

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-522095
(P2024-522095A)

(43)公表日 令和6年6月11日(2024.6.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 6
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全85頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-572771(P2023-572771)				(71)出願人 507226592
(86)(22)出願日	令和4年5月20日(2022.5.20)				オックスフォード ユニヴァーシティ イ
(85)翻訳文提出日	令和6年1月23日(2024.1.23)				ノヴェーション リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/GB2022/051285				英国 オーエックス2 0ジェイビー オ
(87)国際公開番号	WO2022/248839				ックスフォード ウェスト ウェイ3 バ
(87)国際公開日	令和4年12月1日(2022.12.1)				クストン コート
(31)優先権主張番号	2107517.1				(74)代理人 100106518
(32)優先日	令和3年5月26日(2021.5.26)				弁理士 松谷 道子
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)				(74)代理人 100122301
(31)優先権主張番号	2116709.3				弁理士 富田 憲史
(32)優先日	令和3年11月19日(2021.11.19)				(74)代理人 100170520
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)				弁理士 笹倉 真奈美
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA				(74)代理人 100221545
		最終頁に続く		(72)発明者 オッグ, グレアム	
				最終頁に続く	

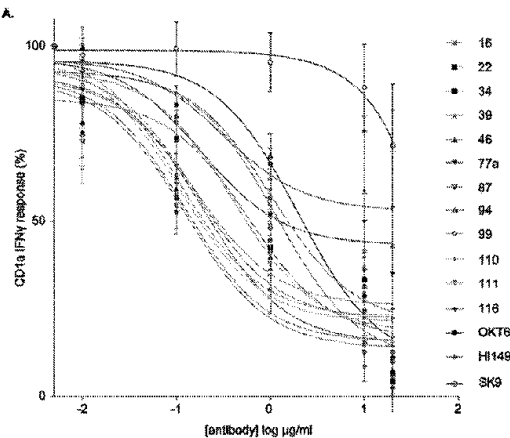
(54)【発明の名称】 抗体

(57)【要約】

本発明は、C D 1 aに結合可能な抗体またはその抗原結合断片であって、1つもしくは複数の炎症性皮膚もしくは粘膜障害、または1つもしくは複数の関連する全身性疾患もしくは障害、または1つもしくは複数の全身的に現れる炎症性薬物反応、またはC D 1 a発現悪性疾患の治療または予防に特に適する、抗体またはその抗原結合断片に関する。

【選択図】 図 1

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 つもしくは複数の炎症性皮膚もしくは粘膜疾患もしくは障害、または 1 つもしくは複数の関連する全身性疾患もしくは障害、または 1 つもしくは複数の全身的に現れる炎症性薬物反応、または 1 つもしくは複数の C D 1 a 発現悪性疾患の治療または予防における使用のための、C D 1 a に結合する抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

a) 配列番号 35 もしくはそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R 3 を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 38 もしくはそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R 3 を含む軽鎖可変領域、あるいは
b) 配列番号 3 もしくはそれに対する少なくとも 80 % の同一性を有する配列の相補性決定領域 C D R 3 を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 6 もしくはそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R 3 を含む軽鎖可変領域、あるいは
c) 配列番号 11 もしくはそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R 3 を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 14 もしくはそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R 3 を含む軽鎖可変領域、あるいは
d) 配列番号 19 もしくはそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R 3 を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 22 もしくはそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R 3 を含む軽鎖可変領域、あるいは
e) 配列番号 27 もしくはそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R 3 を含む重鎖可変領域、および／または配列番号 30 もしくはそれに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列の C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

a) 配列番号 33 の C D R 1、
配列番号 34 の C D R 2、および
配列番号 35 の C D R 3、
もしくはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または
配列番号 36 の C D R 1、
配列番号 37 の C D R 2、および
配列番号 38 の C D R 3、
もしくはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域、あるいは
b) 配列番号 1 の C D R 1、
配列番号 2 の C D R 2、および
配列番号 3 の C D R 3、
もしくはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または
配列番号 4 の C D R 1、
配列番号 5 の C D R 2、および
配列番号 6 の C D R 3、
もしくはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域、あるいは
c) 配列番号 9 の C D R 1、
配列番号 10 の C D R 2、および
配列番号 11 の C D R 3、
もしくはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または
配列番号 12 の C D R 1、

配列番号 13 の C D R 2、および
 配列番号 14 の C D R 3、
 もしくはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列
 を含む軽鎖可変領域、あるいは
 d) 配列番号 17 の C D R 1、
 配列番号 18 の C D R 2、および
 配列番号 19 の C D R 3、
 もしくはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列
 を含む重鎖可変領域、ならびに／または
 配列番号 20 の C D R 1、
 配列番号 21 の C D R 2、および
 配列番号 22 の C D R 3、
 もしくはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列
 を含む軽鎖可変領域、あるいは
 e) 配列番号 25 の C D R 1、
 配列番号 26 の C D R 2、および
 配列番号 27 の C D R 3、
 もしくはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列
 を含む重鎖可変領域、ならびに／または
 配列番号 28 の C D R 1、
 配列番号 29 の C D R 2、および
 配列番号 30 の C D R 3、
 もしくはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列
 を含む軽鎖可変領域
 を含む、抗体またはその抗原結合断片。

10

20

30

40

50

【請求項 4】

e) 配列番号 39 を含むかもしくはそれからなる重鎖可変領域、および／または配列番号 40 を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変領域
 あるいはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列、あるいは
 b) 配列番号 7 を含むかもしくはそれからなる重鎖可変領域、および／または配列番号 8
 を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変領域
 あるいはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列、あるいは
 c) 配列番号 15 を含むかもしくはそれからなる重鎖可変領域、および／または配列番号 16
 を含むかしくはそれからなる軽鎖可変領域
 あるいはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列、あるいは
 d) 配列番号 23 を含むかしくはそれからなる重鎖可変領域、および／または配列番号 24
 を含むかしくはそれからなる軽鎖可変領域
 あるいはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列、あるいは
 e) 配列番号 31 を含むかしくはそれからなる重鎖可変領域、および／または配列番号 32
 を含むかしくはそれからなる軽鎖可変領域
 あるいはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列
 を含む、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

a) 配列番号 49 を含むかしくはそれからなる重鎖、および／または配列番号 50 を
 含むかしくはそれからなる軽鎖、
 あるいはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列、あるいは
 b) 配列番号 41 を含むかしくはそれからなる重鎖、および／または配列番号 42 を含
 むかしくはそれからなる軽鎖、
 あるいはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列、あるいは
 c) 配列番号 43 を含むかしくはそれからなる重鎖、および／または配列番号 44 を含

むかもしくはそれからなる軽鎖、
あるいはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列、あるいは
d) 配列番号 45 を含むかしくはそれからなる重鎖、および／または配列番号 46 を含
むかしくはそれからなる軽鎖、
あるいはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列、あるいは
e) 配列番号 47 を含むかしくはそれからなる重鎖、および／または配列番号 48 を含
むかしくはそれからなる軽鎖、
あるいはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列
を含む、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

S c F v または他の修飾フォーマットを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の
抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

安定化および／または半減期を延長するように修飾し、前記修飾が、P E G 化であって
もよい、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

ヒト化抗体またはその抗原結合断片である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗
体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

ヒト I g G 1 アイソタイプもしくはヒト I g G 4 アイソタイプまたは他の天然もしくは
修飾アイソタイプである、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結
合断片。

【請求項 10】

二特異性または多特異性抗体またはその抗原結合断片である、請求項 1 から 9 のいづれ
か一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 11】

請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする核
酸。

【請求項 12】

請求項 11 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 13】

発現ベクター、プラスミド、またはウイルスベクターである、請求項 12 に記載のベク
ター。

【請求項 14】

請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片、請求項 11
に記載の核酸、および／または請求項 12 もしくは請求項 13 に記載のベクターを含む、
宿主細胞。

【請求項 15】

細菌細胞または哺乳動物細胞である、請求項 14 に記載の宿主細胞。

【請求項 16】

請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の 1 つもしくは複数の抗体もしくはその抗原結
合断片、請求項 11 に記載の核酸、請求項 12 もしくは請求項 13 に記載のベクター、お
よび／または請求項 14 もしくは請求項 15 に記載の宿主細胞を含む、医薬組成物。

【請求項 17】

医学における使用のための、請求項 2 から 10 のいずれか一項に記載の抗体もしくはそ
の抗原結合断片、請求項 11 に記載の核酸、請求項 12 もしくは請求項 13 に記載のベク
ター、請求項 14 もしくは請求項 15 に記載の宿主細胞、または請求項 16 に記載の医薬
組成物。

【請求項 18】

1 つもしくは複数の炎症性皮膚もしくは粘膜疾患もしくは障害、または 1 つもしくは複

10

20

30

40

50

数の関連する全身性疾患もしくは障害、または1つもしくは複数の全身的に現れる炎症性薬物反応、またはCD1a発現悪性疾患の治療または予防における使用のための、請求項2から10のいずれか一項に記載の1つもしくは複数の抗体もしくはその抗原結合断片、請求項11に記載の1つもしくは複数の核酸、請求項12もしくは請求項13に記載の1つもしくは複数のベクター、請求項14もしくは請求項15に記載の1つもしくは複数の宿主細胞、または請求項16に記載の1つもしくは複数の医薬組成物。

【請求項19】

2つの抗体またはその抗原結合断片を含むかまたはそれらからなり、それぞれが、
 a) 配列番号33のCDR1、配列番号34のCDR2、および配列番号35のCDR3、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列
 を含む重鎖可変領域と、
 配列番号36のCDR1、配列番号37のCDR2、および配列番号38のCDR3、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列
 を含む軽鎖可変領域と
 を有する、第1の抗体またはその抗原結合断片、ならびに
 配列番号1のCDR1、配列番号2のCDR2、および配列番号3のCDR3、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列
 を含む重鎖可変領域と、
 配列番号4のCDR1、配列番号5のCDR2、および配列番号6のCDR3、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列
 を含む軽鎖可変領域と
 を有する、第2の抗体またはその抗原結合断片、あるいは
 b) 配列番号39を含むかもしくはそれからなる重鎖可変領域、および配列番号40を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変領域、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を有する、第1の抗体またはその抗原結合断片、ならびに
 配列番号7を含むかもしくはそれからなる重鎖可変領域、および配列番号8を含むかもしくはそれからなる軽鎖可変領域、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を有する、第2の抗体またはその抗原結合断片、あるいは
 c) 配列番号49を含むかもしくはそれからなる重鎖、および配列番号50を含むかもしくはそれからなる軽鎖、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を有する、第1の抗体またはその抗原結合断片、ならびに
 配列番号41を含むかもしくはそれからなる重鎖、および配列番号42を含むかもしくはそれからなる軽鎖、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を有する、第2の抗体またはその抗原結合断片
 を含むかまたはそれからなる、請求項18に記載の使用のための1つまたは複数の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項20】

a) 1つまたは複数の炎症性皮膚または粘膜疾患または障害が、
 i) 好中球優勢皮膚疾患、例えば、ざ瘡、汎発性膿疱性乾癬、尋常性乾癬、滴状乾癬、掌蹠膿疱症、SAPHO症候群、急性熱性好中球性皮膚症（スイート症候群）、組織球様好中球性皮膚炎、手背部好中球性皮膚症、壊疽性膿皮症、好中球性エクリン汗腺炎、化膿性汗腺炎、持久性隆起性紅斑、ベーチェット病、腸関連皮膚炎・関節炎症候群、他の感染症に関連する炎症、好中球性蕁麻疹様皮膚症、柵状好中球性肉芽腫性皮膚炎、ほ行性迂回状紅斑、好中球性環状紅斑、急性汎発性発疹性膿疱症（AGEP）、血管炎他；
 ii) 自己免疫障害、例えば、結合組織疾患（例えば、ループス、皮膚筋炎、強皮症／全身性硬化症、チャグ・ストラウス症候群）、脂肪織炎、血管炎、自己免疫性水疱形成症状（例えば、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、線状IgA病）、ヘルペス状皮膚炎、セリアック病、一部の自己炎症性疾患、白斑、円形脱毛症、汎発性脱毛症、全頭脱毛症、脂肪織炎、扁平苔癬、多形性紅斑、硬化性苔癬、他の苔癬状および多形性紅斑様疾患、乾癬性関節炎、炎症性腸疾患、関節リウマチ、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、横断性脊髄炎、

10

20

30

40

50

甲状腺炎、神経変性他；

i i i) 肥満細胞障害および好酸球性障害、例えば、マックル・ウェルズ症候群、好酸球増加および全身性症候症候群、蕁麻疹、血管浮腫、角結膜炎、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎を含む他のアレルギーまたはアトピー、鼻炎、結膜炎、喘息、好酸球性食道炎および他の好酸球性粘膜疾患、接触性皮膚炎他；

i v) 移植片対宿主病；ならびに

v) スティーブンス・ジョンソン症候群、中毒性表皮壊死症、薬物反応による好酸球増加および全身性症候症候群（DRESS）と急性汎発性発疹性膿疱症（AGEP）、多形性紅斑、水疱性疾患、固定薬疹、ならびに炎症性皮膚または粘膜疾患または障害として現れる他の薬物反応を含む、炎症性皮膚または粘膜疾患または障害として現れる他の薬物反応の1つまたは複数であるか、あるいは

10

b) 1つもしくは複数の関連する全身性疾患もしくは障害、または1つもしくは複数の全身的に現れる炎症性薬物反応が、アルダラ（イミキモド）に対する炎症性反応であるか、あるいは

c) CD1a発現悪性疾患が、ランゲルハンス細胞組織球症、T細胞リンパ腫または胸腺腫の1つまたは複数である、

請求項18または請求項19に記載の使用のための、1つもしくは複数の抗体もしくはその抗原結合断片、核酸、ベクター、宿主細胞、または医薬組成物。

【請求項21】

1つまたは複数の炎症性皮膚または粘膜疾患または障害が、乾癬、皮膚炎、エリテマトーデス、または炎症性皮膚もしくは粘膜疾患もしくは障害として現れる薬物反応の1つまたは複数である、請求項20に記載の使用のための、1つもしくは複数の抗体もしくはその抗体結合断片、核酸、ベクター、宿主細胞、または医薬組成物。

20

【請求項22】

その抗原結合断片、核酸、ベクター、宿主細胞、または医薬組成物が、単独で、または1つまたは複数の他の治療剤と組み合わせて投与されることを意図する、請求項14から21のいずれか一項に記載の使用のための、1つもしくは複数の抗体もしくはその抗原結合断片、核酸、ベクター、宿主細胞、または医薬組成物。

【請求項23】

1つまたは複数の他の治療剤が、細胞毒性物質、抗炎症物質、例えば、ステロイド、およびCAR-T細胞、例えば、調節性もしくは細胞溶解性CAR-T細胞、または請求項1から10のいずれか一項に記載の1つもしくは複数の抗体もしくは抗原結合断片を発現もしくは提示する他の細胞を含む群から選択される、請求項22に記載の使用のための、1つもしくは複数の抗体もしくはその抗原結合断片、核酸、ベクター、宿主細胞、または医薬組成物。

30

【請求項24】

1つもしくは複数の炎症性皮膚もしくは粘膜疾患もしくは障害、または1つもしくは複数の関連する全身性疾患もしくは障害、または1つもしくは複数の全身的に現れる炎症性薬物反応、または1つもしくは複数のCD1a発現悪性疾患の治療または予防のための医薬の製造における、請求項2から10のいずれか一項に記載の1つもしくは複数の抗体もしくはその抗原結合断片、請求項11に記載の核酸、請求項12もしくは請求項13に記載のベクター、請求項14もしくは請求項15に記載の宿主細胞、または請求項16に記載の医薬組成物の使用。

40

【請求項25】

1つまたは複数の抗体またはその抗原結合断片が、2つの抗体またはその抗原結合断片を含むかまたはそれらからなり、それぞれが、

a) 配列番号33のCDR1、配列番号34のCDR2、および配列番号35のCDR3、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域と、

配列番号36のCDR1、配列番号37のCDR2、および配列番号38のCDR3、ま

50

たはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域と

を有する、第 1 の抗体またはその抗原結合断片、ならびに

配列番号 1 の C D R 1、配列番号 2 の C D R 2、および配列番号 3 の C D R 3、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列

を含む重鎖可変領域と、

配列番号 4 の C D R 1、配列番号 5 の C D R 2、および配列番号 6 の C D R 3、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列

を含む軽鎖可変領域と

を有する、第 2 の抗体またはその抗原結合断片、あるいは

b) 配列番号 39 を含むかもしくはそれからなる重鎖可変領域、および配列番号 40 を含むかしくはそれからなる軽鎖可変領域、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列を有する、第 1 の抗体またはその抗原結合断片、ならびに

配列番号 7 を含むかしくはそれからなる重鎖可変領域、および配列番号 8 を含むかしくはそれからなる軽鎖可変領域、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列を有する、第 2 の抗体またはその抗原結合断片、あるいは

c) 配列番号 49 を含むかしくはそれからなる重鎖、および配列番号 50 を含むかしくはそれからなる軽鎖、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列を有する、第 1 の抗体またはその抗原結合断片、ならびに

配列番号 41 を含むかしくはそれからなる重鎖、および配列番号 42 を含むかしくはそれからなる軽鎖、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列を有する、第 2 の抗体またはその抗原結合断片

を含むかまたはそれからなる、請求項 24 に記載の使用。

【請求項 26】

有効量の請求項 2 から 10 のいずれか一項に記載の 1 つもしくは複数の抗体もしくはその抗原結合断片、請求項 11 に記載の核酸、請求項 12 もしくは請求項 13 に記載のベクター、請求項 14 もしくは請求項 15 に記載の宿主細胞、または請求項 16 に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む、対象における 1 つもしくは複数の炎症性皮膚もしくは粘膜疾患もしくは障害、または 1 つもしくは複数の関連する全身性疾患もしくは障害、または 1 つもしくは複数の全身的に現れる炎症性薬物反応、または 1 つもしくは複数の C D 1 a 発現悪性疾患を治療する方法。

【請求項 27】

1 つまたは複数の抗体またはその抗原結合断片が、2 つの抗体またはその抗原結合断片を含むかまたはそれらからなり、それぞれが、

a) 配列番号 33 の C D R 1、配列番号 34 の C D R 2、および配列番号 35 の C D R 3、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列

を含む重鎖可変領域と、

配列番号 36 の C D R 1、配列番号 37 の C D R 2、および配列番号 38 の C D R 3、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列

を含む軽鎖可変領域と

を有する、第 1 の抗体またはその抗原結合断片、ならびに

配列番号 1 の C D R 1、配列番号 2 の C D R 2、および配列番号 3 の C D R 3、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列

を含む重鎖可変領域と、

配列番号 4 の C D R 1、配列番号 5 の C D R 2、および配列番号 6 の C D R 3、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一性を有する配列

を含む軽鎖可変領域と

を有する、第 2 の抗体またはその抗原結合断片、あるいは

b) 配列番号 39 を含むかしくはそれからなる重鎖可変領域、および配列番号 40 を含むかしくはそれからなる軽鎖可変領域、またはそれらに対して少なくとも 80% の同一

10

20

30

40

50

性を有する配列を有する、第1の抗体またはその抗原結合断片、ならびに配列番号7を含むかもしくはそれからなる重鎖可変領域、および配列番号8を含むかしくはそれからなる軽鎖可変領域、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を有する、第2の抗体またはその抗原結合断片、あるいは
c) 配列番号49を含むかしくはそれからなる重鎖、および配列番号50を含むかしくはそれからなる軽鎖、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を有する、第1の抗体またはその抗原結合断片、ならびに配列番号41を含むかしくはそれからなる重鎖、および配列番号42を含むかしくはそれからなる軽鎖、またはそれらに対して少なくとも80%の同一性を有する配列を有する、第2の抗体またはその抗原結合断片を含むかまたはそれからなる、請求項26に記載の方法。

10

【請求項28】

i. 対象から得られる生体試料を用意することと、
ii. 治療前、または治療の合間、または治療が無い期間に対象から得られた試料においてCD1a発現細胞に対する請求項1から10のいずれか一項に記載の1つまたは複数の抗体または抗原結合断片の結合レベルを決定することと、
iii. 治療後または治療の合間または治療が無い期間に腫瘍量、またはCD1a発現細胞に対する1つもしくは複数の本発明の抗体もしくは抗原結合断片の結合レベルが低下し、適宜、腫瘍量またはCD1a発現細胞に対する請求項2から10のいずれか一項に記載の1つもしくは複数の抗体もしくは抗原結合断片の結合レベルの低下が、25%以上である場合、治療が有効であるか、または病状が改善していると判定することとを含む、CD1a発現悪性疾患であると診断された対象における治療有効性または病状を監視する方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体、ならびに炎症性皮膚および粘膜疾患もしくは障害、または関連する全身性疾患もしくは障害、または全身的に現れる炎症性薬物反応、またはCD1a発現悪性疾患の治療、予防または監視におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

30

【0002】

抗原提示は、免疫系が感染症、組織の損傷および疾患を含む脅威を検出して、目的に応じた防御を編成する、宿主免疫の基本的柱の1つである。抗原提示は、特殊化した抗原提示細胞（APC）の表面上の提示分子による抗原の内部移行、プロセッシングおよび呈示を包含する。抗原の提示は、抗原源を標的とする免疫応答の最適な活性化を達成し、脅威を除くために組織化される。抗原は、ペプチド、脂質および代謝物等を含む広範な分子を包含する。MHC IおよびMHC IIは、APCの表面上に発現するタンパク質であり、これらはペプチド抗原に結合し、大部分はCD8+T細胞およびCD4+T細胞にそれぞれ提示する。これらのT細胞サブセットは、細胞表面T細胞受容体（TCR）によるMHC結合ペプチド抗原の認識時に、それらのエフェクター機能を発揮するように誘導されて、病原体およびがんに対する免疫が可能となる。しかし、非侵害性抗原、例えば、アレルギー性疾患におけるアレルゲン、または自己免疫における自己タンパク質提示の調節不全により、宿主の損傷、炎症および疾患が引き起こされる。したがって、抗原提示経路の標的化は、結果として生じる免疫応答を調節する強力な手段である。

40

【0003】

CD1分子は、MHC Iに構造的に似た抗原提示分子のファミリーを構成する。対照的に、CD1分子は相対的に非多形性であり、CD1抗原結合溝は、脂質種の提示を可能とする疎水性アミノ酸が濃縮されている。脂質は、宿主および病原体細胞膜の不可欠な成分を形成する重要な抗原であり、タンパク質由来のペプチド抗原よりも突然変異を受けにくい。CD1ファミリーは、細胞表面群1分子CD1a/b/cおよび群2CD1dおよび

50

群 3 C D 1 e を構成する。C D 1 脂質提示および T 細胞応答の理解のほとんどは、部分的には C D 1 d がマウスで正常に発現する唯一の C D 1 であるため、糖脂質結合 C D 1 d の不変異ナチュラルキラー T 細胞認識の研究によってもたらされた。C D 1 d および M H C I 分子は、広く発現し、一方、M H C I I および群 1 の C D 1 発現は、相対的に A P C に制限される。しかし、このような分子の中でもユニークな C D 1 a は、皮膚および粘膜に対して高度に特異的である。C D 1 a は、皮膚の表皮および粘膜のランゲルハンス細胞 (L C) により構成的に発現し (1)、ランゲリン (l a n g e r i n) に加えて L C の同定マーカーとして一般に使用される。加えて、C D 1 a は、真皮樹状細胞のサブセット上に低レベルで発現し (2-4)、皮膚自然リンパ球系細胞 (I L C)、特に、I L C 2 上で発現および上方制御され得る (5)。重要なことには、C D 1 a は、未成熟胸腺細胞の表面上に存在すると最初に記載されたが、発現は、T 細胞成熟時に典型的に失われる (6)。皮膚における C D 1 a の高レベルの構成的発現は、健常および罹患ヒト皮膚における C D 1 a 依存的監視および T 細胞活性化の重要な生理学的役割を示す。その上、アトピー性皮膚炎の皮膚における C D 1 a 発現の上昇は、炎症性皮膚疾患における C D 1 a 反応性 T 細胞集団の活性化向上の基礎をなし得る。

10

【0004】

マイコバクテリア脂質に基づく抗原を提示する C D 1 a、C D 1 b または C D 1 c 分子により方向づけられる T 細胞応答は、結核菌 (*M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s*) およびらい菌 (*M y c o b a c t e r i u m l e p r a e*) 感染症に対するヒト免疫応答に意味づけられている。C D 1 a 制限 T 細胞による他のさらに一般的な病原性または共生細菌脂質の認識は、進行中の研究の主題であり、一部のデータを本明細書において提示する。M H C 制限 T 細胞によるペプチド抗原の T C R 認識は一般に、ペプチド抗原に対して高度に特異的であるが、T C R 認識の C D 1 による方法は、さらに多様であり、C D 1 a 自己反応性 T 細胞の場合のように、高度な脂質特異的応答 (7)、および直接的 T C R - C D 1 相互作用により媒介される交差反応的または明らかな脂質非依存的シグナル伝達をも有する (8-10)。一部の 경우에는、C D 1 a 自己反応性 T 細胞は、小型の疎水性宿主由来脂質の認識時に活性化され、この脂質は、C D 1 a 抗原結合溝内に営巣して突出せず、T C R が脂質とではなく C D 1 a タンパク質それ自体と相互作用することが可能となる。この場合では、大型または帯電した頭部との脂質の結合により、自己反応性 T C R および C D 1 a の間の相互作用が妨げられ、これにより T 細胞活性化が妨げられる (11,12)。

20

30

【0005】

C D 1 a は、相対的に非多形性であり、このため、炎症性の皮膚および粘膜疾患および障害、例えば、アトピー性皮膚炎、乾癬、エリテマトーデス、または関連する全身性疾患もしくは障害、または全身的に現れる炎症性薬物反応の予防および／または治療における集団規模での可能性が結果として存在し、この場合、C D 1 a 発現樹状細胞サブセットの発生頻度の変更され、L C または応答する T 細胞の遊走パターンが変更される (13-15)。その上、C D 1 a は、炎症性腸疾患、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、甲状腺炎および神経変性を含む他の全身性障害に関連付けられている (Al-amodi Inflammatory Bowel Diseases 2018 24: 1225-1236; Caporale J Neuroimmunol 200 6 177:112-8; Jamshidian Immunological Investigations 2010 3:874-889; Roura-Mir J Immunol 2005 174:3773-80; Wang Aging 2019 11: 4521-4535)。加えて、C D 1 a は、ランゲルハンス細胞組織球症、T 細胞リンパ腫のサブセット、胸腺腫のサブセットを含む特定の悪性疾患および他の悪性疾患のまれな性状、例えば、肥満細胞症のサブセットにより発現し得る。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、抗 C D 1 a 抗体を提供することである。このような抗体は、皮膚もしくは粘膜の炎症性疾患もしくは障害、例えば、乾癬、皮膚炎、エリテマトーデスまたは炎

50

症性皮膚もしくは粘膜疾患もしくは障害として現れる薬物反応の治療または予防において特に有用である。また、このような抗体は、関連する全身性疾患もしくは障害、または全身的に現れる炎症性薬物反応の治療または予防において、またはCD1a発現悪性疾患の治療において有益であり得る。

【課題を解決するための手段】

【0007】

ある態様では、CD1aに結合可能な抗体またはその抗原結合断片を本発明により提供する。抗体またはその抗原結合断片は、CD1aに特異的に結合し得る。抗体またはその抗原結合断片は、CD1aに優先的に結合し得る。抗体またはその抗原結合断片は、CD1aを発現する細胞の細胞死を誘導し得る。抗体またはその抗原結合断片は、CD1aに対するリガンドの結合を遮断し得る。

10

【0008】

抗体またはその抗原結合断片は、配列番号3またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列の相補性決定領域(CDR)3(CDR3)を含む重鎖可変領域を含んでもよく、および／あるいは抗体またはその抗原結合断片は、配列番号6またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列のCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0009】

抗体またはその抗原結合断片は、配列番号11またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列のCDR3を含む重鎖可変領域を含んでもよく、および／あるいは抗体またはその抗原結合断片は、配列番号14またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列のCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。

20

【0010】

抗体またはその抗原結合断片は、配列番号19またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列のCDR3を含む重鎖可変領域を含んでもよく、および／あるいは抗体またはその抗原結合断片は、配列番号22またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列のCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。

30

【0011】

抗体またはその抗原結合断片は、配列番号27またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列のCDR3を含む重鎖可変領域を含んでもよく、および／あるいは抗体またはその抗原結合断片は、配列番号30またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列のCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。

【0012】

抗体またはその抗原結合断片は、配列番号35またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列のCDR3を含む重鎖可変領域を含んでもよく、および／あるいは抗体またはその抗原結合断片は、配列番号38またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列のCDR3を含む軽鎖可変領域を含み得る。

40

【0013】

抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号1のCDR1、
配列番号2のCDR2、および

50

配列番号 3 の C D R 3、
またはそれらに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列
を含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

b) 配列番号 4 の C D R 1、
配列番号 5 の C D R 2、および
配列番号 6 の C D R 3、
またはそれらに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列
を含む軽鎖可変領域
を含むかまたはそれらからなり得る。

10

【0014】

抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号 9 の C D R 1、
配列番号 10 の C D R 2、および
配列番号 11 の C D R 3、
またはそれらに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列
を含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

20

b) 配列番号 12 の C D R 1、
配列番号 13 の C D R 2、および
配列番号 14 の C D R 3、
またはそれらに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列
を含む軽鎖可変領域
を含むかまたはそれらからなり得る。

【0015】

抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号 17 の C D R 1、
配列番号 18 の C D R 2、および
配列番号 19 の C D R 3、
またはそれらに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列
を含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

30

b) 配列番号 20 の C D R 1、
配列番号 21 の C D R 2、および
配列番号 22 の C D R 3
またはそれらに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列
を含む軽鎖可変領域
を含むかまたはそれらからなり得る。

40

【0016】

抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号 25 の C D R 1、
配列番号 26 の C D R 2、および
配列番号 27 の C D R 3、
またはそれらに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列
を含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは

50

b) 配列番号 28 の C D R 1、

配列番号 29 の C D R 2、および
配列番号 30 の C D R 3、
またはそれらに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列
を含む軽鎖可変領域
を含むかまたはそれらからなり得る。

【0017】

抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号 33 の C D R 1、
配列番号 34 の C D R 2、および
配列番号 35 の C D R 3、
またはそれらに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列
を含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは
b) 配列番号 36 の C D R 1、
配列番号 37 の C D R 2、および
配列番号 38 の C D R 3、
またはそれらに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列
を含む軽鎖可変領域
を含むかまたはそれらからなり得る。

【0018】

C D R は、任意のフレームワーク領域と結合し得る。好ましくは、フレームワーク領域は、ヒト起源である。

【0019】

抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号 7 またはそれに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域、および／あるいは
b) 配列番号 8 またはそれに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域
を含むかまたはそれらからなり得る。

【0020】

抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号 15 またはそれに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域、および／あるいは
b) 配列番号 16 またはそれに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域
を含むかまたはそれらからなり得る。

【0021】

抗体またはその抗原結合断片は、
a) 配列番号 23 またはそれに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域、および／あるいは
b) 配列番号 24 またはそれに対して少なくとも 80 %、90 %、95 %、98 %、99 % もしくは 100 % の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域
を含むかまたはそれらからなり得る。

【0022】

抗体またはその抗原結合断片は、

10

20

30

40

50

a) 配列番号 31 またはそれに対して少なくとも 80%、90%、95%、98%、99% もしくは 100% の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域、および／あるいは

b) 配列番号 32 またはそれに対して少なくとも 80%、90%、95%、98%、99% もしくは 100% の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域を含むかまたはそれらからなり得る。

【0023】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号 39 またはそれに対して少なくとも 80%、90%、95%、98%、99% もしくは 100% の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域、および／あるいは

b) 配列番号 40 またはそれに対して少なくとも 80%、90%、95%、98%、99% もしくは 100% の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域を含むかまたはそれらからなり得る。

【0024】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号 7 を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域、および

b) 配列番号 8 を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域からなり得る。

【0025】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号 15 を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域、および

b) 配列番号 16 を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域からなり得る。

【0026】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号 23 を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域、および

b) 配列番号 24 を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域からなり得る。

【0027】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号 31 を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域、および

b) 配列番号 32 を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域からなり得る。

【0028】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号 39 を含むかまたはそれからなる重鎖可変領域、および

b) 配列番号 40 を含むかまたはそれからなる軽鎖可変領域からなり得る。

【0029】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号 41 またはそれに対して少なくとも 80%、90%、95%、98%、99% もしくは 100% の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる重鎖、および／あるいは

b) 配列番号 42 またはそれに対して少なくとも 80%、90%、95%、98%、99% もしくは 100% の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる軽鎖を含むかまたはそれらからなり得る。

【0030】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号 43 またはそれに対して少なくとも 80%、90%、95%、98%、99

10

20

30

40

50

%もしくは100%の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる重鎖、および／あるいは

b) 配列番号44またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる軽鎖を含むかまたはそれらからなり得る。

【0031】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号45またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる重鎖、および／あるいは

b) 配列番号46またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる軽鎖を含むかまたはそれらからなり得る。

【0032】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号47またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる重鎖、および／あるいは

b) 配列番号48またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる軽鎖を含むかまたはそれらからなり得る。

【0033】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号49またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる重鎖、および／あるいは

b) 配列番号50またはそれに対して少なくとも80%、90%、95%、98%、99%もしくは100%の同一性を有する配列を含むかまたはそれからなる軽鎖を含むかまたはそれらからなり得る。

【0034】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号41を含むかまたはそれからなる重鎖、および

b) 配列番号42を含むかまたはそれからなる軽鎖からなり得る。

【0035】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号43を含むかまたはそれからなる重鎖、および

b) 配列番号44を含むかまたはそれからなる軽鎖からなり得る。

【0036】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号45を含むかまたはそれからなる重鎖、および

b) 配列番号46を含むかまたはそれからなる軽鎖からなり得る。

【0037】

抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号47を含むかまたはそれからなる重鎖、および

b) 配列番号48を含むかまたはそれからなる軽鎖からなり得る。

【0038】

10

20

30

40

50

抗体またはその抗原結合断片は、

- a) 配列番号 49 を含むかまたはそれからなる重鎖、および
 - b) 配列番号 50 を含むかまたはそれからなる軽鎖
- からなり得る。

【0039】

本発明の抗体またはその抗原結合断片は、単離され得る。

【0040】

任意の態様では、「抗体またはその抗原結合断片」は、列挙する抗体またはその抗原結合断片の 1 つまたは複数、例えば、2 つを指し得る。例えば、任意の態様では、2 つの抗体またはその抗原結合断片を想定してもよく、それぞれは、

a) 配列番号 33 の CDR1、配列番号 34 の CDR2、および配列番号 35 の CDR3、またはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 36 の CDR1、配列番号 37 の CDR2、および配列番号 38 の CDR3、またはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域とを有する、第 1 の抗体またはその抗原結合断片、ならびに

配列番号 1 の CDR1、配列番号 2 の CDR2、および配列番号 3 の CDR3、またはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 4 の CDR1、配列番号 5 の CDR2、および配列番号 6 の CDR3、またはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域と

を有する、第 2 の抗体またはその抗原結合断片、あるいは

b) 配列番号 39 を含むかもしくはそれからなる重鎖可変領域、および配列番号 40 を含むかしくはそれからなる軽鎖可変領域、またはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を有する、第 1 の抗体またはその抗原結合断片、ならびに

配列番号 7 を含むかしくはそれからなる重鎖可変領域、および配列番号 8 を含むかしくはそれからなる軽鎖可変領域、またはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を有する、第 2 の抗体またはその抗原結合断片、あるいは

c) 配列番号 49 を含むかしくはそれからなる重鎖、および配列番号 50 を含むかしくはそれからなる軽鎖、またはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を有する、第 1 の抗体またはその抗原結合断片、ならびに

配列番号 41 を含むかしくはそれからなる重鎖、および配列番号 42 を含むかしくはそれからなる軽鎖、またはそれらに対して少なくとも 80 % の同一性を有する配列を有する、第 2 の抗体またはその抗原結合断片を含むかまたはそれらからなる。

【0041】

例えば、本明細書に開示の任意の治療適用および／または本明細書に開示の任意の監視方法では、抗体または抗原結合断片の任意の組合せを使用し得る。好ましくは、Ab116 および 16 を併用する。

【0042】

別の実施形態では、Ab116 は、本明細書に開示の任意の治療適用において使用してもよく、Ab16 は、同一の対象の監視において使用し得る。あるいは、Ab16 は、本明細書に開示の任意の治療適用において使用してもよく、Ab116 は、同一の対象の監視において使用し得る。

【0043】

「抗体」という用語は、本明細書において言及する場合、ジスルフィド結合により相互に結合する少なくとも 2 つの重 (H) 鎖および 2 つの軽 (L) 鎖を含む糖タンパク質を指す。各重鎖は、重鎖可変領域 (VH) および重鎖定常領域で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (VL) および軽鎖定常領域で構成される。重および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。VH および VL 領域は、相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分することができ、これには、フレームワーク領域 (FR) と呼ばれる、さらに保存された領域が散在する。抗体の定常領域は、免疫系の種々

の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第 1 の成分（C1q）を含む、宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

【0044】

抗体の「その抗原結合断片」という用語は、抗原に選択的に結合する能力を保持する、1 つまたは複数の抗体断片を指す。その抗原結合断片は、Fab、修飾 Fab、Fab'、修飾 Fab'、F(ab')₂、Fv、単ドメイン抗体（例えば、VH または VL または VHH）、scFv、二価、三価または四価抗体、ビス scFv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディおよび上のいずれかのエピトープ結合断片であり得るが、それらに制限されない（Holliger and Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9): 1126-1136; Adair and Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217）。このような抗原結合断片を生成および製造するための方法は、当技術分野において周知である（例えば、Verma et al., 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181 を参照）。

10

【0045】

抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体、二特異性抗体、多特異性抗体、ScFv または他の一本鎖もしくは修飾フォーマット、Fab、(Fab')₂、Fv、dAb、Fd、ナノボディ、ラクダ抗体またはダイアボディであり得る。好ましくは、抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体である。

【0046】

発明者らは、炎症性皮膚および粘膜疾患および障害、または関連する全身性疾患もしくは障害、または全身的に現れる炎症性薬物反応における CD1a およびその潜在的役割を、有効なモノクローナル抗体を生成することにより標的とした。CD1a が皮膚および粘膜において高度に発現するため、このような抗体の使用により、オフターゲット作用を最小化しながら炎症性皮膚および粘膜疾患および障害を選択的に治療する契機がもたらされる。CD1a は、マウスでは発現しないが、他の哺乳動物では発現する。ヒト CD1a（UniProtKB/Swiss-Prot: P06126-CD1A_HUMAN）は、優勢なアレルにより世界的に発現し、中国の一部の民族に存在する変異体を有する（18）。また、CD1a 抗原提示を標的化すると、他のサイトカイン特異的抗体療法、例えば、抗 IL17 療法または他の免疫療法の上流で炎症経路が妨害され、このため免疫カスケードの初期に炎症促進性障害を調節する強力な手段がもたらされる。その上、例えば、二特異性もしくは多特異性またはコンジュゲート抗体技術を使用して低分子、薬物、核酸、ペプチド、抗体または細胞コンジュゲート療法を特異的に標的とすることにより、皮膚に対する CD1a の特異性を利用すると、皮膚に対してさらなる療法を方向づける手段がもたらされ得る。なお、さらに、CD1a は相対的に非多形性であるため、本発明では、CD1a 発現樹状細胞サブセットの発生頻度が上昇して LC の遊走パターンが変更される炎症性皮膚および粘膜疾患、例えば、アトピー性皮膚炎および乾癬（13-15）、または CD1a 発現悪性疾患の予防および／または治療における普遍的可能性を提供する。

20

30

【0047】

CD1a 発現細胞の数および機能を修飾することにより、抗体は、脂質反応性に留まらない作用を有し、ペプチド特異的 T 細胞に対する抗原提示および先天性経路（例えば、好中球）を含む CD1a 発現細胞のすべての役割に影響する。本発明の抗体は、マウス IgG1 の性質にもかかわらずランゲルハンス細胞を減少させることが可能である。このような減少により、補体／ADCC 関連炎症を有せずに幅広い炎症経路を制御する手段がもたらされ、これにより治療的有用性がもたらされ得る。これは、本明細書に記載のイミキモドモデルにおいて示され、この場合、本発明による抗体により、例えば、野生型マウスを有意に下回るレベルまで炎症が低下し、先天性経路、例えば、好中球および好酸球を含む CD1a 発現細胞に留まらない経路に対する著明な抗炎症作用が実証される。また、本発明の抗体は、広範な臨床疾患に関連する、IFNγ および IL-22 を含む多様なサイトカインの産生を阻害する。

40

【0048】

50

別の態様では、本発明の抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を本発明により提供する。このような核酸は、配列番号 51～90 のいずれかにより提供し得る。当業者は、コドン冗長性のため、多くの DNA 配列を使用して本発明の抗体またはその抗原結合断片をコードし得ることを理解する。あるいは、ヌクレオチド配列のコドン最適化を使用して、本発明の抗体またはその抗原結合断片の生成のための発現系における翻訳の効率を改善させることができる。

【0049】

別の態様では、本発明の核酸を含むベクターを本発明により提供する。プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子および他の配列を含む適切な調節配列を必要に応じて含む、適するベクターを選択または構築することができる。ベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルスであり得る。さらなる詳細については、例えば、(Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) を参照されたい。例えば、核酸コンストラクトの調製、突然変異誘発、シーケンシング、細胞への DNA の導入および遺伝子発現における核酸の操作、ならびにタンパク質の解析のための多くの公知の技術およびプロトコルは、(Ausubel et al., *Current protocols in molecular biology*, New York: Greene Publishing Association; Wiley-Interscience, 1992) に詳細が記載されている。ベクターは、発現ベクターであり得る。ベクターまたは発現ベクターは、プラスミドであり得る。

【0050】

本発明の核酸分子またはベクターは、適する任意の発現系を使用して、例えば、適する宿主細胞または無細胞系において発現させ得る。

【0051】

別の態様では、本発明の抗体もしくはその抗原結合断片、核酸および／またはベクターを含む宿主細胞を本発明により提供する。宿主細胞は、細菌宿主細胞（原核生物系）、例えば、大腸菌（*E. coli*）もしくは真核細胞、例えば、酵母、真菌の細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞から選択され得る。好ましくは、本発明の宿主細胞は、本発明の抗体またはその抗原結合断片を産生することが可能である。産生された抗体またはその抗原結合断片は、選択および／または単離の手段により濃縮し得る。

【0052】

また、本発明の抗体またはその抗原結合断片は、化学合成により生成し得る。得られた抗体またはその抗原結合断片は、選択および／または単離の手段により濃縮し得る。

【0053】

さらなる態様によれば、本発明の抗体またはその抗原結合断片、核酸、ベクターおよび／または宿主細胞を、適宜 1 つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤または希釈剤とともに含む、医薬組成物を本発明により提供する。

【0054】

本発明の抗体またはその抗原結合断片、核酸、ベクターまたは宿主細胞は、確立された調製方法を使用して医薬組成物に製剤化することができる (Gennaro, A.L. and Gennaro, A.R. (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。医薬組成物を調製するために、薬学的に不活性な無機または有機賦形剤を使用することができる。例えば、丸剤、散剤、ゼラチンカプセルまたは坐剤の調製には、ラクトース、タルク、ステアリン酸およびその塩、脂肪、ワックス、固体または液体ポリオール、天然および硬化油が、使用可能な薬学的に許容される賦形剤の例となる。溶液、懸濁液、乳濁液、エアロゾル混合物、または溶液もしくはエアロゾル混合物の使用前の再構成のための散剤の生成に適する賦形剤としては、水、アルコール、グリセロール、ポリオールおよび適するそれらの混合物、ならびに植物油が挙げられる。

【0055】

本発明の医薬組成物は、治療的に有効な任意の非経口または経口（経腸）経路を介して投与し得る。非経口適用方法としては、例えば、注射液、注入液または混合物の形態による、例えば、皮内、皮下、筋肉内、気管内、鼻腔内、硝子体内または静脈内注射および注入技術、ならびに例えば、エアロゾル混合物、スプレーまたは散剤の形態による、エアロゾル導入および吸入が挙げられる。本発明の医薬組成物は、従来の非毒性の薬学的に許容される賦形剤または担体、添加剤および媒体を要望に応じて含む製剤により全身的または局所的に投与することができる。静脈内および皮下注入および／または注射の組合せは、化合物が相対的に短いもしくは長い血清半減期を有するか、または作用の速やかな発現を必要とする場合に最も好都合であり得る。好ましくは、医薬組成物は、皮下または静脈内に投与する。医薬組成物は、水溶液、水中油乳濁液または油中水乳濁液であり得る。

10

【0056】

静脈内注射または患部もしくは他の投与部位における注射では、活性成分は、発熱物質不含であり、適するpH、等張性および安定性を有する、非経口的に許容される水溶液の形態である。当業者は、例えば、等張性媒体、例えば、塩化ナトリウム注射剤、リンゲル注射剤、乳酸リンゲル注射剤を使用した適する溶液の調製に熟達している。保存剤、安定剤、緩衝液、抗酸化剤および／または他の添加剤を必要に応じて含み得る。

【0057】

組成物は、好ましくは、個体に有用性を示すのに十分な「治療有効量」で個体に投与する。最適投与量は、抗体またはその抗原結合断片の体内分布、投与方法、治療する疾患／障害の重症度ならびに患者の医学的症状に依存する。望ましい場合、抗体またはその抗原結合断片は、持続放出製剤、例えば、リポソーム分散剤またはヒドロゲルベースのポリマーミクロスフェア、例えば、PolyActive（商標）またはOctoDEX（商標）により投与し得る（Bos et al., Business Briefing: Pharmatech 2003: 1-6を参照）。利用可能な他の持続放出製剤は、例えば、PLGAベースのポリマー（PR pharmaceuticals社）、PLA-PEGベースのヒドロゲル（Medinco社）およびPEAベースのポリマー（Medivas社）である。治療薬の処方、例えば、投与量の決定等は、医師の責任の範囲内であり、典型的に、治療する障害、個々の患者の症状、送達部位、投与方法および医師に公知の他の因子を考慮する。

20

【0058】

また、医薬組成物は、添加剤、例えば、充填剤、結合剤、湿潤剤、流動促進剤、安定剤、保存剤、乳化剤、さらなる溶媒または溶解剤あるいはデポ作用を達成するための薬剤等を含み得る。最後者は、融合タンパク質を徐放もしくは持続放出または標的送達系、例えば、リポソームおよびマイクロカプセルに組み込み得る。

30

【0059】

別の態様では、本発明の抗体もしくはその抗原結合断片、核酸、ベクター、宿主細胞または医薬組成物は、対象における1つまたは複数の疾患または障害の治療または予防における使用のためのものであり得る。

【0060】

ある態様では、有効量の本発明の抗体もしくはその抗原結合断片、核酸、ベクター、宿主細胞または組成物を対象に投与する工程を含む、対象における1つまたは複数の疾患または障害を治療または予防する方法を提供する。

40

【0061】

ある態様では、対象における1つまたは複数の疾患または障害の治療または予防のための医薬の製造における、本発明の抗体もしくはその抗原結合断片、核酸、ベクター、宿主細胞または医薬組成物の使用を提供する。

【0062】

任意の態様では、対象は、哺乳動物であり得る。哺乳動物は、CD1aオルソログを発現し得る。好ましくは、対象は、ヒトである。

【0063】

1つまたは複数の疾患または障害は、1つもしくは複数の炎症性皮膚もしくは粘膜障害

50

もしくは疾患、または1つもしくは複数の関連する全身性疾患もしくは障害、または1つもしくは複数の全身的に現れる炎症性薬物反応、またはCD1a発現悪性疾患であり得る。

【0064】

炎症性皮膚または粘膜疾患または障害は、次から選択され得る。

a) 好中球優勢皮膚疾患、例えば、ざ瘡、汎発性膿疱性乾癬、尋常性乾癬、滴状乾癬、掌蹠膿疱症、SAPHO症候群、急性熱性好中球性皮膚症（スイート症候群）、組織球様好中球性皮膚炎、手背部好中球性皮膚症、壊疽性膿皮症、好中球性エクリン汗腺炎、化膿性汗腺炎、持久性隆起性紅斑、ベーチェット病、腸関連皮膚炎・関節炎症候群、他の感染症に関連する炎症、好中球性蕁麻疹様皮膚症、柵状好中球性肉芽腫性皮膚炎、ほ行性迂回状紅斑（*erythema gyratum repens*）、好中球性環状紅斑、急性汎発性発疹性膿疱症（AGEP）、血管炎他；

10

b) 自己免疫障害、例えば、結合組織疾患（例えば、ループス、皮膚筋炎、強皮症／全身性硬化症、チャグ・ストラウス症候群）、脂肪織炎、血管炎、自己免疫性水疱形成症状（例えば、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、線状IgA病）、ヘルペス状皮膚炎、セリアック病、一部の自己炎症性疾患、白斑、円形脱毛症、汎発性脱毛症、全頭脱毛症、脂肪織炎、扁平苔癬、多形性紅斑、硬化性苔癬、他の苔癬状および多形性紅斑様疾患、小胞化乾癬性関節炎、関節リウマチ、炎症性腸疾患、多発性硬化症、ギラン・バレー症候群、甲状腺炎、横断性脊髄炎、神経変性他；

c) 肥満細胞障害および好酸球性障害、例えば、マックル・ウェルズ症候群、好酸球増加および全身性症候症候群、蕁麻疹、血管浮腫、角結膜炎、食物アレルギー、アトピー性皮膚炎を含む他のアレルギーまたはアトピー、鼻炎、結膜炎、喘息、好酸球性食道炎（*eosinophilic oesophagitis*）および他の好酸球性粘膜疾患、接触性皮膚炎他；

20

d) 炎症性皮膚または粘膜疾患または障害として現れる薬物有害反応、例えば、スティーブンス・ジョンソン症候群、中毒性表皮壊死症、薬物反応による好酸球増加および全身性症候症候群（*drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms syndrome*）（DRESS）ならびに急性汎発性発疹性膿疱症（AGEP）、多形性紅斑、水疱性疾患、固定薬疹他；

e) 移植片対宿主病。

30

【0065】

CD1a発現悪性疾患は、本明細書において言及する場合、CD1a発現を検出可能な任意の悪性疾患であり得る。このような悪性疾患としては、ランゲルハンス細胞組織球症、T細胞リンパ腫のサブセット、胸腺腫のサブセットまたは他の悪性疾患のまれに生じる症例、例えば、肥満細胞症のサブセットが挙げられ得る。好ましくは、CD1a発現悪性疾患は、T細胞リンパ腫のサブセットである。

【0066】

好ましくは、1つまたは複数の疾患または障害は、乾癬、皮膚炎、エリテマトーデス、好中球性皮膚疾患、関連する全身性疾患もしくは障害、および／または全身的に現れる炎症性薬物反応、またはCD1a発現悪性疾患を含むかまたはそれらからなる。

40

【0067】

関連する全身性疾患または障害は、本明細書において使用する場合、本明細書に定義の炎症性皮膚または粘膜疾患または障害と関連し得る任意の非皮膚部位合併症を指し得る。これは、非皮膚エリテマトーデスを含み得る。

【0068】

全身的に現れる炎症性薬物反応は、非皮膚部位、例えば、脾臓における反応であり得る。関連する全身性疾患もしくは障害、または全身的に現れる炎症性薬物反応は、炎症応答の結果であり得る。炎症応答は、例えば、薬物、例えば、アルダラ（Aldara、イミキモド5%のクリーム）に対するものであり得る。炎症応答により、CD4T細胞、CD8T細胞、好中球もしくは好酸球の数もしくは活性の上昇、ならびに／またはIL-23

50

、IL-12、IL-1 β および／もしくはMCP-1のレベルの上昇、ならびに／またはIL-10および／もしくはIL-27の低下が生じ得る。

【0069】

その上、本発明の抗体もしくはその抗原結合断片、核酸、ベクター、宿主細胞または医薬組成物は、単独で、または1つまたは複数の他の治療剤と組み合わせて、同時、逐次または別々のいずれかにより、治療する症状に応じて投与され得る。1つまたは複数の他の治療剤は、細胞毒性剤、免疫活性化剤、例えば、チェックポイント阻害剤またはTLRアゴニスト、抗炎症剤、例えば、ステロイド、CAR-T細胞、例えば、調節性もしくは細胞溶解性CAR-T細胞、または1つもしくは複数の本発明の抗体もしくは抗原結合断片を発現もしくは提示する他の細胞を含む群から選択され得る。

10

【0070】

別の態様では、

- i. 対象から得られる生体試料を用意することと、
 - ii. 治療前、または治療の合間、または治療が無い期間に対象から得られた試料においてCD1a発現細胞に対する1つまたは複数の本発明の抗体または抗原結合断片の結合レベルを決定することと、
 - iii. 治療後または治療の合間または治療が無い期間に腫瘍量、またはCD1a発現細胞に対する1つもしくは複数の本発明の抗体もしくは抗原結合断片の結合レベルが低下する場合、治療が有効であるか、または病状が改善していると判定することと
- を含む、CD1a発現悪性疾患であると診断された対象における治療有効性または病状を監視する方法を提供する。

20

【0071】

生体試料は、血液もしくは血清試料、組織生検、脳脊髄液、唾液または尿試料であり得る。好ましくは、生体試料は、血液または血清試料であり得る。

【0072】

試料におけるCD1a発現細胞に対する1つまたは複数の本発明の抗体または抗原結合断片の結合レベルは、当業者に公知の任意の方法を使用して決定し得る。このような一方法では、例えば、フローサイトメトリーまたは検出可能な標識を利用する他の任意の技術を使用して、試料におけるCD1a発現細胞数の決定が可能となる。

【0073】

腫瘍量は、当業者に公知の適する任意の技術により決定し得る。

30

【0074】

腫瘍量またはCD1a発現細胞に対する1つもしくは複数の本発明の抗体もしくは抗原結合断片の結合レベルの低下は、10%以上、例えば、25%以上、50%以上、75%以上または90%以上の低下であり得る。

【0075】

治療の合間または治療が無い期間は、2週間以上、例えば、4週間以上、8週間以上、12週間以上、6カ月以上または12カ月以上であり得る。

【0076】

抗体およびその抗原結合断片の生成のための技術は、当技術分野において周知である。「抗体」という用語は、種々のクラス（すなわち、IgA、IgG、IgM、IgDおよびIgE）およびサブクラス（例えば、IgG1、IgG2等）の免疫グロブリン（Ig）をも含む。抗体またはその抗原結合断片の説明的な例としては、Fab断片、F(ab')₂、Fv断片、一本鎖Fv断片（scFv）、ダイアボディ、ドメイン抗体または二特异性抗体が挙げられる（Holt LJ et al., Trends Biotechnol. 21(11), 2003, 484-490）。また、例としては、単一CHドメインまたは単独で抗原に結合可能なVLドメインからなるdAB断片が挙げられる。抗体またはその抗原結合断片は、キメラ、ナノボディ、一本鎖および／またはヒト化抗体またはその抗原結合断片であり得る。抗体またはその抗原結合断片は、ヒトIgG1アイソタイプもしくはヒトIgG4アイソタイプまたは他の天然もしくは修飾アイソタイプであり得る。抗体は、モノクローナル（mAb）

40

50

またはポリクローナル抗体であり得る。

【0077】

抗体またはその抗原結合断片は、インビボ (in vivo) での安定性および／または半減期を変更するように修飾し得る。修飾は、例えば、PEG化であり得る。

【0078】

抗体またはその抗原結合断片は、抗体様分子であってもよく、これは、合成分子、例えば、SMIPおよび小型の抗体ミメティックと別々または組み合わせたCDRの使用を含む。

【0079】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列のパーセント同一性は一般に、最適な比較目的のための配列のアラインメント（例えば、第2の配列による最良のアラインメントのために第1の配列にギャップを導入することができる）および対応する位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドの比較により決定する。「最良のアラインメント」は、最も高いパーセント同一性が生じる2つの配列のアラインメントである。パーセント同一性は、配列内の同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドの数を比較することにより決定する（すなわち、 $\% \text{同一性} = \text{同一位置の数} / \text{位置の総数} \times 100$ ）。

【0080】

2つの配列間のパーセント同一性の決定は、当業者に公知の数値アルゴリズムを使用して達成することができる。2つの配列の比較のための数値アルゴリズムの例は、Karlin and Altschul, 1990, PNAS, 87(6):2264-8のアルゴリズムであり、Karlin and Altschul, 1993, PNAS, 90(12):5873-5877等により改変された。Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラムでは、このようなアルゴリズムを組み込んでいる。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラムのscore=100、word length=12により実施して、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラムのscore=50、word length=3により実施して、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップアラインメントを得るには、Altschul et al. (1997)に記載のようにGapped BLASTを利用することができる。あるいは、PSI-Blastを使用して反復検索を実施し、これにより分子間の距離関係を検出することができる（同上）。BLAST、Gapped BLASTおよびPSI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。配列の比較に利用する数値アルゴリズムの別の例は、MyersおよびMillerのアルゴリズムである。GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）では、このようなアルゴリズムを組み込んでいる。当技術分野において公知の配列解析のための他のアルゴリズムとしては、Torellis and Robotti (1994)に記載のADVANCEおよびADAM、ならびにPearson and Lipman (1988)に記載のFASTAが挙げられる。FASTAでは、ktupは、検索の感度および速度を設定する制御オプションである。

【0081】

本発明の抗体またはその抗原結合断片は、1つまたは複数の突然変異アミノ酸残基を含み得る。本発明の核酸または抗体もしくはその抗原結合断片に関する「突然変異した」、「突然変異体」および「突然変異」という用語は、「天然に」存在する核酸またはポリペプチド、すなわち、野生型を定義するのに利用可能な参照配列と比較した、1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸の置換、欠失または挿入をそれぞれ指す。

【0082】

CDR配列におけるアミノ酸変異は、保存的アミノ酸置換であり得る。

【0083】

突然変異は置換であってもよく、この場合、置換は保存的置換である。保存的置換は一

10

20

30

40

50

般に、次の置換であり、これらは突然変異するアミノ酸に従って列挙し、それぞれが、保存的であると考えられ得る1つまたは複数の置換（複数可）を後に伴う：Ala→Gly、Ser、Val；Arg→Lys；Asn→Gln、His；Asp→Glu；Cys→Ser；Gln→Asn；Glu→Asp；Gly→Ala；His→Arg、Asn、Gln；Ile→Leu、Val；Leu→Ile、Val；Lys→Arg、Gln、Glu；Met→Leu、Tyr、He；Phe→Met、Leu、Tyr；Ser→Thr；Thr→Ser；Trp→Tyr；Tyr→Trp、Phe；Val→He、Leu。他の置換も容認され、経験的に、または他の公知の保存的もしくは非保存的置換に合わせて決定することができる。

【0084】

本発明の抗体またはその抗原結合断片のCDRにおいて1、2または3つの保存的置換を行い得る。

【0085】

抗体またはその抗原結合断片を生成する方法は、当技術分野において周知である。当業者は、例えば、ハイブリドーマ技術を使用し得るか、または組換えDNA技術を使用して、それぞれの抗体配列をベクター、例えば、発現ベクターにクローニングし得る。二特異性抗体分子を生成する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、組換えDNA技術、2つの異なるモノクローナル抗体の化学コンジュゲーション、または例えば、2つの抗体断片、例えば、2つのFab断片の化学コンジュゲーションもが挙げられる。あるいは、二特異性抗体分子は、クアドローマ技術により生成し、これは、親抗体を産生するハイブリドーマの融合によるものである。HおよびL鎖のランダムな組合せにより、10種の異なる抗体構造の潜在的混合物を生成し、このうちの唯1つが、所望の結合特異性を有する。本発明の二特異性抗体分子は、各標的に対するモノクローナル抗体(mAb)として作用し得る。抗体またはその抗原結合断片は、キメラ、ヒト化または完全ヒト抗体またはその抗原結合断片であり得る。抗体またはその抗原結合断片は、ヒトIgG1アイソタイプもしくはヒトIgG4アイソタイプまたは他の天然もしくは修飾アイソタイプであり得る。二特異性抗体分子または多特異性抗体は、例えば、二特異性タンデム一本鎖Fv、二特異性Fab2または二特異性ダイアボディであり得る。

【0086】

本明細書に開示の特徴はすべて、任意の態様または任意の実施形態との組合せを含む任意の組合せで併用し得る。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】図1は、抗CD1a抗体のパネルによるポリクローナルT細胞応答の阻害を示す。A．抗CD1a抗体の上昇濃度(0.01~10μg/ml)によるポリクローナルT細胞IFNγ応答の用量滴定曲線(n=6ドナー)。B．新たに生成した抗CD1a抗体のパネルおよび市販の抗体について算出したIC50値(OKT6、HI149およびSK9、n=6ドナー)。

【図2-1】図2は、抗CD1a抗体のパネルによるCD1a制限濃縮T細胞株応答の阻害を実証する。A~B．空ベクター(EV)または内因性リガンドを提示するCD1aトランスフェクトK562により誘導されるCD1a制限濃縮T細胞株のサイトカイン分泌応答。IFNγ(A.)またはIL-22(B.)の阻害を、新たに生成した抗CD1a抗体のパネルについてフローサイトメトリーにより評価した。C．内因性リガンドを提示するCD1aコーティングビーズにより誘導されるCD1a制限濃縮T細胞株のIFNγ分泌応答。新たに生成した抗CD1a抗体のパネルについてフローサイトメトリーにより阻害を評価した。新たに生成した抗CD1a抗体のパネルについてフローサイトメトリーにより阻害を評価した(N=4~19濃縮T細胞株、二元配置分散分析とともにチューキーの検定、*、P<0.05；**、P<0.01；***、P<0.001；****、P<0.0001、ここで*は「CD1a」に対する比較に関する有意性を示す)。

【図2-2】図2は、抗CD1a抗体のパネルによるCD1a制限濃縮T細胞株応答の阻

10

20

30

40

50

害を実証する。A～B．空ベクター（EV）または内因性リガンドを提示するCD1aトランスフェクトK562により誘導されるCD1a制限濃縮T細胞株のサイトカイン分泌応答。IFN γ （A．）またはIL-22（B．）の阻害を、新たに生成した抗CD1a抗体のパネルについてフローサイトメトリーにより評価した。C．内因性リガンドを提示するCD1aコーティングビーズにより誘導されるCD1a制限濃縮T細胞株のIFN γ 分泌応答。新たに生成した抗CD1a抗体のパネルについてフローサイトメトリーにより阻害を評価した。新たに生成した抗CD1a抗体のパネルについてフローサイトメトリーにより阻害を評価した（N=4～19濃縮T細胞株、二元配置分散分析とともにチューキーの検定、*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ ；***、 $P<0.001$ ；****、 $P<0.0001$ 、ここで*は「CD1a」に対する比較に関する有意性を示す）。

10

【図3-1】図3は、CD1a遺伝子導入マウスの特性決定を実証する。A．それぞれのフローサイトメトリープロットおよびB．野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）マウスの細胞によるCD1aタンパク質発現の要約図。CD1aタンパク質発現が、（左から右に）総生耳皮膚細胞、CD45+皮膚細胞、真皮樹状細胞（dDC、CD45+／CD11c+／ランゲリン-）およびランゲルハンス細胞（LC、CD45+／CD11c+／ランゲリン+）において上昇した。C．免疫蛍光により可視化した野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）マウスの耳皮膚におけるCD1aタンパク質発現。凍結切片をDAPI（青）および抗CD1a AF-594（OKT6、赤）で染色した。スケールバーは、左から右に50 μ m、50 μ mおよび10 μ m。D．CD1aフォワードおよびリバースプライマーならびに尾部ゲノムDNAを使用したCD1a遺伝子導入マウス系統同腹仔（レーンA～F）の例となるPCR遺伝子型決定。655bpにおける予想CD1aバンド。レーンG：ファウンダーマウス由来の陽性対照ゲノムDNA。レーンH：DNA鋳型を欠く陰性対照。E．野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）マウスによる胸腺CD1aタンパク質発現の代表的フローサイトメトリープロット。

20

【図3-2】図3は、CD1a遺伝子導入マウスの特性決定を実証する。A．それぞれのフローサイトメトリープロットおよびB．野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）マウスの細胞によるCD1aタンパク質発現の要約図。CD1aタンパク質発現が、（左から右に）総生耳皮膚細胞、CD45+皮膚細胞、真皮樹状細胞（dDC、CD45+／CD11c+／ランゲリン-）およびランゲルハンス細胞（LC、CD45+／CD11c+／ランゲリン+）において上昇した。C．免疫蛍光により可視化した野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）マウスの耳皮膚におけるCD1aタンパク質発現。凍結切片をDAPI（青）および抗CD1a AF-594（OKT6、赤）で染色した。スケールバーは、左から右に50 μ m、50 μ mおよび10 μ m。D．CD1aフォワードおよびリバースプライマーならびに尾部ゲノムDNAを使用したCD1a遺伝子導入マウス系統同腹仔（レーンA～F）の例となるPCR遺伝子型決定。655bpにおける予想CD1aバンド。レーンG：ファウンダーマウス由来の陽性対照ゲノムDNA。レーンH：DNA鋳型を欠く陰性対照。E．野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）マウスによる胸腺CD1aタンパク質発現の代表的フローサイトメトリープロット。

30

【図4】図4は、インビボでの抗CD1a抗体の特性決定である。A．イミキモド誘発皮膚炎症および抗CD1a予防投与の模式図。B．マウスIgG1アイソタイプ対照をi.p．注射した野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入マウス（CD1a）ならびに模式的パネルA．のように抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a遺伝子導入マウスのイミキモド処置により誘発される耳腫脹の毎日の測定（N=6、二元配置分散分析とともにダネットの検定、**、 $P<0.01$ ；****、 $P<0.0001$ 、6日目または示す日数における「CD1a」に対する比較に関する有意性を示す）。

40

【図5】図5は、イミキモド誘発皮膚免疫応答に対する抗CD1aの作用を実証する。A～C．マウスIgG1アイソタイプ処置野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）ならびに予防投与モデルに従って抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a

50

遺伝子導入マウスの耳皮膚のフローサイトメトリー解析。皮膚T細胞を数え上げ（A.）、細胞表面CD69発現（B.）について評価し、皮膚好中球（C.）および好酸球（D.）発生頻度を決定した（N=4、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ ；***、 $P<0.001$ ）。

【図6】図6は、イミキモド誘発細胞性ランゲルハンス細胞皮膚およびリンパ節応答に対する抗CD1aの作用を実証する。マウスIgG1アイソタイプ処置野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）ならびに予防投与モデルに従って抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a遺伝子導入マウスの耳皮膚（A~B.）および流入領域頸部リンパ節（C~D.）のフローサイトメトリー解析。皮膚LCを数え上げ（A.）、細胞表面CD1a発現について評価した（B.）。リンパ節LCを数え上げ（C.）、細胞表面CD1a発現について評価した（D.）（N=4、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ ；***、 $P<0.001$ ；****、 $P<0.0001$ ）。

【図7-1】図7は、抗体依存性枯渇（表現型変化）を実証する。A. 抗体誘導CD1a依存性細胞減少（例えば、死）のフローサイトメトリー解析。抗CD1a抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照（iso、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）をEVまたはCD1a-K562とともに指示のように48時間インキュベートし、無処理K562の参照集団に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出してEV対照細胞に対して正規化した。B. 上昇濃度の抗CD1a抗体（ $0.625\sim5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）による抗体誘導CD1a-K562細胞減少の用量滴定曲線。C~D. 抗CD1a抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照（iso、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）をMoDC（上パネル）およびMoLC（下パネル）とともに指示のように5日間インキュベートして0日目または2日目に抗体およびサイトカインを加え、Incucyte生細胞イメージング（N=4、二元配置分散分析とともにチューキーの検定）（C.）およびMoLCの代表的画像（D.）を使用してパーセンテージコンフルエンスにより測定したアイソタイプ対照に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出した。E. K562-CD1aまたはK562-EV（空ベクター）を抗CD1a抗体とともに24時間インキュベートし、アネキシンVに染色し、フローサイトメトリーにより解析した（N=3~4、一元配置分散分析とともにチューキーの検定）。F. 補体依存性細胞毒性（CDC）のフローサイトメトリー解析。K562-CD1a細胞を10%の正常ヒト血清とともに $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に 37°C で3時間インキュベートした。無処理K562の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した（N=6、一元配置分散分析とともにチューキーの検定）。G. 抗体依存性細胞媒介細胞毒性（ADCC）のフローサイトメトリー解析。K562-CD1a細胞をPBMCと1:50の比率により、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に 37°C で5時間同時培養した。無処理K562の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した（N=4~6、一元配置分散分析とともにチューキーの検定）。H. NSGマウスにCD1a-K562細胞25万細胞を側腹部に皮下注射し、18日間腫瘍を発生させた。6、10および14日目にマウスの腹腔内をアイソタイプ対照抗体または指示抗体 $100\mu\text{g}$ で処置した。腫瘍量を経時的に測定した（N=6~15、二元配置分散分析とともにチューキーの検定、アスタリスクは、18日目の「CD1a-iso」に対する比較に関する有意性を示す）。*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ ；***、 $P<0.001$ ；****、 $P<0.0001$ 。

【図7-2】図7は、抗体依存性枯渇（表現型変化）を実証する。A. 抗体誘導CD1a依存性細胞減少（例えば、死）のフローサイトメトリー解析。抗CD1a抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照（iso、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）をEVまたはCD1a-K562とともに指示のように48時間インキュベートし、無処理K562の参照集団に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出してEV対照細胞に対して正規化した。B. 上昇濃度の抗CD1a抗体（ $0.625\sim5\mu\text{g}/\text{ml}$ ）による抗体誘導CD1a-K562細胞減少の用量滴定曲線。C~D. 抗CD1a抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照（

i s o、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$)をM o D C (上パネル) およびM o L C (下パネル) とともに指示のように5日間インキュベートして0日目または2日目に抗体およびサイトカインを加え、I n c u c y t e生細胞イメージング ($N=4$ 、二元配置分散分析とともにチューキーの検定) (C.) およびM o L Cの代表的画像 (D.) を使用してパーセンテージコンフルエンスにより測定したアイソタイプ対照に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出した。E. K 5 6 2 - C D 1 aまたはK 5 6 2 - E V (空ベクター) を抗C D 1 a抗体とともに24時間インキュベートし、アネキシンVに染色し、フローサイトメトリーにより解析した ($N=3\sim 4$ 、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。F. 補体依存性細胞毒性 (C D C) のフローサイトメトリー解析。K 5 6 2 - C D 1 a細胞を10%の正常ヒト血清とともに $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に 37°C で3時間インキュベートした。無処理K 5 6 2の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した ($N=6$ 、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。G. 抗体依存性細胞媒介細胞毒性 (A D C C) のフローサイトメトリー解析。K 5 6 2 - C D 1 a細胞をP B M Cと1:50の比率により、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に 37°C で5時間同時培養した。無処理K 5 6 2の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した ($N=4\sim 6$ 、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。H. N S GマウスにC D 1 a - K 5 6 2細胞25万細胞を側腹部に皮下注射し、18日間腫瘍を発生させた。6、10および14日目にマウスの腹腔内をアイソタイプ対照抗体または指示抗体 $100\mu\text{g}$ で処置した。腫瘍量を経時的に測定した ($N=6\sim 15$ 、二元配置分散分析とともにチューキーの検定、アスタリスクは、18日目の「C D 1 a - i s o」に対する比較に関する有意性を示す)。*, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$; ****, $P<0.0001$ 。

【図7-3】図7は、抗体依存性枯渇 (表現型変化) を実証する。A. 抗体誘導C D 1 a依存性細胞減少 (例えば、死) のフローサイトメトリー解析。抗C D 1 a抗体またはマウスI g G 1アイソタイプ対照 (i s o、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$) をE VまたはC D 1 a - K 5 6 2とともに指示のように48時間インキュベートし、無処理K 5 6 2の参照集団に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出してE V対照細胞に対して正規化した。B. 上昇濃度の抗C D 1 a抗体 ($0.625\sim 5\mu\text{g}/\text{ml}$) による抗体誘導C D 1 a - K 5 6 2細胞減少の用量滴定曲線。C~D. 抗C D 1 a抗体またはマウスI g G 1アイソタイプ対照 (i s o、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$) をM o D C (上パネル) およびM o L C (下パネル) とともに指示のように5日間インキュベートして0日目または2日目に抗体およびサイトカインを加え、I n c u c y t e生細胞イメージング ($N=4$ 、二元配置分散分析とともにチューキーの検定) (C.) およびM o L Cの代表的画像 (D.) を使用してパーセンテージコンフルエンスにより測定したアイソタイプ対照に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出した。E. K 5 6 2 - C D 1 aまたはK 5 6 2 - E V (空ベクター) を抗C D 1 a抗体とともに24時間インキュベートし、アネキシンVに染色し、フローサイトメトリーにより解析した ($N=3\sim 4$ 、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。F. 補体依存性細胞毒性 (C D C) のフローサイトメトリー解析。K 5 6 2 - C D 1 a細胞を10%の正常ヒト血清とともに $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に 37°C で3時間インキュベートした。無処理K 5 6 2の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した ($N=6$ 、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。G. 抗体依存性細胞媒介細胞毒性 (A D C C) のフローサイトメトリー解析。K 5 6 2 - C D 1 a細胞をP B M Cと1:50の比率により、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に 37°C で5時間同時培養した。無処理K 5 6 2の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した ($N=4\sim 6$ 、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。H. N S GマウスにC D 1 a - K 5 6 2細胞25万細胞を側腹部に皮下注射し、18日間腫瘍を発生させた。6、10および14日目にマウスの腹腔内をアイソタイプ対照抗体または指示抗体 $100\mu\text{g}$ で処置した。腫瘍量を経時的に測

10

20

30

40

50

定した (N = 6 ~ 15、二元配置分散分析とともにテューキーの検定、アスタリスクは、18日目の「CD1a-iso」に対する比較に関する有意性を示す)。* , P < 0.05 ; ** , P < 0.01 ; *** , P < 0.001 ; **** , P < 0.0001。

【図7-4】図7は、抗体依存性枯渇（表現型変化）を実証する。A. 抗体誘導CD1a依存性細胞減少（例えば、死）のフローサイトメトリー解析。抗CD1a抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照（iso、5 µg/ml）をEVまたはCD1a-K562とともに指示のように48時間インキュベートし、無処理K562の参照集団に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出してEV対照細胞に対して正規化した。B. 上昇濃度の抗CD1a抗体（0.625 ~ 5 µg/ml）による抗体誘導CD1a-K562細胞減少の用量滴定曲線。C ~ D. 抗CD1a抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照（iso、5 µg/ml）をMoDC（上パネル）およびMoLC（下パネル）とともに指示のように5日間インキュベートして0日目または2日目に抗体およびサイトカインを加え、Incucyte生細胞イメージング（N = 4、二元配置分散分析とともにテューキーの検定）（C.）およびMoLCの代表的画像（D.）を使用してパーセンテージコンフルエンスにより測定したアイソタイプ対照に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出した。E. K562-CD1aまたはK562-EV（空ベクター）を抗CD1a抗体とともに24時間インキュベートし、アネキシンVに染色し、フローサイトメトリーにより解析した（N = 3 ~ 4、一元配置分散分析とともにテューキーの検定）。F. 補体依存性細胞毒性（CDC）のフローサイトメトリー解析。K562-CD1a細胞を10%の正常ヒト血清とともに5 µg/mlのアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に37℃で3時間インキュベートした。無処理K562の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した（N = 6、一元配置分散分析とともにテューキーの検定）。G. 抗体依存性細胞媒介細胞毒性（ADCC）のフローサイトメトリー解析。K562-CD1a細胞をPBMCと1:50の比率により、5 µg/mlのアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に37℃で5時間同時培養した。無処理K562の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した（N = 4 ~ 6、一元配置分散分析とともにテューキーの検定）。H. NSGマウスにCD1a-K562細胞25万細胞を側腹部に皮下注射し、18日間腫瘍を発生させた。6、10および14日目にマウスの腹腔内をアイソタイプ対照抗体または指示抗体100 µgで処置した。腫瘍量を経時的に測定した（N = 6 ~ 15、二元配置分散分析とともにテューキーの検定、アスタリスクは、18日目の「CD1a-iso」に対する比較に関する有意性を示す）。* , P < 0.05 ; ** , P < 0.01 ; *** , P < 0.001 ; **** , P < 0.0001。

【図7-5】図7は、抗体依存性枯渇（表現型変化）を実証する。A. 抗体誘導CD1a依存性細胞減少（例えば、死）のフローサイトメトリー解析。抗CD1a抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照（iso、5 µg/ml）をEVまたはCD1a-K562とともに指示のように48時間インキュベートし、無処理K562の参照集団に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出してEV対照細胞に対して正規化した。B. 上昇濃度の抗CD1a抗体（0.625 ~ 5 µg/ml）による抗体誘導CD1a-K562細胞減少の用量滴定曲線。C ~ D. 抗CD1a抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照（iso、5 µg/ml）をMoDC（上パネル）およびMoLC（下パネル）とともに指示のように5日間インキュベートして0日目または2日目に抗体およびサイトカインを加え、Incucyte生細胞イメージング（N = 4、二元配置分散分析とともにテューキーの検定）（C.）およびMoLCの代表的画像（D.）を使用してパーセンテージコンフルエンスにより測定したアイソタイプ対照に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出した。E. K562-CD1aまたはK562-EV（空ベクター）を抗CD1a抗体とともに24時間インキュベートし、アネキシンVに染色し、フローサイトメトリーにより解析した（N = 3 ~ 4、一元配置分散分析とともにテューキーの検定）。F. 補体依存性細胞毒性（CDC）のフローサイトメトリー解析。K562-CD1a細胞を10%の正常ヒト血清とともに5 µg/mlのアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの

存在下に 37℃で3時間インキュベートした。無処理 K562 の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した (N=6、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。G. 抗体依存性細胞媒介細胞毒性 (ADCC) のフローサイトメトリー解析。K562-CD1a 細胞を PBMC と 1:50 の比率により、5 µg/ml のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に 37℃で5時間同時培養した。無処理 K562 の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した (N=4~6、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。H. NSG マウスに CD1a-K562 細胞 25 万細胞を側腹部に皮下注射し、18 日間腫瘍を発生させた。6、10 および 14 日目にマウスの腹腔内をアイソタイプ対照抗体または指示抗体 100 µg で処置した。腫瘍量を経時的に測定した (N=6~15、二元配置分散分析とともにチューキーの検定、アスタリスクは、18 日目の「CD1a-iso」に対する比較に関する有意性を示す)。*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001; ****, P<0.0001。

【図 7-6】図 7 は、抗体依存性枯渇 (表現型変化) を実証する。A. 抗体誘導 CD1a 依存性細胞減少 (例えば、死) のフローサイトメトリー解析。抗 CD1a 抗体またはマウス IgG1 アイソタイプ対照 (iso、5 µg/ml) を EV または CD1a-K562 とともに指示のように 48 時間インキュベートし、無処理 K562 の参照集団に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出して EV 対照細胞に対して正規化した。B. 上昇濃度の抗 CD1a 抗体 (0.625~5 µg/ml) による抗体誘導 CD1a-K562 細胞減少の用量滴定曲線。C~D. 抗 CD1a 抗体またはマウス IgG1 アイソタイプ対照 (iso、5 µg/ml) を MoDC (上パネル) および MoLC (下パネル) とともに指示のように 5 日間インキュベートして 0 日目または 2 日目に抗体およびサイトカインを加え、Incucyte 生細胞イメージング (N=4、二元配置分散分析とともにチューキーの検定) (C.) および MoLC の代表的画像 (D.) を使用してパーセンテージコンフルエンスにより測定したアイソタイプ対照に対して抗体誘導減少のパーセンテージを算出した。E. K562-CD1a または K562-EV (空ベクター) を抗 CD1a 抗体とともに 24 時間インキュベートし、アネキシン V に染色し、フローサイトメトリーにより解析した (N=3~4、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。F. 補体依存性細胞毒性 (CDC) のフローサイトメトリー解析。K562-CD1a 細胞を 10% の正常ヒト血清とともに 5 µg/ml のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に 37℃で3時間インキュベートした。無処理 K562 の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した (N=6、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。G. 抗体依存性細胞媒介細胞毒性 (ADCC) のフローサイトメトリー解析。K562-CD1a 細胞を PBMC と 1:50 の比率により、5 µg/ml のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかの存在下に 37℃で5時間同時培養した。無処理 K562 の参照集団に対してパーセンテージ細胞毒性を算出し、アイソタイプ対照処理細胞に対して正規化した (N=4~6、一元配置分散分析とともにチューキーの検定)。H. NSG マウスに CD1a-K562 細胞 25 万細胞を側腹部に皮下注射し、18 日間腫瘍を発生させた。6、10 および 14 日目にマウスの腹腔内をアイソタイプ対照抗体または指示抗体 100 µg で処置した。腫瘍量を経時的に測定した (N=6~15、二元配置分散分析とともにチューキーの検定、アスタリスクは、18 日目の「CD1a-iso」に対する比較に関する有意性を示す)。*, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001; ****, P<0.0001。

【図 8-1】図 8 (A) は、CD1a エピトープ解析によるヒートマップである。CD1a-AF647 平均蛍光強度 (MFI) により測定したフローサイトメトリーによる CD1a 抗体結合のマトリックスヒートマップ表示。フルオロフォア AF647 にコンジュゲートした抗 CD1a 抗体による CD1a-K652 の染色前に、関連する精製抗体を細胞とともにインキュベートして、AF647 コンジュゲート抗体の CD1a 結合における干渉を評価した。グレースケールは干渉の程度を示し、最上行 (ー) の色調は無干渉を示す。(B) では、インビボでの CD1a 抗体エピトープ競合アッセイ結果を実証する。A.

抗CD1a抗体SK9（左パネル）またはHI149（右パネル）による染色によって測定したCD1a発現のフローサイトメトリープロット。0、2および4日目に抗CD1a抗体116（100 μg i. p.）を投与して、5日目に耳皮膚組織を採取、処理し、CD1aについて染色した。

【図8-2】図8（A）は、CD1aエピトープ解析によるヒートマップである。CD1a-AF647平均蛍光強度（MFI）により測定したフローサイトメトリーによるCD1a抗体結合のマトリックスヒートマップ表示。フルオロフォアAF647にコンジュゲートした抗CD1a抗体によるCD1a-K652の染色前に、関連する精製抗体を細胞とともにインキュベートして、AF647コンジュゲート抗体のCD1a結合における干渉を評価した。グレースケールは干渉の程度を示し、最上行（-）の色調は無干渉を示す。（B）では、インビボでのCD1a抗体エピトープ競合アッセイ結果を実証する。A. 抗CD1a抗体SK9（左パネル）またはHI149（右パネル）による染色によって測定したCD1a発現のフローサイトメトリープロット。0、2および4日目に抗CD1a抗体116（100 μg i. p.）を投与して、5日目に耳皮膚組織を採取、処理し、CD1aについて染色した。

【図9-1】図9は、イミキモド誘発炎症の治療における抗CD1a抗体の適用の有効性を実証する。A. 抗CD1a製剤投与によるイミキモド誘発炎症モデルの模式図。B. 耳腫脹の毎日の測定、ならびにC. 野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入マウス（CD1a）のイミキモド処置後のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi. p. 処置（8日目）、またはCD1a遺伝子導入マウスの模式的パネルAのような抗CD1a抗体の改良パネルによる注射（3日目の矢印）によって誘発される炎症の代表的画像（N=2~10、二元配置分散分析とともにダネットの検定、**，P<0.01；****，P<0.0001、8日目または示す日数における「CD1a」に対する比較に関する有意性を示す）。D. 免疫蛍光により可視化したイミキモド（Imiq）で処置したかまたは無処置（U）の野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）マウスの耳および表皮厚ならびに耳皮膚におけるCD1aタンパク質発現。凍結切片をDAPI（青）および抗CD1a-AF-594（OKT6、赤）で染色した。スケールバーは、上パネル10 μmおよび下パネル100 μm。E~G. マウスIgG1アイソタイプ処置野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）ならびに治療投与モデルに従って抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a遺伝子導入マウスの耳皮膚のフローサイトメトリー解析。皮膚T細胞を数え上げ、細胞表面CD11a発現（E.）について評価し、好中球（F.）および好酸球（G.）発生頻度を決定した（N=7~9、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*，P<0.05；**，P<0.01；***，P<0.001）。

【図9-2】図9は、イミキモド誘発炎症の治療における抗CD1a抗体の適用の有効性を実証する。A. 抗CD1a製剤投与によるイミキモド誘発炎症モデルの模式図。B. 耳腫脹の毎日の測定、ならびにC. 野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入マウス（CD1a）のイミキモド処置後のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi. p. 処置（8日目）、またはCD1a遺伝子導入マウスの模式的パネルAのような抗CD1a抗体の改良パネルによる注射（3日目の矢印）によって誘発される炎症の代表的画像（N=2~10、二元配置分散分析とともにダネットの検定、**，P<0.01；****，P<0.0001、8日目または示す日数における「CD1a」に対する比較に関する有意性を示す）。D. 免疫蛍光により可視化したイミキモド（Imiq）で処置したかまたは無処置（U）の野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）マウスの耳および表皮厚ならびに耳皮膚におけるCD1aタンパク質発現。凍結切片をDAPI（青）および抗CD1a-AF-594（OKT6、赤）で染色した。スケールバーは、上パネル10 μmおよび下パネル100 μm。E~G. マウスIgG1アイソタイプ処置野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）ならびに治療投与モデルに従って抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a遺伝子導入マウスの耳皮膚のフローサイトメトリー解析。皮膚T細胞を数え上げ、細胞表面CD11a発現（E.）について評価し、好中球（F.）および好酸球（G.）発生頻度を決定した（N=7~9、一元配置分散分析とともにダ

ネットの検定、*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ ）。

【図9-3】図9は、イミキモド誘発炎症の治療における抗CD1a抗体の適用の有効性を実証する。A．抗CD1a製剤投与によるイミキモド誘発炎症モデルの模式図。B．耳腫脹の毎日の測定、ならびにC．野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入マウス（CD1a）のイミキモド処置後のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi.p.処置（8日目）、またはCD1a遺伝子導入マウスの模式的パネルAのような抗CD1a抗体の改良パネルによる注射（3日目の矢印）によって誘発される炎症の代表的画像（ $N = 2 \sim 10$ 、二元配置分散分析とともにダネットの検定、**， $P < 0.01$ ；****， $P < 0.0001$ 、8日目または示す日数における「CD1a」に対する比較に関する有意性を示す）。D．免疫蛍光により可視化したイミキモド（Imiq）で処置したかまたは無処置（U）の野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）マウスの耳および表皮厚ならびに耳皮膚におけるCD1aタンパク質発現。凍結切片をDAP I（青）および抗CD1a AF-594（OKT6、赤）で染色した。スケールバーは、上パネル $10 \mu m$ および下パネル $100 \mu m$ 。E～G．マウスIgG1アイソタイプ処置野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）ならびに治療投与モデルに従って抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a遺伝子導入マウスの耳皮膚のフローサイトメトリー解析。皮膚T細胞を数え上げ、細胞表面CD11a発現（E．）について評価し、好中球（F．）および好酸球（G．）発生頻度を決定した（ $N = 7 \sim 9$ 、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ ）。

10

【図10-1】図10は、イミキモド適用の全身作用のCD1a依存性を実証する。A．野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入マウス（CD1a）のイミキモド処置後のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi.p.処置、またはCD1a遺伝子導入マウスの模式的図のような抗CD1a抗体の改良パネルによる注射による8日目の脾臓重量（mg）測定および代表的画像（図9A）。B～E．マウスIgG1アイソタイプ処置野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）、ならびに治療投与モデルに従って抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a遺伝子導入マウスの脾臓のフローサイトメトリー解析。脾臓CD4（B．）およびCD8（C．）T細胞CD69発現を評価し、好中球（D．）および好酸球（E．）を数え上げた（ $N = 7 \sim 9$ 、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ ；****， $P < 0.0001$ ）。F．マウスIgG1アイソタイプ処置野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）、ならびに治療投与モデルに従って抗CD1a抗体を注射したCD1a遺伝子導入マウスの血液の血漿サイトカインレベル（ $N = 7 \sim 9$ 、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ ；****， $P < 0.0001$ ）。

20

30

【図10-2】図10は、イミキモド適用の全身作用のCD1a依存性を実証する。A．野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入マウス（CD1a）のイミキモド処置後のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi.p.処置、またはCD1a遺伝子導入マウスの模式的図のような抗CD1a抗体の改良パネルによる注射による8日目の脾臓重量（mg）測定および代表的画像（図9A）。B～E．マウスIgG1アイソタイプ処置野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）、ならびに治療投与モデルに従って抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a遺伝子導入マウスの脾臓のフローサイトメトリー解析。脾臓CD4（B．）およびCD8（C．）T細胞CD69発現を評価し、好中球（D．）および好酸球（E．）を数え上げた（ $N = 7 \sim 9$ 、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ ；****， $P < 0.0001$ ）。F．マウスIgG1アイソタイプ処置野生型（WT）およびCD1a遺伝子導入（CD1a）、ならびに治療投与モデルに従って抗CD1a抗体を注射したCD1a遺伝子導入マウスの血液の血漿サイトカインレベル（ $N = 7 \sim 9$ 、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ ；****， $P < 0.0001$ ）。

40

【図11】図11は、イミキモド適用の全身作用のCD1a依存性を実証する。A～E．

50

マウス I g G 1 アイソタイプ処置野生型 (W T) および C D 1 a 遺伝子導入 (C D 1 a)、ならびに治療投与モデルに従って抗 C D 1 a 抗体の改良パネルを注射した C D 1 a 遺伝子導入マウスの血液の血液細胞解析。循環 T 細胞 (A.)、C D 4 + (B.) および C D 8 (C.)、好中球 (D.) および好酸球 (E.) を数え上げた (N = 5 ~ 7、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$)。

【図 1 2】図 1 2 は、イミキモドが C D 1 a リガンドを構成しないことを示す。等電点電気泳動 (I E F) ゲル p H 3 ~ 7 上の偽およびイミキモド「添加」C D 1 a タンパク質の等電点依存的遊走。偽：媒体対照 T B S 2 % C H A P S 7 % D M S O。

【図 1 3 - 1】図 1 3 は、イミキモド誘発炎症の持続的制御における抗 C D 1 a 抗体適用の有効性である。A. 後に抗 C D 1 a を投与しないイミキモド再曝露モデルの模式図。B. マウス I g G 1 アイソタイプ対照を i. p. で注射した野生型 (W T) および C D 1 a 遺伝子導入マウス (C D 1 a) ならびに模式的パネル 1 3 A のように抗 C D 1 a 抗体の改良パネルを注射した C D 1 a 遺伝子導入マウスのイミキモド処置により誘発された耳腫脹の毎日の測定 (二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 、イミキモド再適用から 7 日目の「C D 1 a」アイソタイプに対する比較に関する有意性を示す)。

【図 1 3 - 2】図 1 3 は、イミキモド誘発炎症の持続的制御における抗 C D 1 a 抗体適用の有効性である。A. 後に抗 C D 1 a を投与しないイミキモド再曝露モデルの模式図。B. マウス I g G 1 アイソタイプ対照を i. p. で注射した野生型 (W T) および C D 1 a 遺伝子導入マウス (C D 1 a) ならびに模式的パネル 1 3 A のように抗 C D 1 a 抗体の改良パネルを注射した C D 1 a 遺伝子導入マウスのイミキモド処置により誘発された耳腫脹の毎日の測定 (二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 、イミキモド再適用から 7 日目の「C D 1 a」アイソタイプに対する比較に関する有意性を示す)。

【図 1 4】図 1 4 は、標準治療と比較した、イミキモド誘発炎症の治療における抗 C D 1 a 抗体適用の有効性である。野生型 (W T) および C D 1 a 遺伝子導入マウス (C D 1 a) のイミキモド処置後のマウス I g G 1 アイソタイプ対照による i. p. 処置 (C D 1 a)、または C D 1 a 遺伝子導入マウスの模式的パネル図 9 A のような抗 C D 1 a 抗体の改良パネルおよび抗 I L - 1 7 A による注射によって誘発された耳腫脹の毎日の測定。d x = C D 1 a 遺伝子導入マウスの耳厚と比較して有意性が達成されたモデルの日数。

【図 1 5 - 1】図 1 5 は、イミキモド / M C 9 0 3 誘発炎症の治療における抗 C D 1 a 抗体適用の有効性の比較解析である。A. 抗 C D 1 a 製剤投与によるイミキモド誘発炎症の模式図。B. 野生型 (W T) および C D 1 a 遺伝子導入マウス (C D 1 a) のイミキモド処置後のマウス I g G 1 アイソタイプ対照による i. p. 処置、または C D 1 a 遺伝子導入マウスの模式的パネル A のような抗 C D 1 a 抗体の改良パネルもしくは C R 2 1 1 3 による注射によって誘発された耳腫脹の毎日の測定。N = 2 ~ 7、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P < 0.05$, **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$ 、8 日目の「C D 1 a」または 8 日目の O X 1 1 6 対 C R 2 1 1 3 に対する比較に関する有意性を示す。C. W T を補正した、(B) に示すデータおよび比較。D. M C 9 0 3 誘発炎症予防薬による M C 9 0 3 誘発炎症の模式図。E. 野生型 (W T) および C D 1 a 遺伝子導入マウス (C D 1 a) のマウス I g G 1 アイソタイプ対照による i. p. 処置後の M C 9 0 3 処置、あるいは C D 1 a 遺伝子導入マウスの模式的パネル D のような 1 6、1 1 0 もしくは 1 1 6 抗 C D 1 a 抗体または C R 2 1 1 3 による注射によって誘発された耳腫脹の毎日の測定。W T を補正した。N = 3 ~ 4、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P < 0.05$ 、7 日目の「C D 1 a」に対する比較に関する有意性を示す。F. フローサイトメトリーにより測定した皮膚 T 細胞パーセンテージおよび好酸球数。N = 3 ~ 4、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。

【図 1 5 - 2】図 1 5 は、イミキモド / M C 9 0 3 誘発炎症の治療における抗 C D 1 a 抗

体適用の有効性の比較解析である。A．抗CD1a製剤投与によるイミキモド誘発炎症の模式図。B．野生型(WT)およびCD1a遺伝子導入マウス(CD1a)のイミキモド処置後のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi.p.処置、またはCD1a遺伝子導入マウスの模式的パネルAのような抗CD1a抗体の改良パネルもしくはCR2113による注射によって誘発された耳腫脹の毎日の測定。N=2~7、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P<0.05$ 、**、 $P<0.01$ ；****、 $P<0.0001$ 、8日目の「CD1a」または8日目のOX116対CR2113に対する比較に関する有意性を示す。C．WTを補正した、(B)に示すデータおよび比較。D．MC903誘発炎症予防薬によるMC903誘発炎症の模式図。E．野生型(WT)およびCD1a遺伝子導入マウス(CD1a)のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi.p.処置後のMC903処置、あるいはCD1a遺伝子導入マウスの模式的パネルDのような16、110もしくは116抗CD1a抗体またはCR2113による注射によって誘発された耳腫脹の毎日の測定。WTを補正した。N=3~4、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P<0.05$ 、7日目の「CD1a」に対する比較に関する有意性を示す。F．フローサイトメトリーにより測定した皮膚T細胞パーセンテージおよび好酸球数。N=3~4、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ ；***、 $P<0.001$ 。

【図15-3】図15は、イミキモド／MC903誘発炎症の治療における抗CD1a抗体適用の有効性の比較解析である。A．抗CD1a製剤投与によるイミキモド誘発炎症の模式図。B．野生型(WT)およびCD1a遺伝子導入マウス(CD1a)のイミキモド処置後のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi.p.処置、またはCD1a遺伝子導入マウスの模式的パネルAのような抗CD1a抗体の改良パネルもしくはCR2113による注射によって誘発された耳腫脹の毎日の測定。N=2~7、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P<0.05$ 、**、 $P<0.01$ ；****、 $P<0.0001$ 、8日目の「CD1a」または8日目のOX116対CR2113に対する比較に関する有意性を示す。C．WTを補正した、(B)に示すデータおよび比較。D．MC903誘発炎症予防薬によるMC903誘発炎症の模式図。E．野生型(WT)およびCD1a遺伝子導入マウス(CD1a)のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi.p.処置後のMC903処置、あるいはCD1a遺伝子導入マウスの模式的パネルDのような16、110もしくは116抗CD1a抗体またはCR2113による注射によって誘発された耳腫脹の毎日の測定。WTを補正した。N=3~4、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P<0.05$ 、7日目の「CD1a」に対する比較に関する有意性を示す。F．フローサイトメトリーにより測定した皮膚T細胞パーセンテージおよび好酸球数。N=3~4、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P<0.05$ ；**、 $P<0.01$ ；***、 $P<0.001$ 。

【図15-4】図15は、イミキモド／MC903誘発炎症の治療における抗CD1a抗体適用の有効性の比較解析である。A．抗CD1a製剤投与によるイミキモド誘発炎症の模式図。B．野生型(WT)およびCD1a遺伝子導入マウス(CD1a)のイミキモド処置後のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi.p.処置、またはCD1a遺伝子導入マウスの模式的パネルAのような抗CD1a抗体の改良パネルもしくはCR2113による注射によって誘発された耳腫脹の毎日の測定。N=2~7、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P<0.05$ 、**、 $P<0.01$ ；****、 $P<0.0001$ 、8日目の「CD1a」または8日目のOX116対CR2113に対する比較に関する有意性を示す。C．WTを補正した、(B)に示すデータおよび比較。D．MC903誘発炎症予防薬によるMC903誘発炎症の模式図。E．野生型(WT)およびCD1a遺伝子導入マウス(CD1a)のマウスIgG1アイソタイプ対照によるi.p.処置後のMC903処置、あるいはCD1a遺伝子導入マウスの模式的パネルDのような16、110もしくは116抗CD1a抗体またはCR2113による注射によって誘発された耳腫脹の毎日の測定。WTを補正した。N=3~4、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P<0.05$ 、7日目の「CD1a」に対する比較に関する有意性を示す。

F. フローサイトメトリーにより測定した皮膚T細胞パーセンテージおよび好酸球数。N = 3 ~ 4、二元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ 。

【図16-1】図16は、イミキモド誘発炎症による皮膚および全身性免疫応答における抗CD1a抗体の作用の比較解析である。マウスIgG1アイソタイプ処置野生型(WT)およびCD1a遺伝子導入(CD1a)ならびに模式図15Aに示す治療投与モデルに従って抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a遺伝子導入マウス由来の耳皮膚、流入領域頸部リンパ節および血漿試料を解析した。A. 皮膚T細胞IL-17A発現を、フローサイトメトリーにより検出した細胞内サイトカイン発現を使用して直接的にエキスピボで解析し(左パネル)、頸部リンパ節好酸球を数え上げた(右パネル)。B~C. 血漿(B)および皮膚分解物(C)サイトカインレベルをELISAにより測定した(N = 2 ~ 7、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ ；****、 $P < 0.0001$)。

【図16-2】図16は、イミキモド誘発炎症による皮膚および全身性免疫応答における抗CD1a抗体の作用の比較解析である。マウスIgG1アイソタイプ処置野生型(WT)およびCD1a遺伝子導入(CD1a)ならびに模式図15Aに示す治療投与モデルに従って抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a遺伝子導入マウス由来の耳皮膚、流入領域頸部リンパ節および血漿試料を解析した。A. 皮膚T細胞IL-17A発現を、フローサイトメトリーにより検出した細胞内サイトカイン発現を使用して直接的にエキスピボで解析し(左パネル)、頸部リンパ節好酸球を数え上げた(右パネル)。B~C. 血漿(B)および皮膚分解物(C)サイトカインレベルをELISAにより測定した(N = 2 ~ 7、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ ；****、 $P < 0.0001$)。

【図16-3】図16は、イミキモド誘発炎症による皮膚および全身性免疫応答における抗CD1a抗体の作用の比較解析である。マウスIgG1アイソタイプ処置野生型(WT)およびCD1a遺伝子導入(CD1a)ならびに模式図15Aに示す治療投与モデルに従って抗CD1a抗体の改良パネルを注射したCD1a遺伝子導入マウス由来の耳皮膚、流入領域頸部リンパ節および血漿試料を解析した。A. 皮膚T細胞IL-17A発現を、フローサイトメトリーにより検出した細胞内サイトカイン発現を使用して直接的にエキスピボで解析し(左パネル)、頸部リンパ節好酸球を数え上げた(右パネル)。B~C. 血漿(B)および皮膚分解物(C)サイトカインレベルをELISAにより測定した(N = 2 ~ 7、一元配置分散分析とともにダネットの検定、*、 $P < 0.05$ ；**、 $P < 0.01$ ；***、 $P < 0.001$ ；****、 $P < 0.0001$)。

【発明を実施するための形態】

【0088】

材料および方法

マウス

すべてのマウスは、特定の無菌施設において飼育した。個々の実験では、マウスの年齢、性別およびバックグラウンド系統を、対照として使用した野生型同腹仔と一致させた。この試験において行ったすべての実験は、英国内務省(UK Home Office)の承認を得て行った。

【0089】

CD1a遺伝子導入マウスの生成

マウスは、OxfordのWellcome Trust Centre for Human Geneticsにより生成した。0.8 kbの上流配列および0.8 kbの下流配列を含むCD1A遺伝子全体を包含する5.7 kbのゲノム断片を、ヒトゲノムDNAからPCRによりプライマー5'-ATGGGTACCAAGAGGGAATGTAAATGTGTCCGGC-3'および5'-AAGCGGCGCGATCATGTTTAAACAAGGTCAGGA-3'を使用して増幅し、そのようなPCRプライマーに組み込んだKpnIおよびNotI部位を介してLitmus 28ベクター(NEB社)にサ

ブクローニングした。コードするエクソンの配列検証後、導入遺伝子断片をベクター骨格から切り取り、精製し、顕微注射緩衝液（10mMのTris-HCl、pH7.4、0.25mMのEDTA）中2ng/μlで再懸濁し、C57BL/6Jマウスから調製した受精卵の前核に顕微注射した。一晩の培養後、生じた2細胞期の胚を偽妊娠CD1養母の輸卵管に外科的に移植し、妊娠出産させた。遺伝子導入出生仔は、PCRにより導入遺伝子特異的プライマーを使用して同定し、野生型C57BL/6Jマウスとともに個々の系統として飼育した。

【0090】

CD1a 遺伝子型決定

粗製ゲノムDNA調製をCD1a 遺伝子導入マウス由来の刻耳試料に対して実施した。0.4mg/mlのプロテインゼK（Sigma社）を追加したDirectPCR耳溶解緩衝液（Viagen社）100μlを刻耳に加え、55℃で一晩インキュベートした。次いで、酵素を85℃で1時間熱失活させた。試料は、遠心分離してペレット片とし、その溶解物を清潔なチューブに移した。溶解物1μlを遺伝子型決定の鑄型として使用した。以下のPCR反応を遺伝子型決定に使用した。PCR産物は、1%のTAEアガロースゲル上にSyberSafeとともに添加し、電気泳動を実行して、ゲルをUV下で画像化した。予想されたバンドが655bpで検出された場合、マウスは、CD1a 導入遺伝子に対して陽性であると考えた。

【0091】

【表1】

DNA 鑄型	1ul
MyTaqRed Mix (BioLine 社) 2x	25ul
CD1a フォワードプライマー	0.4μM
CD1a リバースプライマー	0.4μM
dd-H2O	反応量最大 50ul

【0092】

【表2】

1. 初期変性	95°C, 2 分
サイクル: 2-4 工程	X34
2. 変性	95°C, 20 秒
3. アニーリング	60°C, 15 秒
4. 伸長	72°C, 20 秒
5. 最終伸長	72°C, 2 分
6. 維持	4°C

【0093】

細胞株

空ベクターをトランスフェクトしたK562 (EV-K562) およびCD1aをトランスフェクトしたK562 (CD1a-K562) 細胞 (Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MAのB. Moodyから寄贈) を、10%のFCS、100IU/mlのペニシリン、100µg/mlのストレプトマイシン (Sigma-Aldrich社)、2mMのL-グルタミン (Gibco社)、1×非必須アミノ酸 (NEAA) (Gibco社)、1mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco社)、10mMのHEPES (Gibco社)、500µMの2-メルカプトエタノール (Gibco社) および200µg/mlのG418抗生物質 (Thermo Fisher Scientific社) を追加したRPMI 1640培地中に維持した。

10

【0094】

ELISpot解析

ELISpotアッセイを使用して、モデルCD1a発現抗原提示細胞との同時培養時のポリクローナルT細胞による活性化誘導サイトカイン分泌を検出した。健常ドナー血液由来のPBMCを密度勾配により単離し (Lymphoprep)、抗CD3磁気ビーズ選別を製造者のプロトコールに従って使用してT細胞を精製した (MACS、Miltenyi社)。すべての試験参加者から書面により完全なインフォームドコンセントを得た [National Health Service (NHS) National Research Ethics Service (NRES) 研究倫理委員会14/SC/0106]。次いで、T細胞をIL-2 (200U/ml) とともに3日間培養して数を増大させた後、非パルス/内因性脂質結合CD1aトランスフェクトK562 (CD1a-K562) または対照の空ベクタートランスフェクトK562 (EV-K562) とともにK562を25000細胞対ポリクローナルT細胞50000細胞の比率で一晩同時培養した。抗CD1a抗体の機能性を評価するために、抗IFNγ捕捉抗体をコーティングしたELISpotプレート内でポリクローナルT細胞と同時培養する1時間前および同時培養中に、K562を10µg/mlの抗CD1a抗体とともにインキュベートした。IFNγ分泌は、ビオチン化抗IFNγ検出抗体により検出し、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ展開により可視化した。生じたスポットは、サイトカイン産生T細胞を示した。これは、自動ELISpotリーダー (Autimmune Diagnostika gmbh社ELISpot Reader Classic) を使用して数え上げ、サイトカイン産生スポットのEVバックグラウンドレベルの減算後に抗体処理および無処理群の比較時に%遮断を算出した。EV-K562の寄与 (抗体有り無し) は、CD1a IFNγスポット数 (それぞれ抗体有り無し) から減算した。次いで、補正したCD1a-K562抗体処理群のスポット数をCD1a無抗体群により割り、%遮断の算出に使用した。

20

30

【0095】

CD1a反応性T細胞生成および活性化解析:

CD1a制限T細胞を蛍光活性化細胞選別により単離した。T細胞をCD1a-K562のEV-K562と同時培養し、Miltenyi社のMACSサイトカイン分泌アッセイを製造者の指示に従って使用してサイトカイン産生応答T細胞を検出した。簡潔には、CD1a-K562との6時間の培養後にT細胞を抗サイトカイン (IL-22またはIFNγ) 抗体でコーティングして、CD1a依存性自己分泌サイトカイン産生を検出した。次いで、生応答細胞を培養プレート内に選別した。CD1a制限T細胞の複合リンパ球反応を増大させて、純度およびCD1a応答性を上のFACSに基づくサイトカイン分泌アッセイ方法により解析フローサイトメーターを使用して評価した。CD1a制限T細胞の活性は、次のように解析した。K562細胞2×10⁵細胞をCD1a自己反応性T細胞1~5×10⁵細胞とともに4時間同時培養した。ヘルパーサイトカインを同時培養物に加えてCD1a依存性サイトカイン産生を支持した。IFNγ産生T細胞培養物には、IL-12 (1ng/ml、BioLegend社)、IL-18 (1ng/ml、BioLegend社) およびIL-2 (25U/ml、BioLegend社) を追加し

40

50

、IL-22産生T細胞培養物には、IL-6 (5 ng/mL、BioLegend社)、TNF- γ (5 ng/mL、BioLegend社) およびIL-2 (25 U/mL、BioLegend社) を追加した。T細胞の活性化は、T細胞のサイトカイン産生により、上の分泌アッセイ (Miltenyi Biotec社) を製造者の指示に従って使用して評価した。

【0096】

マウスへのイミキモド投与

マウスをイソフルランにより軽度麻酔し、予防モデル (図4A) では0、1、2、3、4、5日目または治療モデル (図9A) では0、1、2および4、5、6、7日目に5%のイミキモドを含むアルダラクリーム15 mgを耳介の背側および腹側に適用した。予防モデル (図4A) では-5、-3、-1、1、3、5日目または治療モデル (図9A) では3、5、7日目に抗CD1a抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照100 μ gを腹腔内に投与した。予防モデル (図4A) では0~6日または治療モデル (図9A) では0~8日のアルダラ適用の期間毎日、マイクロメーター (Mitutoyo社) を使用して耳厚測定を行った。曝露後24時間にマウスを犠死させ、組織を採取した。

【0097】

マウスへのMC903投与

マウスをイソフルランにより軽度麻酔し、1用量あたり2 nmolのMC903を7日間毎日、耳の腹側および背側に適用した (各耳側に10マイクロリットル)。図15Dに示すように、抗CD1a抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照100 μ gを腹腔内に投与した。マイクロメーター (Mitutoyo社) を使用して毎日、耳厚測定を行った。

【0098】

組織の処理

最終イミキモド曝露後24時間にマウスを犠死させ、組織を採取した。耳、頸部リンパ節 (cLN) および脾臓を採取して免疫表現型決定またはイメージングを行った。脾臓およびcLNの細胞懸濁液は、組織を70 μ mの濾過器を通過させることにより得、10%のFCSを含むRPMIで洗浄した。脾臓細胞懸濁液の赤血球は、RBC溶解液 (eBioscience社) とのインキュベーションにより除去した。

【0099】

耳皮膚組織をHBSSにより洗浄して過剰なイミキモドを除去し、腹側方向に分割し、0.5 mm未満のさいの目に切り出し、1 mg/mLのコラゲナーゼP (Roche社) および0.1 mg/mLのDNase I (Sigma-Aldrich社) を含むDMEMで3 $\times$ 30分間、攪拌しながら分解し、30分の最終分解工程において5 mg/mLのディスパーゼを加えた。10%のFCSを含むDMEMを用いて70 μ mの濾過器を通過させることにより洗浄して単細胞懸濁液を得た後、フローサイトメトリーにより解析した。

【0100】

フローサイトメトリー

FACS表面染色では、細胞を次の抗マウス抗体で標識した (他に述べない限りBioLegend社により供給) : CD3 (500A2、BUV495:741064 BD Pharmingen社)、CD11b (M1/70、BUV395:563553 BD Pharmingen社)、CD11c (N418、BV711:117349)、CD8 (53-6.7、BUV805:612898 BD Pharmingen社)、CD4 (GK1.5、AF700:100430)、CD45 (2D1、FITC:368507)、CD11a (I21/7、PECy7:153108)、CD69 (H1.2F3、BV650:104541)、ランゲリン (4C7、PE:144204)、Ly6C (RB6-8C5、BV605:108440)、Ly6G (1A8、PETxRed:127648)、MHCI (M5/114.15.2、BV785:107645)、SiglecF (S17007L、BV421:155509)、IL-17A

10

20

30

40

50

(TC11-18H10.1、PECy7:506922)、Live/Dead Aqua (Invitrogen社) および抗ヒトCD1a (APCまたは精製SK9、HI149、OKT6、NA1/34)。

【0101】

フローサイトメトリー：エピトープ競合アッセイ

CD1a-K562細胞を新たに生成した精製抗CD1a一次抗体および市販の抗CD1a抗体とともに氷上で30分間インキュベートし(25 µg/ml)、次いで、非結合抗体を洗い流し、次いで、種々の抗体のAlexa-Fluor-647コンジュゲート形態を細胞とともに氷上で30分間マトリックス配置によりインキュベートした(10 µg/ml)。平均蛍光強度(MFI)を使用してフルオロフォアコンジュゲート抗体の結合の程度を評価した。

10

【0102】

共焦点イメージング

マウスの耳皮膚を最適切断温度包埋化合物中に凍結し、-80℃で保存した。凍結切片10 µmをLeica社のクリオスタットを使用して切断し、Superfrost Plusスライド上に採取して30分間風乾した後、-80℃で保存した。スライドをPBS中で10分間再水和した後、染色した。試料の内因性ペルオキシダーゼ活性を、0.15%の過酸化水素溶液を室温で5分間加えることにより失活させた。内因性ビオチンをアビジン/ビオチンブロッキングキット(Vector Laboratories Ltd社)によりブロッキングし、10%のヤギ血清を使用して抗体の非特異的結合を低下させた。抗CD1a抗体を共焦点顕微鏡観察に使用した(1:100、OKT6;自家生成およびビオチンにコンジュゲート)。Alexa Fluor 594チラミド(Tyramide) SuperBoostキット(ストレプトアビジン;Thermo Fisher Scientific社)を製造者の指示に従って使用してシグナルを増強した。簡潔には、スライドを4℃で一次抗体とともに一晚インキュベートした。洗浄後、HRPコンジュゲートストレプトアビジンを切片に加え、4℃で一晩インキュベートした。過剰なストレプトアビジン-HRPを洗い流し、組織をチラミド希釈標準溶液とともに室温で8分間インキュベートして、反応停止試薬により反応を停止した。染色後、スライドを、DAPIを加えた抗退色封入培地(Vector Laboratories Ltd社)を使用して封入し、カバーガラスを適用して、スライドを共焦点顕微鏡(Zeiss社LSM780共焦点顕微鏡-倒立顕微鏡;25×/0.8 ImmKorrDIC M27;室温;AxioCamカメラ;Zenソフトウェア)により解析するまで暗所で冷蔵し、Fijiを使用して画像処理を行った。

20

30

【0103】

細胞表現型および細胞毒性アッセイ:

抗CD1a抗体(5 µg/ml)および市販の対照薬NA1/34(5 µg/ml)をCD1a発現K562またはEV対照K562とともに48時間インキュベートし、細胞の減少をフローサイトメトリーにより評価した。抗体の直接的誘導による細胞減少を測定するために、K562をCellTrace Violetにより蛍光標識した後、抗CD1a抗体とともに48時間インキュベートした。フローサイトメトリーによる減少の評価前に、無処理のCFSE標識K562の参照集団を、抗体で処理したK562に1:1の比率で加えた。次いで、誘導された減少のパーセンテージを次の式を用いて、解析した種々の集団、抗体処理および無処理の参照CD1a+およびEVK562の生細胞の発生頻度を比較することによって算出した。 $\% \text{減少} = 100 - ((\% \text{抗体処理CD1a-K562生細胞} / \% \text{参照CFSE標識K562生細胞}) / (\% \text{無処理CD1a-K562生細胞} / \% \text{参照CFSE標識K562生細胞}) \times 100)$ 。CD1a発現細胞のアポトーシスに対する抗CD1a抗体の作用を調べるために、K562-CD1aまたはK562-EVを、アイソタイプ対照または抗CD1a抗体(5 µg/ml)のいずれかとともにインキュベートし、インキュベーション後24時間にアネキシンV(Biolegend社)に染色した。

40

50

【0104】

補体媒介溶解（CDC）および抗体依存性細胞毒性ADCCアッセイ：

CDCアッセイでは、K562-CD1a細胞（1ウェルあたり 5×10^4 細胞）を、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかで30分間前処理し、10%の正常ヒト血清とともに5%CO₂により37℃で3時間インキュベートした。ADCCアッセイでは、新鮮PBMCを使用した。K562-CD1a細胞（1ウェルあたり 5×10^3 細胞）は、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ のアイソタイプ対照抗体または指示抗体のいずれかと組み合わせて、IL-2（100U/mL）を加え5%CO₂により37℃で5時間、PBMC（1ウェルあたり 2.5×10^5 細胞）と同時培養した（エフェクター／標的比50：1）。細胞毒性は、生存した標的K562-CD1aのパーセンテージを、次の式：
%細胞毒性 = $\left(\left(\% \text{CD1a抗体処理CD1a-K562生細胞} / \% \text{参照生細胞} \right) / \left(\% \text{アイソタイプ抗体処理CD1a-K562生細胞} / \% \text{参照生細胞} \right) \times 100 \right)$ を使用して算出することにより決定した。

10

【0105】

インビボでのCD1a+細胞枯渇：

「NSG」（NOD-scid IL2R gamma null）マウスに、ECMゲル（Merck社）懸濁液（vol = 100 μL）中CD1a-K562細胞25万細胞を側腹部に皮下注射し、18日間腫瘍を発生させた。6、10および14日目にマウスの腹腔内をアイソタイプ対照抗体または指示抗体100 μgで処置し、腫瘍サイズを測定した。

20

【0106】

等電点電気泳動アッセイ（IEF）：

CD1a 10 μgを、トリス緩衝食塩水および2%のCHAPS、7%のDMSOに溶解した100×モル過剰のイミキモド（Invivogen社）または媒体単独（偽）とともに37℃で2時間および室温で一晩インキュベートすることにより脂質添加を評価した。CD1a試料を等電点電気泳動（IEF）により分離した。簡潔には、CD1a-イミキモドおよびCD1a-偽タンパク質をIEF pH3~7ゲル（Novex）上に添加し、次いでこれを100Vで1時間、200Vで1時間および最終的に500Vで30分実行した。次いで、ゲルを12%のTCAで固定し、SimplyBlue SafeStainで7分間染色し、DI水中で一晩脱染した。

30

【0107】

統計学的解析：

一元および二元配置分散分析検査をGraphPad Prismバージョン6.00（GraphPad Software社）を使用して実施した。エラーバーは、指示のとおり標準偏差を表す。

【0108】

抗CD1a抗体製剤77A（VR11851）、110（VR12112）、111（VR12113）、116（VR12117）および16（VR11834）の生成および選択

様々な種にわたる多くの動物（マウスおよびウサギを含む）を免疫した。マウスは、ヒトCD1aおよびマウスB2MをトランスフェクトしたNIH3T3細胞により免疫した。ウサギは、ヒトCD1aおよびウサギB2MをトランスフェクトしたRab9細胞により免疫した。3~5回の注射後、動物を犠死させ、PBMC、脾臓、骨髄およびリンパ節を回収した。ヒトCD1aおよびヒトB2Mを発現するHEK-293細胞に対する結合について、フローサイトメトリーを介して血清を監視した。

40

【0109】

メモリーB細胞培養物を設定し（77A（VR11851）、110（VR12112）、111（VR12113）および116（VR12117）に関連）、TTP Labtech社のMirrorballシステム上でのビーズに基づくアッセイにおいて、ヒトCD1aを一過性にトランスフェクトしたHEK-293細胞に結合する能力につい

50

て上清を最初にスクリーニングした。これは、細胞色素で染色したヒトCD1aおよびヒトB2Mを発現するHEK-293細胞を使用する多重アッセイであり、ヤギ抗種Fc-FITCコンジュゲートを暴露物質として使用して、CD1b、CD1cまたはCD1dをヒトB2Mとともに発現する対比染色HEK-293細胞に対して対比スクリーニングした。

【0110】

Mirrorballによる一次スクリーニングにおいて、合計10×200プレートのB培養実験から、およそ3500件のCD1a特異的陽性的中が同定された。次いで、このアッセイの陽性上清は、次によってさらなる特性決定に進んだ。

- ・ ELISA、ヒトCD1aタンパク質に対する結合を確認する（以下に詳述）
- ・ ELISA、キメラCD1aタンパク質上のCD1a脂質結合ドメイン（CD1aのヒト脂質結合ドメイン、CD1dのマウスIgドメイン）に対する結合を確認する（以下に詳述）
- ・ フローサイトメトリー、HEK-293細胞上に発現するヒトCD1a（ヒトβ2Mと同時発現）に対する結合を確認する（以下に詳述）

10

【0111】

上のアッセイにおいて結合を実証したウェルは、蛍光焦点法を使用するV領域の回収に進んだ。

【0112】

また、骨髄由来の形質細胞は、ヒトCD1aに結合する能力について、蛍光焦点法を使用して直接的にスクリーニングした（16（VR11834）に関連）。ここでは、CD1a特異的抗体を分泌するB細胞は、ヤギ抗種Fc-FITCコンジュゲート暴露試薬を使用して、ストレプトアビジンビーズ上に固定したビオチン化ヒトCD1a上に採取した。およそ300件の直接的焦点を採取した。

20

【0113】

採取した細胞の逆転写（RT）およびPCR後、抗体のV領域をコードする「転写的に活性なPCR」（TAP）産物を生成および使用して、HEK-293細胞を一過性にトランスフェクトした。組換え抗体を含む生じたTAP上清は、次によってさらに特性決定した。

- ・ ELISA、ヒトCD1aタンパク質およびキメラCD1aタンパク質（CD1aのヒト脂質結合ドメイン、CD1dのマウスIgドメイン）に対する結合を確認する（以下に詳述）
- ・ フローサイトメトリー、HEK-293細胞上に発現するヒトCD1a（ヒトβ2Mと同時発現）に対する結合を確認し、関連する類似タンパク質：HEK-293細胞上に発現するCD1b、CD1cまたはCD1d（ヒトβ2Mと同時発現）に対する交差結合に対して対比スクリーニングする（以下に詳述）

30

【0114】

次いで、興味深いTAP産物由来の重および軽鎖可変領域遺伝子対をウサギまたはマウス完全長抗体のいずれかとしてクローニングし、HEK-293一過性発現系において再発現させた。合計119種のV領域をクローニングして記録した。次いで、組換えクローン抗体を、次によってさらに特性決定した。

40

- ・ 上のフローサイトメトリーおよびELISAアッセイの反復
- ・ フローサイトメトリー、複数の細胞株において発現するCD1aに対する結合を評価する

これは、結合が脂質に非依存的であるという最初の示唆となった。次に対する結合について上清をスクリーニングした。

－ CD1aまたは空ベクターを発現する（ヒトβ2Mと同時発現）安定に形質導入したC1R細胞。これらは、110（VR12112）、111（VR12113）および116（VR12117）に関連する（以下に詳述）。

－ CD1a、CD1b、CD1c、CD1dおよびβ2Mを内因的に発現するMOL

50

T 4 細胞。これらは、110 (VR12112)、111 (VR12113) および 116 (VR12117) に関連する (以下に詳述)。

・ BIAcore によるプロファイリング、解離速度 (off-rate) および親和性を推定する (以下に詳述)

【0115】

上のアッセイにおける結合および 100 nM 未満の親和性を実証した抗体を精製のために選択した。細胞培養上清は、プロテイン A 親和性精製を使用して精製した。精製試料は、緩衝液を 10 mM および pH 7.4 の PBS に交換し、回収および純度について UV 分光法、解析用サイズ排除クロマトグラフィー、SDS Page 電気泳動および LAL エンドトキシンアッセイをそれぞれ使用して解析した。ここで、必要とされる試料を第 2 の精製ラウンドに供して単量体レベルを上昇させた。最終試料は、滅菌濾過し、10 mM および pH 7.4 の PBS 中に保存した。

【0116】

次いで精製後、5 つすべての抗体は、次によってさらに特性決定した。

- ・ 上のフローサイトメトリー、ELISA および BIAcore アッセイの反復
- ・ ELISA、カニクイザル CD1a タンパク質および中国において一般的なヒト CD1a タンパク質の変異体 (18) に対する結合を評価する (以下に詳述)
- ・ フローサイトメトリー、

- ー カニクイザル β 2 M と同時トランスフェクトしたカニクイザル CD1a

- ー ヒト β 2 M と同時トランスフェクトした、中国において一般的なヒト CD1a の変異体を一過性にトランスフェクトした HEK-293 細胞に対する結合を評価する (以下に詳述)

【0117】

77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117) および 16 (VR11834) は、それぞれの抗体発見段階において、組換えおよび細胞発現 CD1a タンパク質の検査したすべての形態に対して結合する能力を実証した (表 1~9)。唯一の例外は、116 (VR12117) であり、これは、組換えまたは細胞発現カニクイザル CD1a に対して結合を示さなかった (表 4 および 9)。後続のインビトロ (in vitro) およびインビボでの解析において抗体 116 を含むことは、明白であるとは考えられなかったが、それにもかかわらず、脂質結合ドメインがヒトおよびカニクイザルとの間で異なり、潜在的に異なる機能性作用を有する、エピトープ結合領域に焦点を合わせるための計画的工程となった。いずれの抗体も、HEK-293 細胞上に発現する CD1b、CD1c または CD1d に対する結合を実証せず (表 5)、このような抗体が CD1a 特異的であることを示した。HEK-293 細胞における CD1a、CD1b、CD1c および CD1d 発現は、市販の抗体により確認され、この結論を支持した (データ非指示)。複数の細胞型 (HEK、C1R および MOLT4) 上に発現する CD1a に対する結合は、CD1a が各細胞株における異なる脂質プールから添加されると思われるため、抗体結合が脂質に非依存的であり得るという最初の示唆となった。

【0118】

抗体発見後、以下の T 細胞アッセイにおいてインビトロでの機能について抗体を評価した。

【0119】

マウス IgG1 骨格上の 77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113) および 116 (VR12117) の重および軽鎖 V 領域をコードする DNA を ATUM において合成し、自家の HEK-293 一過性発現系において発現させた。次いで、抗体に精製およびエンドトキシン除去を行い、以下のようにインビボでのアッセイにおいて検査した。

【0120】

ヒトCD1aに対する77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117) および16 (VR11834) の親和性

ヒトCD1aに対する精製抗体の親和性を、Biacore T200装置 (GE Healthcare社) を使用して、固定した抗種IgG F(ab')₂に対する抗体を捕捉した後、ヒトCD1aを滴定することにより評価した。Affinipureヤギ抗種IgG-F(ab')₂特異的断片 (Jackson ImmunoResearch社) をCM5センサーチップ (GE Healthcare社) 上に、約5000応答単位 (RU) の捕捉レベルまでのアミン共役化学反応を介して固定した。HBS-EP+緩衝液 (10mMおよびpH7.4のHEPES、0.15MのNaCl、3mMのEDTA、0.05%の界面活性剤P20、GE Healthcare社) を10μL/分の流量で泳動緩衝液として使用した。0.5μg/mLの検査抗体の注射10μLを、固定ヤギ抗種Fabによる捕捉に使用した。ヒトCD1aは、30μL/分の流量で、捕捉した抗体に対して滴定して (0nM、0.6nM、1.8nM、5.5nM、16.6nMおよび50nM、泳動緩衝液中で希釈) 親和性を評価した。

【0121】

40mMのHClの注射2×10μLによりサイクル間に表面を再生し、5mMのNaOHの注射10μLにより10μL/分の流量で分散させた。バックグラウンドを減算した結合曲線を、Biacore T200評価ソフトウェアを標準手順に従って使用して解析した。動態パラメータは、適合アルゴリズムにより決定した。このアッセイは、クローン上清および精製抗体段階において実施した。ヒトCD1aに対する抗体結合の動態パラメータは、表10に示す。

【0122】

ELISAにより評価した77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117) および16 (VR11834) の結合CD1a特異的抗体をELISAにより同定した。ELISAプレートを2μg/mLの目的のタンパク質 (ヒトCD1aプールB、キメラCD1aプールB [ヒト脂質結合ドメインおよびマウスCD1d Igドメイン]、中国変異体CD1aまたはカニクイザルCD1a) (20μL/ウェル) により4℃で一晩コーティングし、次いで、洗浄緩衝液 (PBS中0.2% (v/v) のTween-20 (pH7.4)) で洗浄した。次いで、プレートを80μL/ウェルのブロッキング緩衝液 (1% (w/v) のウシ血清アルブミン) により室温で1時間ブロッキングし、次いで、洗浄緩衝液中で洗浄した。抗体試料 (B細胞培養上清、TAP上清、クローン上清、精製抗体溶液) 希釈物20μLをELISAプレートに移し、室温で1時間インキュベートした後、洗浄緩衝液で洗浄した。20μL/ウェルのペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗種IgG Fc特異的F(ab')₂断片 (Jackson ImmunoResearch社) を1:5000でブロッキング緩衝液により希釈して加え、室温で1時間インキュベートした後、洗浄緩衝液で洗浄した。TMB基質 (EMD Millipore社) を加えて (20μL/ウェル) 結合を可視化し、反応物を室温で5分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーを使用して630nmで光学密度を測定した。このアッセイは、B細胞上清段階 (ヒトCD1aプールB)、TAP上清段階 (ヒトCD1aプールB、キメラCD1aプールB)、クローン上清段階 (ヒトCD1aプールB、キメラCD1aプールB) および精製抗体段階 (ヒトCD1aプールB、キメラCD1aプールB、中国変異体CD1a、カニクイザルCD1a) において実施した。精製抗体のデータは、表1~4に示す。

【0123】

フローサイトメトリーにより評価した77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117) および16 (VR11834) の結合

CD1a特異的抗体をフローサイトメトリーにより同定した。HEK、C1RおよびMOLT4細胞株上に発現したタンパク質に対する結合を評価した。HEK-293細胞に目的のタンパク質 (CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、中国変異体CD1aまた

10

20

30

40

50

はカニクイザルCD1a) および種特異的β2M(上に示すもの)をトランスフェクトした。トランスフェクションは、Expifectamine293キット(Gibco社)を使用して実施し、一晚インキュベートした。C1R-CD1a、C1R-空ベクターおよびMOLT4細胞株は、必要とされる日に1×PBS中で洗浄した。すべての細胞株を計数して1×PBS中に再懸濁し、次いで、DiIまたはDiO細胞染色(Invitrogen社)を使用して37℃で30分間染色した。細胞をフローサイトメトリー緩衝液(PBS中1%のウシ血清アルブミン、2mMのEDTAおよび0.1%のアジ化ナトリウム)で洗浄した後、2つのDiI染色およびDiO染色集団をともに混合した。次いで、細胞(20μl/ウェル)を抗体試料(B細胞培養上清、TAP上清、クローン上清、精製抗体溶液)(20μl/ウェル)の希釈物に加え、フローサイトメトリーアッセイプレート内に4℃で1時間インキュベートした後、フローサイトメトリー緩衝液で洗浄した。10μl/ウェルのAlexafluor647コンジュゲートヤギ抗種IgG Fc特異的F(ab')₂断片(JacksonImmunoResearch社)を1:2500でフローサイトメトリー緩衝液により希釈して加え、4℃で30分間インキュベートした後、洗浄緩衝液で洗浄した。次いで、蛍光強度をiQue screener PLUS上で測定した。このアッセイは、B細胞上清段階(ヒトCD1aを発現するHEK-293細胞)、TAP上清段階(ヒトCD1a、CD1b、CD1cまたはCD1dを発現するHEK-293細胞)、クローン上清段階(ヒトCD1a、CD1b、CD1cまたはCD1dを発現するHEK-293細胞;ヒトCD1aまたは空ベクターを発現するC1R細胞;MOLT4細胞株)および精製抗体段階(ヒトCD1a、CD1b、CD1c、CD1d、中国変異体CD1aまたはカニクイザルCD1aを発現するHEK-293細胞;ヒトCD1aまたは空ベクターを発現するC1R細胞;MOLT4細胞)において実施した。精製抗体のデータは、表5~9に示す。

【0124】

【表3】

表1. ヒトCD1aプールBタンパク質に対する抗体結合. 77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117)および16 (VR11834)をヒトCD1aタンパク質に結合する能力についてELISAにより検査した。抗体は希釈系列により滴定し、対照ウサギIgG抗体と比較した。5つすべての抗体がヒトCD1aプールBタンパク質に結合した。精製抗体のデータを示す。

抗体濃度	光学密度(OD)							
	100 μg/ml	31.6 μg/ml	10 μg/ml	3.16 μg/ml	1 μg/ml	0.316 μg/ml	0.1 μg/ml	0.0316 μg/ml
77A (VR11851)	1.39	1.28	1.34	1.33	1.34	1.39	1.36	1.25
110 (VR12112)	1.23	1.24	1.28	1.27	1.19	1.18	1.12	0.81
111 (VR12113)	1.12	1.07	1.12	1.13	1.14	1.04	1.06	1.10
116 (VR12117)	1.15	1.16	1.18	1.15	1.15	1.15	1.07	0.95
16 (VR11834)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.59	NA
対照 IgG	0.07	0.06	0.07	0.06	0.07	0.07	0.06	0.06

【0125】

【表 4】

表 2. キメラ CD1a プール B タンパク質に対する抗体結合. 77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117)および 16 (VR11834)をキメラ CD1a [ヒト CD1a 脂質結合ドメイン、マウス CD1d Ig ドメイン]タンパク質に結合する能力について ELISA により検査した。抗体は希釈系列により滴定し、対照ウサギ IgG 抗体と比較した。5 つすべての抗体がキメラ CD1a プール B タンパク質に結合した。精製抗体のデータを示す。

抗体 濃度(μg/ml)	光学密度(OD)							
	100 μg/ml	31.6 μg/ml	10 μg/ml	3.16 μg/ml	1 μg/ml	0.316 μg/ml	0.1 μg/ml	0.0316 μg/ml
77A (VR11851)	1.27	1.33	1.31	1.28	1.26	1.28	1.25	1.09
110 (VR12112)	1.40	1.40	1.46	1.53	1.45	1.24	1.02	0.73
111 (VR12113)	1.27	1.35	1.40	1.41	1.36	1.32	1.25	1.19
116 (VR12117)	1.37	1.35	1.40	1.38	1.42	1.32	1.25	1.13
16 (VR11834)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.70	NA
対照 IgG	0.08	0.08	0.08	0.10	0.09	0.09	0.08	0.09

【 0 1 2 6 】

【表 5】

表 3. 中国変異体 CD1a タンパク質に対する抗体結合. 77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117)および 16 (VR11834)を中国変異体 CD1a タンパク質に結合する能力について ELISA により検査した。抗体は希釈系列により滴定し、対照ウサギ IgG 抗体と比較した。5 つすべての抗体が中国変異体 CD1a タンパク質に結合した。精製抗体のデータを示す。

抗体 濃度	光学密度(OD)			
	10 μg/ml	1 μg/ml	0.1 μg/ml	0.01 μg/ml
77A (VR11851)	0.99	0.78	1.05	0.79
110 (VR12112)	1.75	1.79	1.57	1.40
111 (VR12113)	1.41	1.44	1.52	1.33
116 (VR12117)	1.51	1.51	1.53	1.47
16 (VR11834)	1.44	1.35	1.30	1.01
対照 IgG	0.14	0.08	0.08	0.08

【 0 1 2 7 】

【表 6】

表 4. カニクイザル CD1a タンパク質に対する抗体結合. 77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117)および 16 (VR11834)をカニクイザル CD1a タンパク質に結合する能力について ELISA により検査した。抗体は希釈系列により滴定し、対照ウサギ IgG 抗体と比較した。116 (VR12117)を除く 5 つすべての抗体がカニクイザル CD1a タンパク質に結合した。精製抗体のデータを示す。

抗体濃度	光学密度 (OD)			
	10 µg/ml	1 µg/ml	0.1 µg/ml	0.01 µg/ml
77A (VR11851)	0.52	0.43	0.24	0.10
110 (VR12112)	0.86	0.94	0.53	0.22
111 (VR12113)	0.79	0.69	0.66	0.48
116 (VR12117)	0.16	0.14	0.07	0.07
16 (VR11834)	0.49	0.58	0.57	0.46
対照 IgG	0.09	0.07	0.07	0.06

【 0 1 2 8 】

【表 7－1】

表 5. HEK-293 細胞上に発現するヒト CD1a、CD1b、CD1c または CD1d に対する抗体結合. HEK-293 細胞にヒト CD1a、CD1b、CD1c または CD1d を一過性にトランスフェクトし、ヒト β 2M を同時トランスフェクトした。77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117)および 16 (VR11834)を希釈系列により滴定し、トランスフェクトしたタンパク質に対する結合について検査した。結合は、フローサイトメトリーにより評価したバックグラウンドに対する蛍光強度幾何平均の倍率変化として定量した。5 つすべての抗体が HEK-293 細胞上に発現するヒト CD1a に結合した。HEK-293 細胞上に発現する CD1b、CD1c または CD1d に対する結合は観察されなかった。精製抗体のデータを示す。

標的細胞	抗体濃度	蛍光強度幾何平均(バックグラウンドに対して正規化)							
		100 μg/ml	31.6 μg/ml	10 μg/ml	3.16 μg/ml	1 μg/ml	0.316 μg/ml	0.1 μg/ml	0.0316 μg/ml
HEK - CD1a	77A (VR11851)	4.1	8.2	13.7	23.3	41.9	58.6	43.8	24.9
	110 (VR12112)	5.9	10.9	15.7	31.5	49.2	38.3	20.2	8.9
	111 (VR12113)	4.3	6.3	11.1	24.9	42.0	30.8	23.1	11.1
	116 (VR12117)	3.9	5.6	12.6	21.9	48.2	36.5	26.7	15.7
	16 (VR11834)	NA	NA	10.2	NA	19.6	NA	12.9	NA
HEK - CD1b	77A (VR11851)	1.0	1.0	1.1	0.9	1.1	1.1	1.0	0.9
	110 (VR12112)	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0
	111 (VR12113)	1.1	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0
	116 (VR12117)	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0
	16 (VR11834)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
HEK - CD1c	77A (VR11851)	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0
	110 (VR12112)	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	0.9	1.0	1.0
	111 (VR12113)	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0
	116 (VR12117)	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0
	16 (VR11834)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

【表 7－2】

HEK - CD1d	77A (VR11851)	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	0.9	0.9
	110 (VR12112)	1.1	1.1	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0
	111 (VR12113)	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	0.9	1.0	1.0
	116 (VR12117)	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0	1.1	1.0
	16 (VR11834)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

【 0 1 2 9 】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 6. CIR 細胞上に発現するヒト CD1a、CD1b、CD1e または CD1d に対する抗体結合. 77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117) および 16 (VR11834) を希釈系列により滴定し、ヒト CD1a または空ベクターおよびヒト β 2M を安定に形質導入した CIR 細胞に対する結合について検査した。結合は、フローサイトメトリーにより評価したバックグラウンドに対する蛍光強度幾何平均の倍率変化として定量した。5 つすべての抗体が CIR 細胞上に発現するヒト CD1a に結合した。空ベクターを発現する CIR 細胞に対する結合は観察されなかった。精製抗体のデータを示す。

標的細胞	抗体濃度	蛍光強度幾何平均(バックグラウンドに対して正規化)							
		100 μ g/ml	31.6 μ g/ml	10 μ g/ml	3.16 μ g/ml	1 μ g/ml	0.316 μ g/ml	0.1 μ g/ml	0.0316 μ g/ml
CIR - CD1a	77A (VR11851)	0.9	1.3	2.3	4.2	10.3	19.0	16.4	17.0
	110 (VR12112)	4.8	6.2	8.3	15.2	28.2	29.7	25.8	17.1
	111 (VR12113)	7.3	7.0	11.7	15.6	28.0	28.8	25.4	26.0
	116 (VR12117)	11.9	13.7	16.9	24.0	28.7	27.5	27.0	24.1
	16 (VR11834)	NA	NA	7.0	NA	10.1	NA	10.2	NA
CIR -空 ベク ター	77A (VR11851)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9
	110 (VR12112)	1.0	0.8	0.9	1.0	0.9	0.8	0.9	0.4
	111 (VR12113)	1.1	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	1.0	1.2
	116 (VR12117)	1.0	1.0	1.2	1.4	1.3	1.0	1.0	0.9
	16 (VR11834)	NA	NA	0.9	NA	0.9	NA	0.9	NA

【 0 1 3 0 】

【表 9】

表 7. MOLT4 細胞に対する抗体結合. 77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117)および 16 (VR11834)を希釈系列により滴定し、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d および β 2M を内因的に発現する MOLT4 細胞に対する結合について検査した。結合は、フローサイトメトリーにより評価したバックグラウンドに対する蛍光強度幾何平均の倍率変化として定量した。5 つすべての抗体が MOLT4 細胞表面タンパク質、おそらくは、CD1a に結合した。精製抗体のデータを示す。

抗体 濃度	蛍光強度幾何平均(バックグラウンドに対して正規化)							
	100 μg/ml	31.6 μg/ml	10 μg/ml	3.16 μg/ml	1 μg/ml	0.316 μg/ml	0.1 μg/ml	0.0316 μg/ml
77A (VR11851)	0.8	2.2	4.1	7.4	13.5	15.2	12.4	8.7
110 (VR12112)	5.2	7.5	14.7	22.6	33.0	27.1	16.8	1.6
111 (VR12113)	3.9	5.4	9.3	18.9	31.2	27.3	20.6	12.4
116 (VR12117)	3.7	5.6	11.7	23.9	30.6	29.6	22.6	14.9
16 (VR11834)	NA	NA	7.5	NA	15.0	NA	14.4	NA

【 0 1 3 1 】

【表 1 0】

表 8. HEK-293 細胞上に発現する一般的中国変異体 CD1a に対する抗体結合. 77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117)および 16 (VR11834)を希釈系列により滴定し、一般的中国変異体 CD1a (18)およびヒト β 2M を一過性にトランスフェクトした HEK-293 細胞に対する結合について検査した。結合は、フローサイトメトリーにより評価したバックグラウンドに対する蛍光強度幾何平均の倍率変化として定量した。5 つすべての抗体が HEK-293 細胞上に発現する中国変異体 CD1a に結合した。精製抗体のデータを示す。

抗体 濃度	蛍光強度幾何平均(バックグラウンドに対し て正規化)			
	10 μg/ml	1 μg/ml	0.1 μg/ml	0.01 μg/ml
77A (VR11851)	6.9	47.2	99.3	76.4
110 (VR12112)	48.3	111.5	119.1	29.1
111 (VR12113)	35.4	39.5	96.4	33.8
116 (VR12117)	48.9	12.8	100.0	34.5
16 (VR11834)	11.4	11.2	11.2	6.0

【 0 1 3 2 】

【表 1 1】

表 9. HEK-293 細胞上に発現するカニクイザル CD1a に対する抗体結合. 77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117)および 16 (VR11834)を希釈系列により滴定し、カニクイザル CD1a およびカニクイザル β 2M を一過性にトランスフェクトした HEK-293 細胞に対する結合について検査した。結合は、フローサイトメトリーにより評価したバックグラウンドに対する蛍光強度幾何平均の倍率変化として定量した。116 (VR12117)を除く 5 つすべての抗体が HEK-293 細胞上に発現するカニクイザル CD1a に結合した。精製抗体のデータを示す。

抗体 濃度	蛍光強度幾何平均(バックグラウンドに対し て正規化)			
	10 μ g/ml	1 μ g/ml	0.1 μ g/ml	0.01 μ g/ml
77A (VR11851)	1.4	10.6	5.7	1.7
110 (VR12112)	13.6	11.2	3.3	1.2
111 (VR12113)	16.3	12.9	25.8	8.9
116 (VR12117)	1.7	0.8	1.0	1.0
16 (VR11834)	8.8	7.6	8.5	6.9

【 0 1 3 3】

【表 1 2】

表 10. ヒト CD1a に対する抗体親和性.ヒト CD1a に対する 77A (VR11851)、110 (VR12112)、111 (VR12113)、116 (VR12117)および 16 (VR11834)の親和性を biacore を使用して評価した。1:1 の結合モデルを使用して、異種リガンド結合モデルを必要とする 16 (VR11834)を除くすべての場合においてデータを適合させた。親和性は、級数が考慮される 100 nM 未満であることを必要とした。精製抗体のデータを示す。

リガンド	ka (1/Ms)	ka 2 (1/Ms)	kd (1/s)	kd 2 (1/s)	KD (M)
77A (VR11851)	4.69E+05		1.13E-04		2.40E-10
110 (VR12112)	4.43E+05		8.74E-04		1.97E-09
111 (VR12113)	3.21E+05		1.47E-08		3.12E-11
116 (VR12117)	4.83E+05		1.40E-03		2.89E-09
16 (VR11834)	1.86E+06	5.14E+05	7.29E-04	6.58E-03	3.92E-10

【 0 1 3 4】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

リガンド	KD2 (M)	Chi ² (RU ²)	リガンドレ ベル(RU)	モデル	Rmax (RU)
77A (VR11851)		0.306	177.2	1:1 結合	118.5
110 (VR12112)		3.94E-02	128.1	1:1 結合	24.2
111 (VR12113)		2.48E-02	68.5	1:1 結合	局所適合
116 (VR12117)		1.19E-01	120.3	1:1 結合	49.0
16 (VR11834)	1.28E-08	NA	78.1	異種リガンド	NA

【実施例】
【0 1 3 5】
【実施例 1】
【0 1 3 6】

抗 C D 1 a パネルの改良：抗 C D 1 a 抗体の機能的評価

C D 1 a 結合評価の後、阻害機能のために生成した抗 C D 1 a 抗体の大型パネルをスクリーニングした。T 細胞のサイトカイン産生をインビトロでの抗原提示モデルにおいて E l i s p o t により測定した。このようなデータの要約は、図 1 に示す。新たに生成した抗体の多くが、C D 1 a T 細胞応答の阻害において市販の抗 C D 1 a 抗体 O K T 6、H I 1 4 9 および S K 9 よりも強力であることが判定された。注目すべきは、抗体 1 6、2 2、3 9、4 6、7 7、8 7、1 1 0、1 1 6 はすべて、O K T 6 よりも少なくとも 1 l o g 低い I C 5 0 を有し（図 1 B）、これは、形質導入クローン不死 T 細胞よりも感受性が低いと予想されるポリクローナル T 細胞の使用にもかかわらず、先行技術に記載の抗体を超える改善である。

【実施例 2】
【0 1 3 7】

抗 C D 1 a パネルの改良：C D 1 a 制限濃縮 T 細胞株応答の阻害

インビボでの解析のための抗体候補の最終選抜リスト作成を助けるために、異なる手法を取って C D 1 a T 細胞応答を評価した。C D 1 a 制限濃縮 T 細胞株を単離および増殖させて、低いシグナル対ノイズ比により阻害性抗体の可能性が部分的に隠蔽され得る複合的ポリクローナル T 細胞バックグラウンドではなく、単離して C D 1 a 応答を解析した。

【0 1 3 8】

このようなアッセイでは、抗体 1 1 6 および 1 6 が、強力な阻害性抗体として優れており、1 6 は、I L - 2 2 の自己反応的／内因的産生をユニークに阻害した（図 2 A および 2 B）。この改善は、I F N γ が果たす役割を有する条件に加えて、I L - 2 2 が病原性の役割を果たす条件下で抗体を使用する可能性を示す。種々のサイトカインに対する差次的作用が見られることは、驚くべきことであった。さらに、無 A P C 系を使用して、C D 1 a 制限 T 細胞活性化の抗体依存性阻害を評価した。C D 1 a をコーティングしたビーズを A P C の代替物として使用し、生じた T 細胞 I F N γ 産生をフローサイトメトリーにより測定した。このアッセイによって、すべての抗体、特に、7 7 a、8 7、1 1 0、1 1 1 および 1 1 6 による C D 1 a 依存性サイトカイン応答の有意な阻害が明らかとなった（図 2 C）。

【実施例 3】
【0 1 3 9】

皮膚炎症における阻害性抗体のインビボでの評価

この試験の目的は、ヒト疾患および障害の治療における臨床的使用のための抗体を生成

することであり、このため、ヒト疾患に似た複雑な免疫系における有効性を確かめることが必須であった。新たに生成した最良の抗体の高度に改良されたパネルを上記のデータの解析から選択し（抗体16、77a、110、111および116）、乾癬、皮膚炎、ループスのインビボでのモデルにおいて、ならびに炎症性皮膚もしくは粘膜疾患もしくは障害として現れる薬物反応、または関連する全身性疾患もしくは障害、または1つもしくは複数の全身的に現れる炎症性薬物反応のモデルとして、これらの可能性を決定しようとした。実験的乾癬および皮膚炎は、CD1a遺伝子導入マウスにおいて、WTと比較して増悪することが示され、CD1a依存性炎症は、抗CD1a抗体の投与により回復させることができる（Kim et al 2016）。一部の個体が、多くの皮膚障害のために局所的に使用したイミキモドに対する皮膚／粘膜炎症性薬物反応を生じることも注目すべきであり、このような薬物反応としては、乾癬性反応、皮膚炎反応、水疱性疾患、脱毛症、小胞形成、苔癬反応、好中球性疾患、エリテマトーデス、多形性紅斑、口腔びらん、ならびに重度の薬物反応、例えば、DRESS、AGEP、スティーブンス・ジョンソン症候群および中毒性表皮壊死症が挙げられる（19-29）。

10

20

30

40

50

【0140】

CD1a遺伝子導入マウスの生成

皮膚および関連する全身性炎症におけるCD1aの可能な役割を評価するために、発明者らは、CD1a遺伝子導入マウスを生成した。CD1aは、マウスゲノムには存在しないため、プロモーターエレメントを含む0.8kb5'および0.8kb3'隣接領域を有するヒトCD1a遺伝子座をクローニングし、この導入遺伝子を、公表されているCD1a遺伝子導入モデルと同様であるが、さらなる導入遺伝子断片ステッチを必要とする、顕微注射により挿入した（Illing et al., Nature 486, 554-558 (2012)）。遺伝子型陽性ファウンダーマウスを飼育し、系統をCD1a導入遺伝子発現についてスクリーニングした。発明者らはさらに、マウスの表現型を決定して、CD1aタンパク質発現が予想プロファイルに従い、ヒトCD1a細胞発現の代表的なものであるかどうかを判定した。野生型およびCD1a遺伝子導入（CD1a Tg）マウスの耳皮膚を採取し、酵素的に処理してフローサイトメトリーによる皮膚細胞環の解析を可能とした（図3A）。CD1a発現は、総皮膚細胞の4.2%（+/-1.79）およびCD45+細胞の23.6%（+/-6.68）を占める皮膚において検出した。細胞の発現調節を評価するために、真皮DC（dDC）およびランゲルハンス細胞（LC）をCD1aタンパク質について評価した。真皮DCサブセットは、CD1aを発現することが報告されており、ランゲルハンス細胞は、特徴的には、構成的なCD1a highである。CD1aは、dDCの41.5%（+/-20.38）およびLCの88%（+/-4.606）が発現することが見出された（図3A~B）。免疫蛍光によって皮膚におけるCD1aタンパク質発現をさらに特性決定し、特徴的な表皮の位置と、LCに典型的な樹状突起を有する細胞とが明らかとなった（図3C）。CD1a遺伝子型が確認され（図3D）、胸腺におけるCD1a発現は、主に、CD4+CD8+二重陽性胸腺細胞の割合によって観察された（図3E）。CD1a Tgマウスは、定常状態では異常な皮膚炎症を示さなかった。要約すると、発明者らは、ヒト組織発現と表現型的に同様にCD1a発現を呈するCD1a遺伝子導入マウスを生成した。

【0141】

このモデルを使用して、抗CD1a抗体を炎症性皮膚疾患および障害の予防について検査した（図4A）。TLR7/8アゴニストであるイミキモド5%を含むアルダラクリームの適用は、皮膚肥厚、鱗屑および発赤により典型的に表される乾癬様、皮膚炎様、ループス様皮膚炎症を誘発する確立されたモデルである（30,31）。CD1a遺伝子導入マウスの耳の炎症が、アルダラに応答して、WT対応マウスのそれよりもかなり高いことが見出された。その上、イミキモドの前に投与したすべての抗CD1a抗体では、その後の耳肥厚が低下したが、抗体116および16では、CD1a依存性炎症が少なくともWTレベルまで低下した（図4B）。実験のエンドポイントまでには、抗体16および110で処置したCD1a遺伝子導入（-Tg）マウスは、耳肥厚のWTレベルまで炎症の低下

を示した。著しくかつ予想外なことには、抗体 116 の処置により、CD1a-Tg 耳皮膚炎症のレベルが、WT 皮膚のレベル未満に有意に低下した（図 4 B）。

【実施例 4】

【0142】

皮膚免疫応答に対する阻害性抗体のインビボでの作用

これにより、イミキモド誘発 CD1a 依存性耳炎症への皮膚免疫集団の寄与について解析しようとした。

【0143】

皮膚 T 細胞浸潤が CD1a 遺伝子導入マウスにおいて上昇し、この集団の発生頻度が抗 CD1a 抗体、特に、予防モデルの抗体 116、16 および 110 により低下することが見出された（図 5 A）。注目すべきは、16 および 116 では、皮膚 T 細胞浸潤を野生型未満のレベルに低下させることが可能であり、インビボでの炎症に対する著明な作用の改善が示唆された。その上、活性化マーカー CD69 が、CD1a 遺伝子導入マウスの皮膚 T 細胞の表面上で上昇し、抗 CD1a 抗体の一部、特に、予防モデルの 116 および 16 により阻害された（図 5 B）。好中球は、乾癬性応答およびマウスイミキモドモデルを含む多くの炎症性障害の重要な細胞であることがわかっている。ここでは、イミキモド処置時の皮膚において好中球発生頻度の上昇、および CD1a 遺伝子導入マウスにおいてさらなる上昇が見出され、これは、予防モデルの抗 CD1a 抗体 116 および 16 により WT レベルまたは未満に低下した（図 5 C）。抗体に応答した皮膚好酸球の低下も認められ、これは、薬物反応性の多くの形態における好酸球の公知の役割を考慮すれば興味深いものである（図 5 D）。好酸球に対する作用がこれまでに観察されていないため、この予想外の知見は、改善の代表的なものである。

【0144】

ヒト皮膚炎症性障害において観察されたように、CD1a 遺伝子導入マウスのイミキモド曝露時の皮膚において、CD11c+ランゲリン+としてここで定義するランゲルハンス細胞も、WT と比較して増加した。抗体 16、116、111 および非有意性には 110 の投与により、予防モデルにおいて皮膚 LC 数が減少した（図 6 A）。注目すべきことには、抗体 116 により、皮膚 LC 数が、野生型皮膚における数未満に減少し、驚くべき作用レベルの改善が示された。主な CD1a 発現集団として、LC の CD1a 発現に対する抗体の作用を評価した。抗体 110 および 116 では染色が減少したが、これは、HI149 検出抗体による結合に対する 110 / 116 抗体の干渉のためであることは注目すべきであった（図 6 B）。これは、驚くべき作用であり、治療的利点と関連する、インビボでの抗体の持続的結合を示す。また、この知見は、診断もしくは予後目的または処置前および処置中の CD1a 発現細胞の監視のために抗体を使用する可能性を高める。この観察は、以下に示すように非競合 SK9 検出抗体では見られなかった。観察された LC 減少は、抗体依存性 LC 死もしくは遊走または表現型の変更のためであり得る。したがって、頸部リンパ節を CD11c+ランゲリン+LC の存在について解析した。しかし、CD1a 遺伝子導入マウスのリンパ節における LC 数の、WT と比較した増加が見出されたが、LN への遊走は、抗体 110 および 116 で処置したマウスにおける皮膚 LC の減少の説明がつくとは考えられなかった（図 6 C）。注目すべきことには、抗体 116 により、野生型皮膚のそれに近い免疫学的改善がもたらされ、驚くべき作用レベルの改善が示された。興味深いことには、リンパ節由来 LC 上の CD1a の発現レベルは、以下にさらに考察するように、HI149 検出抗体による結合に対する 110 / 116 抗体の干渉のためである LC の染色が減少した点において、皮膚のレベルと類似のパターンに従った（図 6 D）。これは、非競合 SK9 検出抗体では見られなかった。リンパ節由来 LC が、皮膚の場合より少なく 1 細胞あたりの CD1a を発現したことは注目すべきであり、これは、全身的炎症を予防する制御機構であり得る。したがって、抗体は、皮膚において、およびリンパ節への遊走後であっても、インビボで LC に対する作用を維持する。臨床作用がより持続性であるため、これは重要な増強である。

【実施例 5】

【0145】

CD1a発現細胞表現型に対する作用において発現した抗CD1a抗体観察細胞毒性

遊走の増強によって皮膚LC減少の説明が十分にはつかなかったことを考慮して、抗体により誘導されるCD1a+細胞表現型変更の可能性を、マウスIgG1の性質にかかわらず検討した。

【0146】

すべての抗CD1a抗体、特に、110および116により、MHCクラスIおよびIIを欠くため、応答の比較が可能であるCD1a+K562細胞の数をインビトロで減少可能であることを実証した(図7A)。抗体110および116は、より詳細に検査したところ、用量依存的減少を示し(図7B)、IgG1アイソタイプを考慮すると、これは改善かつ驚異となった。これは、公表されているCR2113抗体とは異なると思われる(16、18)(米国特許第10844118号明細書およびカナダ国特許出願公開第2924882号明細書)、これには、補体および/または抗体依存性細胞性細胞毒性を必要とすると述べられている。詳細には、「CR2113はアポトーシスを直接的に誘導しない」と述べられ(17)、NA1/34が直接的殺傷を誘導しないことが認められた。しかし、種々のFc領域によりエフェクター機能が影響されるため、マウスIgG1バックグラウンドのCR2113の比較可能な作用を以下に直接的に取り上げる。発明者らは、初代ヒトCD1a発現細胞の直接的減少を誘導する抗体の能力をさらに評価した。サイトカインIL-4/GM-CSFおよびIL-4/GM-CSF/TGF-βをそれぞれ使用し、培養から0または2日目に抗CD1a抗体を加える、5日のインビトロでの単球の分化により、DCおよびLC様細胞を生成した。抗体110および116により、LCおよび比較的程度の小さいDCがインビトロで減少することが観察された(図7Cのそれぞれ上および下パネル)。この減少の根底にある機構の調査では、発明者らは、細胞クラスター形成培養物の著しい表現型形態と関連する減少を見出した(図7D)。数の減少は、このクラスター形成により部分的に説明がつき得るが、加えて、抗体によってCD1a発現標的細胞のアポトーシスが誘導可能かどうかを検査し、CR2113と比較した(マウスIgG1バックグラウンド)。図7Eは、110および116(16ではなく)ならびにCR2113(マウスIgG1バックグラウンド)が、補体またはADCCの非存在下であっても、CD1a発現K562によるアネキシンV発現を誘導することを示す。これは、110、116およびCR2113抗体が、K562細胞死をある程度まで媒介可能であることを示唆する。補体媒介溶解(CDC)および抗体依存性細胞毒性(ADCC)の役割を検討するために、K562-CD1aを補体(図7F)および/またはヒトPBMC(図7G)とともにインキュベートした。マウスIgG1の抗体の性質にもかかわらず、補体媒介溶解およびADCCの証拠が存在した。インビボでの機構をさらに検討するために、リンパ球応答および他の作用を広く欠損する免疫不全NSGモデルのK562-CD1a皮下腫瘍を使用して、新たなモデルを確立した。データは、3つすべての抗体により、10日目までにリンパ球系細胞腫瘍のサイズが低下し、16および116では、15~20日目まで作用が持続する(25%以上のCD1a発現腫瘍細胞量の低下まで)が、CR2113では、失われることを示した(図7H)。インビトロおよびインビボでの応答の差異は、インビボで存在する他の共同因子、例えば、補体、異なるFcに対する特異性を有するFcRを担持する多数の自然細胞サブセット、差次的標的細胞密度、インビボでの抗体半減期の短縮、および組織到達の変更により説明がつき得る。CD1a発現標的細胞表現型のこのような直接的変更により、CD1a発現細胞の低炎症性応答が促進され得る。したがって、110および116で処置したCD1a-Tgマウスの皮膚におけるLCの減少は、CD1a+LCの表現型における直接的抗体依存的変化により部分的に説明がつき、臨床作用、例えば、116では、野生型のレベル未満までの炎症の低下に寄与し得る。また、データにより、ランゲルハンス細胞組織球症およびT細胞リンパ腫の一部の型および胸腺腫の一部の型を含むCD1a発現悪性疾患の治療における有用性を、抗体が有し得る可能性が高まる。しかし、CD1aビーズアッセイ(図2C)が、いかなる枯渇作用によっても影響されないため、標的細胞の表現型変更では、図2に示すT細胞

10

20

30

40

50

胞機能的応答の低下の説明がつかない。

【実施例 6】

【0147】

CD1a 抗体のエピトープ結合解析

本明細書において示すデータにより、5つの新たに生成した抗CD1a抗体が様々な機能性を有することを実証し、抗体が重複結合部位を有するかどうかを、フローサイトメトリ交差遮断アッセイを使用して判定しようとした。加えて、エピトープの重複を市販の抗体OKT6、HI149、SK9およびNA1/34（上記のようにCR2113と重複することが公知の結合部位）により評価した。

【0148】

CD1a-K562細胞を精製抗CD1a一次抗体とともにインキュベートし（図8AのY軸、25μg/ml）、次いで、非結合抗体を洗い流し、次いで、種々の抗体のAlexa-Fluor-647コンジュゲート形態を細胞とともに図8Aのマトリックス配置によりインキュベートした（X軸、10μg/ml）。平均蛍光強度（MFI）を使用してフルオロフォアコンジュゲート抗体の結合の程度を評価したところ、精製一次抗体の結合により生じる任意の立体干渉が、MFIの低下により表された。結果は、抗体HI149、OKT6、110および116が、重複または密接に結合するエピトープを有し得、抗体NA1/34、77a、111および16を含む第2の群が、密接に関連する結合部位を有し得ることを示した。これは、インビボで観察されたCD1a発現の低下（図6BおよびD）が、HI/149検出抗体による結合に対する110/116抗体の干渉のためであることを示唆する。実際、この作用は、非競合SK9検出抗体では見られなかった（図8B）。重要かつ予想外なことには、これにより抗体は、皮膚において、ならびにリンパ節への遊走および次の皮膚組織の酵素分解後であっても、インビボでLC上に存在を維持する。これは、より長期で実質的な臨床的有用性と関連する可能性を有する。抗体が、競合しない2つの主な群に分けられるため、図8（AおよびB）は、各群から選択される抗体メンバーの組合せを、例えば、治療/監視または併用治療として、ともに使用可能であることを示す。このような組合せの1つは、116および16である。

【実施例 7】

【0149】

イミキモド誘発炎症およびさらには全身的に関連する炎症の治療に対する本発明の抗体の有効性の実証

循環するCD1a反応性T細胞の存在が実証されているが（11）、CD1aの皮膚に優勢な発現を考慮して、ほとんどの試験では、皮膚特異的機能性作用に焦点を合わせていた。皮膚に留まらない組織の炎症におけるCD1aの役割は、大規模には試験されていなかった。その上、CD1aは、イミキモド皮膚応答を増幅することが公知であるが（16）、関連する全身性続発症の試験は存在していない。発明者らは、新規のCD1a遺伝子導入マウスおよびCD1a反応性T細胞を生成し、抗CD1a抗体の機能性をインビトロおよびインビボでヒトおよびマウスアッセイをそれぞれ使用して特性決定する。この知見により、CD1a依存性作用が全身作用に及ぶことが確認され、有害な炎症性薬物反応を含む全身的に関連する皮膚疾患の治療に意味づけられる。

【0150】

抗CD1a抗体の治療可能性

新たに生成した抗CD1a抗体の治療可能性をさらに評価するために、発明者らは、3つの臨床的に最も有効な抗体16、110および116をイミキモド処置モデルにおいて検査し、この場合、イミキモド誘発炎症の確立後に抗CD1a抗体を導入した（図9A）。イミキモドの適用が進行中であるにもかかわらず、3つすべての抗体により、開始後速やかに臨床応答が改善した（図9B～C）。116では、応答が最も著名であり、これにより耳厚が低下した（図9B）。皮膚全体（上パネル）および表皮（下パネル）の肥厚を共焦点顕微鏡により可視化し（図9D）、これによりマイクロメーター評価が確認された（図9B）。CD1aタンパク質発現をCD1a遺伝子導入表皮において評価し（抗CD

10

20

30

40

50

1 a O K T 6 A F - 5 9 4、赤)、110および116により処置した皮膚において、細胞死およびエピトープ競合により低下することを認めた(図8Aおよび図9D)。イミキモド処置モデル後の皮膚細胞免疫応答の解析時、我々は、抗体の導入後の皮膚T細胞数および活性化の低下、皮膚LCの減少、ならびに皮膚好中球の減少を観察した(図9E~G)。

【0151】

CD1aはイミキモドに対する全身性免疫反応に関与する

イミキモド処置のヒト作用は、皮膚を越えて拡大させることができ、マウスモデルでは、脾腫を誘発することがわかっている。この経路に対するCD1aの寄与を評価した。著しくは、皮膚に留まらない全身作用と一致して、イミキモド処置CD1a Tgマウスでは、脾臓重量が野生型と比較して上昇し、抗体により脾臓サイズおよび重量が低下した(図10A)。その上、CD69発現(116および110、図10B~C)、脾臓好中球(非有意傾向)、および好酸球発生頻度(16、110、116)(それぞれ図10Dおよび10E)により決定した場合、抗体により、CD4およびCD8T細胞活性化が低下した。8日目に血漿サイトカインレベルを評価した。イミキモド処置CD1a遺伝子導入マウスでは、IL-23、IL-12p70、IL-1 β 、IL-1 α およびMCP-1の有意な上昇が観察され、16、110および116処置群の一部またはすべてでは、低下した(図10F)。それぞれ抗体16および116の存在下では、血漿免疫調節サイトカインIL-10およびIL-27は上昇した(他では同様の傾向)。次いで、循環免疫細胞に対する影響を確かめた。脾臓と同様に、イミキモド処置CD1a遺伝子導入群では、血中CD4およびCD8T細胞数、好中球増加症および好酸球増加症が増加した。この増加は、16、110または116による処置後に有意に遮断された(図11A~E)。最後に発明者らは、イミキモドそれ自体がCD1aリガンドであり得るかどうかを検討したところ、これが事実ではないことを示し、CD1a経路のより広範な自己免疫および自己炎症作用と意味づけた(図12)。したがって皮膚のCD1aにより、幅広い全身性炎症免疫応答が刺激されるか、または影響されることを示唆することができる。

【0152】

抗CD1a抗体がイミキモド適用後に皮膚炎症の持続的リセットをもたらし得るかどうかを検討するために、模式図13Aに示すモデルを試み、ここでは、抗CD1a抗体の非再投与下でイミキモドの再曝露を行った(図13B)。驚くべきことには、持続的な免疫学的作用と一致して、16、110および116のすべてにより、抗体の非反復投与下で耳厚の持続的改善をもたらされた。また、免疫学的応答が持続するとともに、皮膚T細胞の発生頻度(110、116)、皮膚T細胞活性化(16、110、116)、皮膚好酸球(116)および皮膚好中球(16、110、116)、リンパ節T細胞発生頻度(110、116)、リンパ節T細胞活性化(16、116)、リンパ節ランゲルハンス細胞(116)、リンパ節好酸球(116)およびリンパ節好中球(116)、血中T細胞発生頻度(110、116)、血中T細胞活性化(116)、血中好酸球(110、116)、血漿IL-1 α (116)、IFN γ (16、110、116)、IL-1 β (16、110、116)、IL-6(16、116)、IL-17A(16、110、116)が有意に減少した。

【0153】

中等~重度の乾癬の管理における現在の標準治療と抗体の能力を比較するために、イミキモド処置モデル(図9A)を、抗CD1a抗体と同時かつ同一用量(100 μ g)による抗IL-17A(IgG1アイソタイプ)の投与と並行して反復した(図14)。すべての抗CD1a抗体は再び、耳厚の結果における有意な改善を示し、すべてが抗IL-17Aよりも早期に有意な改善をもたらした。種々の抗CD1a抗体とは対照的に、抗IL-17Aにより、皮膚T細胞、皮膚ランゲルハンス細胞、皮膚好酸球、リンパ節T細胞、リンパ節好中球、リンパ節好酸球、血漿IL-23、MCP-1、IL-6の発生頻度は有意に低下しないことが認められた。

【0154】

本明細書に記載の抗体とCR2113との間の皮膚および全身性炎症の結果を直接的に比較するために、イミキモド皮膚処置モデルを試みた（図15A）。すべての抗CD1a抗体が耳厚に対する有利な作用を有したが、抗体116は、CR2113よりも有意に上昇した（図15B～C）。CR2113に対する抗CD1a抗体16、110および116の改善の検討を拡大するために、皮膚炎症のさらなるモデル、すなわち、MC903誘発炎症についての比較を行ったところ（図15D）、CR2113ではなく抗体16、110および116において有意な有用性が観察されたため、改善を示す（図15E）。16および116では、皮膚T細胞パーセンテージおよび皮膚好酸球数において有意な低下を示すが、CR2113では、有意な低下は示さなかったことが認められた（図15F）。皮膚抽出サイトカインが有意に低下し、この場合、CR2113では、IL-5（16、110、116）、IL-6（16、110、116）、IL-9（16）、IL-23（116）、IL-17F（16、110、116）の有意な低下は示さなかった。

10

【0155】

イミキモドに対する皮膚、リンパ節および血漿炎症応答の低下において、116がCR2113よりも一貫した改善を示すことがさらに観察された（図16）。一部の結果では、16はまた、CR2113よりも有意に改善した（図16）。詳細には、皮膚T細胞によるIL-17A発現の低下および流入領域リンパ節好酸球の発生頻度において、抗体116は、CR2113よりも改善した。116は、血漿IFN γ 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-5、IL-9、IL-17A、IL-17F、IL-22、ならびに皮膚分解物IL-1 α 、IL-22およびTNF α の低下においてもCR2113よりも改善した。16は、リンパ節好酸球、血漿IL-1 β 、IL-22、IL-9およびIL-5、ならびに皮膚分解物IL-1 α およびIL-17Aでは強力な傾向による低下においてCR2113よりも改善した。全体的に見て、本明細書に記載の抗体により、イミキモドおよびMC903に対する皮膚および全身性炎症応答を阻害可能であることがデータにより確認された。

20

【0156】

考察

皮膚炎症、例えば、皮膚炎、乾癬、およびループスは、理学的かつ心理学的罹患率と顕著に関連する一般的障害である。薬物に対する皮膚有害反応も一般的であり、入院患者1000名あたり1.8～7の範囲に及ぶ。広汎かつ全身的作用を有する重度の皮膚有害反応、例えば、SJS、TEN、AGEP、およびDRESSは、それほど一般的ではなく、例えば、SJS/TENは、1年に個体百万名あたりおよそ1～6症例の発症率を有する（M. Mockenhaupt, Allergol Select 1, 96-108 (2017)）。GellおよびCoombsは、1960年代に過敏症の分類を定義し、ここでは、遅延型IV過敏症に、エフェクターT細胞の役割を必要とした（R. R. A. Coombs, Gell, P.G.H., Classification of allergic reactions responsible for drug hypersensitivity reactions. In Clinical Aspects of Immunology. (Davis, Philadelphia, ed. second, 1968)）。この分類では薬物過敏症のすべての態様の説明はつかないという認識が高まっているが、共有結合ハプテンまたは非共有結合修飾ペプチド/MHC分子の認識の変更に、なお大部分が焦点を合わせている。しかし現在のモデルでは、薬物過敏症の皮膚および粘膜合併症が優勢である説明がつかない（M. Mockenhaupt, Allergol Select 1, 96-108 (2017)）。

30

40

【0157】

CD1a遺伝子導入マウスおよび自己反応性ヒトCD1a制限濃縮T細胞株の生成、ならびに機能性抗CD1a抗体の特性決定により、ここに示すデータは、内因性脂質リガンドのCD1a提示の誘導を示す。これによって、自己反応性T細胞により媒介される皮膚および全身性炎症が引き起こされる。抗CD1a抗体は、遮断または遮断/調節しているかにかかわらず、臨床的かつ免疫学的作用を有し、T細胞に対するCD1a脂質提示が意義を有することを示唆した。TLR7は一本鎖RNAを認識可能であるため、ウイルス感染症に対する反応性が、乾癬、皮膚炎、ループス、ならびにSJSおよびTENを含む薬

50

物に対する有害炎症反応を含む、皮膚炎症の種々の重症型の臨床表現型を模倣可能であることは興味深い。このように共有された最終的な一般臨床所見により、多くの沈殿剤がCD1a自己反応性および自己炎症を促進し得ることが示され得る。このモデルは、エリテマトーデスおよびDRESS症候群を含む特定の薬物反応と関連する自己免疫のリスク上昇の説明にも役立ち得る。その上、この知見によって、より広範なT細胞寛容の破壊にCD1a自己反応性が意味づけられる。

【0158】

イミキモド含有薬物であるアルダラに対するT細胞応答への作用に加えて、皮膚、流入領域リンパ節、および脾臓における好中球および好酸球応答の上昇が、CD1a遺伝子導入マウスにおいて観察された。このような作用は、本発明の抗体、特に、16、110および116の投与により阻害された。これにより、CD1a依存性免疫カスケードが当初の予測よりも広範に及ぶことが意味づけられる。好中球の枯渇により、イミキモドにより誘発される炎症の重症度が回復することがわかっている(H. Sumida et al., *Interplay between CXCR2 and BLT1 facilitates neutrophil infiltration and resultant keratinocyte activation in a murine model of imiquimod-induced psoriasis*. *J Immunol* 192, 4361-4369 (2014))。

【0159】

アルダラ／イミキモドの適用により、上に考察するT細胞および好中球浸潤を含む、乾癬、皮膚炎、ループスおよび重度の皮膚過敏症反応を含む、皮膚炎症ならびに関連する全身性疾患および障害の種々の形態の鍵となる態様が再現される。本明細書において実証するデータにより、皮膚、リンパ節および脾臓のイミキモド依存性好酸球浸潤が、CD1a遺伝子導入マウスにおいて増強され、本発明の抗体、特に、16、110および116の投与により低下することが示される。

【0160】

その上、乾癬、皮膚炎、ループス、および斑状丘疹を含む炎症性皮膚疾患または障害の種々の形態を有する患者の病変皮膚におけるLC数が、非病変皮膚と比較して増加し、皮疹が消散すると非病変レベルまで減少することが報告されている(D. I. Dascalu, Y. Kletter, M. Baratz, S. Brenner, *Acta Derm Venereol* 72, 175-177 (1992))。興味深いことには、乾癬は、LC遊走の変更と関連し、イミキモドの適用ならびに乾癬およびループスおよび皮膚炎の有効なマウスモデルは十分に研究されているが、有害薬物炎症性薬物反応に対する適応性をも有することが示唆される。ここで、発明者らは、LCのCD1a抗体依存的調節が、本発明の抗体、特に、110および116の投与時の皮膚炎症の低下と関連したことを示し、これは、乾癬、皮膚炎、ループス、炎症性薬物反応および他の症状の治療に対して治療的意義を有し得る。エピトープ解析では、エピトープ結合部位の潜在的な治療的意義が強調され、抗CD1a抗体は、結合部位および生じるエフェクター機能に基づいて2つの群に分けられる。エピトープ部位により、抗体を主に遮断していた抗体77a、111および16ではなく110および116によって見られるクラスター形成および表現型作用の変化が促進され得る。クラスター形成により、実際、架橋／凝集様細胞形態が引き起こされることがあり、CD1aトランスフェクトK562および単球由来LCが単球由来DCよりも高い高レベルのCD1aを発現するため、これによっても両細胞型の減少の説明がつき得る。2つの群の種々の抗体結合部位は競合しないため、2つの群のそれぞれから選択される組合せに対する、例えば、治療／監視または併用療法における有用性が存在する。

【0161】

皮膚炎症および関連する全身性疾患の病態形成におけるCD1aの役割により、乾癬、皮膚炎およびエリテマトーデスならびに薬物過敏症を含む多くの疾患におけるこの役割が意味づけられる。その上、CD1a遮断および調節抗体の特性決定により、皮膚炎症およびCD1a発現悪性疾患に対する予防法および治療法の開発への新たな潜在的経路がもたらされる。

【0162】

10

20

30

40

50

要約

要約すると、発明者らは、炎症性皮膚および粘膜障害の予防および／または治療における治療可能性を有する抗CD1a抗体の改良パネルを生成した。5つの抗体16、77a、110、111および116では、インビトロでのヒトCD1a抗原提示の強力な阻害物質であることが示され、乾癬、皮膚炎、エリテマトーデスおよび炎症性皮膚または粘膜疾患または障害として現れる薬物反応、ならびに全身性（非皮膚性）障害の特徴を有する、例となる炎症性皮膚疾患の予防および治療モデル、ならびに異種移植腫瘍モデルにおける有効性が示された。改善抗体の同定における抗体発見プロセスの成功は、次の併用に起因し得る：a) 多数のヒット（3500）のスクリーニングを、b) 新規のキメラ免疫原の使用により行い、これによってヒトCD1a脂質結合ドメインを宿主生物CD1d I gドメインに融合し、したがって脂質結合ドメインに対して抗体生成を標的とした。この場合、機能的阻害可能性は、c) 種々の機能的結果を調べる多様なポリクローナルおよび濃縮T細胞解析次第であり得る。

10

【0163】

インビトロでのヒト機能性アッセイでは、この抗体が、市販の抗体よりも強力であることが示され、初代ポリクローナルT細胞応答の阻害のIC50評価により測定された。その上、高度に感受性のヒトCD1a制限T細胞クローンアッセイを使用して、抗CD1a抗体16および116が、炎症性皮膚および粘膜疾患の鍵となる調節因子であるIL-22産生を遮断可能であることを判定した。これは抗CD1a CR2113の既存の公表文献または特許においては示されず（（16、17）、米国特許第10844118号明細書およびカナダ国特許出願公開第2924882号明細書）、ここではIL-17またはIFN γ 産生がマウス系において誘導および阻害されたため、このような活性は改善かつ驚異となった。IL-22が皮膚および粘膜疾患の鍵となる調節因子であるため、IL-22阻害は、抗体の重要な利点である。

20

【0164】

ヒトおよびインビボでのマウスモデルの並行解析では、新たに生成した抗体の治療的有用性を評価する強力な手段がもたらされる。インビボでは、イミキモドを利用して乾癬様、皮膚炎様、ループス様、薬物反応様表現型を誘発し、モデル皮膚炎症系をもたらしした。また、イミキモドは、多くの炎症性疾患および障害だけでなく関連する全身性疾患または障害および全身的に現れる炎症性薬物反応に対して、より広く適用可能であり得る。ここでは、抗体110、116および16が、イミキモドにより誘発されたCD1a依存性炎症を有意に低下させることが示され、標準治療（抗IL-17A）および対照薬である同一のマウスIgG1バックグラウンドの抗CD1a抗体（CR2113）よりも改善した。重要かつ予想外なことには、抗体116は、WTイミキモド処置マウスのレベル未満に皮膚炎症を低下させ、皮膚および全身性免疫マーカーの多くをWTのレベルまで正常化し、抗CD1a 116が、CD1a-TCRシグナル伝達の阻害に留まらない作用を有する機構を示唆した。皮膚の免疫表現型を決定し、抗体110、116および16の投与によるWTレベルへの好中球浸潤と同様に、T細胞数および活性化の低下を観察した。WTレベルへの好中球の減少が観察されたことは、公表された抗CD1a CR2113に対する予想外の改善であり、これによって抗体110、116および16の可能性が強調される。

30

40

【0165】

重要なことには、皮膚におけるLC集団を解析すると、抗体110および116の投与後にCD11c+ランゲリン+LCの有意な低下が観察された。この低下は、流入領域リンパ節への遊走の増強では説明がつかなかった。しかし、抗体110およびかなりの程度の116が、CD1a+細胞をインビボで直接的に減少させる可能である可能性を有し、インビボでの皮膚LCの減少の説明が付き、インビトロでのヒトCD1a+細胞の著しい低下によって証明される。これは、抗体のマウスIgG1アイソタイプを考慮すると驚くべき結果であり、この場合、マウスIgG2aアイソタイプは、補体媒介溶解または抗体依存性細胞性細胞毒性を介して細胞毒性を引き起こす可能性がより高い。また、ここでは

50

C D 1 a 発現細胞のアポトーシスがマウス I g G 1 バックグラウンドの C R 2 1 1 3 によっても誘導され得ることがわかったが、特許を有し公開されているさらなる抗 C D 1 a C R 2 1 1 3 では、直接的枯渇が不可能であると報告されている（17）。このような抗体の調節能力は、W T アイソタイプ処置マウスのレベル未満のイミキモド誘発炎症の低下の説明に役立ち得る。抗体 1 1 6 は、T C R との C D 1 a の相互作用を遮断するだけでなく、皮膚の炎症可能性を低下／リセットする L C を修飾し、皮膚および全身性免疫マーカーの多くを W T のレベルまで正常化する。これにより、抗 C D 1 a C R 2 1 1 3 にはない、野生型を凌ぐ改善への C D 1 a 依存性応答を超えて上回る回復作用の説明が付き得る。

【0166】

その上、データにより、ここに示す 1 6、1 1 0 および／または 1 1 6 抗体が、C D 1 a 発現悪性疾患、例えば、ランゲルハンス細胞組織球症または T 細胞リンパ腫および胸腺腫の一部の型の治療における有用性を有することが示唆される。これは、直接的作用によるものであり得るか、またはこの場合、抗 C D 1 a 抗体は、細胞毒性剤、抗炎症剤、例えば、ステロイド、および C A R - T 細胞、例えば、調節性もしくは細胞溶解性 C A R - T 細胞、または抗体もしくは抗原結合断片を発現もしくは提示する他の細胞を含む群から選択される 1 つまたは複数の他の治療剤と共役または会合させる。

【0167】

この検討では、抗体 1 6 が、C D 1 a 依存性炎症をインビボで直接的アポトーシスを誘導せずに除去する高度に有効な遮断抗体であり、1 1 0 が、L C 表現型および機能を修飾して C D 1 a 依存性炎症をインビボで有意に低下させ、1 1 6 が、W T レベル未満に炎症を低下させ、皮膚および全身性免疫マーカーの多くを W T のレベルまで正常化する高度に有効な遮断および修飾抗体であることを実証する。抗体のこの群化は、抗体 1 1 0 および 1 1 6 クラスターを直接的に修飾し、抗体 7 7 a、1 1 1 および 1 6 クラスターを遮断する、基本的エピトープ解析と一致する。また、このエピトープ解析により、群 7 7 a、1 1 1 および 1 6 が、非枯渇 N A 1 / 3 4 と重複するエピトープを認識することが明らかとなった。N A 1 / 3 4 が抗 C D 1 a C R 2 1 1 3 の結合を交差遮断することがわかっていいため、これは、注目すべき重要なことである。抗体 1 1 0 および 1 1 6 は、N A 1 / 3 4 を交差遮断せず、このため異なるエピトープ領域を表す可能性を有する。抗体は、皮膚において、およびリンパ節への遊走後であっても、インビボで L C 上に存在を維持する。臨床作用がより持続性であるため、これは重要な増強である。

【0168】

このようなデータにより、発明者らは、制限されないが、乾癬、皮膚炎、ループスを含む炎症性皮膚および粘膜症状の予防および治療における、ならびに 1 つもしくは複数の関連する全身性疾患または障害、または 1 つもしくは複数の全身的に現れる炎症性薬物反応の治療および／または予防における使用のための、改善した抗 C D 1 a 抗体のこの改良パネルの可能性を実証する。L C、T 細胞および好中球を含む広く連鎖する炎症に対する作用、特に、抗体 1 1 0、1 1 6 および 1 6 の作用は、乾癬、皮膚炎、ループスを含む炎症性皮膚および粘膜障害ならびに炎症性皮膚もしくは粘膜疾患もしくは障害として現れる薬物反応、または C D 1 a 発現悪性疾患において、広範に及ぶ作用を有する。

【0169】

結論として、発明者らは、抗 C D 1 a 抗体 1 6、7 7 a、1 1 0、1 1 1 および 1 1 6 の改善を、C D 1 a の遮断および／または C D 1 a + 細胞の表現型／機能の修飾により、炎症性皮膚および粘膜疾患もしくは障害、または関連する全身性疾患もしくは障害、または全身的に現れる炎症性薬物反応、または C D 1 a 発現悪性疾患を予防および治療するための方法として実証する。

【0170】

参考文献

特許、特許出願、論文、テキスト等を含む、本明細書に引用するすべての参考文献、お

10

20

30

40

50

よびそれらに引用される参考文献は、これらを既に組み込んでいない限りにおいて、これらの全体を参照により本明細書にこれによって組み込む。

【 0 1 7 1 】

【 表 1 4 - 1 】

表 11 - 配列番号

SEQ ID NO	Feature	Sequence
1	16 CDR1 H	GFTFSNYAMS
2	16 CDR2 H	AINSNNGGSAY YPDTVKD
3	16 CDR3 H	RFYYDYGWFA Y
4	16 CDR1 L	RASENIDSYL A
5	16 CDR2 L	AATLLAD
6	16 CDR3 L	QHYYSSPWT
7	16-Hv full	EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NYAMSWVRQ T PEKRLEWVAA INSNNGGSAYY PDTVKDRFTI SRDNAKN TLY LQMSSLRSED TALYYCARRF YYDYGWFAYW GQGTLVTVSS
8	16-Lv full	DIVLTQSPAS LSASVGETVT ITCRASENID SYLAWYQQKQ GKSPQLLVYA ATLLADGVPS RFSGSGSGTQ YSLKINSLQS EDVARYYCQH YYSSPWTFGG GTKLEIK
9	77a CDR1 H	GFSLSSYAMS
10	77a CDR2 H	IISSSGTTYT ASWAKG
11	77a CDR3 H	VDYYSSGWGG L
12	77a CDR1 L	QASEDIYSNL A
13	77a CDR2 L	GASTLAS
14	77a CDR3 L	QCTYDTSSYG NT
15	77a-Hv full	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YAMSWVRQA P GKGLEWIGII SSSGTTYTAS WAKGRFTISK TSTTVDL KIT SPTTEDTATY FCARVDYYSS GWGGLWGPST LTVTS S
16	77 -Lv full	AVEMTQTPAS MSAAVGGTGT IKCQASEDIY SNLAWYQQK P GQPPKLLIYG ASTLASGVPS RFGSGSGSTE YTLTISG VQC DDAATYYCQC TYDTSSYGNT FGGGTEMVVE
17	110 CDR1 H	GFSLSSYAMI
18	110 CDR2 H	IINSSDNTHY ATWAKG
19	110 CDR3 H	DPYDYGWY FDL
20	110 CDR1 L	QASQSVFNNK NLA
21	110 CDR2 L	KASTLAS
22	110 CDR3 L	QGEFSCSSTD CVT
23	110-Hv full	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YAMSWVRQA P GKGLEWIGII NSSDNTHYAT WAKGRFTISK TSTTVDL

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

		KIT SPTTEDTATY FCARDPYDYG YGWYFDLWGF GTLVT VSS
24	110 -Lv full	AQVLTQTPSP VSAAVGGTVT INCQASQSVF NNKNLAWYQ Q KPGQPPKLLI YKASTLASGV SSRFKGSGSG TQFALTI SGV QCDDAATYYC QGEFSCSSTD CVTFGGGTEV VVK
25	111 CDR1 H	GFSLSTYAMS
26	111 CDR2 H	IISSSGSTYY ASWAKG
27	111 CDR3 H	ETWYWLDL
28	111 CDR1 L	QASEDIYSNL A
29	111 CDR2 L	GASTLAS
30	111 CDR3 L	QCAYDSSSYG TP
31	111-Hv full	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTASGFSLST YAMSWVRQA P GKGLEWIGII SSSGSTYYAS WAKGRFTISK TSTTVDL KIT SPTTEDTATY FCARETWYWL DLWGQGTILVT VSS
32	111-Lv full	AVEMTQTPAS VSAAVGGTVT INCQASEDIY SNLAWYQQK P GQPPKLLIYG ASTLASGVPS RFKSGSGSGTE YTLTISG VQC DDAATYYCQC AYDSSSYGTP FGGGTEVVVK
33	116-CDR1 H	GFSLSNYAMS
34	116CDR2 H	IIYTTGFTYY ASWVKG
35	116-CDR3 H	GLATYVSPPT RLDL
36	116 CDR1 L	QASQSIYNSK NLA
37	116 CDR2 L	SASTLAS
38	116 CDR3 L	QGEFSCSSVD CAT
39	116-Hv full	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSN YAMSWVRQA P GKGLEWIGII YTTGFTYYAS WVKGRFTISK TSTTVDL KIT SPTTEDTATY FCARGLATYV SPPTRLDLWG QGTLV TVSS
40	116-Lv full	AQVLTQTPSP VSAAVGGTVT INCQASQSIY NSKNLAWYQQ KPGQPPKLLI YSASTLASGV PSRFKSGSGSG TQFTLTISDL ECDDAATYYC QGEFSCSSVD CATFGGGTEV VVK
41	16 H full	EVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NYAMSWVRQT PEKRLEWVAA INSNGGSAYY PDIVKDRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCARRE YYDYGWFAYW GQGTILVTVSS AKTTPPSVYP LAPGSAAQTN SMVTLGCLVK GYFPEPVTVT WNSGSLSSGV HTFPAVLQSD

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【表 1 4 - 4】

45	110 H full	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS
		YAMIWVRQAP GKGLEWIGII NSSDNTHYAT
		WAKGRFTISK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY
		FCARDPYDYG YGWYFDLWGP GTLVTVSSAK
		TTPPSVYPLA PGSAAQTNSM VTLGCLVKGY
		FPEPVTVTWN SGSLSSGVHT FPAVLQSDLY
		TLSSSVTVPS STWPSETVTC NVAHPASSTK
		VDKKIVPRDC GCKPCICTVP EVSSVFIFPP
		KPKDVLITIL TPKVTCVVVD ISKDDPEVQF
		SWFVDDVEVH TAQTQPREEQ FNSTFRSVSE
		LPIMHQDWLN GKEFKCRVNS AAFPAPIEKT
		ISKTGGRPKA PQVYTIPPPK EQMAKDKVSL
		TCMITDEFFPE DITVEWQWNG QPAENYKNTQ
		PIMDTDGSYF VYSKLNQKS NWEAGNTFTC
		SVLHEGLHNN HTEKSLSHSP GK
46	110 L full	AQVLTQTPSP VSAAVGGTGT INCQASQSVF
		NNKNLAWYQQ KPGQPPKLLI YKASTLASGV
		SSRFKSGSGG TQFALTISGV QCDDAATYYC
		QGEFSCSSTD CVTFGGGTEV VVKRTDAAPT
		VSIFPPSSEQ LTSGGASVVC FLNNFYPKDI
		NVKWKIDGSE RQNGVLNSWT DQDSKDCITYS
		MSSTLTLT KD EYERHNSYTC EATHKTSTSP
		IVKSFNRNEC
47	111 H full	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTASGFSLST
		YAMSWVRQAP GKGLEWIGII SSSGSTYYAS
		WAKGRFTISK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY
		FCARETWYWL DLWGQGT LVT VSSAKTTPPS
		VYPLAPGSAA QTNSMVT LGC LVKGYFPEPV
		TVTWN SGSLSGVHTFPAVL QSDLYTLSSS
		VTVPSSSTWPS ETVTCNVAHP ASSTKV DKKI
		VPRDCGCKPC ICTVPEVSSV FIFPPKPKDV
		LTITLTPKVT CVVVDISKDD PEVQFSWFVD
		DVEVHTAQTQ PREEQFNSTF RSVSELPIMH
		QDWLNGKEFK CRVNSAAFP A PIEKTISKTK
		GRPKAPQVYT IPPPK EQMAK DKVSLTCMIT
		DFFPEDITVE WQWNGQPAEN YKNTQPIMDT
		DGSYFVYSKL NVQKSNWEAG NTFTCSVLHE
		GLHNHHTEKS LSHSPGK
48	111 L full	AVEMTQTPAS VSAAVGGTGT INCQASEDIY
		SNLAWYQQKP GQPPKLLIYG ASTLASGVPS

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 5】

		RFKGS GSGTE YTLTISGVQC DDAATYYCQC AYDSSSYGTP FGGGTEVVVK RTDAAPT VSI FPPSSEQ LTS GGASVVCFLN NFYPKDINVK WKIDGSERQN GVLNSWTDQD SKDCTYSMSS TLTLTKDEYE RHNSYTCEAT HKTSTSPIVK SFNRNEC
49	116 H full	QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSN YAMSWVRQAP GKGLEWIGII YTTGFTYYAS WVKGRFTISK TSTTVDLKIT SPTTEDTATY FCARGLATYV SPPTRLDLWG QGTLVTVSSA KTPPPSVYPL APGSAAQTNS MVTLGCLVKG YFPEPVTVTW NSGSLSSGVH TFP AVLQSDL YTLSSSVTVP SSTWPSETVT CNVAHPASST KVDKKIVPRD CGCKPCICTV PEVSSVFIFP PKPKDVL TIT LTPKVTCVVV DISKDDPEVQ FSWFVDDVEV HTAQTQPREE QFNSTFRSVS ELPIMHQDWL NGKEPKCRVN SAAFPAPIEK TISKTKGRPK APQVYTIPPP KEQMAKDKVS LTCMITDFFP EDITVEWQWN GQPAENYKNT QPIMDTDGSY FVYSKLVNQK SNWEAGNTFT CSVLHEGLHN HHT EKSLSHS PGK
50	116 L full	AQVLTQTPSP VSAAVGGT VT INCQASQSIY NSKNLAWYQQ KPGQPPKLLI YSASTLASGV PSREFKSGSG TQFTLTISDL ECDDAATYYC QGEFSCSSVD CATFGGGTEV VVKRTDAAPT VSIFPPSSEQ LTSGGASVVC FLNNFYPKDI NVKWKIDGSE RQNGVLNSWT DQDSKDCTYS MSSTLTLTKD EYERHNSYTC EATHKTSTSP IVKSFN RNEC
51	16 H DNA	<u>AAGCTTGCCA CCATGGAATG GAGCTGGGTC</u> <u>TTTCTCTTCT TCCTGTCAGT AACTACAGGA</u> <u>GTCCATTCTG</u> AGGTGCAGCT GGTGCAGTCT GGGGGAGGCT TAGTGAAGCC TGGAGGGTCC CTGAAACTCT CCTGTGCAGC CTCTGGATTCT ACTTTCAGTA ACTATGCCAT GTCTTGGGTT CGCCAGACTC CAGAGAAGAG GCTGGAGTGG GTCGCAGCCA TTAATAGTAA TGGTGGTAGC GCCTACTATC CAGACACTGT GAAGGACCGA TTCACCATCT CCAGAGACAA TGCCAAGAAC ACCCTGTACC TGCAAATGAG CAGTCTGAGG TCTGAGGACA CAGCCTTGTA TTACTGTGCA

10

20

30

40

【表 1 4 - 6】

		AGACGCTTCT ACTATGATTA CGGCTGGTTT GCTTACTGGG GCCAAGGGAC TCTGGTCACA GTCTCGAGC
52	16 L DNA	<u>AAGCTTGCCA CCATGTCTGT CCCCACCCAA</u> <u>GTCCCTCGGAC TCCTGCTACT CTGGCTTACA</u> <u>GATGCCAGAT GCGACATTGT GCTGACCCAA</u> TCTCCAGCTT CCCTGTCTGC ATCTGTGGGA GAAACTGTCA CCATCACATG TCGAGCAAGT GAGAATATTG ACAGTTATTT AGCATGGTAT CAGCAGAAAC AGGGAAAATC TCCTCAGCTC CTGGTCTATG CTGCAACACT CTTAGCAGAT GGTGTGCCAT CAAGGTTGAG TGGCAGTGGA TCAGGCACAC AGTATTCTCT CAAGATCAAC AGCCTGCAGT CTGAAGATGT TGCGAGATAT TACTGTCAAC ATTATTATAG TTCTCCGTGG ACGTTCCGGTG GAGGCACCAA GCTGGAAATA AAACGTACG
53	77a H DNA	<u>AAGCTTGCCA CCATGGAATG GAGCTGGGTC</u> <u>TTTCTCTTCT TCCTGTCAGT AACTACAGGA</u> <u>GTCCATTCTC AGTCGGTGGA GGAGTCCGGG</u> GGTCGCCTGG TCACGCCTGG GACACCCCTG ACACTCACAT GCACAGTCTC TGGATTCTCC CTCAGTAGCT ATGCGATGAG CTGGGTCCGC CAGGCTCCAG GGAAGGGGCT GGAATGGATC GGAATCATTG GTAGCAGTGG TACCACATAC TACGCGAGCT GGGCGAAAGG CCGATTACCC ATTTCCAAAA CCTCGACCAC GGTGGATCTG AAAATCACCA GTCCGACAAC CGAGGACACG GCCACCTATT TCTGTGCCAG AGTCGATTAC TATAGTAGTG GCTGGGGTGG CTTGTGGGGC CCAGGCACCC TGGTCACCGT CTCGAGC
54	77a H DNA	<u>AAGCTTCGAA GCCACCATGG ACACGAGGGC</u> <u>CCCCACTCAG CTGCTGGGGC TCCTGCTGCT</u> <u>CTGGCTCCCA GGTGCCACAT TTGCCGTTGA</u> AATGACCCAG ACTCCAGCCT CGATGTCTGC CGCTGTGGGA GGCACAGTCA CCATCAAGTG CCAGGCCAGT GAGGACATTT ATAGCAATTT GGCCTGGTAT CAGCAGAAAC CAGGGCAGCC TCCCAAGCTC CTGATCTATG GTGCATCCAC TCTGGCTTCT GGGGTCCCAT CGCGGTTCAA AGGCAGTGGA TCTGGGACAG AGTACACTCT CACCATCAGC GGTGTGCAGT GTGACGATGC

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 7】

		TGCCACTTAC TATTGTCAAT GCACTTATGA TACTAGTAGT TATGGTAATA CTTTCGGCGG AGGGACCGAG ATGGTAGTCG AACGTACG
55	110 H DNA	<u>AAGCTTGCCA CCATGGAATG GAGCTGGGTC</u> <u>TTTCTCTTCT TCCTGTCAGT AACTACAGGA</u> <u>GTCCATTCTC AGTCGGTGGA GGAGTCCGGG</u> GGTCGCCTGG TCACGCCTGG GACACCCCTG ACACTCACCT GCACAGTCTC TGGATTCTCC CTCAGTAGCT ATGCAATGAT CTGGGTCCGC CAGGCTCCAG GGAAGGGGCT GGAATGGATC GGAATCATT A TAGTAGTGA TAACACACAC TACGCGACCT GGGCGAAAGG CCGATTACCC ATCTCCAAA CCTCGACCAC GGTGGATCTA AAAATCACCA GTCCGACAAC CGAGGACACG GCCACCTATT TCTGTGCCAG AGATCCCTAC GACTATGGTT ATGGTTGGTA CTTTGACTTG TGGGGCCCAG GCACCCTGGT CACCGTCTCG AGC
56	110 L DNA	<u>AAGCTTCGAA GCCACCATGG ACACGAGGGC</u> <u>CCCCACTCAG CTGCTGGGGC TCCTGCTGCT</u> <u>CTGGCTCCCA GGTGCCACAT TTGCCCAGT</u> GCTGACCCAG ACTCCATCCC CTGTGTCTGC AGCTGTGGGA GGCACAGTCA CCATCAACTG CCAGGCCAGT CAGAGTGTTC TTAATAACAA AAATTTAGCC TGGTATCAGC AGAAACCAGG GCAGCCTCCC AAGCTCCTGA TCTACAAGGC ATCCACTCTG GCATCTGGCG TCTCATCGCG GTTCAAAGGC AGTGGATCTG GGACACAGTT CGCTCTCACC ATCAGCGGCG TGCAGTGTGA CGATGCTGCC ACTTACTACT GTCAAGGCGA ATTTAGTTGT AGTAGTACTG ATTGCGTGAC TTTCGGCGGA GGGACCGAGG TGGTGGTCAA ACGTACG
57	111 H DNA	<u>AAGCTTGCCA CCATGGAATG GAGCTGGGTC</u> <u>TTTCTCTTCT TCCTGTCAGT AACTACAGGA</u> <u>GTCCATTCTC AGTCGGTGGA GGAGTCCGGG</u> GGTCGCCTGG TCACGCCTGG GACACCCCTG ACACTCACCT GCACAGCCTC TGGATTCTCC CTCAGTACCT ATGCAATGAG TTGGGTCCGC CAGGCTCCAG GGAAGGGGCT GGAATGGATC GGAATCATT A GTAGTAGTGG TAGCACATAC

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 8】

		TACGCGAGCT GGGCGAAAGG CCGATTCAACC ATCTCCAAAA CCTCGACCAC GGTGGATCTG AAAATCACCA GTCCGACAAC CGAGGACACG GCCACCTATT TCTGTGCCAG AGAGACTTGG TACTGGTTGG ATCTCTGGGG CCAGGGCACC CTGGTCACCG TCTCGAGC
58	111 L DNA	AAGCTTCGAA GCCACCATGG ACATGAGGGC CCCCACTCAG CTGCTGGGGC TCCTGCTGCT CTGGCTCCCA GGTGCCACAT TTGCCGTTGA AATGACCCAG ACTCCAGCCT CGGTGTCTGC CGCTGTGGGA GGCACAGTCA CCATCAATTG CCAGGCCAGT GAGGACATTT ATAGCAATTT GGCCTGGTAT CAGCAGAAAC CAGGGCAGCC TCCCAAGCTC CTGATCTATG GTGCATCCAC TCTGGCATCT GGGGTCCCAT CGCGTTCAA AGGCAGTGGA TCTGGGACAG AGTACACTCT CACCATCAGC GGTGTGCAGT GTGACGATGC TGCCACTTAC TACTGTCAAT GCGCTTATGA TAGTAGTAGT TATGGTACCC CTTTCGGGGG AGGGACCGAG GTGGTGGTCA AACGTACG
59	116 H DNA	AAGCTTGCCA CCATGGAATG GAGCTGGGTC TTTCTCTTCT TCCTGTCAGT AACTACAGGA GTCCATTCTC AGTCGGTGGA GGAGTCCGGG GGTCGCCTGG TCACGCCTGG GACACCCCTG ACACTCACCT GCACAGTCTC TGGATTCTCC CTCAGTAACT ATGCAATGAG CTGGGTCCGC CAGGCTCCAG GGAAGGGGCT GGAATGGATC GGAATCATTT ATACTACTGG TTTACATAC TACGCGAGCT GGGTGAAAGG CCGATTCAACC ATCTCCAAAA CCTCGACCAC GGTGGACCTG AAAATCACCA GTCCGACAAC CGAGGACACG GCCACCTATT TCTGTGCCAG AGGGCTGGCT ACTTATGTTA GTCCCCGAC TCGGTTGGAT CTCTGGGGCC AGGGCACCCCT GGTCAACCGTC TCGAGC
60	116 L DNA	AAGCTTCGAA GCCACCATGA ACATGAGGGC CCCCACTCAG CTGCTGGGGC TCCTGCTGCT CTGGCTCCCA GGTGCCACAT TTGCCCAAGT GCTGACCCAG ACTCCATCCC CTGTGTCTGC AGCTGTGGGA GGCACAGTCA CCATCAACTG CCAGGCCAGT CAGAGTATTT ATAATAGCAA

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 9】

		AAATTTAGCC TGGTATCAGC AGAAACCAGG GCAGCCTCCC AAGCTCCTGA TCTATTCTGC ATCCACTCTG GCATCTGGGG TCCCATCGCG GTTCAAAGGC AGTGGATCTG GGACACAGTT CACTCTCACC ATCAGCGACC TGGAGTGTGA CGATGCTGCC ACTTACTACT GTCAAGGCGA ATTTAGTTGT AGTAGTGTG ATTGCGCCAC TTTCGGCGGA GGGACCGAGG TGGTGGTCAA ACGTACG
61	16 CDR1 H	GGATTCACCTT TCAGTAACTA TGCCATGTCT
62	16 CDR2 H	GCCATTAATA GTAATGGTGG TAGCGCCTAC TATCCAGACA CTGTGAAGGA C
63	16 CDR3 H	CGCTTCTACT ATGATTACGG CTGGTTTGCT TAC
64	16 CDR1 L	CGAGCAAGTG AGAATATTGA CAGTTATTTA GCA
65	16 CDR2 L	GCTGCAACAC TCTTAGCAGA T
66	16 CDR3 L	CAACATTATT ATAGTTCTCC GTGGACG
67	77a CDR1 H	GGATTCTCCC TCAGTAGCTA TGCGATGAGC
68	77a CDR2 H	ATCATTAGTA GCAGTGGTAC CACATACTAC GCGAGCTGGG CGAAAGGC
69	77a CDR3 H	GTCGATTACT ATAGTAGTGG CTGGGGTGGC TTG
70	77a CDR1 L	CAGGCCAGTG AGGACATTTA TAGCAATTTG GCC
71	77a CDR2 L	GGTGCATCCA CTCTGGCTTC T
72	77a CDR3 L	CAATGCACTT ATGATACTAG TAGTTATGGT AATACT
73	110 CDR1 H	GGATTCTCCC TCAGTAGCTA TGCAATGATC
74	110 CDR2 H	ATCATTAAATA GTAGTGATAA CACACACTAC GCGACCTGGG CGAAAGGC
75	110 CDR3 H	GATCCCTACG ACTATGGTTA TGGTTGGTAC TTTGACTTG
76	110 CDR1 L	CAGGCCAGTC AGAGTGTTTT TAATAACAAA AATTTAGCC
77	110 CDR2 L	AAGGCATCCA CTCTGGCATC T
78	110 CDR3 L	CAAGGCGAAT TTAGTTGTAG TAGTACTGAT TGCSTGACT
79	111 CDR1 H	GGATTCTCCC TCAGTACCTA TGCAATGAGT
80	111 CDR2 H	ATCATTAGTA GTAGTGGTAG CACATACTAC GCGAGCTGGG CGAAAGGC
81	111 CDR3 H	GAGACTTGGT ACTGGTTGGA TCTC
82	111 CDR1 L	CAGGCCAGTG AGGACATTTA TAGCAATTTG GCC
83	111 CDR2 L	GGTGCATCCA CTCTGGCATC T
84	111 CDR3 L	CAATGCGCTT ATGATAGTAG TAGTTATGGT ACCCCT
85	116 CDR1 H	GGATTCTCCC TCAGTAACTA TGCAATGAGC
86	116 CDR2 H	ATCATTTATA CTA CTGGTTT CACATACTAC GCGAGCTGGG TGAAAGGC

10

20

30

40

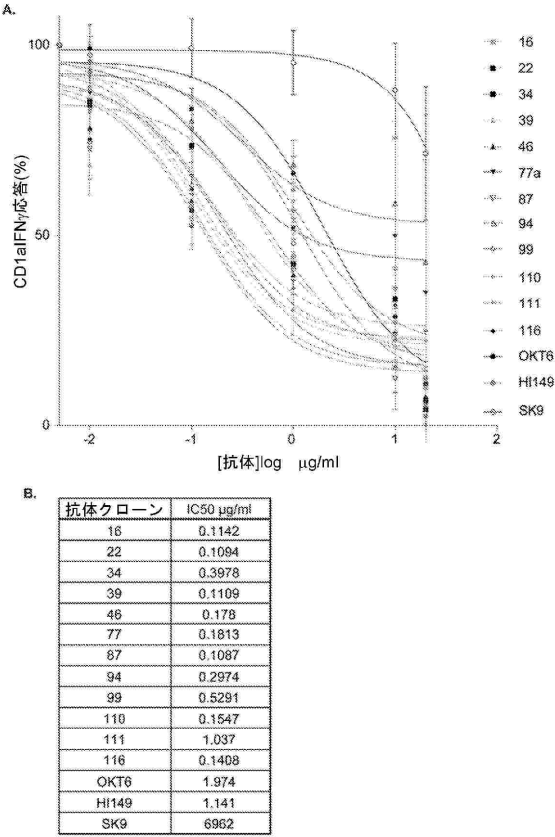
【表 1 4 - 1 0】

87	116 CDR3 H	GGGCTGGCTA CTTATGTTAG TCCCCGACT CGGTTGGATC TC
88	116 CDR1 L	CAGGCCAGTC AGAGTATTTA TAATAGCAAA AATTTAGCC
89	116 CDR2 L	TCTGCATCCA CTCTGGCATC T
90	116 CDR3 L	CAAGGCGAAT TTAGTTGTAG TAGTGTTGAT TGCGCCACT

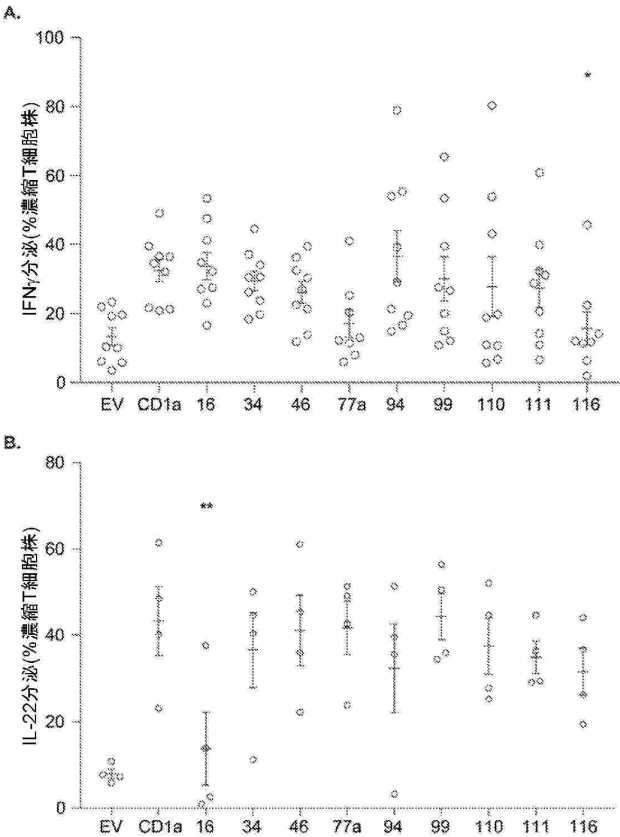
上の任意の DNA 配列の下線部はシグナル配列を表す。

50

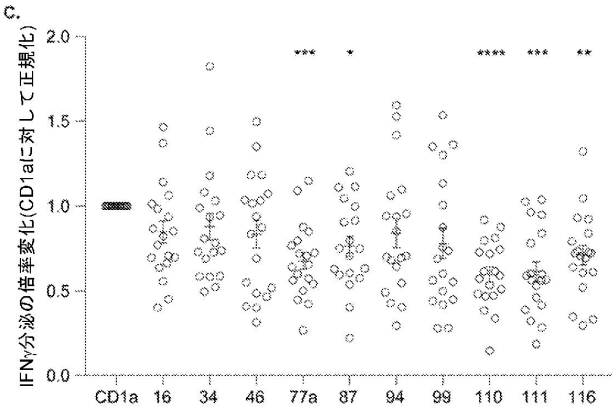
【図面】
【図 1】



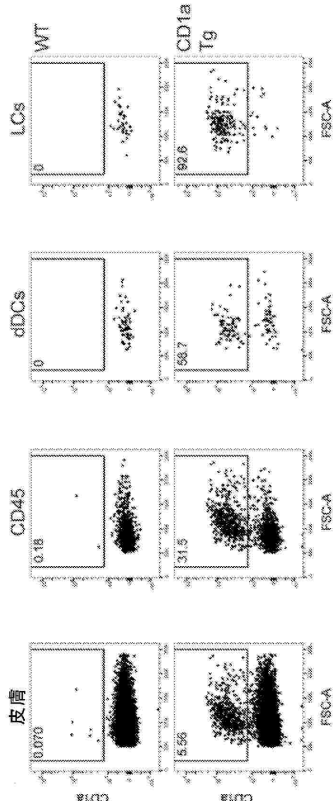
【図 2 - 1】



【図 2 - 2】

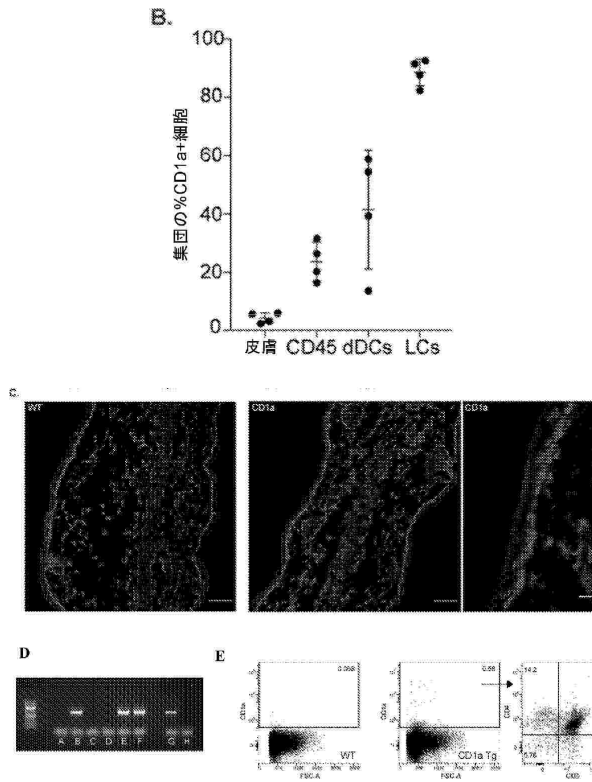


【図 3 - 1】

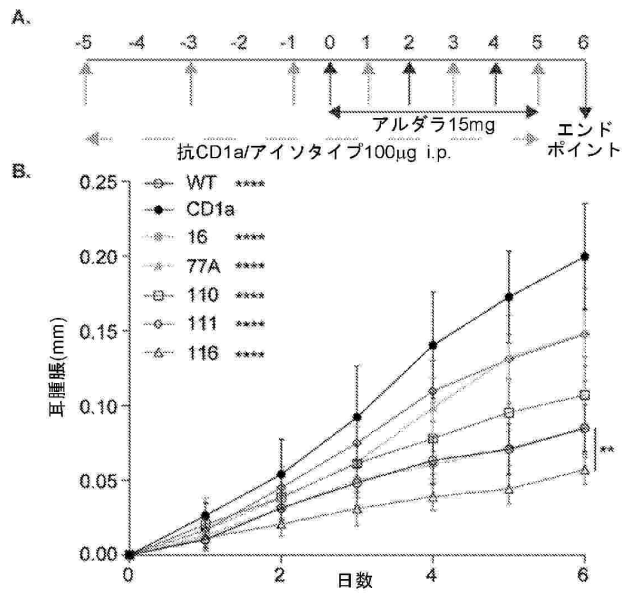


A.

【図 3 - 2】



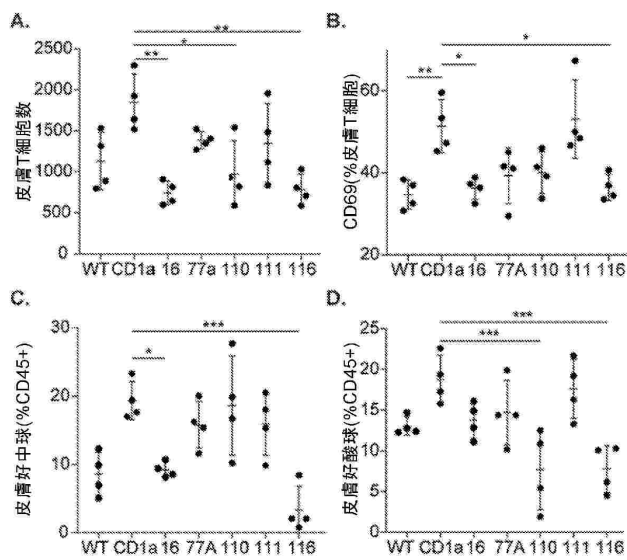
【図 4】



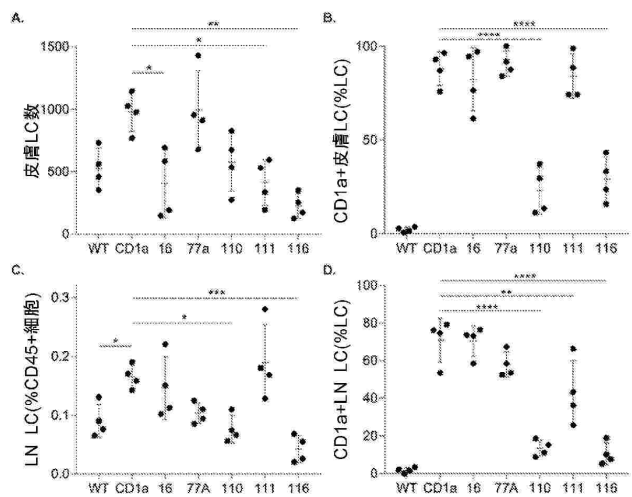
10

20

【図 5】



【図 6】

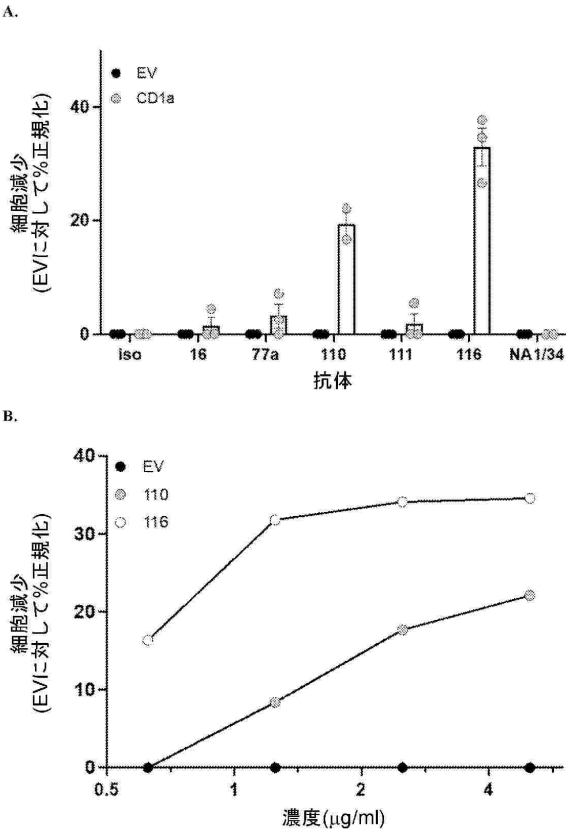


30

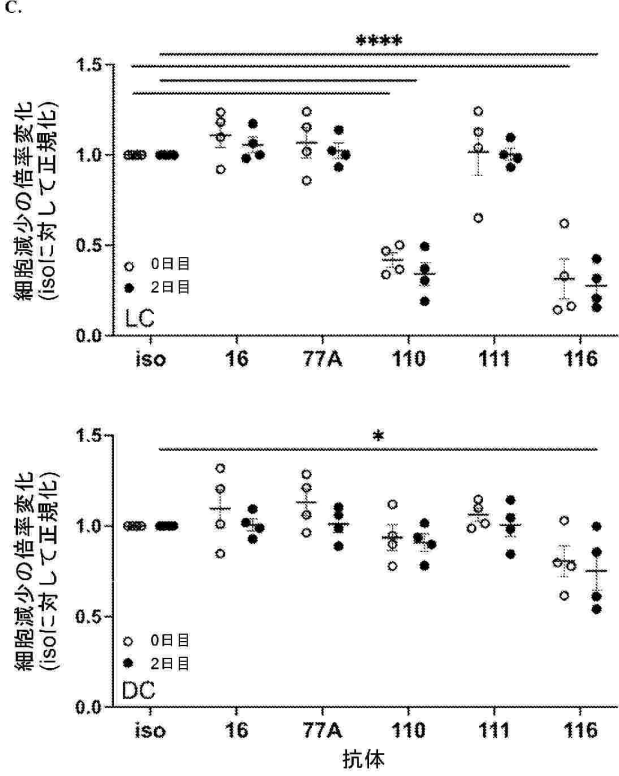
40

50

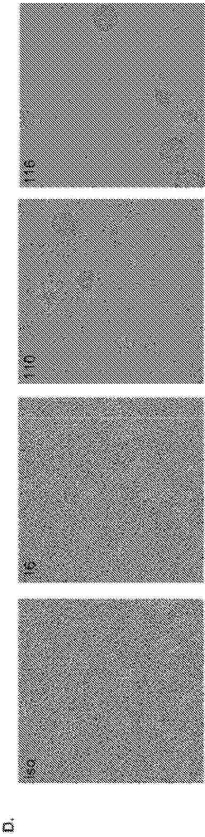
【図 7 - 1】



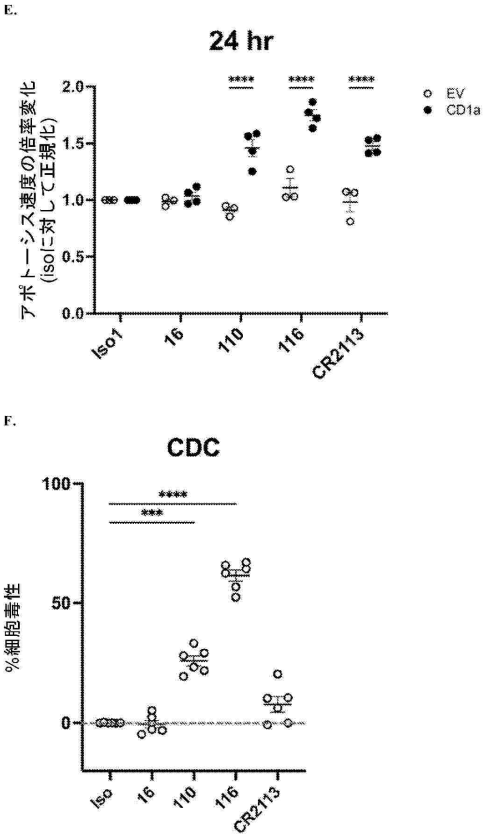
【図 7 - 2】



【図 7 - 3】



【図 7 - 4】



10

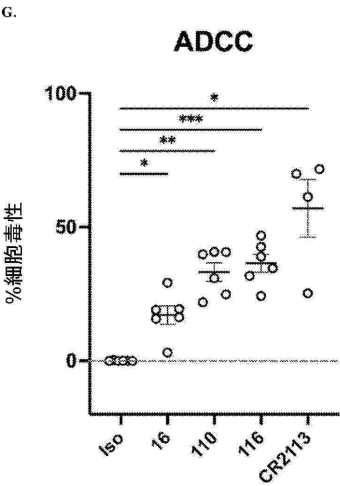
20

30

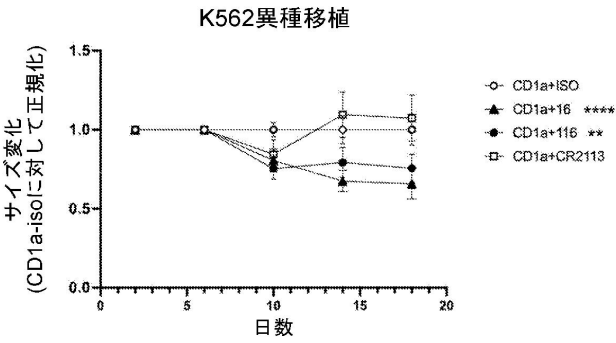
40

50

【図 7 - 5】

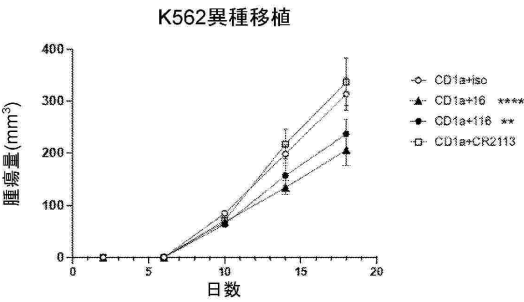


【図 7 - 6】



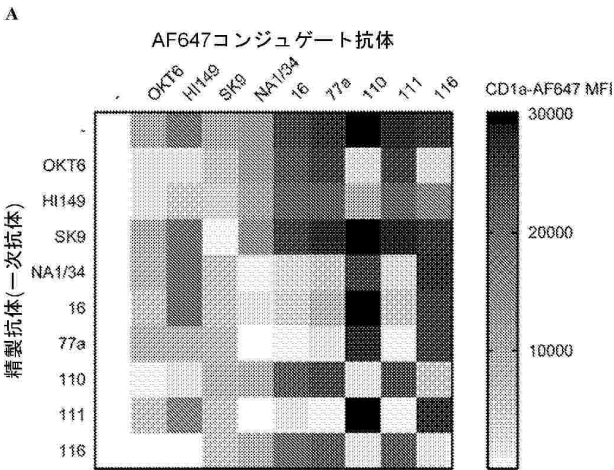
10

H.

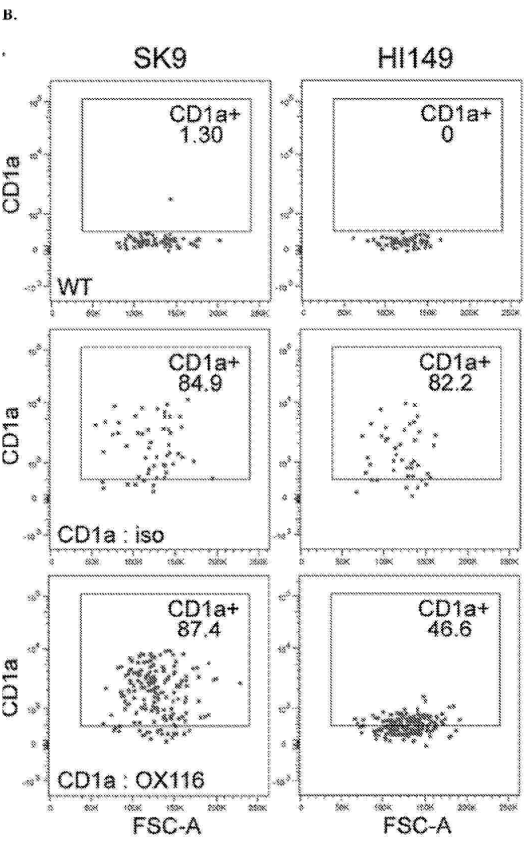


20

【図 8 - 1】



【図 8 - 2】

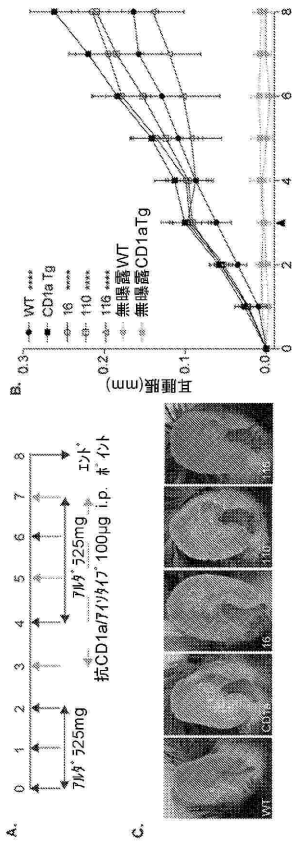


30

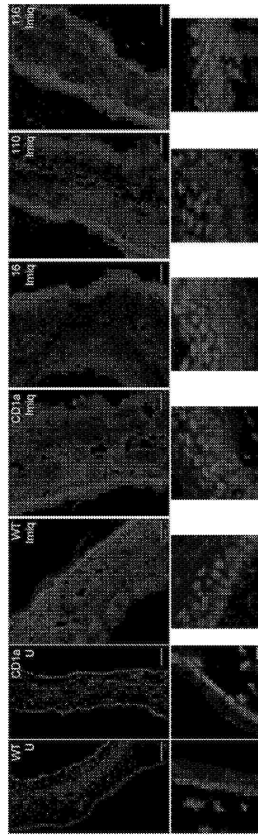
40

50

【図 9 - 1】



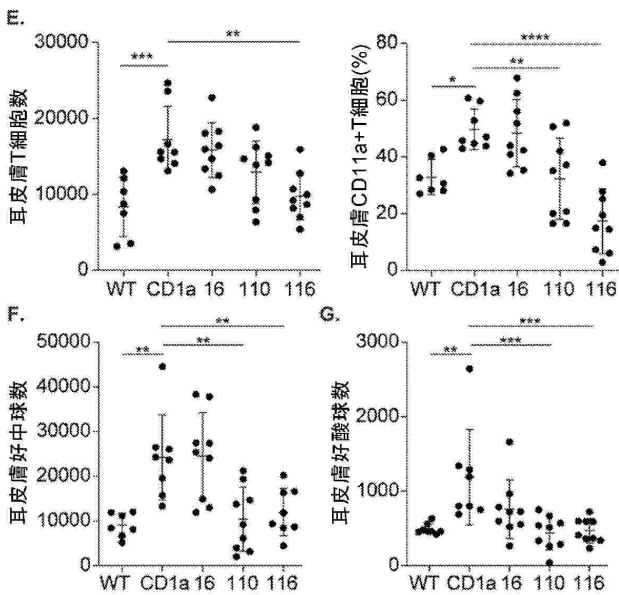
【図 9 - 2】



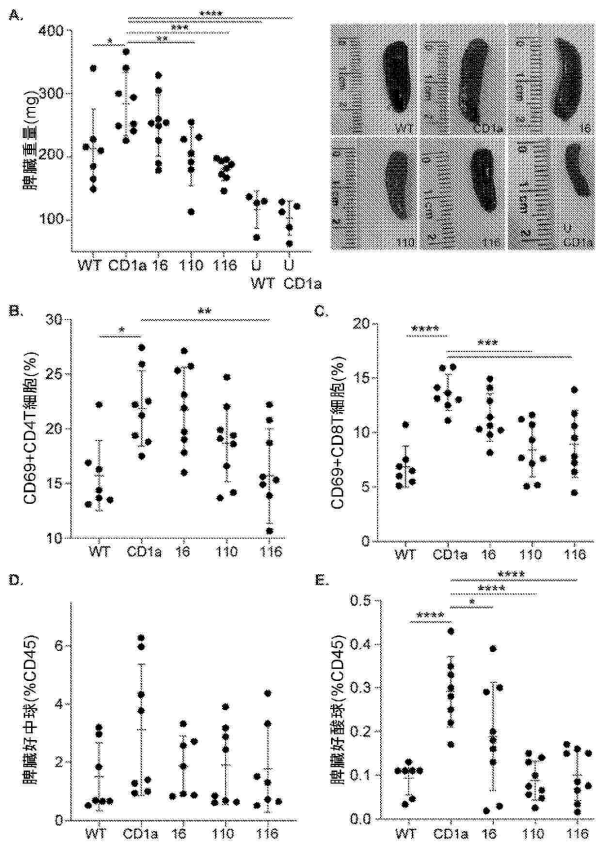
10

20

【図 9 - 3】



【図 10 - 1】

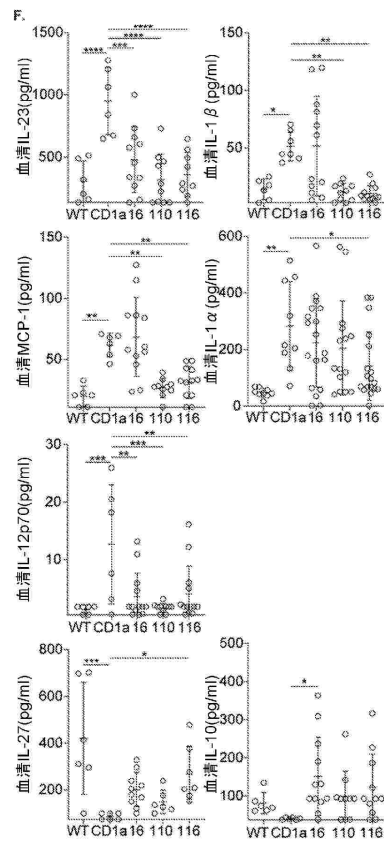


30

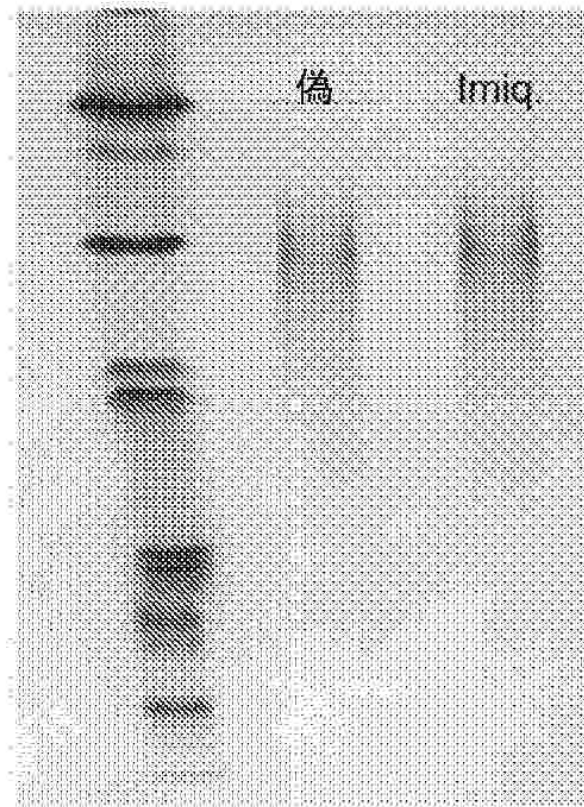
40

50

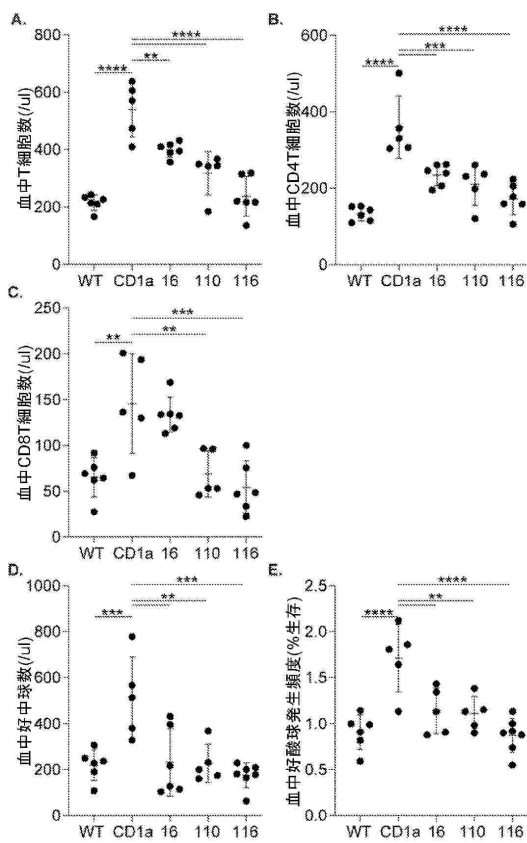
【図 10 - 2】



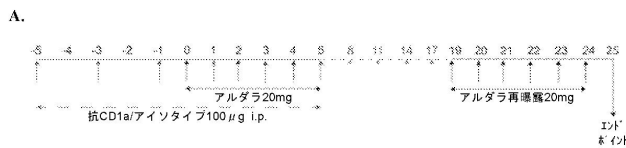
【図 1 2】



【図 1 1】



【図 1 3 - 1】



10

20

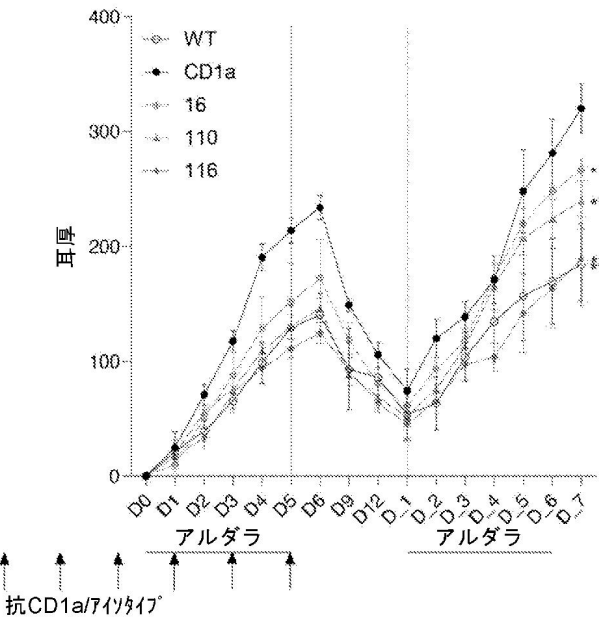
30

40

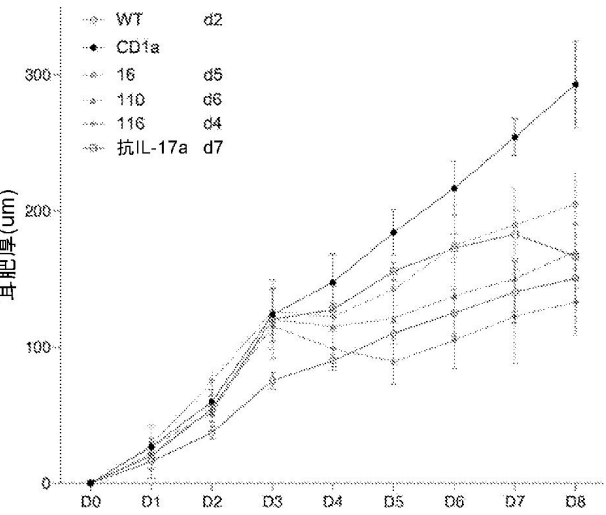
50

【図 13-2】

B.

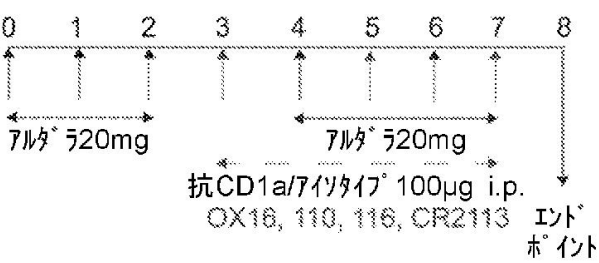


【図 14】



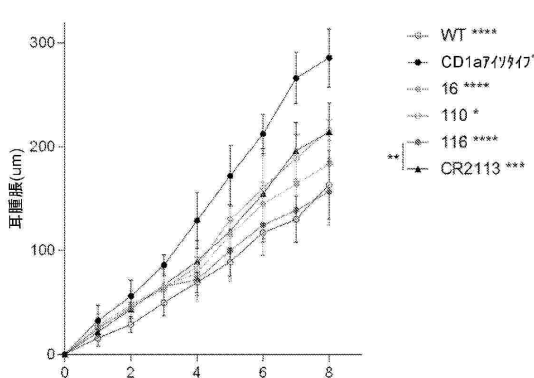
【図 15-1】

A.

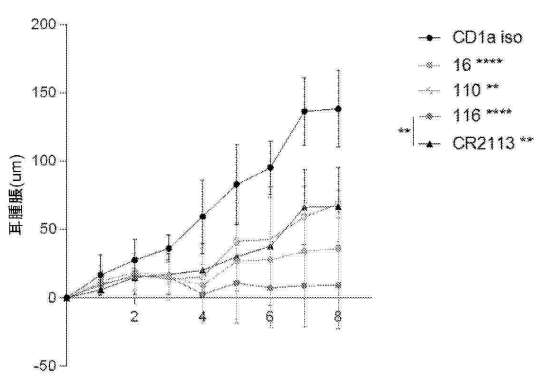


【図 15-2】

B.



C.



10

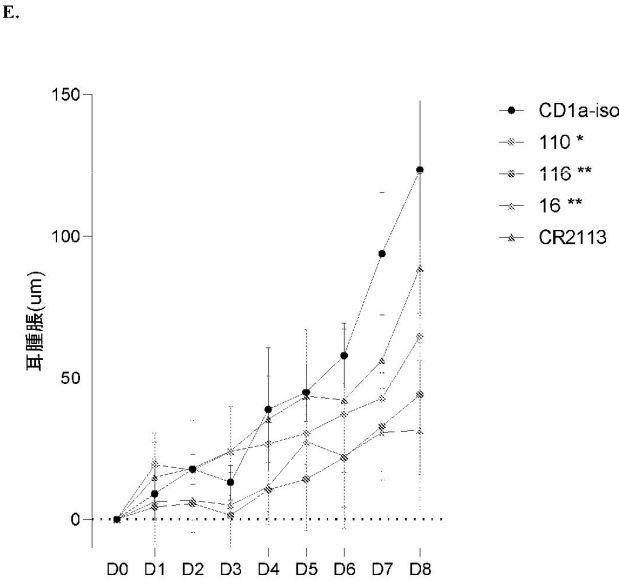
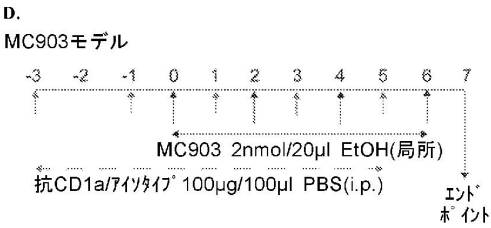
20

30

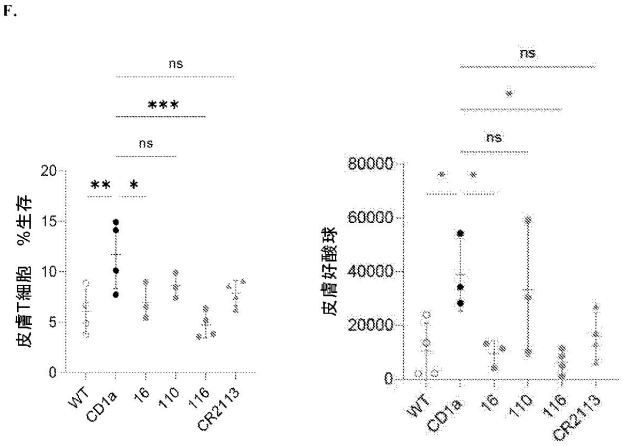
40

50

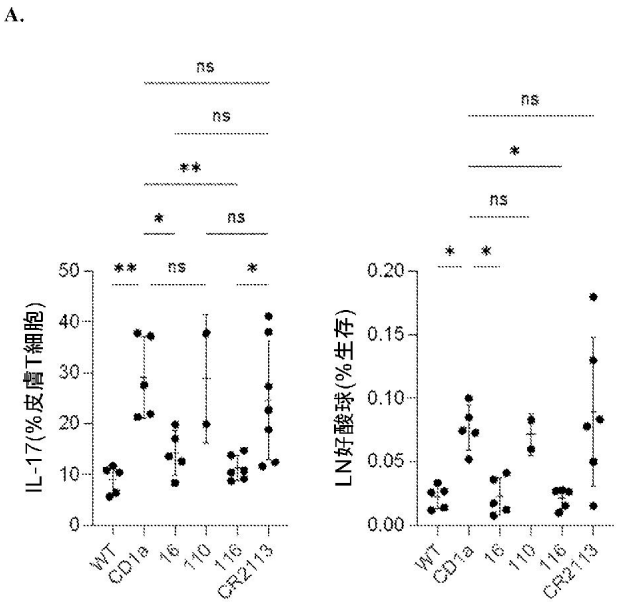
【図 15 - 3】



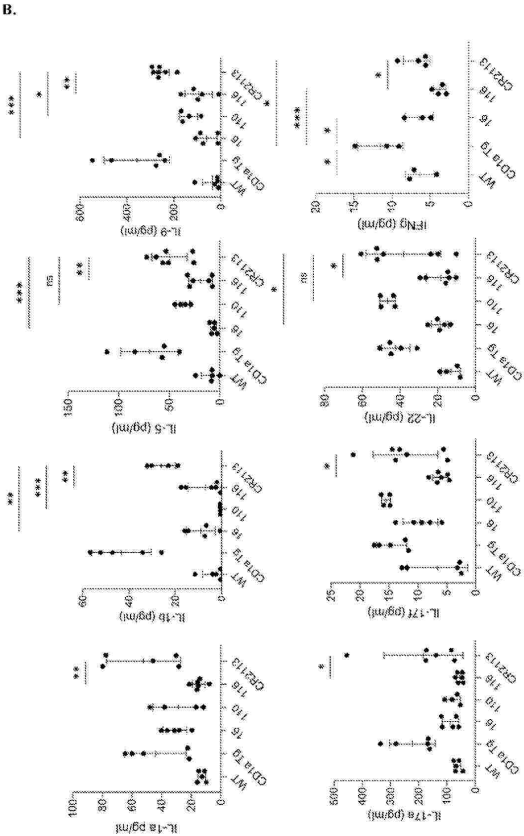
【図 15 - 4】



【図 16 - 1】

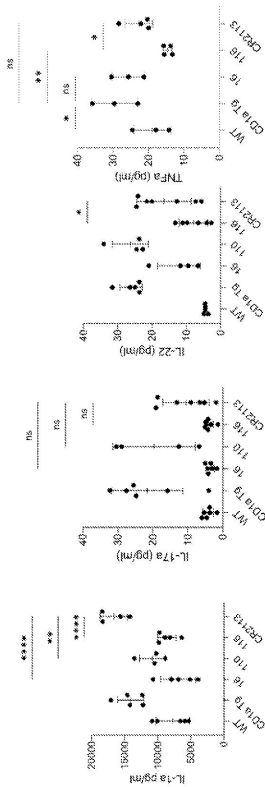


【図 16 - 2】



【図 16 - 3】

C.



10

20

【配列表】

202452209500001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/051285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61P37/00	C07K16/28 A61K39/00 A61P17/00
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K 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, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/063819 A2 (CRUCCELL HOLLAND BV [NL]; UNIV JOHNS HOPKINS [US] ET AL.) 14 July 2005 (2005-07-14) Examples 4, 5, 8, 9; claims 1-22; figure 4 -----	1, 3-28
X	WO 2015/042110 A1 (CHILDRENS MEDICAL CENTER [US]) 26 March 2015 (2015-03-26) [0172]-[0174]; claims 1-30; figures 4D, 6A, 9A -----	1, 3-28
Y	WO 2020/165350 A1 (FUNDACION INST DE INVESTIGACION CONTRA LA LEUCEMIA JOSEP CARRERAS [ES]) 20 August 2020 (2020-08-20) page 16, line 1-20; page 20, lines 1-8; claims 1-12; sequences 1-8 ----- -/-	1, 3-28
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 24 August 2022		Date of mailing of the international search report 26/10/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Klee, Barbara

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2022/051285

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM JI HYUNG ET AL: "CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin disease", NATURE IMMUNOLOGY, vol. 17, no. 10, 22 August 2016 (2016-08-22), pages 1159-1166, XP055878042, New York ISSN: 1529-2908, DOI: 10.1038/ni.3523 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/ni.3523.pdf> [retrieved on 2022-07-25] abstract page 1160, column 1, paragraph 1 page 1161, column 2, paragraph 1 -----	1,3-28
A	RUDIHOFF S ET AL: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979 the whole document -----	1,3-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/GB2022/051285
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, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).	10
2.	☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	20
3.	Additional comments:	30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2022/051285**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **2 (completely); 3-27 (partially)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1, 3-28 (all partially)

30

40

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/GB2022 /051285

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 2 (completely); 3-27 (partially)

The search division considers that the Markush formulas of claim 2 (completely) and claims 3 -27 (partially) lack clarity (conciseness) to the extent that they cannot be searched:

Claim 2: only the heavy or light chain CDR3 is defined and in addition with 80% identity

Claim 3: only 3 CDRs are defined with 80% identity.

Claims 4, 5 and claims 19, 27: only a heavy or a light chain is defined with 80% identity.

Claims 6-18, 20-27 directly or indirectly dependent on claims 2-5, 19, 27.

The combination of different residues claimed within the context of sequences of certain lengths yields such a large number of possible antibodies that a complete search is not only over-burdensome, but also useless given that the application only actually discloses several antibodies falling under the scope of the claims.

In view of the importance of the role played by each single amino acid in the binding of an antibody to its target, especially at the level of its CDRs (see Rudikoff et.al., PNAS 1982, Vol.79, pp. 1979-1983), a claim to an antibody which is structurally characterised by less than the full sequence of all the CDRs, and their specific order, cannot be seen to sufficiently disclose an antibody with any particular properties.

The search has been performed on the complete sequences as listed in claims 3, 19, 25 and 27 with the alternative wording "and" referring to the combinations of the 6 CDRs and claims 4-27 with the heavy and light chain variable region with 100% identity.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/GB2022 /051285

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1, 3-28(all partially)

An antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to CDa1 comprising the selected VH CDRs 1, 2, 3 amino acid sequences are set forth in SEQ ID NOs: 33-35 respectively, and the selected VL CDRs 1,2, 3 amino acid sequences are set forth in SEQ ID NOs:36-39 respectively; VH SEQ ID NO: 39/49; VL SEQ ID NO: 40/50 internal designation: 116.

2. claims: 1, 3-28(all partially)

An antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to CDa1 comprising the selected VH CDRs 1, 2, 3 amino acid sequences are set forth in SEQ ID NOs:1-3 respectively, and the selected VL CDRs 1,2, 3 amino acid sequences are set forth in SEQ ID NOs:4-6 respectively; VH SEQ ID NO: 7/ 41; VL SEQ ID NO:8 /42 internal designation: 16.

3. claims: 1, 3-28(all partially)

An antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to CDa1 comprising the selected VH CDRs 1, 2, 3 amino acid sequences are set forth in SEQ ID NOs:9-11 respectively, and the selected VL CDRs 1,2, 3 amino acid sequences are set forth in SEQ ID NOs:12-14 respectively; VH SEQ ID NO:157 43; VL SEQ ID NO:16/ 44 internal designation: 77.

4. claims: 1, 3-28(all partially)

An antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to CDa1 comprising the selected VH CDRs 1, 2, 3 amino acid sequences are set forth in SEQ ID NOs:17-19 respectively, and the selected VL CDRs 1,2, 3 amino acid sequences are set forth in SEQ ID NOs:20-22 respectively; VH SEQ ID NO:31/47; VL SEQ ID NO: 32/ 48 internal designation: 110.

5. claims: 1, 3-28(all partially)

An antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to CDa1 comprising the selected VH CDRs 1, 2, 3 amino acid sequences are set forth in SEQ ID NOs:25-27 respectively, and the selected VL CDRs 1,2, 3 amino acid sequences are set forth in SEQ ID NOs: 28-30 respectively; VH SEQ ID NO:157 43; VL SEQ ID NO:16/ 44 internal designation: 111.

6. claims: 2(completely); 3-27(partially)

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/GB2022 /051285

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210	
An antibody not limited to antibodies binding to CDa1 ---	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					International application No	
Information on patent family members					PCT/GB2022/051285	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 2005063819	A2	14-07-2005	AT	536376	T	15-12-2011
			ES	2378767	T3	17-04-2012
			JP	4712724	B2	29-06-2011
			JP	2008505605	A	28-02-2008
			US	2006257397	A1	16-11-2006
			WO	2005063819	A2	14-07-2005

WO 2015042110	A1	26-03-2015	CA	2924882	A1	26-03-2015
			EP	3046629	A1	27-07-2016
			EP	3461535	A1	03-04-2019
			JP	2016531843	A	13-10-2016
			US	2016229912	A1	11-08-2016
			WO	2015042110	A1	26-03-2015

WO 2020165350	A1	20-08-2020	AU	2020222239	A1	07-10-2021
			CA	3128955	A1	20-08-2020
			CN	113795506	A	14-12-2021
			EP	3696191	A1	19-08-2020
			EP	3924374	A1	22-12-2021
			JP	2022520455	A	30-03-2022
			US	2022143085	A1	12-05-2022
			WO	2020165350	A1	20-08-2020

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	17/14 (2006.01)	A 6 1 P	17/14	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

英国オーエックス２・０ジェイビー、オックスフォードシャー、オックスフォード、ウエスト・ウ
エイ３、バクストン・コート、オックスフォード・ユニバーシティ・イノベーション・リミテッド
内

(72)発明者 ハードマン、クレア

英国オーエックス２・０ジェイビー、オックスフォードシャー、オックスフォード、ウエスト・ウ
エイ３、バクストン・コート、オックスフォード・ユニバーシティ・イノベーション・リミテッド
内

(72)発明者 チェン、イー・リン

英国オーエックス２・０ジェイビー、オックスフォードシャー、オックスフォード、ウエスト・ウ
エイ３、バクストン・コート、オックスフォード・ユニバーシティ・イノベーション・リミテッド
内

F ターム (参考)	4B065	AA01X AA57X AA72X AA87X AA92Y AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
	4C084	AA13 AA19 NA14 ZA02 ZA61 ZA89 ZA92 ZA96 ZB07 ZB11 ZB13 ZB15 ZC75
	4C085	AA14 BB11 DD62 EE01 EE03
	4C086	AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA02 ZA61 ZA89 ZA92 ZA96 ZB07 ZB11 ZB13 ZB15 ZC75
	4C087	AA01 AA02 BB65 BC83 CA12 NA14 ZA02 ZA61 ZA89 ZA92 ZA96 ZB07 ZB11 ZB13 ZB15 ZC75
	4H045	AA11 AA30 BA57 DA76 EA20 EA28 EA50 EA51 FA74