特定の実施態様によれば、細胞傷害性抗体は、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)を示す。

【0030】

ADCC特性は、実施例に記載されている試験などのADCCアッセイで評価することができる。抗体がラット抗体である場合、ADCCアッセイで使用す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。抗体がヒト化される場合、ADCCアッセイは、ヒトLAK細胞上で行うことができる。

【0031】

本発明の特定の実施態様によれば、本発明の抗体のADCC活性は、少なくとも10 ng/mlの抗体の濃度により達成される。ADCCは、キメラ抗体を用いて、すなわち、定常断片がヒトFc断片である抗体(Fc)を用いてアッセイすることができる。

40

【0032】

抗体がその抗原との結合によりADCC活性を有する場合、Fc断片は、このような活性を観察する際に有用であり得る。

【0033】

この点に関して、本発明は、特にMD707-3抗体又はMD707-3由来の抗体、具体的には、組換えヒトCD127を発現する標的細胞を用いて評価した場合に少なくとも80%のレベルのADCC活性を有した、ヒトFc断片を有するキメラMD707-3抗体を提供する。

【0034】

50

別の実施態様によれば、本発明のフレーム内にある細胞傷害性抗体又はその機能的断片は、インターロイキン7 (IL-7) 対してアンタゴニスト特性を更に有し、これによって、IL-7がCD127陽性細胞上のCD127に接近すること、すなわち、IL-7がCD127陽性細胞上のCD127に結合することに拮抗する。

【0035】

「アンタゴニスト特性」とは、IL-7R を標的とする本発明の抗体又はその機能的断片が、その結合パートナーIL-7、特にヒトIL-7のために、CD127細胞、特にヒトエフェクタ-T細胞、具体的にはヒトメモリーT細胞上に発現したIL-7受容体の接近を防止する効果を有することを意味する。IL-7の結合への拮抗により、本発明の抗体又はその機能的断片は、IL-7依存性胸腺T細胞の発生を防止することによってリンパ球減少をもたらす。本発明の抗体又はその機能的断片のアンタゴニスト特性を測定するための試験は、実施例に記載されている。10

【0036】

CD127陽性細胞に対する細胞傷害性及びアンタゴニスト特性をともに有する本発明の抗体は、エフェクターT細胞、特にメモリーT細胞の枯渇に対しこれらの特性の累積効果を発揮することが可能であり、これによって、強力な枯渇 (CD127+細胞のプールの消耗) が可能になり、また、標的T細胞の数の減少に対応する。

【0037】

本発明の別の実施態様において、抗体又はその機能的断片は、そのIL-7R 鎮を介してTSLP受容体に結合する。その結果、本発明の抗体又は抗体の機能的断片は、T細胞及びB細胞分化の改善により、TSLP阻害を実行し、特に、一部の自己免疫疾患及び喘息においてみられる、いわゆるTH-2分化に影響を与える。20

【0038】

本発明の抗体又はその機能的断片は、ヒトT細胞によって発現するCD127である分子に対して特に有利に発生し、恐らく、天然ポリペプチド又は組換え分子の形態下で免疫化から発生する。

【0039】

免疫化は、下記の実施例に開示されているプロトコールに従って行うことができる。すなわち、組換えCD127 Fcキメラ (10975-H03H, Sino Biological社(Beijing, China)製) を使用し、Louvain大学で利用可能なLOU/C IgkIA系統ラットなどのラットを免疫した。ハイブリドーマを、先に記載されている手順 (Chassouxらの文献、Immunology 1988 65 623-628) に従い、脾臓単核細胞を、LOUラット免疫細胞腫IR983F、非分泌及びアザグアニン耐性細胞系と融合させることによって得た。ハイブリドーマを、まず、分泌されたモノクローナル抗体が組換えCD127分子に結合する能力に従ってスクリーニングした (CD127 Fc キメラ ; 10975-H03H, Sino Biological社(Beijing, China)製)。次いで、ハイブリドーマを、これらモノクローナル抗体がヒトT細胞によって発現させたCD127に結合する能力についてスクリーニングした。30

【0040】

本発明の特定の実施態様によれば、細胞傷害性抗体又はその機能的断片は、

a) No. I-4531でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-1により產生された抗体若しくはその機能的断片、又は、40

b) a)の抗体をコードするNo. I-4531でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-1において発現させたRNAに対応するcDNAと同一の核酸分子により組み換えられた組換え真核細胞によって発現する、抗体若しくはその機能的断片、並びに、

c) その可変重鎖(VH)及び/又はその可変軽鎖(VL)において改変されたCDR領域を有する、特に、場合により、VH若しくはVLのうちのいずれか若しくは両方に少なくとも1つの同一のCDR3、CDR2及び/又はCDR1領域を保持する、及び/又は改変されたフレームワーク(FR)及び/又は定常(CH)領域を有する、a)又はb)に対して改変された抗体であって、前述の改変された抗体が、そのアミノ酸配列の全長において、a)又はb)の抗体と、70%を超える同一性、特に、75%を超える、80%を超える、85%を超える、90%を超える、95%を超える若50

しくは最大99%の同一性を有する、抗体若しくはその機能的断片の群から選択される。

【0041】

本発明の別の実施態様において、抗体又はその機能的断片は、IL-7に対して細胞傷害性及びアンタゴニストであり、

a) No. I-4532でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-3、若しくはNo. I-4533でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-13により產生された抗体若しくはその機能的断片、又は

b) a)の抗体をコードする、No. I-4532でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-3若しくはNo. I-4533でCNCMに寄託されたハイブリドーマMD707-13において発現させたRNAに対応するcDNAと同一の核酸分子により組み換えられた組換え真核細胞によって発現する抗体若しくはその機能的断片、並びに、10

c)その可変重鎖(VH)及び/又はその可変軽鎖(VL)において改変されたCDR領域を有する、特に、場合により、VH若しくはVLのうちのいずれか若しくは両方に少なくとも1つの同一のCDR3、CDR2及び/又はCDR1領域を保持する、及び/又は改変されたフレームワーク(FR)及び/又は定常(CH)領域を有する、a)又はb)に対して改変された抗体であって、前述の改変された抗体が、そのアミノ酸配列の全長において、a)又はb)の抗体と、70%を超える同一性、特に、75%を超える、80%を超える、85%を超える、90%を超える、95%を超える若しくは最大99%の同一性を有する、抗体若しくはその機能的断片の群から選択される。No. I-4531、I-4532及びI-4533でのハイブリドーマの寄託は、ブダペスト条約に基づいて、CN
CM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Paris, France)で2011年
9月28日になされた。20

【0042】

本発明に係る「ハイブリドーマ細胞」は、選択された免疫原、及び得られた融合細胞に不死性を提供することが可能な腫瘍細胞である融合パートナーをあらかじめ免疫した動物由來の抗体產生細胞(B細胞)の融合から発生させた細胞である。腫瘍細胞及び抗体產生細胞(脾細胞などのB細胞)は、同じ由来のものであってもよく、真核細胞、特に、同じ動物の哺乳動物細胞である。または、これらは異なる由来であってもよく、そのため、ヘテロハイブリドーマを発生させ得る。LOUラット免疫細胞腫IR983Fなどの腫瘍細胞、非分泌及びアザグアニン耐性系は、製造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、免疫グロブリンを产生することができない細胞の中から選択される。組換え細胞における発現による抗体の製造のための以下の頁に記載されているものなどのADCCを促進するのに適した他の細胞を、ラット免疫細胞腫の代わりに用いてもよい。かかる細胞は、低いフコシル化能を有するか又はこれを有しない細胞であることが有利である。30

【0043】

本発明を実施するのに適したハイブリドーマの製造は、従来法によって行われる。実施態様は、特定の開示されている特徴が、融合パートナーとして使用される他の細胞に適応できる、本出願の実施例に詳細に記載されている。

【0044】

抗体又はその機能的断片の製造に有用な本発明の具体的なハイブリドーマは、2011年9月28日にNo. I-4531でCNCMに寄託されたMD707-1、又は2011年9月28日にNo. I-4532でCNCMに寄託されたMD707-3、又は2011年9月28日にNo. I-4533でCNCMに寄託されたMD707-13である。40

【0045】

寄託されたハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体の特性に関し、本発明によって提供される教示を考慮すると、本発明の抗体を発現するために、当業者は、ハイブリドーマにより分泌され、その結合及び中和特性を有した構造を有する抗体の選択によって、発現ライブラリ及び発現系などの代替技術を用いることができる。cDNAライブラリは、本発明のハイブリドーマで発現させたRNA、及び選択して発現させた適切な配列から十分に製造することができる。50

【0046】

抗体の機能的断片は、特にパパイン若しくはペプシン消化を含む周知の技術に従い酵素消化を用いて、又はいずれかの適切な切断法を用いて、抗体から出発して得ることができる。または、これらは、前述の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改変された宿主細胞において発現させるか、又は合成、特に化学合成することができる。

【0047】

したがって、改変された抗体を含む本発明の抗体、並びに抗体の機能的断片はまた、例えばSambrookらの文献（分子クローニング、実験室マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual), 第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989))、及び最新版）に記載されているような古典的遺伝子工学技術によっても製造することができる。10

【0048】

本発明によれば、IL-7Raタンパク質への「結合」とは、抗原 抗体型の相互作用をいい、そして、抗体又はその機能的断片の「特異的結合」特性とは、抗体又はその機能的断片が、IL-7Raタンパク質に結合し、さらに、他のタンパク質（例えば、一般的なサイトカイン受容体 鎖）に対し顕著に弱い親和性により結合するか又は結合しないことを意味する。結合能は、実施例に開示されている試験に従ってアッセイすることができ、具体的には、ELISA又はウェスタンプロット分析によってアッセイすることができる。

【0049】

特定の実施態様において、本発明に係る抗体又はその機能的断片は、次に示すポリペプチドのうちの少なくとも1つの抗原結合部位に含まれる。20

【0050】

1) MD707-1

a) 可変重鎖において、

- (i) 配列番号6のアミノ酸配列を有するVHCDR 1、
- (ii) 配列番号8のアミノ酸配列を有するVHCDR 2、
- (iii) 配列番号10のアミノ酸配列を有するVHCDR 3、若しくは、
- (iv) 配列番号2の位置19から位置141のアミノ酸配列を有するVH、及び／又は、

b) 可変軽鎖において、

- (i) 配列番号12のアミノ酸配列を有するVLCDR 1、
 - (ii) 配列番号14のアミノ酸配列を有するVLCDR 2、
 - (iii) 配列番号16のアミノ酸配列を有するVLCDR 3、若しくは、
 - (iv) 配列番号4の位置21から位置133のアミノ酸配列を有するVL。
- 30

【0051】

2) MD707-3

a) 可変重鎖において、

- (i) 配列番号22のアミノ酸配列を有するVHCDR 1、
 - (ii) 配列番号24のアミノ酸配列を有するVHCDR 2、
 - (iii) 配列番号26のアミノ酸配列を有するVHCDR 3、若しくは、
 - (iv) 配列番号18の位置19から位置141のアミノ酸配列を有するVH、及び／又は、
- 40

b) 可変軽鎖において、

- (i) 配列番号28のアミノ酸配列を有するVLCDR 1、
- (ii) 配列番号30のアミノ酸配列を有するVLCDR 2、
- (iii) 配列番号32のアミノ酸配列を有するVLCDR 3、若しくは、
- (iv) 配列番号20の位置21から位置133のアミノ酸配列を有するVL。

【0052】

3) MD707-13

a) 可変重鎖において、

- (i) 配列番号38のアミノ酸配列を有するVHCDR 1、

10

20

30

40

50

- (ii)配列番号40のアミノ酸配列を有するVHCDR 2、
 - (iii)配列番号42のアミノ酸配列を有するVHCDR 3、若しくは、
 - (iv)配列番号34の位置22から位置135のアミノ酸配列を有するVH、及び／又は、
- b)可変鎖鎖において、
- (i)配列番号44のアミノ酸配列を有するVLCDR 1、
 - (ii)配列番号46のアミノ酸配列を有するVLCDR 2、
 - (iii)配列番号48のアミノ酸配列を有するVLCDR 3、若しくは、
 - (iv)配列番号36の位置22から位置129のアミノ酸配列を有するVL。

【0053】

また、本発明は、シグナルペプチドを包含し、配列番号2、配列番号4、配列番号18、配列番号20、配列番号34及び配列番号36にそれぞれ対応する、VH及びVLポリペプチドの変形にも関する。 10

【0054】

ヒト患者への投与のために本発明の抗体又はその機能的断片を使用することを目的として、特に、前述の抗体に対する受容宿主又は患者の免疫反応を低下させるために、実施例に示されているものなどの非靈長類抗体である本発明の抗体から、ヒト化モノクローナル抗体若しくはキメラモノクローナル抗体及び／又は脱免疫抗体を誘導することは有益であると考えられる。これらの変異体抗体の機能的断片は、ヒト化、キメラ又は脱免疫化変異体としても得ることができる。 20

【0055】

ヒト化抗体である抗体又はその機能的断片は、標準的な定義及び数体系に従って、ヒト抗体において対応する位置を有するヒトアミノ酸残基が、本発明の非ヒト抗体の可変鎖の定常領域、すなわち、VH及び／又はVLのフレームワーク領域中に存在するアミノ酸残基で置換されることにより誘導され、その置換レベルは、前述の定常領域、すなわちフレームワークにおいて1%～20%、特に1%～18%の残基である。前述の定常領域には、4本鎖抗体で画定されたFR領域が含まれる。 20

【0056】

本発明に係る改変された抗体の特定の例は、キメラ抗体、ヒト化抗体及び／又は脱免疫抗体を包含する。 30

【0057】

特定の改変された抗体は、CDR領域においてアミノ酸残基が修飾され、前述の修飾は、結果として、非ヒト抗体の可変領域中のT細胞エピトープの喪失により脱免疫化が生じる。脱免疫化は、抗体可変領域のT細胞エピトープを決定した後に、特に、インシリコ予測、続いて、機能的T細胞エピトープを排除する抗体の可変鎖配列における点突然変異によって行うことができる。本発明の好適な実施態様において、CDR領域、特にCDR3領域の改変は、例えば、HLAクラスII／ペプチド複合体に対するT細胞受容体の結合親和性を減少させるために、人体への投与の目的で脱免疫化するのに必要な程度まで制限されている。特定の実施態様において、VH及び／又はVLのCDR3領域は改変されていない。別の実施態様において、FR領域及び／又はCH領域も改変され、特にヒト化されている。 40

【0058】

したがって、本発明のフレームワーク内の抗体は、上に定義された特徴に基づく抗体を包含し、特に、標準的な定義及び数体系に従って、ヒト抗体において対応する位置を有するヒトアミノ酸残基が、本発明の抗体の定常領域中に存在するアミノ酸残基で置換されることによって得られるヒト化抗体であり、その置換レベルは、前述のフレームワーク領域において1%～20%、特に1%～18%の残基であり、また、脱免疫化のために、CDR領域のうちの一部又はすべてに適切に置換されている。上述したように、ヒト化は、主に、元の抗体のフレームワーク領域を標的とする。場合によっては、ヒト化は、代替的に又はさらに、CDR領域、特に、CDR1及び／又はCDR2領域に関するものであってもよい。

【0059】

ここで、ヒト化は、非ヒト抗体若しくはその断片の配列と最も高い配列同一性を示す、 50

ヒト生殖系列軽鎖又は重鎖フレームワークを考慮し、対応するヒト残基に適合させるために、前述の非ヒト抗体又はその断片において置換された、アミノ酸残基、特に抗体表面で暴露した残基を選択して、達成することができる。特定の実施態様において、FRLのうちの一部又はすべて、及び／又はFRHのうちの一部又はすべては、完全にヒトであり、すなわち、ヒトフレームワーク配列に特有である。別の実施態様において、FR領域のうちの一部又はすべてにおいて選択された残基は置換されている。

【0060】

また、抗体をヒト化する方法も、当該技術分野で周知であり、例えば、Routledgeらの文献（ヒトにおける予防及び治療用途の抗体分子のタンパク質工学（Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man）（Academic Titles, Nottingham, England (1993)），13-44中の「治療用抗体の再形成（Reshaping antibodies for therapy）」）、又はRoguskaらの文献（Protein Engineering, 9(10), 895-904, (1996)）によって記載されている。これらの方法も、scFvなどの抗原結合断片に適用することができる。10

【0061】

一例として、「リサーフェシング(resurfacing)」として知られている方法には、ヒトの1組の表面残基を有する非ヒト抗体の可変領域のフレームワークにおいて1組の表面残基を置換することがあるが、CDRグラフト化として知られている方法には、CDRを、非ヒト抗体からヒト抗体のフレームワーク領域へ転写させことがある。CDRグラフト化は、一般に、結合親和性を最適化するために、ヒトフレームワークの一部の残基の置換がある、フレームワーク最適化によってなされる。20

【0062】

フレームワーク最適化の手段は、近年、コンビナトリアルライブラリを用いることによって簡素化されている（Rosokらの文献：J. Biol. Chem. 271, 22611-22618, 1996；Bacaらの文献：J. Biol. Chem. 272, 10678-10684, 1997）。

【0063】

抗体のヒト化に利用可能な別の近年の戦略は、軽鎖及び重鎖の元の非ヒトCDR3配列のみを保持し、他の配列は、ナイーブヒトV遺伝子ライブラリから選択される（Raderらの文献：Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 8910-8915, 1998）。

【0064】

本発明の別の実施態様によれば、抗体は改変され、その結果、異なる抗体のアミノ酸残基のドメイン又は鎖を含むキメラ抗体、具体的には、異なる動物種から得られ、機能的抗体とともに組み合わされた抗体となる。30

【0065】

本発明のキメラ、ヒト化及び／又は脱免疫抗体は、非改変抗体のように、いずれかの分類の免疫グロブリンに属し得る。これらは、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4などのIgGクラスのサブクラスに属していることが好ましい。

【0066】

抗体の可変領域を、適當なリンカー又は別の抗体の定常領域と組み合わせることによって組換え抗原結合断片又はキメラ抗体を製造するための方法は、当該技術分野において周知である。40

【0067】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体であると考えられ、これらの抗体の組成物が、抗原結合特異性、したがって可変領域組成の点で、均質で、特に同一であることを意味する。したがって、抗体は、ハイブリドーマ技術に代わる技術によって得られる場合であっても、モノクローナルとして適格である。

【0068】

別の実施態様によれば、本発明は、本明細書に提供される定義のいずれかによる抗体又はその機能的断片を含むキメラ分子にも関し、前述のモノクローナル抗体又はその機能的断片は、機能的に異なる分子に結合する。本発明のキメラ分子は、抗体若しくは機能的断50

片の安定性及び／又は半減期の改善のために、融合キメラタンパク質、又は、化学基若しくは生物基(biological group)と又は分子(PEGポリマー若しくは別の保護基、若しくはインビボにおけるプロテアーゼ切断に対する保護に適した分子など)との共有結合、グラフト化、化学結合を含む適切な形態の結合から生じた結合体のいずれかであってもよい。同様の技術を用いて、特に化学結合又はグラフト化によって、キメラ分子を、生物活性分子により製造することができ、前述の活性分子は、例えば、毒素、具体的には、シュードモナス外毒素A(Risbergらの文献:PLoS One. 2011;6(9):e24012)、植物毒素リシンのA鎖(Van Oosterhoutらの文献:Int J Pharm. 2001年6月19日;221(1-2):175-86.)、又はサポリン毒素(Flavellらの文献:Br J Haematol. 2006 Jul;134(2):157-70)、特に治療有効成分、人体の特定の細胞若しくは組織に対する抗体若しくは機能的断片を標的とするに適したベクター(特にタンパク質ベクターを含む。)の中から選択されるか、又は、キメラ分子は、特に抗体の断片が使用される場合、標識若しくはリンカーに結合することができる。

10

【0069】

抗体又はその機能的断片のPEG化が、特に治療用途において、宿主への活性物質の送達条件を改善する場合、PEG化は、特定の関心を惹く態様である。PEG化は、抗体又はその機能的断片の認識部位との干渉を防止する特異的な部位であり、高分子量PEGにより行うことができる。PEG化は、抗体若しくはその機能的断片の配列中に存在する遊離システイン残基によってか、又は抗体若しくはその機能的断片のアミノ酸配列中の遊離システイン残基の添加によって達成することができる。

20

【0070】

また、本発明は、本明細書に定義する抗体若しくはその機能的断片を含む組成物であって、抗体若しくはその機能的断片が、抗体若しくはその機能的断片の均質な集団であるか、又はモノクローナル抗体若しくはその機能的断片である、組成物にも関する。

【0071】

さらに、本発明は、本明細書に開示されている抗体を含む組成物若しくは化合物の集合体、又は本発明のキメラ分子にも関し、これは、

30

a) CD127陽性細胞に対して、特にCD127+ T細胞に対して細胞傷害活性を有し、ヒトIL-7に対してアンタゴニスト特性も有する抗体、又は、

b) CD127陽性細胞に対して、特にCD127+ T細胞に対して細胞傷害活性を有する抗体若しくはその機能的断片の集団、及びヒトIL-7に対してアンタゴニスト特性を有する抗体若しくはその機能的断片の集団であって、これらの抗体の集団が、混合物中で組み合わされるか、又は分離され、後者の選択では、併用投与若しくは連続投与のために製剤される集団を含む。

40

【0072】

特に本発明の抗体を参照することによってされる定義は、同様に、技術的に明らかに関連性がない場合を除き、その機能的断片にも適用される。また、これらの定義は、これらの抗体若しくはその機能的断片を含むか、又は、本出願に開示されているように、これらの抗体から誘導された分子(特に、キメラ抗体若しくはキメラ分子)又は組成物にも適用される。さらに、本発明の抗体の機能的断片が、概念又は設計の観点から当該抗体に由来するが、必ずしも製品のような抗体に頼らずに、種々の技術によって製造できることが明示されている。

【0073】

また、本発明は、本明細書で提供される定義のいずれかによる抗体をコードする核酸分子にも関する。

【0074】

本発明の抗体又はその機能的断片の製造に適したかかる核酸は、特に、次に示す群から選択される。

【0075】

1) MD707-1

50

i. 配列番号1の配列を有するVH領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置55から位置423のその断片、

ii. 配列番号3の配列を有するVL領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置61から位置399のその断片、

iii. 配列番号5の配列を有するVHCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

iv. 配列番号7の配列を有するVHCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

v. 配列番号9の配列を有するVHCDR3領域をコードするポリヌクレオチド、

vi. 配列番号11の配列を有するVLCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

vii. 配列番号13の配列を有するVLCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

viii. 配列番号15の配列を有するVLCDR3領域をコードするポリヌクレオチド。

10

【0076】

2) MD707-3

i. 配列番号17の配列を有するVH領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置55から位置423のその断片、

ii. 配列番号19の配列を有するVL領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置61から位置399のその断片、

iii. 配列番号21の配列を有するVHCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

iv. 配列番号23の配列を有するVHCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

v. 配列番号25の配列を有するVHCDR3領域をコードするポリヌクレオチド、

vi. 配列番号27の配列を有するVLCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

vii. 配列番号29の配列を有するVLCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

viii. 配列番号31の配列を有するVLCDR3領域をコードするポリヌクレオチド。

20

【0077】

3) MD707-13

i. 配列番号33の配列を有するVH領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置64から位置405のその断片、

ii. 配列番号35の配列を有するVL領域をコードするポリヌクレオチド、又は位置67から位置387のその断片、

iii. 配列番号37の配列を有するVHCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

iv. 配列番号39の配列を有するVHCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

v. 配列番号41の配列を有するVHCDR3領域をコードするポリヌクレオチド、

vi. 配列番号43の配列を有するVLCDR1領域をコードするポリヌクレオチド、

vii. 配列番号45の配列を有するVLCDR2領域をコードするポリヌクレオチド、

viii. 配列番号47の配列を有するVLCDR3領域をコードするポリヌクレオチド。

30

【0078】

本発明の特定の実施態様によれば、ポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45及び／又は配列番号47の配列に対して修飾されたヌクレオチドを有し、

40

a) それぞれ、配列番号2のアミノ酸配列若しくは位置19から位置141のその断片、配列番号4のアミノ酸配列若しくは位置21から位置133のその断片、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18のアミノ酸配列若しくは位置19から位置141のその断片、配列番号20のアミノ酸配列若しくは位置21から位置133のその断片、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34のアミノ酸配列若しくは位置22から位置135のその断片、配列番号36のアミノ酸配列若しくは位置22から位置129のその断片、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46及び／又は配列番号48のアミノ酸配列を有するポリペプチドのいずれかをコードし、及び／又は、

b) 配列番号1の配列若しくは位置55から位置423のその断片、配列番号3の配列若しくは

50

位置61から位置399のその断片、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17の配列若しくは位置55から位置423のその断片、配列番号19の配列若しくは位置61から位置399のその断片、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33の配列若しくは位置64から位置405のその断片、配列番号35の配列若しくは位置67から位置387のその断片、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45及び／又は配列番号47の配列を有するポリヌクレオチドのうちの1つと、これらの全長に対して、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、及び最も好ましくは少なくとも98%若しくは少なくとも99%の同一性を有する。

【0079】

10

本発明の別のポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号31、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45及び／又は配列番号47の配列を有するポリヌクレオチド配列の断片であり、それぞれ、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46及び／又は配列番号48のアミノ酸配列を有するポリペプチドの機能的断片をコードする。

20

【0080】

本発明のポリヌクレオチドは、特に宿主細胞中での発現のために、配列を最適化することができる。本分野における最適化技術は、従来技術である。

【0081】

細胞の產生から本発明の抗体を回収する目的で、ポリヌクレオチドは、抗体鎖をコードするヌクレオチド配列から上流に、発現された抗体の分泌のためのシグナルペプチドをコードする配列を含み得る。

【0082】

上述のポリヌクレオチド断片は、少なくとも9つのヌクレオチドの配列を有し、これらの起源の配列よりも短いことが有利である。

30

【0083】

特定の実施態様によれば、本発明のポリヌクレオチドは、本発明に係る抗体若しくはその機能的断片をコードする配列、本明細書に開示されているものと同じものを含むキメラ分子に加えて、產生細胞で発現させる場合、前述のタンパク質の分泌を可能にするシグナルペプチドをコードする配列を含むことが有利であり得る。また、これらは、前述したタンパク質の検出及び／又は精製を容易にする1以上のマーカーペプチドをコードする1以上の配列も含み得る。

【0084】

また、本発明は、本明細書に開示されているポリヌクレオチドのクローニング及び／又は発現のためのベクターにも関し、特に、哺乳動物細胞におけるクローニング及び／又は発現に適したプラスミドであり、このプラスミドは、転写及び発現のための調節配列を含む。

40

【0085】

さらに、本発明は、本発明のポリヌクレオチドにより組み換えられた細胞又は細胞系、特に、哺乳動物又は鳥類細胞若しくは細胞系に関する。例えば、遺伝的に改変されたチャイニーズハムスター卵巣細胞は、全フコシル化を減少させる。実際、コアフコシル化を欠く抗体は、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)を有意に高めることを示す(von Horstetnらの文献：Glycobiology. 2010 Dec;20(12):1607-18)。別の例は、低フコシル化特性を生来有するEB66細胞系である(Olivierらの文献：MAbs. 2010年7月16日;2(4))。

【0086】

50

したがって、本発明は、抗体又はその機能的断片を製造する方法にも関し、この方法は、

a) 動物、特にヒトIL-7受容体のヒト鎖を有する哺乳動物を免疫した後にハイブリドーマを得ること、及び、必要に応じて、同じ免疫原により前述の動物を増強させ、免疫化に応答する動物から脾臓又はリンパ節細胞を回収し、前述の細胞を腫瘍細胞と融合させモノクローナル抗体を単離することと、

b) 抗体の回収が可能な条件下で、EB66鳥類細胞などの低いフコシル化能を提示するか又はフコシル化能を提示しない細胞の組換え形態において、かかる抗体をコードする遺伝子を発現させること、

c) ヒトIL-7受容体の鎖に対して所望の結合親和性を有した抗体を回収することと、を含む。

【0087】

本発明の別の目的は、本発明に係る抗体若しくはその機能的断片又はキメラ分子とともに医薬用ビヒクルを含む医薬組成物であり、前述の医薬組成物は、必要に応じて、別の有効成分を更に含む。

【0088】

また、本発明は、ヒト患者に投与する場合、ヒトCD127陽性細胞の生存若しくは増殖、具体的にはヒトCD127陽性エフェクター細胞、特にCD127+メモリーT細胞の生存若しくは増殖、特にCD127+及びCD8+メモリーT細胞、又はCD127+及びCD4+メモリーT細胞を制御するのに適した製剤中に、有効成分として、本明細書に提供される定義による抗体若しくはその機能的断片又はキメラ分子、又は医薬組成物を含む、組成物にも関する。

【0089】

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上で免疫調節治療効果を有する、付加的な化合物を更に含み得る。例示の目的において、関心対象の免疫調節剤は、抗CD3、抗ICOS若しくは抗CD28抗体又は組換えタンパク質、又はCTLA4Ig若しくは抗CD40抗体などの補助細胞を標的とする抗体などのT細胞を標的とする他のモノクローナル抗体である。

【0090】

また、本発明は、併用して有効成分としてか又はその必要のある患者の追加治療法に使用される、本明細書に定義するか又は示す抗体若しくはその機能的断片又はキメラ分子にも関する。

【0091】

本発明に係る抗体若しくはその機能的断片又はキメラ分子、本明細書に定義する医薬組成物若しくは組成物は、具体的には、免疫応答、特にメモリーT細胞応答による影響を受けた病態を治療するためのヒト患者での使用に提案されている。したがって、本発明者らは、本発明に係る抗体若しくはその機能的断片又はキメラ分子、本明細書に定義する医薬組成物若しくは組成物が、臓器若しくは組織移植拒絶の予防、又は自己免疫疾患若しくはアレルギー性疾患の治療、又はCD127+細胞に関連する乳癌などの癌の治療、又はセザールリンパ腫などのT細胞皮膚リンパ腫の治療、又はIL7-R/TSPL経路の獲得型突然変異(gain-of-mutation)による急性リンパ芽球性白血病の治療に使用することを提案した。また、TSPLRと相互作用させることによって、本発明の抗体又はその機能的断片は、喘息などのアレルギー反応を阻害することもできる。

【0092】

「治療」又は「治療的処置」とは、投与を行う段階が、IL-7経路に関連する障害、すなわち、CD127陽性細胞の活性化若しくは増殖に関与する障害に罹患している必要のある動物又はヒト患者の臨床状態を改善させることを意味する。かかる治療は、IL-7若しくはTSPL経路に関連した障害、すなわち、CD127陽性細胞の活性化若しくは増殖に関与した障害に関連する症状を排除又は低下させることにより、動物又はヒト患者の臨床状態を改善させること、及び／又は、好適な実施態様において、健康の回復を目的とする。

【0093】

10

20

30

40

50

本発明の更なる特徴及び特性は、次に示す実施例及び図面から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0094】

図面の説明

【図1】ナイーブT細胞及びメモリーT細胞とMD707の選択的な枯渇。

【0095】

【図2】5 µg/mlの組換えヒトIL-7受容体でコーティングされたプレート上のラット抗ヒトCD127抗体のELISAプロファイル。

【0096】

【図3】ヒト末梢血単核細胞(PBMC)、ヒヒPBMC、マカク(macaque)PBMC及びラット脾臓細胞におけるフローサイトメトリにより分析したラット抗ヒトCD127抗体の交差反応性。MFI:蛍光強度中央値。abissa上の座標は、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 である。
10

【0097】

【図4】エフェクター(E)細胞としてのラットリンホカイン活性化キラー(LAK)細胞、及び標的(T)細胞としての⁵¹Cr標識ヒトリンパ球を、種々の比:E:T=30:1()、E:T=10:1()、E:T=3:1()及びE:T=1:1()で、ともに4時間インキュベーション後のラット抗ヒトCD127抗体の抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)。特異的細胞傷害性の割合を、⁵¹Cr放出によって決定した。
5

【0098】

【図5】ラット抗ヒトCD127抗体によるIL-7誘導増殖の阻害。ヒトリンパ球を、100 UI/ml()、50 UI/ml()又は10 UI/ml()で、OKT3コーティングプレート(1 µg/ml)、可溶性組換えヒトIL-7タンパク質(rhIL-7; Sino Biologicals社(Beijing, China)製; 標準10975-H08H)上で3日間、抗体とともにインキュベートした。3H-チミジン(1 µCi/ウェル)を導入することによって、インキュベーションの最後の8時間で増殖を測定した。rhIL-7を含むOKT3コーティングプレート上の抗CD127抗体のない状態でインキュベートしたヒトT細胞の増殖は、約 10^5 計数毎分(counts per minutes) (cpm)であった。
20

【0099】

【図6】MD707-1 (A)、MD707-3 (B)及びMD707-13 (C)のVH及びVL可変領域のアミノ酸及びヌクレオチド配列。それぞれの可変断片にシグナルペプチドをコードする核酸配列に、下線を付している。MD707-1、MD707-3及びMD707-13のそれぞれのVH及びVLのCDR1、CDR2及びCDR3領域のそれぞれのアミノ酸配列を、配列番号として開示する配列に応じて下線を付している。したがって、これらのCDR配列をコードする核酸配列は、図中の下線を付したアミノ酸配列に沿って配置されている。
30

【0100】

【図7】8週齢の雄Balb/cマウスに、21日間、1日おきに、抗IL-7R mAb (クローンA7R34)を400 µg腹腔内に(n=5)、又はアイソタイプ対照と同じ計画で(n=5)投与した。マウスを第21日目に屠殺し、血液及び脾臓を、マラッセ(Malassez)装置を備えた従来の顕微鏡による絶対リンパ球計数のために採取した。

【0101】

【図8】8週齢の雄Balb/cマウスに、21日間、1日おきに、抗IL-7R mAb (クローンA7R34)を400 µg腹腔内に(n=5)、又はアイソタイプ対照と同じ計画で(n=5)投与した。マウスを第21日目に屠殺し、腸間膜リンパ節及び脾臓を、フローサイトメトリによるリンパ球表現型決定のために採取した。抗IL-7R 処置マウスは、リンパ節(12.5%に対して21.4%)又は脾臓(11.6%のCD4+ T細胞に対して20.3%)のいずれかにおいて、対照マウスよりも有意に高いCD3+CD4+CD25+FOXP3+制御性T細胞の頻度を有していた($p < 0.01$)。
40

【0102】

【図9】7~9週齢の雄Balb/cマウス(H-2b)を、移植5~10日前に、腹腔内に250 mg/kgのストレプトゾトシンを投与することによって糖尿病にさせた。それぞれのレシピエントに、7~9週齢の雄C57BL/6マウス(H-2d)から分離した約500の胰島を移植した。対照群には処置を行わなかった。処置群に、移植21日前から開始し、1日おきに、抗IL-7R モノクローナ
50

ル抗体（クローンA7R34）を400 μg腹腔内に投与し、これを、移植後90日間継続させた。対照マウスの移植生存率の中央値は21日であった（範囲：14～34日）が、6匹の処置マウス中5匹は、限定のない移植生存（160日超）であった（P=0.0002、ログランク検定）。

【0103】

【図10】非肥満糖尿病(NOD) 6週齢雌マウスを、Charles-River France社から購入し、本発明者らの動物施設で維持した。血糖を、10週齢から毎週測定した。処置群に、8週齢から16週齢まで、8週間、週3回、抗IL-7R モノクローナル抗体（クローンA7R34）を400 μg腹腔内に投与した。対照群に、同じ量及び同じ計画でPBSを投与した。52週齢において、対照マウスの5/8 (62.5%)が糖尿病を発症し、処置マウスの1/8が糖尿病であった（p=0.028、ログランク検定）。

10

【0104】

【図11】ヒトCD127でトランスフェクトさせたマウスBA/F3細胞系に対するキメラクローン3抗ヒトCD127抗体の抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)。エフェクター(E)として使用したヒトNK細胞を、標的(T)細胞として⁵¹Cr標識マウスBA/F3 CD127トランスフェクト細胞の種々の比：E:T=3:1（）、10:1（）、又は30:1（）、及びキメラMD707-3を種々の濃度とともに4時間インキュベートした。特異的細胞傷害性の割合を、⁵¹Cr放出によって決定した。

【0105】

【図12】ヒトT細胞急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)細胞系に対するキメラクローン3抗ヒトCD127抗体の抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)。エフェクター(E)として使用したヒトNK細胞を、標的(T)細胞として2つの異なる⁵¹Cr標識T-ALL細胞系の種々の比：E:T=1:1（）、3:1（）、又は10:1（）、及びキメラMD707-3を種々の濃度とともに4時間インキュベートした。特異的細胞傷害性の割合を、⁵¹Cr放出によって決定した。A/標的細胞は、CD127を過剰発現するDND41 T-ALL細胞系であり、B/標的細胞は、低いレベルのCD127を発現するJurkat T-ALL細胞系であった。

20

【実施例】

【0106】

実施例

I) モノクローナル抗体の調製及び特性評価

1. 新規抗ヒトCD127 Mabの調製及び選択

30

ラットを、組換えhCD127-Ig（免疫グロブリンの定常領域と融合させたhCD127 Sino Biologicals社(Beijing, China)製；標準10975-H03H）により免疫し、モノクローナル抗体を、従来法に従って誘導した。免疫化プロトコールは次に示すとおりであった。組換えCD127 Fcキメラ（10975-H03H、Sino Biologicals社(Beijing, China)製）を使用し、LOU/C IgkIA株のラットを免疫した。50 μgのタンパク質を、完全フロイントアジュバント中で懸濁させ、皮下投与した。20日後、不完全フロイントアジュバント中に懸濁させたタンパク質のリコール注射(recall injection)を行った。別の同様のリコール注射を60日間行い、ブースト注射(boost injection)を、脾臓細胞回収4日前に、100 μgのタンパク質とともに第90日目で行った。

40

【0107】

ハイブリドーマを、先に記載されている手順（Chassouxらの文献：Immunology 1988 65 623-628）に従い、LOUラット免疫細胞腫IR983F、非分泌及びアザグアニン耐性細胞系と脾臓単核細胞を融合させることによって得た。ハイブリドーマを、まず、組換えCD127分子に対する分泌されたモノクローナル抗体の結合能に応じてスクリーニングした（CD127 Fcキメラ；10975-H03H、Sino Biological社(Beijing, China)製）。次いで、ハイブリドーマを、ヒトT細胞により発現させたCD127に対するモノクローナル抗体の結合能についてスクリーニングした。

【0108】

組換えCD127 (Sino Biological社製) の分泌された抗体による認識に基づいて、13のクローンを最初に選択し、これらの中から、さらに、ヒトT細胞によって発現するCD127の認

50

識に基づいて9つのクローンを選択した。

【0109】

抗体を作製し、これらのアイソタイプ並びにこれらの親和性を、BIAcore技術を用いた表面プラズモン共鳴測定により特性評価した（表1）。

【0110】

【表1】

クローン	アイソ タイプ	Biacore		
		会合 (Kon)	解離 (Koff)	Biacore (Kd)
MD707-1	G2 a	3,64E +04	5,78E- 04	1,59 E-08
		2,90E +05	1,81E- 04	6,24 E-10
MD707-3	G2 a	4,89E +04	3,19E- 04	6,52 E-09
		1,72E +04	1,11E- 04	6,54 E-09
MD707-5	G1 G1	2,66E +05	6,78E- 04	2,55 E-09
		3,02E +04	1,29E- 04	4,27 E-09
MD707-9	G1 G1	4,23E +04	3,84E- 05	9,08 E-10
		1,30E +05	2,58E- 04	1,98 E-09
MD707-12	G1	6,82E +04	8,91E- 05	1,31 E-09
MD07-13	G1			

表1：抗CD127 Mabのアイソタイプ及び親和性

【0111】

ELISAによって評価した抗h-CD127 MabのrCD127認識

組換えhCD127 (Sino Biologicals社(Beijing, China)製、標準10975-H08H)を、プラスチック上で固定化し、漸増用量のMabを加え、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抗ラット免疫グロブリン抗体を加え、従来法により明らかにした。結果は、MD707-1、2、3、4、9、13の良好な結合、MD707-5及び12の中程度の結合、並びにMD707-6の弱い結合が明らかになった。

【0112】

抗ヒトCD127 Mabと非ヒト靈長類の交差反応性

表1に示すMabをフローサイトメトリアッセイに使用し、ヒトT細胞と比較した靈長類T細胞上の結合について検討した。ラット由来のMabがラット分子を認識することは想定されなかったので、ラットT細胞を負の対照として使用した。データ(図3)は、試験した全Mabが、靈長類(カニクイザル(Cynomolgus Macaque)及びヒヒ)T細胞を認識することも示す。ラットT細胞は陰性であった。

【0113】

10

20

30

40

50

抗ヒトCD127 Mabの抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)

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Fc受容体（本質的にNK細胞及び活性化リンパ球）を発現するエフェクター免疫細胞のFc依存性リクルートをいい、主にグランザイム／パーフォリン系機構によって標的細胞の死滅が生じ、表1に示すMabをADCCアッセイに使用した。ラット由来（Mabがラット脾細胞から得られたため）のリンホカイン活性化キラー細胞(LAK)を、Mabの存在下で、CD127を発現する標的ヒトT細胞を死滅させるエフェクター細胞として使用した。図4に示すデータは、Mab 7MD07-1、3、6、9及び13がADCCを誘発することを明らかにした。興味深いことに、親和性、結合特性及びADCC特性の間に直接の相関関係はなく、このことは、ADCC特性が結合分析から予測できなかったことを示す。

10

【0114】

抗ヒトCD127 Mabのアンタゴニスト特性

受容体へのリガンドの結合に拮抗する当該受容体に対する所定のMabの能力は、恐らく、受容体にドッキングさせるのにリガンドにより使用されるエピトープを標的とするMabの能力によって異なる。また、標的の構造を改変するMabの能力、したがって、受容体の結合特性を改変するMabの能力によっても異なると考えられた。図5に示すデータは、Mab MD707-1、2、3、4、5、12及び13が、IL-7媒介性T細胞の増殖を妨げることができるが、MD707-6及び9が、限られた範囲でしかIL-7媒介性T細胞の増殖を妨げないことを明らかにした。

20

【0115】

抗ヒトCD127 Mabのヌクレオチド及びアミノ酸配列

RACE PCR法を用いて、MD707クローニングのVH及びVL領域の配列決定をした。簡潔には、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した。第1の35サイクルのPCR反応を、オリゴdTアンカーブライマー及びHerculease酵素（Stratagene社製）を用いて行った。第2の35サイクルのPCRを、入れ子PCRアンカーブライマーを用いて行った。次いで、得られたPCR産物を大腸菌でTAクローニングし、アンピシリンにおいて選択した後、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の配列決定をした。ヌクレオチド配列及び推定アミノ酸配列を図6及び配列表に示す。

30

【0116】

2. T細胞の枯渇における代用抗CD127モノクローナル抗体の活性

代用抗ヒトCD127 Mabは、Teff細胞を枯渇させ、Treg/Teff比を増加させる

抗CD127 MabがどのようにT細胞に影響を与えるかについて説明するために、9週齢の雄Balb/cマウス(H-2b)に、21日間、1日おきに、抗CD127 Mab（マウスCD127に対するクローニングA7R34）を400 μg、腹腔内に投与した。その結果、血液及び脾臓でT細胞の枯渇がみられた（図7）（並びに、リンパ節及び胸腺においてもT細胞の枯渇がみられたが、そのデータは示さない。）。興味深いことに、残存する細胞において、Treg細胞の比は、通常、約10%、最大20%上昇し、このことは、Treg細胞に対するTeff細胞の選択的な枯渇を示した（図8）。

40

【0117】

代用抗ヒトCD127のMabは、臍島移植拒絶を予防する

抗CD127 Mabが同種移植拒絶をどのようにして調節し得るかについて理解するために、7~9週齢の雄Balb/cマウス(H-2b)を、C57BL/6マウス(H-2d)から臍島を移植する5~10日前に、腹腔内に250 mg/kgのストレプトゾトシンを投与することによって糖尿病にさせた。対照マウスの移植生存率の中央値は21日であった（範囲：14~34日）が、6匹の処置マウス中5匹は、限定のない移植生存（160日超）であった（P=0.0002、ログランク検定；図9）。

【0118】

代用抗ヒトCD127 Mabは、NODマウスの糖尿病を予防し、治癒する

抗CD127 Mabが自己免疫疾患をどのようにして調節し得るかについて理解するために、

50

非肥満糖尿病(NOD) 6週齢雌マウスを、8週齢から16週齢まで、8週間、週3回、400 µgの抗IL-7Rモノクローナル抗体（クローニA7R34）を腹腔内に投与して処置した。対照群に、同じ量及び同じ計画でPBSを投与した。図10に示すように、結果は、処置されたマウスのほとんどで糖尿病が予防されるが、対照動物の60%超が、最初の26週齢以内に糖尿病を発症することを実証した。

【0119】

II)キメラ抗CD127抗体のADCC活性

MD707-3抗CD127 Mabにより調製されたキメラ抗体を、元のラット抗体のFc断片をヒトFc断片に置換することによって得た。

【0120】

このキメラ抗体において、エフェクター細胞は、AutoMACS 細胞分類器及び磁気ビーズ（NK単離キット、Miltenyi Biotec社(Bergisch Gladbach ,Germany)製）を使用した負の選択によって末梢血単核細胞から単離された、新しい初代ヒトNK細胞であった。NK細胞を、10% FBS (Life Technologies社(Carlsbad, California)製)、100 IU/mlのペニシリン (Life Technologies社製)、0.1 mg/mlのストレプトマイシン (Life Technologies社製)、2 mMのL-グルタミン (Life Technologies社製) 及び150 IU/mlのヒトIL-2 (Roche社(Basel, Switzerland)製) を添加したRPMI 1640培地 (Life Technologies社製) で、37、5% CO₂で一晩、インキュベートした。

【0121】

標的細胞を、100 µCi (3.7 MBq)の⁵¹Cr (PerkinElmer社製) で、37 で1時間標識し、培養培地で3回洗浄した。標的細胞を、室温で15分間、希釈した抗体、又は賦形剤（培養培地）とともにインキュベートし、10,000細胞を96ウェルU底プレートに置いた。エフェクターT細胞を、示されたE:T(エフェクター：標的)の細胞比 (200 µlの最終容積) で加え、37 で4時間又は18時間、インキュベートした。次いで、上清の全25 µlを回収し、ガンマカウンター (Packard Instrument社製) で計数した。

【0122】

アッセイの結果を図11及び12に開示する。

10

20

【表2】

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)
(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.231 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	International Application No.	
0-3	Applicant's or agent's file reference	B09614A - AD

1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	9
1-2	line	18
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes
1-3-2	Address of depositary institution	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France
1-3-3	Date of deposit	28 September 2011 (28.09.2011)
1-3-4	Accession Number	CNCM I-4531
1-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
2	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
2-1	page	10
2-2	line	3
2-3	Identification of deposit	
2-3-1	Name of depositary institution	CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes
2-3-2	Address of depositary institution	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France
2-3-3	Date of deposit	28 September 2011 (28.09.2011)
2-3-4	Accession Number	CNCM I-4532
2-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

10

20

30

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)
 (This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

3	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
3-1	page	10
3-2	line	4
3-3	Identification of deposit	
3-3-1	Name of depositary institution	CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes
3-3-2	Address of depositary institution	Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France
3-3-3	Date of deposit	28 September 2011 (28.09.2011)
3-3-4	Accession Number	CNCM I-4533
3-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

10

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	

20

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

【図 1】

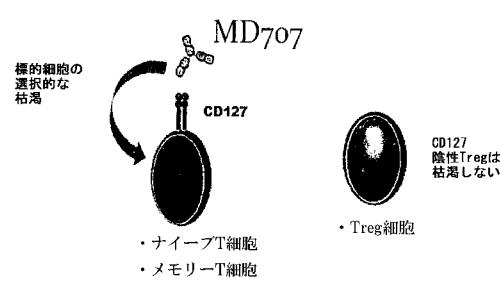


図 1

【図 2】

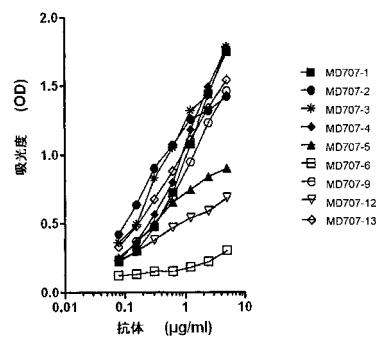
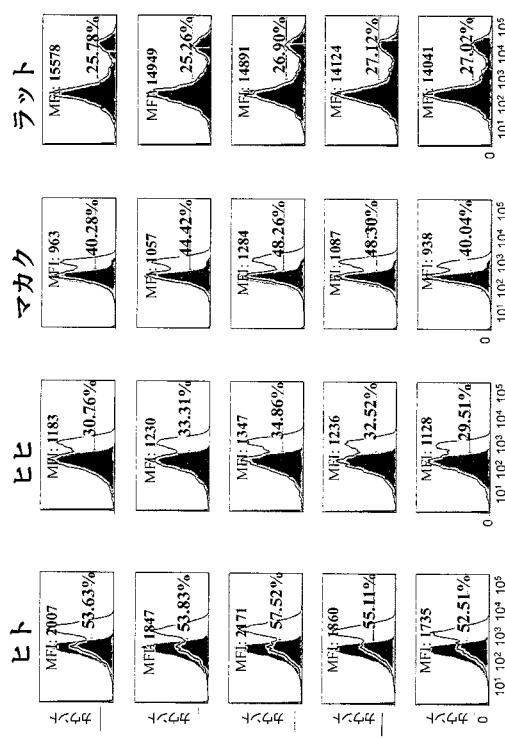


図 2

【図 3 A】



【図 3 B】

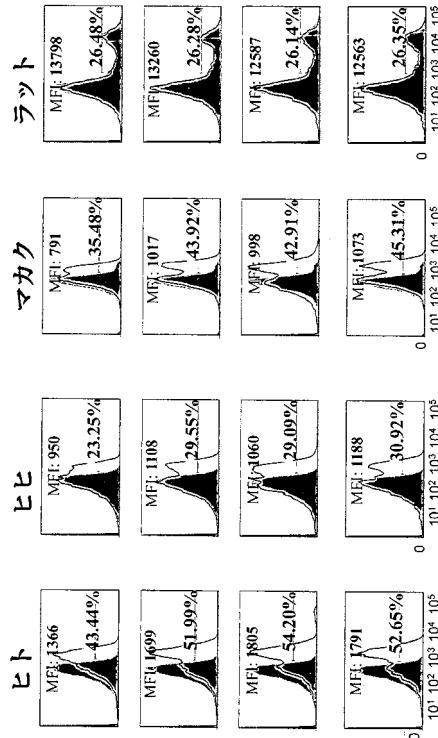


図 3B

【図 4 A】

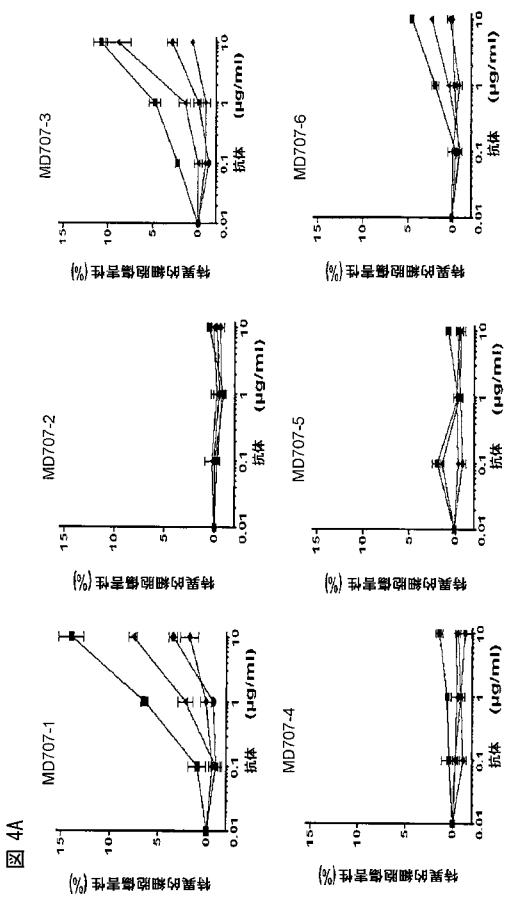


図 4A

【図 4 B】

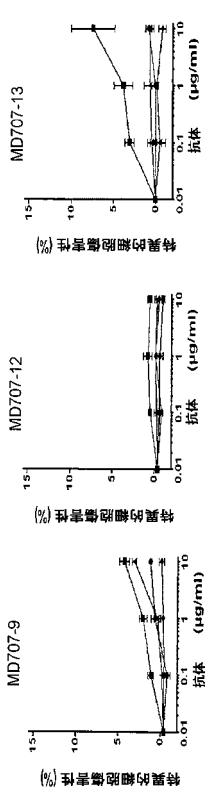


図 4B

【図 5 A】

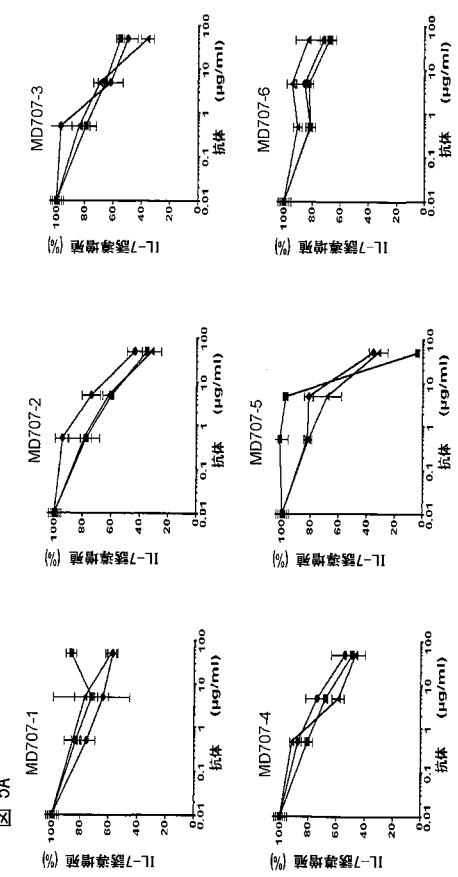


図 5A

【図 5 B】

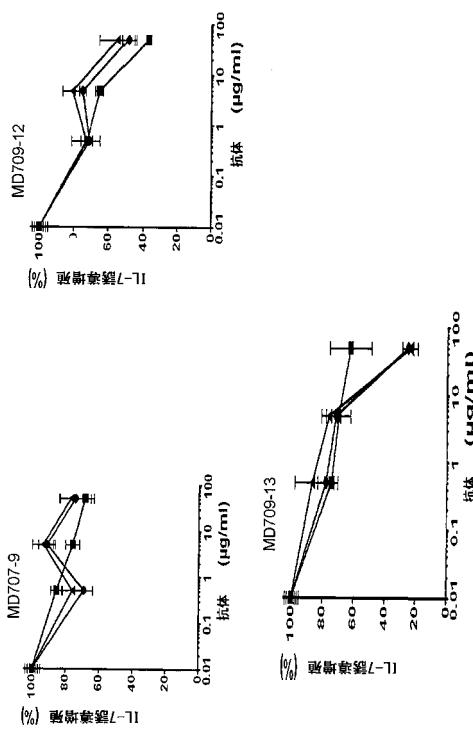


図 5B

【図 6 A】

(A) MD707-1 VH

```

1 ANG TGG CTG CGC CAG TGG GTT TGG GTC ACT GCT CTT ATT CAA CGG 45
1 Met Leu Val Leu Glu Trp Val Leu Val Thr Ala Leu Phe Glu Gly 15
46 GTC CAT TGT GCG GTC CAC CTT GTT GAG TCA GGT GGA GGC TGG GTC 90
16 Val His Gys Ala Val His Leu Val Glu Ser Gly Glu Leu Val 30
91 CGG CCT AAC GAG TCA TTG AAA ATC TCA TGT SCA GCC TGT GGA TCC 135
31 Gln Pro Lys Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe 45
136 ACC TTC AGV ATT GCT GCC ATG TTC TGG GGC CGC CGG GCT CCA CGA 180
46 Tyr Phe Ser Alan Ala Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly 60
181 AGG GGT CTG GAA TGG GTT GCT CGC ATA AGA ACT ATT AAA GCT ATT ATT 225
61 Lys Glu Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Arg 75
226 TAT GCA ACA TAA TAT TAT GCT GNC TCA GTG AAA GGC AGA TTC ACC ATC 270
76 TAT Phe Ala Thr Tyr Ala Arg Ser Val Lys Glu Arg Phe Thr Ile 90
271 TCC AGA GAT GAT TCA AAA AGC ATG GTC TAC CTA CAA ATG GAT GAC 315
91 Ser Arg Arg Asp Ser Lys Ser Met Val Leu Glu Met Asp Asn 105
316 GTG AAA AGC GAC GAC ACA GCC ATG TAT GAT TGT ATA GTC GTG GTT 360
106 Val Lys Thr Asp Arg Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ile Val Val Val 120
361 CTC ACA ACA AGG AGG GAC TAC TTG GAT TAC TGG GGC CAA CGA GTC 405
121 Leu Thr Thr Val Arg Asp Tyr Phe Arg Ser Trp Glu Glu Val Val 135
406 ATG GWC ACA ACA GUC TCC TCA 423
136 Met Val Thr Val Ser Ser

```

MD707-1 VL

```

1 ANG AAC TTT CCT CCT CAG TTT CCTT GGA CTC ATA GGG CTC TGT ATT 45
1 Met Lys Phe Pro Ala Glu Phe Leu Glu Leu Val Ile Val Cys Ile 15
46 CCT GGA GGC ACT GGG GAT ATT GGG TTG ACT CAA GCT CCA CTC TGT 90
16 Pro Glu Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Glu Ala Pro Leu Ser 30
91 GTC TCT GTC ACT CCT GGA GAG TCA GCT TCC ATC TCC TGG AGG TCT 135
31 Val Ser Val Pro Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser 45
136 AGT CAG ACT CTC CTC ACT GTC AGG AGC ACT ACT TCC TGG TAT TGG 180
46 Ser Lys Ser Leu Leu Thr Val Lys Glu Ile Thr Ser Leu Tyr Trp 60
181 TTC CTT CAG AMG CCA GGA AGG TCT CCT CAA CTC CTG ATG TAT CGG 225
61 Phe Glu Lys Pro Gly Lys Ser Pro Glu Leu Leu Met Tyr Arg 75
226 ARG TCC AAC CCT GGC TCA CGA GGT CCA CGC AGG ATT CCT CGG AGC 270
76 Met Ser Alan Leu Ala Ser Glu Val Pro Arg Phe Arg Gly Ser 90
271 DGG TCA CGA ACA GAT ATT ACA CGN AAA ATC AGT AAA GNS GAG ACT 315
91 Glu Ser Glu Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Lys Val Glu Thr 105
316 GAG GAT GTC GGC GTT TAT TAC TGT GCA CGA ATT CCT CTG GAG ATT CCT 360
106 Glu Asp Val Glu Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Phe Leu Glu Tyr Pro 120
361 CAC AGC TTG GSA GCT GGG ACC AGG CGA CTC AAA CGG 399
121 His Thr Phe Glu Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

```

Figure 6A

【図 6 B】

(B) >MD707-3 VH

```

1 ATG TTG GTC CTC CAG TGG GTC ATT GTC ACT GCT CTC ATT CAA CGG 45
1 Met Leu Val Leu Glu Trp Val Leu Val Thr Ala Leu Phe Glu Gly 15
46 GTG CAA TGT GCG GAG GAC CTC CTG GAG TCT GGT GGA GGC TGG GTC 90
16 Val His Gys Ala Val His Leu Val Glu Ser Gly Glu Leu Val 30
91 CGG CCT AAC GAG TCA TTG AAA ATC TCA TGT SCA GCC TGT GGA TCC 135
31 Gln Pro Lys Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe 45
136 ACC TTC AGV ATT GCT GCC ATG TTC TGG GGC CGC CGG GCT CCA CGA 180
46 Tyr Phe Ser Alan Ala Met Tyr Ile Val Arg Gln Ala Pro Gly 60
181 AGG GGT CTC GAA TGG GTT GCT GCT ATA AGA ACT ATT GCT ATT ATT 225
61 Lys Glu Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Ala Asn Arg 75
226 TAT GCA ACA TAT TAT GCT GAA TCA GTG AAA GGC AGA TTC ACC ATC 270
76 TAT Phe Ala Thr Tyr Ala Arg Ser Val Lys Glu Arg Phe Thr Ile 90
271 TCC AGA GAT GAT TCA AAA AGC ATG GTC TAC CTA CAA ATG GAT GAC 315
91 Ser Arg Arg Asp Ser Lys Ser Met Val Tyr Leu Glu Met Asp Asn 105
316 GTG AAA ACT GAC GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT ATA GTC GTG GTT 360
106 Val Lys Thr Asp Arg Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ile Val Val Val 120
361 CTC ACA ACA AGG AGG GAC TAC TTG GAT TAC TGG GGC CAR CGA GTC 405
121 Leu Thr Thr Arg Asp Tyr Phe Arg Ser Trp Glu Glu Val Val 135
406 ATG GTC ACA GTC TCA 423
136 Met Val Thr Val Ser Ser

```

MD707-3 VL

```

1 ANG AMG TTT CCT CCT GCT CAG TAA CCT GGT GTC GTC TGT ATT 45
1 Met Lys Phe Pro Ala Glu Phe Leu Glu Ile Val Leu Cys Ile 15
46 CCT GGA GGC ACT GGG GAT ATT GGG TTG ACT CAA GCT CCA CTC TGT 90
16 Pro Glu Ala Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Glu Ala Pro Leu Ser 30
91 GTC TCT GTC ACT CCT GGA GAG TCA GCT TCC ATC TCC TGG AGG TCT 135
31 Val Ser Val Pro Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser 45
136 AGT CAG ACT CTC CTC ACT GTC AGG AGC ACT ACT TCC TGG TAT TGG 180
46 Ser Lys Ser Leu Leu Thr Val Lys Glu Ile Thr Ser Leu Tyr Trp 60
181 TTC CTT CAG AMG CCA GGA AGG TCT CCT CAA CTC CTG ATG TAT CGG 225
61 Phe Glu Lys Pro Gly Lys Ser Pro Glu Leu Leu Met Tyr Arg 75
226 ARG TCC AAC CCT GGC TCA CGA GGT CCA CGC AGG ATT CCT CGG AGT 270
76 Met Ser Alan Leu Ala Ser Glu Val Pro Arg Phe Arg Gly Ser 90
271 GGG TCA CGA ACA GAT ATT ACA CGN AAA ATC ACT ANG GTC GAG ACT 315
91 Glu Ser Glu Thr Asp Pro Thr Leu Lys Ile Ser Lys Val Glu Thr 105
316 GAG GAT GTT GGC GTT TAT TAC TGT GCA CGA ATT CCT CTG TAT TGT 360
106 Glu Asp Val Glu Val Tyr Tyr Cys Ala Glu Phe Leu Glu Tyr Pro 120
361 CTC AGC TTG GSA GCT GGG ACC AGG CGA CTC AAA CGG 399
121 His Thr Phe Glu Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

```

Figure 6B

【図 6 C】

(C) MD707-13 VH

```

1 ANG CCT GTC CTC GKG GKG TGG CTC TCC CTC CTC GTC TGG ATT ATT CCA ACC 45
1 Met Ala Val Leu Val Leu Leu Leu Cys Leu Leu Ile Phe Pro Ser 15
46 TGT GTC CTC TGG CAA GNG CAA CTC ATA AGG TCA GGA CCT GGT CTC 90
16 Cys Val Val Glu Val Val Glu Val Leu Lys Glu Ser Glu Pro Gly Ile 30
91 GTC CAG CCA TCA CAA ACC CTC TCT CTC ACC TCC ACT GTC TCT GGG 135
31 Val Glu Pro Ser Glu Thr Val Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Glu 45
136 TTA TCA TIA CCC AAC TAT TAT ATA GCA CGC TGG ATT CGG CGG TCT CCA 180
46 Leu Ser Leu Pro Alan Alan Ile Ala Trp Ile Arg Glu Ser Pro 60
181 GGG AAG GGT CAA GAG ITC ATT GGA GIA ATA TGG AGT ATT GGA GAC 225
61 Glu Lys Glu Leu Trp Met Glu Val Ile Trp Ser Alan Glu Asp 75
226 ACA GAT TAT ATT TCA GCT ATT AGA TCC CGA CTC CTC AGC ATT AGC AGG 270
76 Tyr Asp Tyr Ile Asp Alan Ile Arg Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg 90
271 GAC TCC TCG AAC AGC CGA GTC TTC TIA AGG ATG AAC AGC ATT CTC CAR 315
91 Asp Ser Ser Lys Ser Glu Val Phe Leu Arg Met Alan Ser Leu Glu 105
316 TCT GAA GAC ACA GCA ATG TAC ATT TGT GGC AGC AGA GAG GGG ATG ACA 360
106 Ser Alan Asp Thr Alan Met Thr Phe Cys Alan Asp Glu Met Thr 120
361 ACT CTT GAT TAC TGG GGC CAA GGA GTC GTC ACA GTC GTC TCC TCA 405
121 Thr Leu Asp Ile Val Trp Glu Val Glu Val Val Thr Val Ser Ser

```

MD707-13 VL

```

1 ATG GAT TTT CAG GAG CAG ATT TTC AGC CTC CTC GTC ATT ATT ATT 45
1 Met Asp Phe Glu Val Glu Ser Phe Ser Leu Leu Ile Ser Ile 15
46 ACA GTC ATA ATG TGG CTC AGT GGA GAA ATT GTC CTC ACC CGG TCT CCA 90
16 Thr Val Ile Val Ser Glu Glu Ile Val Leu Thr Glu Ser Pro 30
91 ACA ACC ATG GTC GCG TCT CCA CGG CGG AGG GTC ACT ATT ACC ITC 135
31 Thr Thr Met Alan Alan Ser Pro Glu Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys 45
136 CGT GGC AGC TCA ACT ATA AGC TAC ATT CGC TGG TCT CAG CGG AGG 180
46 Arg Ala Ser Ser Val Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Glu Glu Lys 60
181 TCA GGT TCC TCC CCC AAA CGG TGG ATT ATT DAT GAG TCA TOC GAC CTG 225
61 Ser Glu Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Arg Ser Ser Alan Ile 75
226 GCT IGT GGA GTC CGA GAT CGC ATT ATT AGC AGT GGG ITC ATT CGG ACC 270
76 Ala Ser Glu Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Glu 90
271 TCT TAT TCT CTC CTC ACA ATG AGC TCC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCT 315
91 Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala 105
316 ACT TAT TAC TGT CTC CTC CGA AGG AGT AGY TAC CGA CGG ACC AGC ITC GGT 360
106 Thr Tyr Cys Leu Glu Arg Ser Ser Trp Pro Arg Alan Phe Glu 120
361 GGG GGC ACC ARG CTC GAA TIG AAA CGG 387
121 Glu Lys Glu Ile Lys Leu Glu Leu Lys Arg

```

Figure 6C

【図 7】

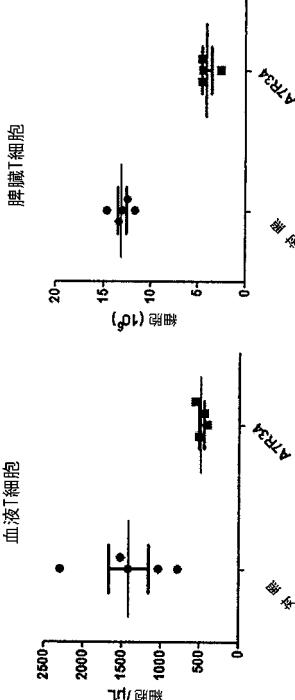


図 7

【図 8】

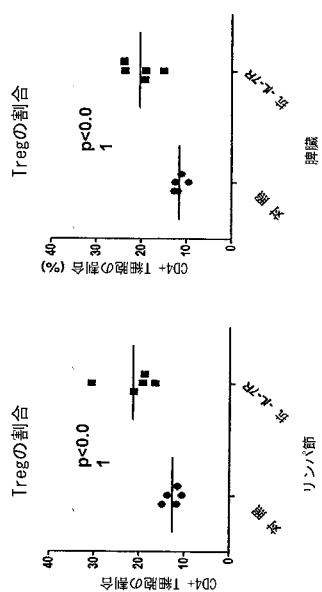


図 8

【図 9】

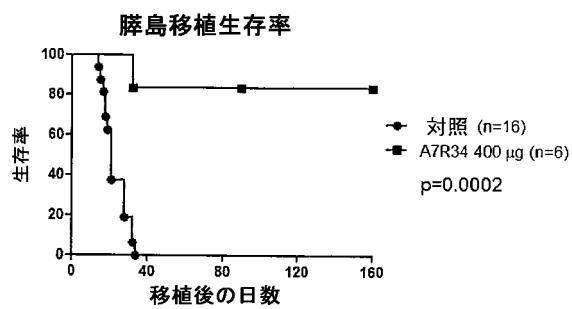


図 9

【図 10】

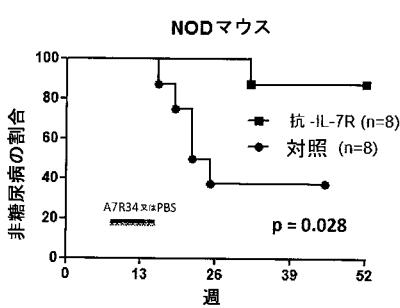


図 10

【図 11】

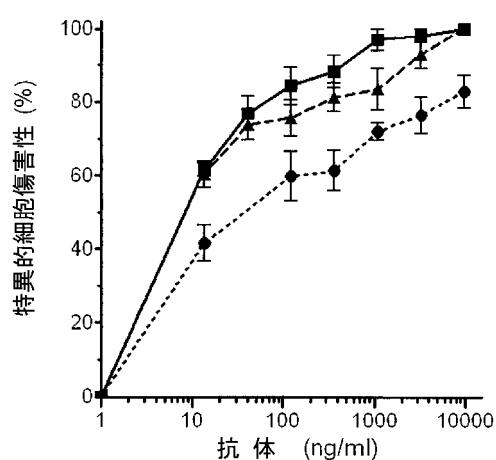


図 11

【図 12】

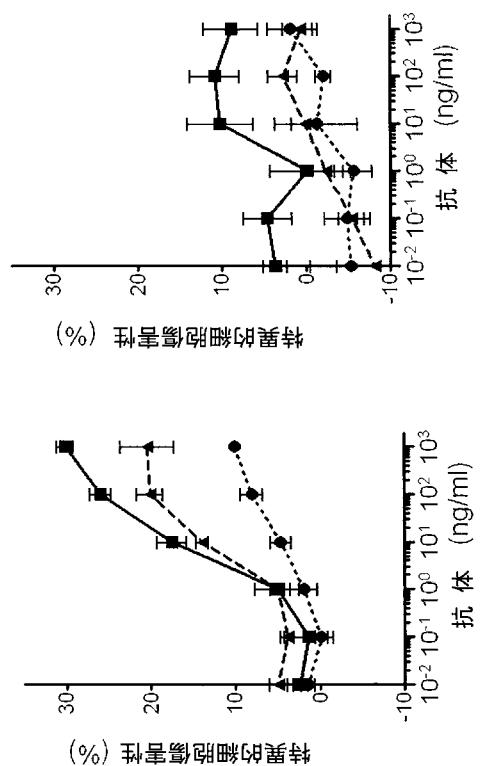


図 12

【配リスト】

2014532074000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2012/069670
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:		
a. (means)		
<input type="checkbox"/>	on paper	
<input checked="" type="checkbox"/>	in electronic form	
b. (time)		
<input checked="" type="checkbox"/>	in the international application as filed	
<input type="checkbox"/>	together with the international application in electronic form	
<input type="checkbox"/>	subsequently to this Authority for the purpose of search	
2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.		
3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/069670

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P37/06 ADD.
--

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
--

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>CHUNG BRILE ET AL: "Prevention of graft-versus-host disease by anti IL-7R.alpha. antibody", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 110, no. 8, 15 October 2007 (2007-10-15), pages 2803-2810, XP002560035, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2006-11-055673 [retrieved on 2007-06-26] e.g. abstract; the whole document</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	2-8,13, 20

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.
--

<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
--

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report
--

4 January 2013

18/01/2013

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016
--

Gruber, Andreas

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2012/069670

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/094259 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; KIRBY IAN [GB]; TAYLOR ALEXANDER H [US]; WEBB TH) 4 August 2011 (2011-08-04) e.g. page 4, paragraph 4; page 75, last paragraph; example starting on page 83; page 103/104, section 4.5.2; claim 1,22-25,28,29; the whole document -----	1,9-12, 16-19, 21-23
Y	e.g. page 4, paragraph 4; page 75, last paragraph; example starting on page 83; page 103/104, section 4.5.2; claim 1,22-25,28,29; the whole document -----	2-8,13, 20
X	WO 2010/017468 A1 (GLAXO WELLCOME MFG PTE LTD [SG]; LEUNG STUART [CN]; LI LIXIN [CN]; LIU WEIHONG [CN]) 11 February 2010 (2010-02-11) e.g. example 2; claim 21,26; the whole document -----	1,9-12, 16-19, 21-23
A	WO 2007/140472 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; BLUESTONE JEFFREY A [US]; LIU WEIHONG [US]; PUTN) 6 December 2007 (2007-12-06) e.g. paragraph 152-154; page 55, first paragraph, penultimate sentence; the whole document -----	1-23
A	MAUD RACAPÉ ET AL: "Interleukin 7 receptor [alpha] as a potential therapeutic target in transplantation", ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS, vol. 57, no. 4, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 253-261, XP055020450, ISSN: 0004-069X, DOI: 10.1007/s00005-009-0036-7 the whole document -----	1-23
A	WO 2010/085643 A1 (UNIV MIAMI [US]; BETHEA JOHN R [US]; MALEK THOMAS H [US]) 29 July 2010 (2010-07-29) the whole document -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/069670

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011094259 A2	04-08-2011	AR 080027 A1 AU 2011209713 A1 CA 2787070 A1 CN 102812046 A CR 20120404 A EP 2528947 A2 SG 182590 A1 TW 201136607 A US 2011200585 A1 US 2012282254 A1 UY 33202 A WO 2011094259 A2	07-03-2012 13-09-2012 04-08-2011 05-12-2012 04-10-2012 05-12-2012 30-08-2012 01-11-2011 18-08-2011 08-11-2012 31-08-2011 04-08-2011
WO 2010017468 A1	11-02-2010	AR 072985 A1 AU 2009279471 A1 CA 2733432 A1 CN 102177179 A CO 6341640 A2 CR 20110118 A DO P2011000041 A EA 201100150 A1 EP 2318442 A1 JP 2011530533 A KR 20110044777 A MA 32621 B1 NZ 590994 A PE 03822011 A1 TW 201018482 A US 2010040616 A1 US 2011287000 A1 UY 32038 A WO 2010017468 A1	06-10-2010 11-02-2010 11-02-2010 07-09-2011 21-11-2011 28-07-2011 28-02-2011 31-10-2011 11-05-2011 22-12-2011 29-04-2011 01-09-2011 28-09-2012 27-06-2011 16-05-2010 18-02-2010 24-11-2011 26-03-2010 11-02-2010
WO 2007140472 A2	06-12-2007	AU 2007266450 A1 CA 2655392 A1 EP 2032695 A2 US 2008131445 A1 WO 2007140472 A2	06-12-2007 06-12-2007 11-03-2009 05-06-2008 06-12-2007
WO 2010085643 A1	29-07-2010	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
	A 6 1 P 35/02	

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

(72) 発明者 ソフィエ プロウアルド
フランス国 エフ 4 4 2 4 0 スセ スル エルドレ レス バウク イムパッセ デス バウク

(72) 発明者 レ ホア マイ
フランス国 エフ 4 4 7 0 0 オルバウルト ルエ アルフォンセ ベイレバイレ 9

(72) 発明者 カロリネ マリ
フランス国 エフ 4 4 6 8 0 サインテ パザンヌ ルエ デュ ベルデレト 1 0

(72) 発明者 ニコラス ポイリエル
フランス国 エフ 4 4 1 1 9 トレイリエレス ロウテ デ レンヌス 9

(72) 発明者 ジャン ポール ソウリロウ
フランス国 エフ 4 4 0 0 0 ナンテ ルエ デ ル'アバイエ 3 2 テル

(72) 発明者 ベルナルド バンホベ
フランス国 エフ 4 4 4 0 0 レゼ ルエ ヘンリ バルブッセ 7 2 ビス

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 BA53 CA07 GA03
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
4B065 AA91X AA91Y AB05 AC14 BA08 CA25 CA44
4C084 AA19 MA02 NA05 ZB082 ZB132
4C085 AA13 AA14 AA16 BB41 BB43 BB50 CC23 DD62 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA57 DA76 EA22 FA74