

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6359031号
(P6359031)

(45) 発行日 平成30年7月18日(2018.7.18)

(24) 登録日 平成30年6月29日(2018.6.29)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46 Z N A

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 Z

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

請求項の数 36 (全 100 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-549864 (P2015-549864)
 (86) (22) 出願日 平成25年12月23日(2013.12.23)
 (65) 公表番号 特表2016-509585 (P2016-509585A)
 (43) 公表日 平成28年3月31日(2016.3.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/077586
 (87) 国際公開番号 W02014/100823
 (87) 国際公開日 平成26年6月26日(2014.6.26)
 審査請求日 平成28年12月8日(2016.12.8)
 (31) 優先権主張番号 61/745,296
 (32) 優先日 平成24年12月21日(2012.12.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 61/745,312
 (32) 優先日 平成24年12月21日(2012.12.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 504333972
 メディミュン、エルエルシー
 アメリカ合衆国 20878 メリーラン
 ド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミ
 ユン ウェイ
 (73) 特許権者 398076227
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシテ
 イー
 アメリカ合衆国、メリーランド州 212
 18、ボルチモア、ノース・チャールズ・
 ストリート 3400
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗H7CR抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト化抗ヒトH7CR抗体の抗原結合フラグメントを含む分子であって、前記分子がヒトH7CRに免疫特異的に結合し、前記抗原結合フラグメントが、

(A) (1) 配列番号17~22のいずれかのアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域；および

(2) 配列番号23~28のいずれかのアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域；
 または

(B) (1) 配列番号33~38のいずれかのアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域；および

(2) 配列番号39~44のいずれかのアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域
を含み、かつ、前記分子がH7CRのB7-H7との相互作用を実質的に遮断することができない分子。

【請求項2】

前記免疫特異的に結合したH7CRが、
 (A) 生細胞の表面に配置されたH7CR；または
 (B) 内因性濃度で発現されたH7CR
 である、請求項1に記載の分子。

【請求項3】

前記生細胞が、T細胞、NK細胞または形質細胞様樹状細胞である、請求項2に記載の

分子。

【請求項 4】

前記分子が、H7CR 活性を調節または促進する、請求項 1 に記載の分子。

【請求項 5】

前記分子が、二重特異性抗体、三重特異性抗体または多重特異性抗体である、請求項 1 に記載の分子。

【請求項 6】

前記分子が、検出可能に標識されるか、またはコンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、受容体リガンドを含む、請求項 1 に記載の分子。

【請求項 7】

治療上有効な量の請求項 1 に記載の分子および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 8】

ある疾患の症状を示す被験体において前記疾患を処置するための、請求項 7 に記載の医薬組成物であって、前記組成物が治療上有効な量で前記被験体に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 9】

それを必要とする被験体において免疫反応を増強するための、請求項 7 に記載の医薬組成物であって、前記組成物が治療上有効な量で前記被験体に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 10】

前記疾患が癌である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記疾患が感染症である、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記感染症が慢性ウイルス疾患である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記医薬組成物が H7CR 機能を促進する、請求項 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

ある疾患を予防処置するための請求項 7 に記載の医薬組成物であって、前記組成物が、前記疾患の症状を示す前に予防上有効な量で被験体に投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 15】

被験体においてある疾患を診断するための組成物であって、前記組成物が、請求項 1 に記載の分子を含み、前記被験体の細胞が、請求項 1 に記載の H7CR 結合分子に結合するその能力を細胞学的アッセイにおいてアッセイされることを特徴とし、前記被験体の細胞への H7CR 結合分子の結合が、前記被験体における前記疾患の存在を示すことを特徴とする、組成物。

【請求項 16】

前記疾患が癌である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記疾患が、T 細胞の数および健康に影響を及ぼす疾患である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

H7CR に特異的に結合する分子、または、その抗原結合フラグメントであって、前記 H7CR 結合分子またはその抗原結合フラグメントが、

(A) 配列番号 29 の軽鎖 CDR1、
配列番号 32 の軽鎖 CDR2、および
配列番号 45 の軽鎖 CDR3 と、

10

20

30

40

50

- 配列番号 4 9 の重鎖 C D R 1、
 配列番号 5 2 の重鎖 C D R 2、および
 配列番号 5 6 の重鎖 C D R 3 と、または
 (B) 配列番号 3 0 の軽鎖 C D R 1、
 配列番号 3 2 の軽鎖 C D R 2、および
 配列番号 4 6 の軽鎖 C D R 3 と、
 配列番号 5 0 の重鎖 C D R 1、
 配列番号 5 3 の重鎖 C D R 2、および
 配列番号 5 7 の重鎖 C D R 3 と、または
 (C) 配列番号 2 9 の軽鎖 C D R 1、
 配列番号 3 2 の軽鎖 C D R 2、および
 配列番号 4 7 の軽鎖 C D R 3 と、
 配列番号 5 0 の重鎖 C D R 1、
 配列番号 5 4 の重鎖 C D R 2、および
 配列番号 5 8 の重鎖 C D R 3 と、
 を含む、6 つの C D R 配列を含み、前記分子が H 7 C R の B 7 - H 7 との相互作用を実質的に遮断することができない、分子またはその抗原結合フラグメント。
- 【請求項 1 9】
 前記免疫特異的に結合した H 7 C R が、
 (A) 生細胞の表面に配置された H 7 C R ; または
 (B) 内因性濃度で発現された H 7 C R
 である、請求項 1 8 に記載の分子。
- 【請求項 2 0】
 前記生細胞が、T 細胞、NK 細胞または形質細胞様樹状細胞である、請求項 1 9 に記載の分子。
- 【請求項 2 1】
 前記分子が、モノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 1 8 に記載の分子。
- 【請求項 2 2】
 前記抗体が、二重特異性抗体、三重特異性抗体または多重特異性抗体である、請求項 2 1 に記載の抗体。
- 【請求項 2 3】
 前記分子が、検出可能に標識されるか、またはコンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、受容体リガンドを含む、請求項 1 8 に記載の分子。
- 【請求項 2 4】
 治療上有効な量の請求項 1 8 に記載の分子および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含む医薬組成物。
- 【請求項 2 5】
 ある疾患の症状を示す被験体において前記疾患を処置するための、請求項 2 4 に記載の医薬組成物であって、前記組成物が、治療上有効な量で前記被験体に投与されることを特徴とする、組成物。
- 【請求項 2 6】
 前記疾患が癌である、請求項 2 5 に記載の組成物。
- 【請求項 2 7】
 前記疾患が感染症である、請求項 2 5 に記載の組成物。
- 【請求項 2 8】
 前記感染症が慢性ウイルス疾患である、請求項 2 7 に記載の組成物。
- 【請求項 2 9】
 前記医薬組成物が H 7 C R 機能を促進する、請求項 2 4 または請求項 2 5 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 3 0】

ある疾患を予防処置するための請求項 2 4 に記載の医薬組成物であって、前記組成物が、前記疾患の症状を示す前の被験体に予防上有効な量で投与されることを特徴とする、組成物。

【請求項 3 1】

被験体においてある疾患を診断するための組成物であって、前記組成物が、請求項 1 8 に記載の結合分子を含み、前記被験体の細胞が、請求項 1 8 に記載の H 7 C R 結合分子に結合するその能力を細胞学的アッセイにおいてアッセイされることを特徴とし、前記被験体の細胞への H 7 C R 結合分子の結合が、前記被験体における前記疾患の存在を示すことを特徴とする、組成物。

10

【請求項 3 2】

前記疾患が癌である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 3】

前記疾患が、T 細胞の数および健康に影響を及ぼす疾患である、請求項 3 1 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

抗 H 7 C R 抗体の抗原結合フラグメントを含む分子であって、前記分子がヒト H 7 C R に免疫特異的に結合し、前記抗原結合フラグメントが、

(A) (1) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域；および

(2) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域；

20

または

(B) (1) 配列番号 7 のアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域；および

(2) 配列番号 8 のアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域；

または

(C) (1) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域；および

(2) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域

を含み、かつ、前記分子が H 7 C R の B 7 - H 7 との相互作用を実質的に遮断することができない分子。

【請求項 3 5】

H 7 C R に特異的に結合する、ヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

(1) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

30

(2) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(3) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(4) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(5) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

40

(6) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(7) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(8) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(9) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(1 0) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

50

(1 1) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(1 2) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(1 3) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；または

(1 4) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域

を含み、前記抗体が、H 7 C R の B 7 - H 7 との相互作用を実質的に遮断することができない、抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 3 6】

請求項 3 4 に記載の分子または請求項 3 5 に記載の抗体の治療上有効な量と、生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤とを含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年12月21日に出願された米国仮特許出願第61/745,296号明細書、2012年12月21日に出願された米国仮特許出願第61/745,312号明細書、2013年5月24日に出願された米国仮特許出願第61/827,269号明細書、および2013年5月24日に出願された米国仮特許出願第61/827,279号明細書の利益およびそれらに対する優先権を主張するPCT出願であり、これらはすべて、許容される限り、その全体を参照により本明細書に援用する。

20

【0002】

連邦支援の研究または開発に関する記載

本発明は、国立衛生研究所(National Institute of Health)(NIH)からの助成金R01CA097085-10および国立癌研究所(National Cancer Institute)(NCI)からの助成金U19CA113341の下で、政府の支援により一部なされた。米国政府は本発明において一定の権利を有し得る。

30

【0003】

配列表の参照

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

【0004】

本発明は、抗体およびその抗原結合フラグメントと、B7-H7のカウンター受容体であるH7CRに免疫特異的に結合することができる他の分子、ならびに癌および他の疾患の処置および診断におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

40

【0005】

ヒトおよび他の哺乳動物の免疫系は、感染および疾患を防止する役割を担っている。こうした防止は、液性免疫反応および細胞性免疫反応により行われる。液性反応では、抗体と外来の標的(抗原)を認識し、中和することができる他の生体分子とが作られる。一方、細胞性免疫反応では、T細胞によりマクロファージ、ナチュラルキラー細胞(NK)および抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球が活性化し、抗原の認識に反応して様々なサイトカインが放出される(Dong, C. et al. (2003)「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」Immunolog. Res. 28(1):39-48)。

【0006】

50

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

【0007】

免疫系は、共刺激および共抑制リガンドおよび受容体によりしっかりと制御されている。これらの分子は、T細胞活性化のための第2のシグナルを与え、正のシグナルおよび負のシグナルのネットワークのバランスを取って、自己に対する免疫を抑制しながら感染に対する免疫反応を最大化する(Wang, L. et al. (March 7, 2011)「VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T Cell Responses,」J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16;Lepeniev, B. et al. (2008)「The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections,」Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288)。特に重要なのは、抗原提示細胞のB7.1(CD80)リガンドおよびB7.2(CD86)リガンドと、CD4⁺Tリンパ球のCD28受容体およびCTLA-4受容体との間の結合である(Sharpe, A. H. et al. (2002)「The B7-CD28 Superfamily,」Nature Rev. Immunol. 2:116-126;Dong, C. et al. (2003)「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」Immunol. Res. 28(1):39-48;Lindley, P. S. et al. (2009)「The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,」Immunol. Rev. 229:307-321)。B7.1またはB7.2がCD28に結合すると、T細胞の活性化が刺激されるのに対し、B7.1またはB7.2がCTLA4に結合すると、そうした活性化が阻害される(Dong, C. et al. (2003)「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」Immunol. Res. 28(1):39-48;Lindley, P. S. et al. (2009)「The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,」Immunol. Rev. 229:307-321;Greenwald, R. J. et al. (2005)「The B7 Family Revisited,」Ann. Rev. Immunol. 23:515-548)。CD28は、T細胞の表面に恒常的に発現する一方(Gross, J., et al. (1992)「Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse,」J. Immunol. 149:380-388)、CTLA4の発現は、T細胞活性化後に急速に上方制御される(Linsley, P. et al. (1996)「Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localizati

10

20

30

40

50

on Towards Sites Of TCR Engagement,」Immunity 4:535-543)。CTLA4は高親和性受容体であるため(Sharpe, A.H. et al. (2002)「The B7-CD28 Superfamily,」Nature Rev. Immunol. 2:116-126)、結合すると、最初にT細胞増殖を惹起し(CD28を介して)、次いでT細胞増殖を阻害する(CTLA4の新たな発現により)ことで、増殖がもはや必要でなくなったときにその作用を抑制する。

【0008】

CD28受容体のリガンドに関する詳細な調査により、関連する一連のB7分子(「B7スーパーファミリー」)の同定および特徴付けが行われてきた(Coylye, A.J. et al. (2001)「The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function,」Nature Immunol. 2(3):203-209; Sharpe, A.H. et al. (2002)「The B7-CD28 Superfamily,」Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005)「The B7 Family Revisited,」Ann. Rev. Immunol. 23:515-548; Collins, M. et al. (2005)「The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,」Genome Biol. 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004)「Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells,」Arthritis Res. Ther. 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007)「Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,」Adv. Immunol. 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007)「The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,」J. Immunother. 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008)「The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance,」Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372; Lenschow, D.J. et al. (1996)「CD28/B7 System of T Cell Costimulation,」Ann. Rev. Immunol. 14:233-258; Wang, S. et al. (2004)「Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses,」Microbes Infect. 6:759-766)。このファミリーには、現在、8つの公知のメンバー、すなわち、B7.1(CD80)、B7.2(CD86)、inducible co-stimulator ligand(ICOS-L)、programmed death-1 ligand(PD-L1; B7-H1)、programmed death-2 ligand(PD-L2; B7-DC)、B7-H3、B7-H4(B7xおよびB7S1とも呼ばれる; Sica, G.L. et al. (2003)「B7-4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」Immunity 18:849-861; Zang, X. et al. (2003)「B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100:10388-10392; Prasad, D.V. et al. (2003)「B7S1, A Novel B7 Family

10

20

30

40

50

Member That Negatively Regulates T Cell Activation,」Immunity 18:863-873), B7-H6 (Collins, M. et al. (2005)「The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,」Genome Biol. 6:223.1-223.7)およびB7-H7 (Flajnik, M. F. et al. (2012)「Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC,」Immunogenetics 64:571-590)が存在する。B7の遺伝子ファミリーは、適応免疫系の調節に不可欠である。ほとんどのB7ファミリーメンバーは、免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)の可変(V)型と定常(C)型の両方のドメインを含有する。

10

B7リガンドは、抗原提示細胞(APC)を含む様々な細胞型の細胞表面上に発現され、それとT細胞上の受容分子との相互作用により、T細胞の活性化および寛容性を調節する活性化シグナルおよび/または抑制シグナルが与えられる(Collins, M. et al. (2005)「The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands,」Genome Biol. 6:223.1-223.7)。抑制性B7リガンドの一部は、腫瘍細胞上にも発現され、免疫応答の抑制がもたられる(Keir, M. E. et al. (2008)「PD-1 And Its Ligands In Tolerance And Immunity,」Annu. Rev. Immunol. 26:677-704; Zou, W. et al. (2008)「Inhibitory B7-Family Molecules In The Tumour Microenvironment,」Nat. Rev. Immunol. 8:467-477)。したがって、B7リガンドとその受容体との相互作用の促進または減弱により、自己免疫疾患および癌の治療が可能になる可能性がある(国際公開第2011/020024号パンフレット; Flajnik, M. F. et al. (2012)「Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC,」Immunogenetics 64:571-590)。

20

30

炎症および癌の処置におけるこれまでのあらゆる進歩にもかかわらず、そうした状態の処置のための免疫療法を改善することができる組成物が依然として求められている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】国際公開第2011/020024号

【非特許文献】

【0010】

40

【非特許文献1】Dong, C. et al. (2003)「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」Immunolog. Res. 28(1):39-48

【非特許文献2】Viglietta, V. et al. (2007)「Modulating Co-Stimulation,」Neurotherapeutics 4:666-675

【非特許文献3】Korman, A. J. et al. (2007)「Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,」Adv. Immunol. 90:297-339

【非特許文献4】Wang, L. et al. (March 7, 2011)「VIST

50

A, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T Cell Responses, J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16

【非特許文献5】Lepenies, B. et al. (2008) 「The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections,」 Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288

【非特許文献6】Sharpe, A. H. et al. (2002) 「The B7 - CD28 Superfamily,」 Nature Rev. Immunol. 2:116-126

10

【非特許文献7】Lindley, P. S. et al. (2009) 「The Clinical Utility Of Inhibiting CD28 - Mediated Costimulation,」 Immunol. Rev. 229:307-321

【非特許文献8】Dong, C. et al. (2003) 「Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,」 Immunolog. Res. 28(1):39-48

【非特許文献9】Greenwald, R. J. et al. (2005) 「The B7 Family Revisited,」 Ann. Rev. Immunol. 23:515-548

【非特許文献10】Gross, J., et al. (1992) 「Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse,」 J. Immunol. 149:380-388

20

【非特許文献11】Linsley, P. et al. (1996) 「Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement,」 Immunity 4:535-543

【非特許文献12】Coyle, A. J. et al. (2001) 「The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function,」 Nature Immunol. 2(3):203-209

30

【非特許文献13】Collins, M. et al. (2005) 「The B7 Family Of Immune - Regulatory Ligands,」 Genome Biol. 6:223.1-223.7

【非特許文献14】Loke, P. et al. (2004) 「Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells,」 Arthritis Res. Ther. 6:208-214

【非特許文献15】Flies, D. B. et al. (2007) 「The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity,」 J. Immunother. 30(3):251-260

40

【非特許文献16】Agarwal, A. et al. (2008) 「The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance,」 Curr. Opin. Organ Transplant. 13:366-372

【非特許文献17】Lenschow, D. J. et al. (1996) 「CD28 / B7 System of T Cell Costimulation,」 Ann. Rev. Immunol. 14:233-258

【非特許文献18】Wang, S. et al. (2004) 「Co - Signaling

50

g Molecules Of The B7 - CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses,」Microbes Infect. 6: 759 - 766

【非特許文献19】Sica, G. L. et al. (2003)「B7 - 4, A Molecule Of The B7 Family, Negatively Regulates T Cell Immunity,」Immunity 18: 849 - 861

【非特許文献20】Zang, X. et al. (2003) B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100: 10388 - 10392

【非特許文献21】Prasad, D. V. et al. (2003) B7S1, A Novel B7 Family Member That Negatively Regulates T Cell Activation,」Immunity 18: 863 - 873

【非特許文献22】Flajnik, M. F. et al. (2012)「Evolution Of The B7 Family: Co - Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC,」Immunogenetics 64: 571 - 590

【非特許文献23】Keir, M. E. et al. (2008)「PD - 1 And Its Ligands In Tolerance And Immunity,」Annu. Rev. Immunol. 26: 677 - 704

【非特許文献24】Zou, W. et al. (2008)「Inhibitory B7 - Family Molecules In The Tumour Microenvironment,」Nat. Rev. Immunol. 8: 467 - 477

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的は、癌、感染症、炎症、および他の疾患および状態の処置のための免疫療法を改善することができる組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

抗体およびその抗原結合フラグメントならびにB7 - H7カウンター受容体(H7CR)に免疫特異的に結合することができる他の分子が提供される。B7 - H7カウンター受容体は、B7 - H7CRおよびCD28Hとしても知られている(Yhu, et al., Nature Communications, 4: 1 - 12 (2013))。癌、感染症、炎症、ならびに他の疾患および状態の処置および診断におけるそれらの使用方法も提供される。H7CR結合分子は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体であってもよい。

【0013】

一実施形態は、抗原結合フラグメントが6つのCDRを含むH7CR結合分子を提供し、ここで、これらのCDRは、抗H7CR抗体、すなわち1. 3、4. 5および7. 8の少なくとも1つのCDRまたはそのコンセンサスCDRを含み、残りのすべてのCDRは、

(A) 抗H7CR抗体1. 3の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR；

(B) 抗H7CR抗体4. 5の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR；または

(C) 抗H7CR抗体7. 8の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR

から選択される。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

別の実施形態は、6つのCDRが、

- (A) 抗H7CR抗体1・3の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR；
- (B) 抗H7CR抗体4・5の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR；または
- (C) 抗H7CR抗体7・8の3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR

である、H7CR結合分子を提供する。

【 0 0 1 5 】

さらに別の実施形態は、抗ヒトH7CR抗体1・3または4・5のヒト化変異体の抗原結合フラグメントを有するH7CR結合分子を提供し、ここで、この分子はヒトH7CRに免疫特異的に結合し、かつ抗原結合フラグメントは、

- (A) (1) 配列番号17～22のいずれかのアミノ酸配列を有する、抗ヒトH7CR抗体1・3のヒト化変異体の軽鎖可変領域；および

- (2) 配列番号23～28のいずれかのアミノ酸配列を有する、抗ヒトH7CR抗体1・3のヒト化変異体の重鎖可変領域；

または

- (B) (1) 配列番号33～38のいずれかのアミノ酸配列を有する、抗ヒトH7CR抗体4・5のヒト化変異体の軽鎖可変領域；および

- (2) 配列番号39～44のいずれかのアミノ酸配列を有する、抗ヒトH7CR抗体4・5のヒト化変異体の重鎖可変領域

を含む。

【 0 0 1 6 】

好ましい実施形態は、前記H7CR結合分子が、

- (A) 生細胞の表面に配置されたH7CR；または
- (B) 内因性濃度で発現されたH7CR

に免疫特異的に結合する実施形態に関する。

【 0 0 1 7 】

一実施形態では、生細胞は、T細胞、NK細胞または形質細胞様樹状細胞である。

【 0 0 1 8 】

さらに別の実施形態では、この分子は、H7CRのB7-H7との相互作用を実質的に遮断することができない。

【 0 0 1 9 】

別の実施形態では、この分子はH7CRに結合するができ、H7CR活性を促進する。

【 0 0 2 0 】

抗体はいずれも、二重特異性抗体、三重特異性抗体または多重特異性抗体であり得る。この分子は、検出可能に標識することができるか、またはコンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、受容体リガンドもしくはそれらの組合せを含む。

【 0 0 2 1 】

別の実施形態は、治療上有効な量の上記に言及された分子のいずれか、および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含有する医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 2 】

開示された組成物は、治療上有効な量の上記に言及された医薬組成物のいずれかを被験体に投与して、B7-H7経路を活性化し免疫反応を刺激することにより、疾患症状を示す被験体の疾患を処置するために使用することができる。処置される具体的な適応症としては、以下に限定されるものではないが、癌、感染症、慢性ウイルス疾患、炎症状態または自己免疫疾患が挙げられる。

【 0 0 2 3 】

疾患を処置するための方法であって、医薬組成物がH7CR機能を促進する方法も提供される。

【 0 0 2 4 】

疾患を予防的に処置するための方法は、疾患の症状を示す前に、予防上有効な量の上記

10

20

30

40

50

に言及された医薬組成物を被験体に投与することを含む。

【 0 0 2 5 】

被験体の疾患（特に癌、またはT細胞の数および健康に影響を及ぼす疾患）を診断するための方法は、被験体の細胞について、上記に言及されたH7CR結合分子のいずれかに結合するその能力をアッセイすることを含み、この方法は、被験体の免疫反応性または疾患の存在を診断するための細胞学的アッセイを提供する。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目1）

抗ヒトH7CR抗体1．3または4．5のヒト化変異体の抗原結合フラグメントを含む分子であって、前記分子がヒトH7CRに免疫特異的に結合し、かつ前記抗原結合フラグメントが、

10

（A）（1）配列番号17～22のいずれかのアミノ酸配列を有する、抗ヒトH7CR抗体1．3のヒト化変異体の軽鎖可変領域；および

（2）配列番号23～28のいずれかのアミノ酸配列を有する、抗ヒトH7CR抗体1．3のヒト化変異体の重鎖可変領域；

または

（B）（1）配列番号33～38のいずれかのアミノ酸配列を有する、抗ヒトH7CR抗体4．5のヒト化変異体の軽鎖可変領域；および

（2）配列番号39～44のいずれかのアミノ酸配列を有する、抗ヒトH7CR抗体4．5のヒト化変異体の重鎖可変領域

20

を含む分子。

（項目2）

前記免疫特異的に結合したH7CRが、

（A）生細胞の表面に配置されたH7CR；または

（B）内因性濃度で発現されたH7CR

である、項目1に記載の分子。

（項目3）

前記生細胞が、T細胞、NK細胞または形質細胞様樹状細胞である、項目1に記載の分子。

（項目4）

30

前記分子が、H7CRのB7-H7との相互作用を実質的に遮断することができない、項目1に記載の分子。

（項目5）

前記分子が、H7CR活性を調節または促進する、項目1に記載の分子。

（項目6）

前記抗体が、二重特異性抗体、三重特異性抗体または多重特異性抗体である、項目1に記載の分子。

（項目7）

前記分子が、検出可能に標識されるか、またはコンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、受容体リガンドを含む、項目1に記載の分子。

40

（項目8）

治療上有効な量の項目1に記載の分子および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含む医薬組成物。

（項目9）

ある疾患の症状を示す被験体において前記疾患を処置するための方法であって、治療上有効な量の項目8に記載の医薬組成物を前記被験体に投与することを含む方法。

（項目10）

それを必要とする被験体において免疫反応を増強するための方法であって、治療上有効な量の項目8に記載の医薬組成物を前記被験体に投与することを含む方法。

（項目11）

50

<u>前記疾患が癌である、項目 1 0 に記載の方法。</u>	
<u>(項目 1 2)</u>	
<u>前記疾患が感染症である、項目 1 0 に記載の方法。</u>	
<u>(項目 1 3)</u>	
<u>前記感染症が慢性ウイルス疾患である、項目 1 2 に記載の方法。</u>	
<u>(項目 1 4)</u>	
<u>前記医薬組成物が H 7 C R 機能を促進する、項目 1 0 に記載の方法。</u>	
<u>(項目 1 5)</u>	
<u>ある疾患を予防処置するための方法であって、前記疾患の症状を示す前に予防上有効な量の項目 7 に記載の医薬組成物を被検体に投与することを含む方法。</u>	10
<u>(項目 1 6)</u>	
<u>被験体においてある疾患を診断するための方法であって、前記被験体の細胞について、項目 1 に記載の H 7 C R 結合分子に結合するその能力をアッセイすることを含み、前記被験体における前記疾患の存在を診断するための細胞学的アッセイを提供する方法。</u>	
<u>(項目 1 7)</u>	
<u>前記疾患が癌である、項目 1 6 に記載の方法。</u>	
<u>(項目 1 8)</u>	
<u>前記疾患が、 T 細胞の数および健康に影響を及ぼす疾患である、項目 1 6 に記載の方法。</u>	
<u>。</u>	
<u>(項目 1 9)</u>	20
<u>H 7 C R に免疫特異的に結合する抗体の抗原結合フラグメントを含む分子。</u>	
<u>(項目 2 0)</u>	
<u>前記免疫特異的に結合した H 7 C R が、</u>	
<u>(A) 生細胞の表面に配置された H 7 C R ; または</u>	
<u>(B) 内因性濃度で発現された H 7 C R</u>	
<u>である、項目 1 9 に記載の分子。</u>	
<u>(項目 2 1)</u>	
<u>前記生細胞が、 T 細胞、 N K 細胞または形質細胞様樹状細胞である、項目 1 9 に記載の分子。</u>	
<u>(項目 2 2)</u>	30
<u>前記分子が、 H 7 C R の B 7 - H 7 との相互作用を実質的に遮断することができない、項目 1 9 に記載の分子。</u>	
<u>(項目 2 3)</u>	
<u>前記分子が、モノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である、項目 1 9 に記載の分子。</u>	
<u>(項目 2 4)</u>	
<u>前記抗体が、二重特異性抗体、三重特異性抗体または多重特異性抗体である、項目 2 3 に記載の抗体。</u>	
<u>(項目 2 5)</u>	
<u>前記抗原結合フラグメントが 6 つの C D R を含み、前記 C D R が抗 H 7 C R 抗体、すなわち 1 . 3 . 4 . 5 および 7 . 8 の C D R の少なくとも 1 つのコンセンサス C D R を含み、残りのすべての C D R が</u>	40
<u>(A) 軽鎖 C D R 1、配列番号 3 1 ;</u>	
<u>(B) 軽鎖 C D R 2、配列番号 3 2 ;</u>	
<u>(C) 軽鎖 C D R 3、配列番号 4 8 ;</u>	
<u>(D) 重鎖 C D R 1、配列番号 5 1 ;</u>	
<u>(E) 重鎖 C D R 2、配列番号 5 5 ; または</u>	
<u>(f) 重鎖 C D R 3、配列番号 5 9</u>	
<u>から選択される、項目 1 9 に記載の分子。</u>	
<u>(項目 2 6)</u>	50

前記 6 つの C D R が、
 (A) 抗 H 7 C R 抗体 1 . 3 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R、配列番号 2 9、3 2、4 5、4 9、5 2 および 5 6 ;
 (B) 抗 H 7 C R 抗体 4 . 5 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R、配列番号 3 0、3 2、4 6、5 0、5 3 および 5 7 ; または
 (C) 抗 H 7 C R 抗体 7 . 8 の 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R、配列番号 2 9、3 2、4 7、5 0、5 4 および 5 8
 である、項目 2 5 に記載の分子。
 (項目 2 7)
 前記分子が、モノクローナル抗体、ヒト抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である、項目 2 5 に記載の分子。
 (項目 2 8)
 前記抗体が、二重特異性抗体、三重特異性抗体または多重特異性抗体である、項目 2 7 に記載の抗体。
 (項目 2 9)
 前記分子が、検出可能に標識されるか、またはコンジュゲートされたトキシン、薬剤、受容体、酵素、受容体リガンドを含む、項目 1 9 に記載の分子。
 (項目 3 0)
 治療上有効な量の項目 1 に記載の分子および生理学的に許容されるキャリアまたは賦形剤を含む医薬組成物。
 (項目 3 1)
 ある疾患の症状を示す被験体において前記疾患を処置するための方法であって、治療上有効な量の項目 3 0 に記載の医薬組成物を前記被験体に投与することを含む方法。
 (項目 3 2)
 前記疾患が癌である、項目 3 1 に記載の方法。
 (項目 3 3)
 前記疾患が感染症である、項目 3 1 に記載の方法。
 (項目 3 4)
 前記感染症が慢性ウイルス疾患である、項目 3 1 に記載の方法。
 (項目 3 5)
 前記医薬組成物が H 7 C R 機能を促進する、項目 3 1 に記載の方法。
 (項目 3 6)
 ある疾患を予防処置するための方法であって、前記疾患の症状を示す前に予防上有効な量の項目 2 8 に記載の医薬組成物を被検体に投与することを含む方法。
 (項目 3 7)
 被験体においてある疾患を診断するための方法であって、前記被験体の細胞について、項目 1 に記載の H 7 C R 結合分子に結合するその能力をアッセイすることを含み、前記被験体における前記疾患の存在を診断するための細胞学的アッセイを提供する方法。
 (項目 3 8)
 前記疾患が癌である、項目 3 7 に記載の方法。
 (項目 3 9)
 前記疾患が、T 細胞の数および健康に影響を及ぼす疾患である、項目 3 7 に記載の方法。
 (項目 4 0)
 H 7 C R 抗体 1 . 3、4 . 5 または 7 . 8 の抗原結合フラグメントを含む分子であって、前記分子がヒト H 7 C R に免疫特異的に結合し、前記抗原結合フラグメントが、
 (A) (1) 配列番号 5 のアミノ酸配列を有する、抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3 の軽鎖可変領域 ; および
 (2) 配列番号 6 のアミノ酸配列を有する、抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3 の重鎖可変領域 ;

10

20

30

40

50

(B) (1) 配列番号 7 のアミノ酸配列を有する、抗ヒト H 7 C R 抗体 4 . 5 の軽鎖可変領域；および

(2) 配列番号 8 のアミノ酸配列を有する、抗ヒト H 7 C R 抗体 4 . 5 の重鎖可変領域；

または、

(C) (1) 配列番号 9 のアミノ酸配列を有する、抗ヒト H 7 C R 抗体 7 . 8 の軽鎖可変領域；および

(2) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有する、抗ヒト H 7 C R 抗体 7 . 8 の重鎖可変領域

を含む分子。

10

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 6 】

【図 1】別個の細胞上にある H 7 C R および B 7 - H 7 の構造、発現パターンおよびそれらの間の相互作用を示す図である。

【図 2】H 7 C R C H O トランスフェクタントに対する抗 H 7 C R 抗体 1 . 3 (K d = 5 . 9 n M) および 4 . 5 (K d = 3 . 5 n M) のそれぞれの結合親和性を示す、中央蛍光強度対 l o g [A b] (n M) の折れ線グラフである。

【図 3 A - 3 B】P B M C に由来するヒトナイーブ (C D 4 5 R A +) C D 4 および C D 8 T 細胞 (図 3 B) に対する H 7 C R m A b の結合曲線を示す、中央蛍光強度対 l o g [A b] (n M) の折れ線グラフである。

20

【図 4 A - 4 C】C H O トランスフェクタントの表面上に発現されたヒト H 7 C R に結合する、抗体 1 . 3、4 . 5 および 7 . 8 の能力を示すフローサイトメトリーデータのヒストグラムである。データは、細胞カウント対化合物 P E - A の l o g 蛍光として提示する。各パネルの左側ピークはアイソタイプ対照抗体を示し、右側ピークは H 7 C R 抗体を示す。

【図 5 A - 5 D】B 7 - H 7 I g 融合タンパク質が H 7 C R C H O トランスフェクタントに結合することを示すフローサイトメトリーデータのヒストグラムである。データは、細胞カウント対化合物 A P C - A の l o g 蛍光として提示する。抗体 1 . 3 (図 5 B)、4 . 5 (図 5 C) および 7 . 8 (図 5 D) を H 7 C R トランスフェクタントとブレインキュベートしたところ、それぞれは、H 7 C R の B 7 - H 7 との相互作用を実質的に遮断することができないことが分かった。

30

【図 6】ヒト扁桃腺組織の表面上に内因的に発現される H 7 C R に結合する、抗ヒト H 7 C R 抗体 (H 7 C R 4 . 5) の能力を示す顕微鏡写真である。

【図 7】(パネル A ~ C) H 7 C R 発現が T 細胞および N K 細胞におけるナイーブ T 細胞表現型と関連していることを示すフローサイトメトリーデータの散布図である。パネル A は、C D 3 + T 細胞上の C D 4 5 R O の発現に対する H 7 C R の発現を示す、4 つのドナー由来の散布図を示す。この散布図は、抗 H 7 - C R 抗体の蛍光対抗 C D 4 5 R O 由来の蛍光である。パネル B は、C D 3 および C D 1 6 マーカーの発現に基づいた T 細胞および N K 細胞のゲーティングを示す散布図である。この散布図は、抗 C D 3 抗体の蛍光対抗 C D 1 6 抗体由来の蛍光である。パネル C は、C D 1 6 + N K 細胞上の C D 4 5 R O の発現に対する H 7 C R の発現を示す、4 つのドナー由来の散布図を示す。この散布図は、抗 H 7 - C R の蛍光対抗 C D 4 5 R O 由来の蛍光である。

40

【図 8 A - 8 H】4 つの健常 P M B C ドナーの H 7 C R および B 7 - H 7 の発現プロファイルのフローサイトメトリー散布図である (ドナー 1、図 8 A および 8 B ; ドナー 2、図 8 C および 8 D ; ドナー 3 (図 8 E および 8 F) ならびにドナー 4 (図 8 G および 8 H))。図 8 A、8 C、8 E および 8 G は、抗体 1 . 3 を用いる l o g 蛍光対抗 C D 3 抗体を用いる l o g 蛍光の散布図である。図 8 B、8 D、8 F および 8 H は、抗 B 7 H 7 抗体 2 D 3 を用いる l o g 蛍光対抗 C D 1 4 抗体を用いる l o g 蛍光の散布図である。すべてのドナーは、P B M C において、T 細胞上に H 7 C R の発現を示したが、B 7 - H 7 の発現は最小であった。

50

【図 9 A - 9 H】4つの健常 P M B C ドナーの H 7 C R および B 7 - H 7 の発現プロファイルを示すフローサイトメトリー散布図である（ドナー 1、図 9 A および 9 B；ドナー 2、図 9 C および 9 D；ドナー 3、図 9 E および 9 F；ならびにドナー 4、図 9 G および 9 H）。図 9 A、9 C、9 E および 9 G は、抗体 1 . 3 を用いる蛍光対抗 C D 3 抗体を用いる蛍光の散布図である。図 9 B、9 D、9 F および 9 H は、抗 B 7 H 7 抗体 2 D 3 を用いる蛍光対抗 C D 1 4 抗体を用いる蛍光の散布図である。ドナー 2、3、4 は、P B M C において、T 細胞上に H 7 C R の発現を示したが、B 7 - H 7 の発現は最小であった。ドナー 1 は、C D 1 4 + 単球上に高発現レベルの B 7 - H 7 を示し、C D 3 T 細胞上に低発現レベルの H 7 C R を示す。

【図 1 0 A - 1 0 D】ヒト単球（1 0 A、1 0 F、1 0 K、1 0 P、1 0 U、および 1 0 Z）、C D 8 + C D 3 + リンパ球（1 0 B、1 0 G、1 0 L、1 0 Q、1 0 V、1 0 A A）、C D 8 - C D 3 + リンパ球（1 0 C、1 0 H、1 0 M、1 0 R、1 0 W および 1 0 A B）、C D 1 6 + N K 細胞（1 0 D、1 0 I、1 0 N、1 0 S、1 0 X および 1 0 A C）、ならびに C D 3 - C D 8 - 細胞（1 0 E、1 0 J、1 0 O、1 0 T、1 0 Y および 1 0 A D）による H 7 C R および B 7 - H 7 の発現を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。抗体 1 8 C 3（1 0 A - 1 0 E）および 2 D 3（1 0 F - 1 0 J）は抗 B 7 - H 7 モノクローナル抗体である。図 1 0 K - 1 0 O は抗 P D - 1 抗体を使用する。図 1 0 P - T は抗体 1 . 3 を使用する。図 1 0 U - Y は抗体 4 . 5 を使用する。図 1 0 Z - A D は抗体 7 . 8 を使用する。

【図 1 1 A - 1 1 D】カニクイザル単球（1 1 A、1 1 F、1 1 K、1 1 P、1 1 U および 1 1 Z）、C D 8 + C D 3 + リンパ球（1 1 B、1 1 G、1 1 L、1 1 Q、1 1 V、1 1 A A）、C D 8 - C D 3 + リンパ球（1 1 C、1 1 H、1 1 M、1 1 R、1 1 W および 1 1 A B）、C D 1 6 + N K 細胞（1 1 D、1 1 I、1 1 N、1 1 S、1 1 X および 1 1 A C）、ならびに C D 3 - C D 8 - 細胞（1 1 E、1 1 J、1 1 O、1 1 T、1 1 Y および 1 1 A D）による H 7 C R および B 7 - H 7 の発現を示すフローサイトメトリーヒストグラムである。抗体 1 8 C 3（図 1 0 A - 1 0 E）および 2 D 3（図 1 0 F - 1 0 J）は、抗 B 7 - H 7 モノクローナル抗体である。図 1 0 K - 1 0 O は抗 P D - 1 抗体を使用する。図 1 0 P - T は抗体 1 . 3 を使用する。図 1 0 U - Y は抗体 4 . 5 を使用する。図 1 0 Z - A D は抗体 7 . 8 を使用する。

【図 1 2 A - 1 2 E】成熟単球由来の樹状細胞による B 7 - H 7 および他の活性化マーカーの発現のインビトロ分析に関するフローサイトメトリーヒストグラムである。図 1 2 A は、カウント対抗 H L A - A B C 抗体を用いる l o g 化合物 F I T C - A のヒストグラムである。図 1 2 B は、カウント対抗 B 7 - H 1 抗体を用いる l o g 化合物 P E - A のヒストグラムである。図 1 2 C は、カウント対抗 H L A - D R 抗体を用いる l o g 化合物 P e r C P - C y 5 - 5 - A のヒストグラムである。図 1 2 D は、カウント対抗 C D 4 0 抗体を用いる l o g 化合物 P E - C y 7 - A のヒストグラムである。図 1 2 E は、カウント対抗 C D 8 6 抗体を用いる l o g 化合物 A P C - A のヒストグラムである。図 1 2 F は、カウント対抗 C D 8 3 抗体を用いる l o g 化合物 P a c i f i c B l u e - A のヒストグラムである。図 1 2 G は、カウント対抗 C D 8 0 抗体を用いる l o g 化合物 F I T C - A のヒストグラムである。図 1 2 H は、カウント対抗 B 7 - D C 抗体を用いる l o g 化合物 P E - A のヒストグラムである。図 1 2 I は、カウント対抗 C D 5 4 抗体を用いる l o g 化合物 P a c i f i c B l u e - A のヒストグラムである。図 1 2 J は、カウント対抗 B 7 - H 7 抗体を用いる l o g 化合物 P e r C P - C y 5 - 5 A のヒストグラムである。図 1 2 K は、カウント対抗 C C R 7 抗体を用いる l o g 化合物 A P C - A のヒストグラムである。灰色実線はアイソタイプ対照を表す。破線は未成熟樹状細胞を表す。点線は、T N F および P G E 2 で 1 日間処理された細胞を表す。黒色実線は、1 n g / m l の T N F a および 1 μ g / m l の P G E 2 で 2 日間処理された細胞を表す。

【図 1 2 F - 1 2 K】成熟単球由来の樹状細胞による B 7 - H 7 および他の活性化マーカーの発現のインビトロ分析に関するフローサイトメトリーヒストグラムである。図 1 2 A は、カウント対抗 H L A - A B C 抗体を用いる l o g 化合物 F I T C - A のヒストグラム

10

20

30

40

50

である。図12Bは、カウント対抗B7-H1抗体を用いるlog化合物PE-Aのヒストグラムである。図12Cは、カウント対抗HLA-DR抗体を用いるlog化合物PerCP-Cy5-5-Aのヒストグラムである。図12Dは、カウント対抗CD40抗体を用いるlog化合物PE-Cy7-Aのヒストグラムである。図12Eは、カウント対抗CD86抗体を用いるlog化合物APC-Aのヒストグラムである。図12Fは、カウント対抗CD83抗体を用いるlog化合物PacificBlue-Aのヒストグラムである。図12Gは、カウント対抗CD80抗体を用いるlog化合物FITC-Aのヒストグラムである。図12Hは、カウント対抗B7-DC抗体を用いるlog化合物PE-Aのヒストグラムである。図12Iは、カウント対抗CD54抗体を用いるlog化合物PacificBlue-Aのヒストグラムである。図12Jは、カウント対抗B7-H7抗体を用いるlog化合物PerCP-Cy5-5-Aのヒストグラムである。図12Kは、カウント対抗CCR7抗体を用いるlog化合物APC-Aのヒストグラムである。灰色実線はアイソタイプ対照を表す。破線は未成熟樹状細胞を表す。点線は、TNFおよびPGE2で1日間処理された細胞を表す。黒色実線は、1ng/mlのTNFαおよび1μg/mlのPGE2で2日間処理された細胞を表す。

【図13】対照Ig()、H7CR1.3()、H7CR4.5()、H7CR7.8()およびT細胞のみ(-)について、分裂細胞(CFSE低値)のパーセント対日数の折れ線グラフであり、抗H7CR抗体がモデル抗原、破傷風トキソイド特異的T細胞反応を促進することを示す。

【図14A-14L】図14A-14L。破傷風トキソイドタンパク質刺激およびH7CR抗体または対照抗体処理を受けた細胞により発現されるサイトカインの性質およびレベルを示す棒グラフである。図14Aは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIFN-γ(pg/ml)の棒グラフである。図14Bは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-5(pg/ml)の棒グラフである。図14Dは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-13(pg/ml)の棒グラフである。図14Eは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのGM-CSF(pg/ml)の棒グラフである。図14Fは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-10(pg/ml)の棒グラフである。図14Gは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-6(pg/ml)の棒グラフである。図14Hは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-12p70(pg/ml)の棒グラフである。図14Iは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのMCP-1(pg/ml)の棒グラフである。図14Jは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-17(pg/ml)の棒グラフである。図14AKは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのMIP-1(pg/ml)の棒グラフである。図14Lは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-8(pg/ml)の棒グラフである。

【図14C-14D】図14A-14L。破傷風トキソイドタンパク質刺激およびH7CR抗体または対照抗体処理を受けた細胞により発現されるサイトカインの性質およびレベルを示す棒グラフである。図14Aは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIFN-γ(pg/ml)の棒グラフである。図14Bは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-5(pg/ml)の棒グラフである。図14Dは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-13(pg/ml)の棒グラフである。図14Eは、対照Ig、H7

10

20

30

40

50

CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのGM-CSF (pg/nl) の棒グラフである。図14Fは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-10 (pg/nl) の棒グラフである。図14Gは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-6 (pg/nl) の棒グラフである。図14Hは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-12p70 (pg/nl) の棒グラフである。図14Iは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのMCP-1 (pg/nl) の棒グラフである。図14Jは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-17 (pg/nl) の棒グラフである。図14AKは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのMIP-1 (pg/nl) の棒グラフである。図14Lは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-8 (pg/nl) の棒グラフである。

10

【図14E-14F】図14A-14L。破傷風トキソイドタンパク質刺激およびH7CR抗体または対照抗体処理を受けた細胞により発現されるサイトカインの性質およびレベルを示す棒グラフである。図14Aは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIFN- (pg/nl) の棒グラフである。図14Bは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-5 (pg/nl) の棒グラフである。図14Dは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-13 (pg/nl) の棒グラフである。図14Eは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのGM-CSF (pg/nl) の棒グラフである。図14Fは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-10 (pg/nl) の棒グラフである。図14Gは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-6 (pg/nl) の棒グラフである。図14Hは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-12p70 (pg/nl) の棒グラフである。図14Iは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのMCP-1 (pg/nl) の棒グラフである。図14Jは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-17 (pg/nl) の棒グラフである。図14AKは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのMIP-1 (pg/nl) の棒グラフである。図14Lは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-8 (pg/nl) の棒グラフである。

20

30

【図14G-14H】図14A-14L。破傷風トキソイドタンパク質刺激およびH7CR抗体または対照抗体処理を受けた細胞により発現されるサイトカインの性質およびレベルを示す棒グラフである。図14Aは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIFN- (pg/nl) の棒グラフである。図14Bは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-5 (pg/nl) の棒グラフである。図14Dは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-13 (pg/nl) の棒グラフである。図14Eは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのGM-CSF (pg/nl) の棒グラフである。図14Fは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H7CR7・8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-10 (pg/nl) の棒グラフである。図14Gは、対照Ig、H7CR1・3、H7CR4・5、H

40

50

7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 6 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 H は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 1 2 p 7 0 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 I は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの M C P - 1 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 J は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 1 7 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 A K は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの M I P - 1 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 L は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 8 (p g / n l) の棒グラフである。

10

【図 1 4 I - 1 4 J】図 1 4 A - 1 4 L。破傷風トキソイドタンパク質刺激および H 7 C R 抗体または対照抗体処理を受けた細胞により発現されるサイトカインの性質およびレベルを示す棒グラフである。図 1 4 A は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I F N - (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 B は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 5 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 D は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 1 3 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 E は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの G M - C S F (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 F は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 1 0 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 G は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 6 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 H は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 1 2 p 7 0 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 I は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの M C P - 1 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 J は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 1 7 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 A K は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの M I P - 1 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 L は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 8 (p g / n l) の棒グラフである。

20

30

【図 1 4 K - 1 4 L】図 1 4 A - 1 4 L。破傷風トキソイドタンパク質刺激および H 7 C R 抗体または対照抗体処理を受けた細胞により発現されるサイトカインの性質およびレベルを示す棒グラフである。図 1 4 A は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I F N - (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 B は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 5 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 D は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 1 3 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 E は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの G M - C S F (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 F は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 1 0 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 G は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 6 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 H は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞または T 細胞のみの I L - 1 2 p 7 0 (p g / n l) の棒グラフである。図 1 4 I は、対照 I g、H 7 C R 1 . 3、H 7 C R 4 . 5、H 7 C R 7 . 8 で処理された細胞

40

50

またはT細胞のみのMCP-1 (pg/ml)の棒グラフである。図14Jは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-17 (pg/ml)の棒グラフである。図14AKは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのMIP-1 (pg/ml)の棒グラフである。図14Lは、対照Ig、H7CR1.3、H7CR4.5、H7CR7.8で処理された細胞またはT細胞のみのIL-8 (pg/ml)の棒グラフである。

【図15A-15B】抗H7CR抗体による処理により、抗原特異的T細胞の増殖および細胞内IFN 発現が増強されたことを示すフローサイトメトリー散布図である。図15Aは、log化合物PerCP-Cy5-5-A::IFNg対対照Igを用いる化合物FITC::CFSEの散布図である。図15Bは、log化合物PerCP-Cy5-5-A::IFNg対化合物FITC::CFSEの散布図である。

【図16A-16B】ヒトT細胞反応に対する抗H7CR抗体の効果を示す棒グラフである。図16Aは、抗CD28H抗体(黒塗り)が、CTLA4-Igの非存在下において、T細胞増殖の強力な増強を媒介することを示す分裂CD4+T細胞(%)の棒グラフである。図16Bは、抗CD28H抗体(黒塗り)がサイトカイン発現の増加を媒介することを示す。図16Bは、対照(白抜き)または抗CD28H(黒塗り)で処理されたT細胞に由来するIFN- (pg/ml)の棒グラフを示すパネルAを含む。パネルBは、左から右にIL-5、IL-10、TNF-、IL-17であるサイトカイン(黒塗り)(pg/ml)の棒グラフである。対照(白抜き)。

【図17A-17B】抗体1.3の軽鎖(図17A)および重鎖(図17B)の可変ドメインのCollier Perles 2D表示である。この鎖の3つのCDRループを、図の一番上に示す。陰影が付いた円は、このmAbには見当たらない残基である。四角で囲まれたアミノ酸は、その位置での保存アミノ酸である。

【図18A-18B】抗体4.5の軽鎖(図18A)および重鎖(図18B)の可変ドメインのCollier Perles 2D表示である。この鎖の3つのCDRループを、図の一番上に示す。陰影が付いた円は、このmAbには見当たらない残基である。四角で囲まれたアミノ酸は、その位置での保存アミノ酸である。

【図19A-19D】抗体1.3が、インビボで、ヒトCD4+およびCD8+細胞を増殖させることを示す、細胞数対CFSEのフローサイトメトリーヒストグラムである。図19Aおよび19Cは、細胞数対対照抗体のlog蛍光を示す対照である。図19Bは、抗H7CR抗体1.3を用いる、CD4+細胞数対log蛍光を示す。図19Dは、抗H7CR抗体1.3を用いる、CD8+細胞数対log蛍光を示す。ハムスターIgGアイソタイプ対照(Biolegend)を、対照抗体として使用した。

【図20A-20H】図20A-20H。抗体1.3を注入したNGSマウスにおける、CD40L、IFN およびCD107aを発現する細胞の増加を示すフローサイトメトリー散布図である。図20Aは、無処理CD4+細胞のlog抗CD40L抗体蛍光対log抗CD3抗体蛍光を示す。図20Bは、抗H7CR抗体1.3で処理したCD4+細胞の抗CD40L抗体蛍光のlog蛍光対log抗CD3抗体蛍光を示す。図20Cは、無処理CD4+細胞における、抗IFN 抗体のlog蛍光対抗CD3抗体のlog蛍光を示す。図20Dは、抗H7CR抗体で処理したCD4+細胞における、IFN 抗体のlog蛍光対Hのlog蛍光を示す。図20Eは、無処理CD8+細胞のlog抗CD107a抗体蛍光対log抗CD3抗体蛍光を示す。図20Fは、抗H7CR抗体1.3で処理したCD8+細胞の抗CD107a抗体蛍光のlog蛍光対log抗CD3抗体蛍光を示す。図20Gは、無処理CD8+細胞における、抗IFN 抗体のlog蛍光対抗CD3抗体のlog蛍光を示す。図20Hは、抗H7CR抗体で処理したCD8+細胞における、IFN 抗体のlog蛍光対Hのlog蛍光を示す。

【図20E-20H】抗体1.3を注入したNGSマウスにおける、CD40L、IFN およびCD107aを発現する細胞の増加を示すフローサイトメトリー散布図である。図20Aは、無処理CD4+細胞のlog抗CD40L抗体蛍光対log抗CD3抗体蛍

光を示す。図20Bは、抗H7CR抗体1・3で処理したCD4+細胞の抗CD40L抗体蛍光のlog蛍光対log抗CD3抗体蛍光を示す。図20Cは、無処理CD4+細胞における、抗IFN 抗体のlog蛍光対抗CD3抗体のlog蛍光を示す。図20Dは、抗H7CR抗体で処理したCD4+細胞における、IFN 抗体のlog蛍光対Hのlog蛍光を示す。図20Eは、無処理CD8+細胞のlog抗CD107a抗体蛍光対log抗CD3抗体蛍光を示す。図20Fは、抗H7CR抗体1・3で処理したCD8+細胞の抗CD107a抗体蛍光のlog蛍光対log抗CD3抗体蛍光を示す。図20Gは、無処理CD8+細胞における、抗IFN 抗体のlog蛍光対抗CD3抗体のlog蛍光を示す。図20Hは、抗H7CR抗体で処理したCD8+細胞における、IFN 抗体のlog蛍光対Hのlog蛍光を示す。

10

【図21A - 21B】図21Aは、(左から右に)キメラマウス抗H7CR抗体(1・3)、陰性対照(対照Ig)、OKT3、OKT3+CD28、固定化キメラマウス抗H7CR抗体(1・3)、固定化陰性対照、および固定化OKT3で刺激した休止期ヒトPMBcにおけるIFN- (pg/mL)のドットプロットである。図22Bは、(左から右に)キメラマウス抗H7CR抗体(1・3)、陰性対照(対照Ig)、OKT3、OKT3+CD28、固定化キメラマウス抗H7CR抗体(1・3)、固定化陰性対照、および固定化OKT3で刺激した活性化PMBcにおけるIFN- のドットプロットである。図21Bは、10μg/mLの濃度で一晩、(左から右に)キメラマウス抗H7CR抗体(1・3)、陰性対照(対照Ig)、OKT3、OKT3+CD28、固定化キメラマウス抗H7CR抗体(1・3)、固定化陰性対照(対照Ig)、および固定化OKT3で

20

刺激した活性化PMBcにおけるIFN- (pg/mL)のドットプロットである。
【図22】1ng/mLのTNF および1μg/mLのPGE2で2日間成熟させた単球由来樹状細胞に対する、CFSE希釈T細胞のパーセントの棒グラフである。100ng/mLの破傷風トキソイドと共に2週間、樹状細胞をCFSE標識自己T細胞とインキュベートした。(左から右に)10μg/mLの可溶性対照IgG4、キメラマウス抗H7CR抗体(1・3)、および変異体V1-V14(表10を参照のこと)で細胞を処理した。

【図23】表示の重鎖および軽鎖を有する36種のヒト化H7CR4・5の一連のフローサイトメトリー散布図である。H7CR-GFP融合タンパク質をトランスフェクトされたCHO細胞と36種の変異体をインキュベートし、抗ヒトIg二次抗体で染色した。X軸はH7CR-GFP発現を示し、Y軸はトランスフェクタントへの変異体結合を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0027】

抗体、抗体のヒト化変異体およびそれらの抗原結合フラグメントと、B7-H7カウンター受容体であるH7CR(B7-H7CRおよびCD28Hとしても知られる)に免疫特異的に結合することができる他の分子、ならびに癌および他の疾患の処置および診断におけるそれらの使用が提供される。

【0028】

B7-H7は抗原提示細胞上に発現される；それは、マクロファージ上に構成的に発現され、樹状細胞上に誘導される。B7-H7は、カウンター受容体(H7CR)と相互作用して免疫系および免疫反応を刺激する(図1)。H7CRは特に、ナイーブT細胞、NK細胞および形質細胞様樹状細胞上に(特に脾臓、リンパ節および胸腺において)発現され、その発現は成熟細胞または活性化細胞上で下方制御される。H7CRのそうした下方制御は、インビボでの活性化/記憶T細胞の生存を損ない、正常個体における免疫系の静止状態に復帰させる。したがって、B7-H7とH7CRとの間の相互作用は、インビボにおける、ナイーブT細胞プライミングおよび活性化/記憶T細胞の生存にとって重要である。しかしながら、H7CRはまた、長期にわたって抗原に曝露された/消耗したT細胞で下方制御されると見られる。H7CRに結合することができるB7-H7 Igおよび抗H7CR抗体などの分子は、T細胞増殖およびサイトカイン産生のアゴニストとして機能することができる。こうした分子は、癌、感染症および不適切なT細胞反応を特徴

40

50

とする疾患の処置に有用である。逆に、B7-H7とH7CRとの間の相互作用を遮断することができる抗B7-H7抗体およびH7CR-Igなどの分子は、T細胞増殖およびサイトカイン産生のアンタゴニストとして機能する。こうした分子は、炎症および特に自己免疫疾患の処置に有用である。

【0029】

A. B7-H7

B7-H7は、アフリカツメガエル (*Xenopus*) B7-H4に顕著な相同性を示す遺伝子としてアフリカツメガエル (*Xenopus*) データベースの検索を通して発見された。B7-H4タンパク質は282個のアミノ酸残基を有し、このアミノ酸残基は、アミノ末端細胞外ドメイン、大きな疎水性膜貫通ドメイン、および非常に短い細胞内ドメイン(2個のアミノ酸残基のみからなる)を有するものとして分類されている。他のB7ファミリーメンバーと同様に、B7-H4は、その細胞外ドメインに1対のIg様領域を有する。B7-H4タンパク質は、I型膜貫通タンパク質の全体構造を有する。

【0030】

B7-H7アミノ酸配列は、機能が知られていなかった(Flajnik, M. F. et al. (2012) "Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC," *Immunogenetics* 64:571-590)、以前に発見されたヒト遺伝子のHHLA2 (human endogenous retrovirus-H long terminal repeat-associating protein 2 (HHLA2); Mager, D. L. et al. (1999) "Endogenous Retroviruses Provide The Primary Polyadenylation Signal For Two New Human Genes (HHLA2 And HHLA3," *Genomics* 59:255-263)に類似していることが分かった。

【0031】

ヒトB7-H7配列は、ニワトリ、オポッサム、有蹄哺乳動物(たとえば、ウマ、ブタ)、サケおよびサメにホモログがあることが見出されている。しかしながら、げっ歯類(マウスおよびラット)ではこれまでに偽遺伝子のみが同定されている。こうした遺伝子のアミノ酸配列は、あらゆる種で類似のドメイン構造を示し、Igスーパーファミリードメインの基準残基が保存されている。

【0032】

ヒトB7-H7ポリペプチドは、414アミノ酸長であり、以下のもの、すなわち、シグナル配列、細胞外ドメイン、3つの免疫グロブリン様(Ig様)ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを含有することが報告されている。特に、ヒトB7-H7ポリペプチドは、Ig様V型1ドメイン、Ig様C-1型ドメインおよびIg様V型2ドメインを含有することが報告されている。B7-H7の複数の天然変異体が存在する(たとえば、受託番号Q9UM44-1(ヒト(*homo sapiens*))、NP_009003(GI:5901964、ヒト(*homo sapiens*))およびAAD48396(GI:15726285、ヒト(*homo sapiens*)); 国際公開第2011/020024号パンフレットを参照のこと)。

【0033】

「ネイティブB7-H7」という用語は、未成熟形態、前駆形態および成熟形態を含む、任意の天然B7-H7アミノ酸配列をいう。B7-H7の成熟形態は、翻訳後修飾されたB7-H7タンパク質、たとえば、シグナルアミノ酸配列またはリーダーアミノ酸配列が切断されたB7-H7ポリペプチドを含む。代表的なヒトB7-H7、受託番号Q9UM44-1のアミノ酸配列は以下のとおりである(配列番号1):

【化 1】

MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLEDEDIILP
 SSFERGSEVV IHWKYQDSYK VHSYYKGSDH LESQDPRIAN RTSLFYNEIQ
 NGNASLFFRR VSLLEDEGIYT CYVGTAIQVI TNKVVLKVG V FLTPVMKYEK
 RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS ENNMEETGSL DSFSINSPLN
 ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS LSCQPVNDYF
 SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYYLSQQN TIINESRFSW NKELINQSD F
 SMNLMDLNLS DSGEYLCNIS SDEYTLTTH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL
 VPSAILAAFL LIWSVKCCRA QLEARSRHP ADGAQQERCC VPPGERCPSA
 PDNGEENVPL SGKV

10

【0034】

ヒトB7-H7は、インシリコ分析に基づいて、以下の予測されるドメイン、すなわち、配列番号1のアミノ酸残基1～22のシグナル配列、配列番号1のアミノ酸残基61～131のIg様V型1ドメイン、配列番号1のアミノ酸残基138～222のIg様C-1型ドメイン、配列番号1のアミノ酸残基235～328のIg様V型2ドメイン、および配列番号1のアミノ酸残基345～365の膜貫通ドメインを含有することが報告されている。ヒトB7-H7ポリペプチドに対して予測される二量体界面は、配列番号1のアミノ酸残基141～144、156、158、160、162、193～196、198、200、201、224および225である。ヒトB7-H7ポリペプチドに対して予測されるN連結糖鎖付加部位は、配列番号1のアミノ酸残基90、103および318である。ヒトB7-H7ポリペプチドの天然変異体としては、BOT、N344KおよびS346R(UniProt Q9UM44)が挙げられる(国際公開第2011/020024号パンフレットを参照のこと、この文献は、ヒトB7-H7の構造および配列のその教示のために、その内容全体を参照により本明細書に援用する)。

20

【0035】

ヒトB7-H7(配列番号1)をコードするDNA配列(配列番号2)は、以下のとおりである：

【化 2】

```

atgaaggcac agacagcact gtctttcttc ctcattctca taacatctct
gagtggatct caaggcatat tccctttggc tttcttcatt tatgttccta
tgaatgaaca aatcgtcatt ggaagacttg atgaagatat aattctccct
tcttcatttg agaggggatc cgaagtcgta atacactgga agtatcaaga
tagctataag gttcatagtt actacaaagg cagtgaccat ttggaaagcc
aagatcccag atatgcaaac aggacatccc ttttctataa tgagattcaa
aatgggaatg cgtcactatt tttcagaaga gtaagccttc tggacgaagg
aattttacacc tgctatgtag gaacagcaat tcaagtgatt acaaacaag
tgggtgctaaa ggtgggagtt tttctcacac ccgtgatgaa gtatgaaaag
aggaacacaa acagcttctt aatatgcagc gtgttaagtg tttatcctcg
tccaattatc acgtggaaaa tggacaacac acctatctct gaaaacaaca
tggaagaaac aggggtctttg gattcttttt ctattaacag cccactgaat
attacaggat caaattcatc ttatgaatgt acaattgaaa attcactgct
gaagcaaaca tggacagggc gctggacgat gaaagatggc cttcataaaa
tgcaaagtga acacgtttca ctctcatgtc aacctgtaaa tgattatttt
tcaccaaacc aagacttcaa agttacttgg tccagaatga aaagtgggac
tttctctgtc ctggcttact atctgagctc ctcacaaaat acaattatca
atgaatcccg attctcatgg aacaaagagc tgataaacca gagtgacttc
tctatgaatt tgatggatct taatctttca gacagtgggg aatatttatg
caatatttct tcggatgaat atactttact taccatccac acagtgcattg
tagaaccgag ccaagaaaca gcttcccata acaaaggctt atggattttg
gtgccctctg cgatttttggc agcttttctg ctgatttgga gcgtaaaatg
ttgcagagcc cagctagaag ccaggaggag cagacaccct gctgatggag
cccaacaaga aagatgttgt gtccctcctg gtgagcgctg tcccagtgca
cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag ta

```

10

20

【 0 0 3 6】

発現が広範囲にわたるヒト B 7 - H 4 とは対照的に、ヒト B 7 - H 7 は、発現が限定されている（たとえば、腸、腎臓、肺、上皮細胞およびリンパ球での発現）ことが見出されている。ヒト HHLA 2 は、B 7 . 1 および B 7 . 2 の近傍の染色体 3 q 1 3 . 3 3 上に見出されている。B 7 - H 7 は、マクロファージ上で構成的に発現され、樹状細胞（DC）上で誘導される。

30

【 0 0 3 7】

B . H 7 C R

本明細書で使用する場合、「ネイティブ H 7 C R」という用語は、B 7 - H 7 の任意の天然に存在するカウンター受容体をいう。H 7 C R はまた、B 7 - H 7 C R および CD 2 8 H と呼ばれる。H 7 C R は、T 細胞、NK 細胞および形質細胞様樹状細胞により発現される。ヒト H 7 C R ポリペプチドは、そうでなければ、文献 / データベース中で膜貫通および免疫グロブリンドメイン含有 2（TMIGD 2）と呼ばれるが（Rahimi, N . et al . (Epub 2012 Mar 14)「Identification Of IGPR - 1 As A Novel Adhesion Molecule Involved In Angiogenesis」Molec . Biol . Cell . 23 (9) : 1646 - 1656）、B 7 - H 7 C R の機能はこれまでに解明されなかった。こうしたネイティブ H 7 C R 分子のアミノ酸配列に対する受託番号の非限定例としては、以下のものが挙げられる：Q 9 6 B F 3 - 1（ヒト（homo sapiens））、Q 9 6 B F 3 - 2（ヒト（homo sapiens））、NP_653216 . 1（GI : 21389429 ; ヒト（homo sapiens））および NP_653216 . 2（GI : 281306838 ; ヒト（homo sapiens））。ネイティブ H 7 C R 分子の代表的なアミノ酸配列（Q 9 6 B F 3 - 2）を、配列番号 3 として以

40

50

下に示す：

【化 3】

```

MGSPGMVLGL LVQIWALQEA SSVSVQQGPN LLQVRQGSQA TLVCQVDQAT
AWERLRVKWT KDGAILCQPY ITNGSLSLGV CGPQGRLSWQ APSHLTLQLD
PVSLNHSGAY VCWAAVEIPE LEEAEGNITR LFVDPDDPTQ NNRRIASFPG
FLFVLLGVGS MGVAIVWGA WFWGRRSCQQ RDSGNSPGNA FYSNVLYRPR
GAPKKSEDCS GEGKDQRGQS IYSTSFQPA PRQPHLASRP CPSRPRCPSP
RPGHPVSMVR VSPRPSPTQQ PRPKGF PKVG EE

```

【0038】

10

ヒトH7CR（配列番号3）をコードするDNA配列（配列番号4）は、以下のとおりである。

【化 4】

```

atgggggtccc cgggcatggt gctgggcctc ctggtgcaga tctgggcctt
gcaagaagcc tcaagcctga gcgtgcagca ggggccaac ttgctgcagg
tgaggcaggg cagtcaggcg accctggtct gccagggtga ccaggccaca
gcctgggaac ggctccgtgt taagtggaca aaggatgggg ccctcctgtg
tcaaccgtac atcaccaacg gcagcctcag cctgggggtc tgcgggcccc
agggacggct ctcttggcag gcacccagcc atctcaccct gcagctggac
cctgtgagcc tcaaccacag cggggcgtag gtgtgctggg cggccgtaga
gattcctgag ttggaggagg ctgagggcaa cataacaagg ctctttgttg
accagatga cccacacag aacagaaacc ggatcgcaag ctcccagga
ttctcttctg tgetgctggg ggtgggaagc atgggtgttg ctgcgatcgt
gtgggggtgcc tgggttctggg gccgccgcag ctgccagcaa agggactcag
gtaacagccc aggaaatgca ttctacagca acgtcctata cgggccccgg
ggggcccca aagaagagtga ggactgctct ggagagggga aggaccagag
gggccagagc atttattcaa cctccttccc gcaaccggcc ccccgccagc
cgcacctggc gtcaagacc tgcgccagcc cgagaccctg cccagcccc
agggccggcc accccgtctc tatggtcagg gtctctccta gaccaagccc
caccagcag ccgaggccaa aagggttccc caaagtggga gaggag

```

20

30

【0039】

C．定義

本明細書で使用する場合、ある分子が第2の分子に「免疫特異的に結合する」ことができるとされるのは、そうした結合が抗体に対応する抗原に対して抗体の特異性および親和性を示す場合である。抗体が抗原（特に、抗原H7CR）の標的領域または立体構造（「エピトープ」）に「免疫特異的に結合する」ことができるとされるのは、そうした結合が免疫グロブリン分子の抗原認識部位を含む場合である。特定の抗原に免疫特異的に結合する抗体は、たとえば、イムノアッセイ、BIACORE（登録商標）アッセイまたは当該技術分野において公知の他のアッセイで判定して、他の抗原が抗原認識部位により認識される配列または立体構造に類似性のある程度有する場合、より低い親和性を持つ他の抗原に結合することもあるが、まったく無関係の抗原には結合しないと考えられる。ただし、抗体（およびその抗原結合フラグメント）は、他の抗原と交差反応しないことが好ましい。また、抗体は、Fc領域など、抗原認識部位を含まない分子の他の領域/ドメインの結合ドメインによって、免疫特異的でない形でFc受容体（FcR）など他の分子に結合することができる。

40

【0040】

結合または示された効果の文脈で使用する「実質的に」という用語は、観察された効果が生理学上または治療上意味があることを表すことを意図している。したがって、たとえば、遮断の程度が生理学上または治療上意味がある場合、分子はH7CRの活性を実質的

50

に遮断することができる(たとえば、そうした程度が、60%超完全、70%超完全、75%超完全、80%超完全、85%超完全、90%超完全、95%超完全、または97%超完全である場合)。同様に、ある分子が別の分子と実質的に同じ免疫特異性および/または特性を有するとされるのは、そうした免疫特異性および特性が、60%超同一、70%超同一、75%超同一、80%超同一、85%超同一、90%超同一、95%超同一、または97%超同一である場合である。

【0041】

本明細書で使用する場合、「被検体」という用語は、非霊長類(たとえば、雌ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラット等)および霊長類(たとえば、サルおよびヒト)、最も好ましくはヒトなど、哺乳動物を意味することを意図している。「患者」という用語は、診断、治療または予防を目的として、開示された組成物を投与される被験体を意味することを意図している。

10

【0042】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、「可変領域」抗原認識部位を有する免疫グロブリン分子を意味することを意図している。「可変領域」という用語は、免疫グロブリンのそうしたドメインと、抗体により広く共有されるドメイン(抗体のFcドメインなど)を区別することを意図している。可変領域は、その残基が抗原結合を担う「超可変領域」を含む。超可変領域は、「相補性決定領域」すなわち「CDR」のアミノ酸残基(すなわち、典型的には軽鎖可変ドメインの約24~34残基(L1)、50~56残基(L2)および89~97残基(L3)と、重鎖可変ドメインの約27~35残基(H1)、50~65残基(H2)および95~102残基(H3); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))および/または「超可変ループ」のアミノ酸残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの26~32(L1)残基、50~52(L2)残基および91~96(L3)残基と、重鎖可変ドメインの26~32(H1)、53~55(H2)および96~101(H3); Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917)を含む。「フレームワーク領域」すなわち「FR」残基は、本明細書で定義したような超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。抗体という用語は、モノクローナル抗体、多重特異的抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体(たとえば、Muyldermans et al., 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall et al., 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann and Muyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231:25; 国際公開第94/04678号パンフレットおよび国際公開第94/25591号パンフレット; 米国特許第6,005,079号明細書を参照)、一本鎖Fv(scFv)(たとえば、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、イントラボディおよび抗イデオタイプ(抗Id)抗体(たとえば、本明細書に開示される抗体に対する抗Idおよび抗-抗Id抗体)を含む。特に、そうした抗体は、任意の種類(たとえば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(たとえば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂)またはサブクラスの免疫グロブリン分子を含む。

20

30

40

【0043】

本明細書で使用する場合、抗体の「抗原結合フラグメント」という用語は、抗体の相補性決定領域(「CDR」と)、任意に抗体の「可変領域」抗原認識部位を含むフレームワーク残基とを含み、抗原に免疫特異的に結合する能力を示す抗体の1つまたは複数の部分

50

をいう。そうしたフラグメントは、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 、一本鎖 ($ScFv$) およびこれらのミュータント、天然変異体、ならびに抗体の「可変領域」抗原認識部位と異種タンパク質（たとえば、トキシン、別の抗原の抗原認識部位、酵素、受容体または受容体リガンド等）を含む融合タンパク質を含む。本明細書で使用する場合、「フラグメント」という用語は、少なくとも5個の連続するアミノ酸残基、少なくとも10個の連続するアミノ酸残基、少なくとも15個の連続するアミノ酸残基、少なくとも20個の連続するアミノ酸残基、少なくとも25個の連続するアミノ酸残基、少なくとも40個の連続するアミノ酸残基、少なくとも50個の連続するアミノ酸残基、少なくとも60個の連続するアミノ酸残基、少なくとも70個の連続するアミノ酸残基、少なくとも80個の連続するアミノ酸残基、少なくとも90個の連続するアミノ酸残基、少なくとも100個の連続するアミノ酸残基、少なくとも125個の連続するアミノ酸残基、少なくとも150個の連続するアミノ酸残基、少なくとも175個の連続するアミノ酸残基、少なくとも200個の連続するアミノ酸残基、または少なくとも250個の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドをいう。

10

【0044】

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

【0045】

20

ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いた上記のファージディスプレイ法など当該技術分野において公知の種々の方法により作製することができる（米国特許第4,444,887号明細書および同第4,716,111号明細書；ならびに国際公開第98/46645号パンフレット、国際公開第98/50433号パンフレット、国際公開第98/24893号パンフレット、国際公開第98/16654号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレット、国際公開第96/33735号パンフレットおよび国際公開第91/10741号パンフレットを参照）。ヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現できないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて製造してもよい。たとえば、ヒト重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子の複合体は、ランダムにまたは相同組換えによりマウス胚性幹細胞に導入することができる。あるいは、ヒト重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域をマウス胚性幹細胞に導入してもよい。マウス重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別に非機能的にしても、あるいは同時に非機能的にしてもよい。特に、 J_H 領域がホモ接合性に欠失すると、内因性抗体の産生が妨げられる。改変された胚性幹細胞は、増殖させ、胚盤胞に微量注入してキメラマウスを作製する。次いでキメラマウスを交配して、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を得る。このトランスジェニックマウスを、選択された抗原、たとえば、ポリペプチドの全部または一部で従来の方法を用いて免疫する。従来ハイブリドーマ技術を用いれば、免疫したトランスジェニックマウスから、抗原に対するモノクローナル抗体を得ることができる（たとえば、米国特許第5,916,771号明細書を参照）。トランスジェニックマウスが持つヒト免疫グロブリン導入遺伝子はB細胞分化において再編成し、その後クラススイッチおよび体細胞突然変異が起こる。このように、こうした技術を用いて、治療上有用なIgG抗体、IgA抗体、IgM抗体およびIgE抗体を作製することができる。このヒト抗体の作製に関する技術の概要については、L o n b e r g および H u s z a r（その全体を本明細書に援用する1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93）を参照されたい。このヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体に関する技術の詳細な考察と、そうした抗体を作製するためのプロトコルに関しては、たとえば、本明細書にその全体を援用する国際公開第98/24893号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレットおよび国際公開第96/33735号パンフレット；ならびに米国特許第5,413,923号明

30

40

50

細書、同第5,625,126号明細書、同第5,633,425号明細書、同第5,569,825号明細書、同第5,661,016号明細書、同第5,545,806号明細書、同第5,814,318号明細書および同第5,939,598号明細書を参照されたい。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) および Medarex (Princeton, NJ) などの会社は、上述の技術と同様の技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体の提供に従事している場合がある。

【0046】

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

【0047】

「ヒト化抗体」が当該技術分野において公知である(たとえば、欧州特許第239,400号明細書、欧州特許第592,106号明細書および欧州特許第519,596号明細書; 国際公開第91/09967号パンフレットおよび国際公開第93/17105号パンフレット; 米国特許第5,225,539号明細書、同第5,530,101号明細書、同第5,565,332号明細書、同第5,585,089号明細書、同第5,766,886号明細書および同第6,407,213号明細書; ならびに Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13:353-360; Morea et al., 2000, Methods 20:267-79; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-10684; Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9:895-904; Couto et al., 1995, Cancer Res. 55(23 Supp):5973s-5977s; Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22; Sandhu, 1994, Gene 150:409-10; Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-973; Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988, Nature 332:323-329; および Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596を参照されたい)。本明細書で使用

10

20

30

40

50

する場合、「ヒト化抗体」という用語は、ヒトフレームワーク領域および非ヒト（通常マウスまたはラット）免疫グロブリン由来の1つまたは複数のCDRを含む免疫グロブリンをいう。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンを「ドナー」と呼び、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンを「アクセプター」と呼ぶ。定常領域は存在しなくてもよいが、存在する場合、定常領域はヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85～90%、好ましくは約95%以上同一でなければならない。このため、おそらくCDRを除くヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。たとえば、ヒト化抗体は、典型的なキメラ抗体を包含しないと考えられる。たとえば、キメラ抗体の全可変領域は非ヒトであるためである。ドナー抗体は、「ヒト化」のプロセスにより「ヒト化」されてきた。得られるヒト化抗体が、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合すると予想されるからである。ほとんどの場合、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超可変領域残基が、非ヒト種（ドナー抗体）、たとえばマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類由来の、所望の特異性、親和性および能力を有する超可変領域残基で置き換えられている。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために施される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを実質的に全部含むもので、超可変領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンの超可変領域に対応し、FRの全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリン配列のFRである。また、ヒト化抗体は任意に、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはアミノ酸残基の置換、欠失または付加（すなわち、突然変異）の導入により変化したFcRIIBポリペプチドに免疫特異的に結合するヒト免疫グロブリンのFcの少なくとも一部を含む。

【0048】

ヒト抗体、キメラ抗体または抗ヒトH7CR抗体のヒト化誘導体は、ヒトにおけるインビボでの使用に特に好ましいものであるが、しかしながら、マウス抗体または他の種の抗体も多く用途（たとえば、インビトロまたはインサイツ検出アッセイ、インビボでの急性使用等）に有利に利用することができる。こうしたヒト抗体またはヒト化抗体は、1つまたは複数の非ヒトCDRにアミノ酸残基の置換、欠失または付加を含む。ヒト化抗体誘導体は、非誘導体ヒト化抗体に比較すると、結合が実質的に同じでも、結合がより強くても、あるいは結合がより弱くてもよい。特定の実施形態では、CDRの1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されている（すなわち、変異している）。完全なヒト抗体は、ヒト被験者の治療処置に特に望ましい。

【0049】

こうしたヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを用いたファージディスプレイ法など当該技術分野において公知の種々の方法により作製することができる（米国特許第4,444,887号明細書および同第4,716,111号明細書；ならびに国際公開第98/46645号パンフレット、国際公開第98/50433号パンフレット、国際公開第98/24893号パンフレット、国際公開第98/16654号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレット、国際公開第96/33735号パンフレットおよび国際公開第91/10741号パンフレットを参照）。こうしたヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現できないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて製造してもよい。たとえば、ヒト重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子の複合体は、ランダムにまたは相同組換えによりマウス胚性幹細胞に導入することができる。あるいは、ヒト重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域をマウス胚性幹細胞に導入してもよい。マウス重鎖および軽鎖の免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と別に非機能的にしても、あるいは同時に非機能的にしても

よい。特に、 J_H 領域がホモ接合性に欠失すると、内因性抗体の産生が妨げられる。改変された胚性幹細胞は、増殖させ、胚盤胞に微量注入してキメラマウスを作製する。次いでキメラマウスを交配して、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を得る。このトランスジェニックマウスを、選択された抗原、たとえば、ポリペプチドの全部または一部で従来の方法を用いて免疫する。従来のハイブリドーマ技術を用いれば、免疫したトランスジェニックマウスから、抗原に対するモノクローナル抗体を得ることができる（たとえば、米国特許第5,916,771号明細書を参照）。トランスジェニックマウスが持つヒト免疫グロブリン導入遺伝子はB細胞分化において再編成し、その後クラススイッチおよび体細胞突然変異が起こる。このように、こうした技術を用いて、治療上有用なIgG抗体、IgA抗体、IgM抗体およびIgE抗体を作製することができる。このヒト抗体の作製に関する技術の概要については、LonbergおよびHuszar（その全体を本明細書に援用する1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93）を参照されたい。このヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体に関する技術の詳細な考察と、そうした抗体を作製するためのプロトコールに関しては、たとえば、本明細書にその全体を援用する国際公開第98/24893号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレットおよび国際公開第96/33735号パンフレット；ならびに米国特許第5,413,923号明細書、同第5,625,126号明細書、同第5,633,425号明細書、同第5,569,825号明細書、同第5,661,016号明細書、同第5,545,806号明細書、同第5,814,318号明細書および同第5,939,598号明細書を参照されたい。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) および Medarex (Princeton, NJ) などの会社は、上述の技術と同様の技術を用いて、選択された抗原に対するヒト抗体の提供に従事している場合がある。

【0050】

開示された方法で使用される抗体は、単一特異性であり得る。H7CRに加えて免疫系の他の分子など異なる標的に特異性を示す二重特異性抗体、三重特異性抗体またはより多重性の抗体も対象となる。たとえば、そうした抗体は、H7CRと、抗体が特定の細胞型または組織を標的とするのに重要な抗原（たとえば、処置している腫瘍の癌抗原に関連する抗原）との両方に結合することができる。別の実施形態では、そうした多重特異性抗体は、B7-H7とH7CRとの両方に結合し、そうした分子を保有する細胞の結合を促進して、T細胞反応を促進する機能を果たす。そうした分子は、癌および感染症の処置に特に有用である。別の実施形態では、そうした多重特異性抗体は、CTLA4、TIM3、TIM4、OX40、CD40、GITR、4-1-BB、B7-H4、LIGHTまたはLAG3など、代替的または補足的免疫調節経路に関与する分子（受容体またはリガンド）に結合し、免疫調節効果を増強する。さらに、多重特異性抗体は、急性および慢性免疫反応の両方の調節に特に関係し得るエフェクター分子、たとえばサイトカイン（たとえば、IL-7、IL-15、IL-12、IL-4、TGF- β 、IL-10、IL-17、IFN γ 、Flt3、Blys）およびケモカイン（たとえば、CCL21）に結合してもよい。

【0051】

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

【0052】

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

【0053】

いくつかの実施形態では、抗体は、軽鎖と少なくとも重鎖の可変ドメインとの両方を含む。他の実施形態では、抗体は、重鎖のCH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域およびCH4領域の1つまたは複数をさらに含んでもよい。抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEなど免疫グロブリンの任意のクラス、ならびにIgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄などの任意のアイソタイプから選択することができる。いくつかの実施形態では、定常ドメインは補体結合定常ドメインであり、抗体が細胞障害活性を示し、クラスは典型的にはIgG₁であることが望ましい。そうした細胞障害活性が望ましくない他の実施形態では、定常ドメインはIgG₂クラスのものであってもよい。抗体は、2つ以上のクラスまたはアイソタイプ由来の配列を含んでもよく、所望のエフェクター機能を最適化する特定の定常ドメインを選択することは、当業者の技術の範囲である。

【0054】

特定の態様では、本開示は、Fc領域が、Kabatt（1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.）に示されるEU指数による番号付けの228、234、235および331からなる群から選択される、1つまたは複数の位置に少なくとも1つの修飾（たとえば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失）を含むFc変異体を提供する。一態様では、修飾は、Kabattに示されるEU指数による番号付けの228P、234F、235E、235F、235Yおよび331Sからなる群から選択される少なくとも1つの置換である。

【0055】

別の特定の態様では、本開示は、Fc領域がIgG4 Fc領域であり、かつこの領域がKabattに示されるEU指数による番号付けの228および235からなる群から選択される、1つまたは複数の位置に少なくとも1つの修飾を含むFc変異体を提供する。さらに別の特定の態様では、Fc領域がIgG4 Fc領域であり、かつ非天然アミノ酸が、Kabattに示されるEU指数による番号付けの228P、235Eおよび235Yからなる群から選択される。

【0056】

別の特定の態様では、本開示は、Fc領域が、Kabattに示されるEU指数による番号付けの239、330および332からなる群から選択される、1つまたは複数の位置に少なくとも1つの非天然アミノ酸を含むFc変異体を提供する。一態様では、修飾は、Kabattに示されるEU指数による番号付けの239D、330L、330Yおよび3

10

20

30

40

50

3 2 E からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換である。本明細書にその全体を援用する米国特許第 7 , 3 1 7 , 0 9 1 号明細書を参照されたい。

【 0 0 5 7 】

特定の態様では、本開示は、F c 領域が、K a b a t に示される E U 指数による番号付けの 2 5 2、2 5 4 および 2 5 6 からなる群から選択される、1 つまたは複数の位置に少なくとも 1 つの非天然アミノ酸を含む F c 変異体 1 を提供する。一態様では、修飾は、K a b a t に示される E U 指数による番号付けの 2 5 2 Y、2 5 4 T および 2 5 6 E からなる群から選択される少なくとも 1 つの置換である。本明細書にその全体を援用する米国特許第 7 , 0 8 3 , 7 8 4 号明細書を参照されたい。

【 0 0 5 8 】

特定の態様では、本開示は、F c 領域が、K a b a t に示される E U 指数による番号付けの位置 4 2 8 に非天然アミノ酸を含む F c 変異体を提供する。一態様では、K a b a t に示される E U 指数による番号付けの位置 4 2 8 における修飾は、4 2 8 T、4 2 8 L、4 2 8 F および 4 2 8 S からなる群から選択される。本明細書にその全体を援用する米国特許第 7 , 6 7 0 , 6 0 0 号明細書を参照されたい。別の態様では、F c 変異体は、K a b a t に示される E U 指数による番号付けの位置 4 3 4 に非天然アミノ酸をさらに含む。一態様では、K a b a t に示される E U 指数による番号付けの位置 4 3 4 における修飾は、4 3 4 A、4 3 4 S および 4 3 4 F からなる群から選択される。別の態様では、本開示は、F c 領域が、K a b a t に示される E U 指数による番号付けの位置 4 2 8 および 4 3 4 に非天然アミノ酸を含む F c 変異体を提供する。特定の態様では、F c 領域は 4 2 8 L、4 3 4 S を含む。米国特許第 8 , 0 8 8 , 3 7 6 号明細書を参照されたい。

【 0 0 5 9 】

ヒト化抗体のフレームワーク領域および C D R 領域は、親配列に正確に一致する必要はなく、たとえば、少なくとも 1 つの残基の置換、挿入または欠失により、ドナー C D R またはコンセンサスフレームワークに変異を誘発して、その部位の C D R 残基またはフレームワーク残基がコンセンサスあるいはドナー抗体に一致しないようにしてもよい。ただし、そうした突然変異は、好ましくは大規模なものではない。通常、ヒト化抗体残基は、親フレームワーク領域 (F R) 配列および C D R 配列の残基と少なくとも 7 5 %、より頻繁には 9 0 %、最も好ましくは 9 5 % 超一致する。ヒト化抗体は、当該技術分野において公知の様々な技術、以下に限定されるものではないが、C D R 移植法 (欧州特許第 2 3 9 , 4 0 0 号明細書 ; 国際公開第 9 1 / 0 9 9 6 7 号パンフレット ; ならびに米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号明細書、同第 5 , 5 3 0 , 1 0 1 号明細書および同第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号明細書)、ベニヤリング (v e n e e r i n g) またはリサーフィニング (r e s u r f a c i n g) (欧州特許第 5 9 2 , 1 0 6 号明細書および欧州特許第 5 1 9 , 5 9 6 号明細書 ; P a d l a n , 1 9 9 1 , M o l e c u l a r I m m u n o l o g y 2 8 (4 / 5) : 4 8 9 - 4 9 8 ; S t u d n i c k a e t a l . , 1 9 9 4 , P r o t e i n E n g i n e e r i n g 7 (6) : 8 0 5 - 8 1 4 ; および R o g u s k a e t a l . , 1 9 9 4 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 9 1 : 9 6 9 - 9 7 3)、鎖シャフリング (米国特許第 5 , 5 6 5 , 3 3 2 号明細書) および、たとえば、米国特許第 6 , 4 0 7 , 2 1 3 号明細書、同第 5 , 7 6 6 , 8 8 6 号明細書、同第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号明細書、国際公開第 9 3 1 7 1 0 5 号パンフレット、T a n e t a l . , 2 0 0 2 , J . I m m u n o l . 1 6 9 : 1 1 1 9 - 2 5 , C a l d a s e t a l . , 2 0 0 0 , P r o t e i n E n g . 1 3 : 3 5 3 - 6 0 , M o r e a e t a l . , 2 0 0 0 , M e t h o d s 2 0 : 2 6 7 - 7 9 , B a c a e t a l . , 1 9 9 7 , J . B i o l . C h e m . 2 7 2 : 1 0 6 7 8 - 8 4 , R o g u s k a e t a l . , 1 9 9 6 , P r o t e i n E n g . 9 : 8 9 5 - 9 0 4 , C o u t o e t a l . , 1 9 9 5 , C a n c e r R e s . 5 5 (2 3 S u p p) : 5 9 7 3 s - 5 9 7 7 s , C o u t o e t a l . , 1 9 9 5 , C a n c e r R e s . 5 5 : 1 7 1 7 - 2 2 , S a n d h u , 1 9 9 4 , G e n e 1 5 0 : 4 0 9 - 1 0 , P e d e r s e n e t a l . , 1 9 9 4 , J . M o l . B i o l . 2 3 5 : 9 5 9 - 7 3 , J o n e s e

10

20

30

40

50

t al., 1986, Nature 321: 522-525, Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323 および Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 に開示されている技術を用いて作製することができる。多くの場合、フレームワーク領域のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させる、好ましくは向上させるため、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換される。こうしたフレームワークの置換は、当該技術分野において周知の方法、たとえば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するための、CDR残基とフレームワーク残基との相互作用のモデル化、および特定の位置の特殊なフレームワーク残基を特定するための配列比較により確認される。(たとえば、Queen et al., 米国特許第5,585,089号明細書; 米国特許出願公開第2004/0049014号明細書および同第2003/0229208号明細書; 米国特許第6,350,861号明細書; 同第6,180,370号明細書; 同第5,693,762号明細書; 同第5,693,761号明細書; 同第5,585,089号明細書; および同第5,530,101号明細書、ならびに Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323 を参照)。

10

【0060】

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

20

30

【0061】

組換えキメラ抗体を作製するための例示的方法は、a) 従来の分子生物学法により、抗体重鎖をコードし発現する発現ベクターであって、マウス抗ヒトH7CRモノクローナル抗体のCDRおよび可変領域を、ヒト免疫グロブリンに由来するFc領域に融合した発現ベクターを構築することで、キメラ抗体重鎖発現用のベクターを作製すること; b) 従来の分子生物学法により、マウス抗ヒトH7CRモノクローナル抗体の抗体軽鎖をコードし発現する発現ベクターを構築することで、キメラ抗体軽鎖発現用のベクターを作製すること; c) 従来の分子生物学法により発現ベクターを宿主細胞に導入して、キメラ抗体発現用のトランスフェクトされた宿主細胞を作製すること; および d) キメラ抗体を産生するように、トランスフェクト細胞を従来の細胞培養技術により培養することを含んでもよい。

40

【0062】

組換えヒト化抗体を作製するための例示的方法は、a) 従来の分子生物学法により、抗ヒトH7CR重鎖をコードし発現する発現ベクターであって、ドナー抗体結合特異性の保持に必要とされているCDRおよび可変領域フレームワークの最小限の部分が非ヒト免疫グロブリン、たとえばマウス抗ヒトH7CRモノクローナル抗体に由来し、抗体の残りの部分がヒト免疫グロブリンに由来する発現ベクターを構築することで、ヒト化抗体重鎖の発現用のベクターを作製すること; b) 従来の分子生物学法により、抗体軽鎖をコードし

50

発現する発現ベクターであって、ドナー抗体結合特異性の保持に必要とされるCDRおよび可変領域フレームワークの最小限の部分が非ヒト免疫グロブリン、たとえばマウス抗ヒトH7CRモノクローナル抗体に由来し、抗体の残りの部分がヒト免疫グロブリンに由来する発現ベクターを構築することで、ヒト化抗体軽鎖発現用のベクターを作製すること；
c) 発現ベクターを従来の分子生物学法により宿主細胞に導入して、ヒト化抗体の発現用のトランスフェクトされた宿主細胞を作製すること；およびd) ヒト化抗体を産生するように、トランスフェクト細胞を従来の細胞培養技術により培養することを含んでもよい。

【0063】

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

【0064】

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

【0065】

開示される抗体の結合特性は、必要に応じて、そうした所望の特性を示す変異体をスクリーニングすることによりさらに改良してもよい。たとえば、そうした抗体は、当該技術分野において公知の様々なファージディスプレイ法を用いて作製することができる。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインがそれをコードするポリヌクレオチド配列を持つファージ粒子の表面上に提示される。特定の実施形態では、そうしたファージを利用して、レパトリまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（たとえば、ヒトまたはマウス）から発現した抗原結合ドメイン、たとえばFabおよびFvまたはジスルフィド結合安定化Fvを提示させてもよい。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、たとえば、標識抗原、あるいは、固体表面もしくはビーズに結合または捕捉された抗原を用いて選択または特定することができる。こうした方法に使用されるファージは典型的にはfdおよびM13などの繊維状ファージである。抗原結合ドメインは、ファージ遺伝子IIIタンパク質あるいはファージ遺伝子VIIタンパク質との組換え融合タンパク質として発現される。免疫グロブリンまたはそのフラグメントの製造に使用できるファージディスプレイ法の例として、Brinkman, U. et al. (1995) 「Phage Display Of Disulfide-Stabilized Fv Fragments」, J. Immunol. Methods, 182: 41-50, 1995; Ames, R.S. et al. (1995) 「Conversion Of Murine Fabs Isolated From A Combinatorial Phage Display Library To Full Length Immunoglobulins」, J. Immunol. Methods, 184: 177-186; Kettleborough, C.A. et al

. (1994) 「Isolation Of Tumor Cell - Specific Single - Chain Fv From Immunized Mice Using Phage - Antibody Libraries And The Reconstruction Of Whole Antibodies From These Antibody Fragments,」Eur. J. Immunol., 24: 952 - 958, 1994; Persic, L. et al. (1997) 「An Integrated Vector System For The Eukaryotic Expression Of Antibodies Or Their Fragments After Selection From Phage Display Libraries,」Gene, 187: 9 - 18; Burton, D. R. et al. (1994) 「Human Antibodies From Combinatorial Libraries,」Adv. Immunol. 57: 191 - 280; 国際公開第92/001047号パンフレット; 国際公開第90/02809号パンフレット; 国際公開第91/10737号パンフレット; 国際公開第92/01047号パンフレット; 国際公開第92/18619号パンフレット; 国際公開第93/11236号パンフレット; 国際公開第95/15982号パンフレット; 国際公開第95/20401号パンフレット; および米国特許第5,698,426号明細書; 同第5,223,409号明細書; 同第5,403,484号明細書; 同第5,580,717号明細書; 同第5,427,908号明細書; 同第5,750,753号明細書; 同第5,821,047号明細書; 同第5,571,698号明細書; 同第5,427,908号明細書; 同第5,516,637号明細書; 同第5,780,225号明細書; 同第5,658,727号明細書; 同第5,733,743号明細書および同第5,969,108号明細書に開示されているものがある。

【0066】

上記の参考文献に記載されているように、ファージの選択後、抗体をコードする領域をファージから単離し、これを使用して全抗体、たとえばヒト化抗体または他の任意の所望のフラグメントを作製し、たとえば、以下に詳述するように所望の宿主、たとえば哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌で発現させることができる。また、たとえば、当該技術分野において公知の方法により、Fabフラグメント、Fab'フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントを組換えにより作製する技術を利用してよい(たとえば国際公開第92/22324号パンフレット; Mullinax, R. L. et al. (1992) 「Expression Of A Heterodimeric Fab Antibody Protein In One Cloning Step,」BioTechniques, 12(6): 864 - 869; および Sawai et al. (1995) 「Direct Production Of The Fab Fragment Derived From The Sperm Immobilizing Antibody Using Polymerase Chain Reaction And cDNA Expression Vectors,」Am. J. Reprod. Immunol. 34: 26 - 34; および Better, M. et al. (1988) 「Escherichia coli Secretion Of An Active Chimeric Antibody Fragment,」Science 240: 1041 - 1043に開示されている方法)。一本鎖Fvおよび抗体の作製に使用できる技術の例として、米国特許第4,946,778号明細書および同第5,258,498号明細書; Huston, J. S. et al. (1991) 「Protein Engineering Of Single - Chain Fv Analogs And Fusion Proteins,」Methods in Enzymology 203: 46 - 88; Shu, L. et al., 「Secretion Of A Single - Gene - Encoded Immunoglobulin From Myeloma Cells,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90: 7995 - 7999; および Skerra, A. et al. (1

10

20

30

40

50

988)「Assembly Of A Functional Immunoglobulin Fv Fragment In Escherichia coli,」Science 240:1038-1040に記載されているものが挙げられる。

【0067】

ファージディスプレイ技術は、H7CRに対する開示される抗体の親和性を高めるために使用してもよい。この技術は、コンビナトリアル法に使用し得る高親和性抗体を得るのに有用であると考えられる。この技術は、親和性成熟と呼ばれ、変異誘発またはCDRウォーキング、およびそうした受容体もしくはリガンド（またはそれらの細胞外ドメイン）またはその抗原性フラグメントを用いた再選択を利用して、最初の抗体または親抗体と比較すると、より高い親和性で抗原に結合する抗体を特定する（たとえば、Glaser, S.M. et al. (1992)「Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System,」J. Immunol. 149:3903-3913を参照）。単一のヌクレオチドではなく全コドンに変異を誘発すると、アミノ酸突然変異をセミランダムに導入したレパートリーが得られる。各々が単一のCDRに単一のアミノ酸変化を含み、かつCDR残基ごとに可能なそれぞれのアミノ酸置換を示す変異体を含む、変異体クローンのプールからなるライブラリーを構築してもよい。抗原に対する結合親和性が増加したミュータントは、固定化したミュータントを標識抗原と接触させることによりスクリーニングすることができる。当該技術分野において公知の任意のスクリーニング法を用いれば、抗原に対するアビディティーが向上したミュータント抗体を特定することができる（たとえば、ELISA）（たとえば、Wu, H. et al. (1998)「Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3-Specific Humanized Mab,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95(11):6037-6042; Yelton, D.E. et al. (1995)「Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis,」J. Immunol. 155:1994-2004を参照されたい）。軽鎖にランダム変異を導入するCDRウォーキングを使用してもよい（Schier et al. (1996)「Isolation Of Picomolar Affinity Anti-C-ErbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site,」J. Mol. Biol. 263:551-567を参照）。

【0068】

ランダム変異誘発はまた、改良されたCDRを特定するために使用することができる。あるいは、ファージディスプレイ技術を、CDR親和性を増加（または減少）させるために使用することができる。この技術は、親和性成熟と呼ばれ、変異誘発または「CDRウォーキング」、および標的抗原もしくはその抗原性フラグメントを用いた再選択を利用して、最初の抗体または親抗体と比較すると、より高い（またはより低い）親和性で抗原に結合するCDRを有する抗体を特定する（たとえば、Glaser, S.M. et al. (1992)「Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System,」J. Immunol. 149:3903-3913を参照）。単一のヌクレオチドではなく全コドンに変異を誘発すると、アミノ酸突然変異をセミランダムに導入したレパートリーが得られる。各々が単一のCDRに単一のアミノ酸変化を含み、かつCDR残基ごとに可能なそれぞれのアミノ酸置換を示す変異体を含む、変異体クローンのプールからなるライブラリーを構築してもよい。抗原に対する結合親和性が増加（または減少）したミュータントは、固定化したミュータントを標識抗原と接触させ

10

20

30

40

50

ることによりスクリーニングすることができる。当該技術分野において公知の任意のスクリーニング法を用いれば、抗原に対するアビディティが向上（低下）したミュータント抗体を特定することができる（たとえば、ELISA）（Wu, H. et al. (1998) 「Stepwise In Vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An Alphav Beta3 - Specific Humanized Mab,」 Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95 (11): 6037 - 6042; Yelton, D. E. et al. (1995) 「Affinity Maturation Of The BR96 Anti - Carcinoma Antibody By Codon - Based Mutagenesis,」 J. Immunol. 155: 1994 - 2004を参照されたい）。軽鎖にランダム変異を導入するCDRウォーキングを使用してもよい（Schier et al. (1996) 「Isolation Of Picomolar Affinity Anti - C - ErbB - 2 Single - Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site,」 J. Mol. Biol. 263: 551 - 567を参照）。

【0069】

そうした親和性成熟を達成するための方法は、たとえば、Krause, J. C. et al. (2011) 「An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody,」 MBio. 2(1) pii: e00345 - 10. doi: 10.1128/mbio.00345 - 10; Kuan, C. T. et al. (2010) 「Affinity - Matured Anti - Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas,」 Int. J. Cancer 10.1002/ijc.25645; Hackel, B. J. et al. (2010) 「Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes,」 J. Mol. Biol. 401(1): 84 - 96; Montgomery, D. L. et al. (2009) 「Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV - 1 gp41,」 MAbs 1(5): 462 - 474; Gustchina, E. et al. (2009) 「Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR - H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled - Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV - 1 Neutralization Potency And Breadth,」 Virology 393(1): 112 - 119; Finlay, W. J. et al. (2009) 「Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti - RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity - Determining Regions,」 J. Mol. Biol. 388(3): 541 - 558; Bostrom, J. et al. (2009) 「Improving Antibody Binding Affinity A

10

20

30

40

50

nd Specificity For Therapeutic Development,」Methods Mol. Biol. 525:353-376; Steidl, S. et al. (2008)「In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification,」Mol. Immunol. 46(1):135-144; および Barderas, R. et al. (2008)「Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling,」Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26):9029-9034に記載されている。

【0070】

10

上記抗体およびその抗原結合フラグメントのいずれかの「誘導体」の作製および使用もまた提供される。

【0071】

「誘導体」という用語は、抗原に免疫特異的に結合するが、「親」（または野生型）分子に対して1、2、3、4、5またはそれを上回るアミノ酸の置換、付加、欠失または修飾を含む抗体またはその抗原結合フラグメントをいう。そうしたアミノ酸の置換または付加は、天然の（すなわち、DNAによりコードされた）アミノ酸残基を導入しても、あるいは非天然のアミノ酸残基を導入してもよい。「誘導体」という用語は、たとえば、抗体1、3、4、5または7、8のいずれかのキメラ変異体またはヒト化変異体、ならびに例えばエフェクター特性または結合特性が増強または障害された変異Fc領域を有する抗体等を形成させるように改変されたCH1、ヒンジ、CH2、CH3またはCH4の領域を有する変異体を包含する。「誘導体」という用語は、非アミノ酸修飾、たとえば、グリコシル化（たとえば、マンノース、2-N アセチルグルコサミン、ガラクトース、フクトース（fucose）、グルコース、シアル酸、5-N -アセチルノイラミン酸、5-グリコルノイラミン酸等の含量の変更）、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結等を施し得るアミノ酸をさらに包含する。

20

いくつかの実施形態では、変化させた糖鎖修飾により、抗体の可溶化、細胞内輸送および抗体の分泌の促進、抗体形成の促進、立体構造の安定性および抗体のエフェクター機能のうち1つまたは複数が調節される。特定の実施形態では、変化させた糖鎖修飾により、糖鎖修飾がない抗体と比較して抗体のエフェクター機能が増強される。抗体のエフェクター機能を変化させる糖鎖修飾は、当該技術分野において周知である（たとえば、Shields, R. L. et al. (2002)「Lack Of Fucose On Human IgG N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human FcγRIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity,」J. Biol. Chem. 277(30):26733-26740; Davies J. et al. (2001)「Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In ADCC Through Higher Affinity For FCγRIII,」Biotechnology & Bioengineering 74(4):288-294を参照）。糖鎖量を変化させる方法は当業者に公知であり、たとえば、Wallick, S. C. et al. (1988)「Glycosylation Of A VH Residue Of A Monoclonal Antibody Against Alpha(1-6) Dextran Increases Its Affinity For Antigen,」J. Exp. Med. 168(3):1099-1109; Tao, M. H. et al. (1989)「Studies Of Aglycosylated Chimeric Mouse-Human Ig

30

40

50

G . R o l e O f C a r b o h y d r a t e I n T h e S t r u c t u r e
A n d E f f e c t o r F u n c t i o n s M e d i a t e d B y T h e H
u m a n I g G C o n s t a n t R e g i o n , 」 J . I m m u n o l . 1 4 3 (8) : 2 5 9 5 - 2 6 0 1 ; R o u t l e d g e , E . G . e t a l . (1 9 9 5) 「
T h e E f f e c t O f A g l y c o s y l a t i o n O n T h e I m m u
n o g e n i c i t y O f A H u m a n i z e d T h e r a p e u t i c C D
3 M o n o c l o n a l A n t i b o d y , 」 T r a n s p l a n t a t i o n 6
0 (8) : 8 4 7 - 5 3 ; E l l i o t t , S . e t a l . (2 0 0 3) 「 E n h a n
c e m e n t O f T h e r a p e u t i c P r o t e i n I n V i v o A c
t i v i t i e s T h r o u g h G l y c o e n g i n e e r i n g , 」 N a t u r
e B i o t e c h n o l . 2 1 : 4 1 4 - 2 1 ; S h i e l d s , R . L . e t a l .
(2 0 0 2) 「 L a c k O f F u c o s e O n H u m a n I g G N - L i
n k e d O l i g o s a c c h a r i d e I m p r o v e s B i n d i n g T o
H u m a n F c g a m m a R I I I A n d A n t i b o d y - D e p e n d e
n t C e l l u l a r T o x i c i t y . , 」 J . B i o l . C h e m . 2 7 7 (3
0) : 2 6 7 3 3 - 2 6 7 4 0) を参照されたい。

【 0 0 7 2 】

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

【 0 0 7 3 】

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

【 0 0 7 4 】

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

傷害 (A D C C) 活性の変化、C 1 q 結合活性の変化、補体依存性細胞傷害活性 (C D C) の変化、食作用活性、またはこれらの任意の組み合わせを有する。

【 0 0 7 5 】

誘導体化抗体を用いて、哺乳動物、好ましくはヒトにおける親抗体の半減期 (たとえば、血清中半減期) を変化させてもよい。好ましくは、そうした変化の結果、半減期は 1 5 日を超える、好ましくは 2 0 日を超える、2 5 日を超える、3 0 日を超える、3 5 日を超える、4 0 日を超える、4 5 日を超える、2 ヶ月を超える、3 ヶ月を超える、4 ヶ月を超える、または 5 ヶ月を超える。哺乳動物、好ましくはヒトにおける、ヒト化抗体またはそのフラグメントの半減期の延長の結果、哺乳動物における前記抗体または抗体フラグメントの血清中力価が上昇し、したがって、前記抗体または抗体フラグメントの投与頻度が減少する、および/または、投与される前記抗体または抗体フラグメントの濃度が低下する。インビボ半減期を延長した抗体またはそのフラグメントは、当業者に公知の技術により作製することができる。たとえば、インビボ半減期を延長した抗体またはそのフラグメントは、F c ドメインと F c R n 受容体との間の相互作用に関与すると判定されたアミノ酸残基を修飾する (たとえば、置換、欠失または付加する) ことにより作製することができる。ヒト化抗体は、生物学的半減期を延長するように操作してもよい (たとえば米国特許第 6 , 2 7 7 , 3 7 5 号明細書を参照)。たとえば、ヒト化抗体は、F c - ヒンジドメインにおいてインビボまたは血清中半減期を延長するように操作してもよい。

10

【 0 0 7 6 】

インビボ半減期を延長した抗体またはそのフラグメントは、前記抗体または抗体フラグメントにポリマー分子、たとえば高分子量ポリエチレングリコール (P E G) を結合することにより作製することができる。P E G は、多機能リンカーを用いてあるいは用いずに、前記抗体または抗体フラグメントの N 末端または C 末端にあるいはリジン残基上にある - アミノ基を介して、P E G を部位特異的にコンジュゲートすることにより前記抗体または抗体フラグメントに結合することができる。生物活性の低下を最小限にとどめる直鎖または分岐ポリマー誘導体化を使用する。コンジュゲーションの程度は、S D S - P A G E および質量分析法により詳細にモニターして、P E G 分子の抗体への適切なコンジュゲーションを確かなものにする。未反応 P E G は、たとえば、サイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーにより抗体 - P E G コンジュゲートから分離することができる。

20

【 0 0 7 7 】

また、抗体は、実質的に免疫原性反応を伴わない、哺乳動物の循環系に注入してもよい組成物を得るため、D a v i s e t a l . (米国特許第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号明細書を参照) に記載された方法およびカップリング剤により修飾してもよい。

30

【 0 0 7 8 】

ヒト化抗体のフレームワーク残基は修飾され得る。フレームワーク領域のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させる、好ましくは向上させるため、C D R ドナー抗体由来の対応する残基で置換してもよい。こうしたフレームワークの置換は、当該技術分野において周知の方法、たとえば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定するための、C D R 残基とフレームワーク残基との相互作用のモデル化、および特定の位置の特殊なフレームワーク残基を特定するための配列比較により確認される。(たとえば、米国特許第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号明細書; および R i e c h m a n n , L . e t a l . (1 9 8 8) 「R e s h a p i n g H u m a n A n t i b o d i e s F o r T h e r a p y , 」N a t u r e 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 7 を参照)。

40

【 0 0 7 9 】

異種分子 (すなわち、無関係の分子) に組換え技術で融合させたまたは化学的にコンジュゲートした (共有結合および非共有結合の両方) 抗ヒト H 7 C R 抗体 (一層好ましくは、ヒト化抗体) およびその抗原結合フラグメントもまた提供される。融合は、必ずしも直接でなくてもよく、リンカー配列を介して行ってもよい。

【 0 0 8 0 】

一実施形態では、そうした異種分子は、少なくとも 1 0 個のアミノ酸、少なくとも 2 0

50

個のアミノ酸、少なくとも30個のアミノ酸、少なくとも40個のアミノ酸、少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも60個のアミノ酸、少なくとも70個のアミノ酸、少なくとも80個のアミノ酸、少なくとも90個のアミノ酸または少なくとも100個のアミノ酸を有するポリペプチドである。あるいは、そうした異種分子は、酵素でも、ホルモンでも、細胞表面受容体でも、薬剤部分、たとえば、トキシン（たとえばアブリン、リシンA、シュードモナス（*Pseudomonas*）外毒素（すなわち、PE-40）、ジフテリア毒素、リシン、ゲロニンもしくはアメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質）、タンパク質（たとえば腫瘍壊死因子、インターフェロン（たとえば、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン）、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子またはアポトーシス剤（たとえば、腫瘍壊死因子- α 、腫瘍壊死因子- β ）、生物学的応答調節剤（たとえば、リンホカイン（たとえば、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）もしくはマクロファージコロニー刺激因子、（「M-CSF」）、または増殖因子（たとえば、成長ホルモン（「GH」））、細胞毒（たとえば、細胞増殖抑制剤もしくは殺細胞薬、たとえばパクリタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにこれらのアナログまたはホモログ）、代謝拮抗薬（たとえば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（たとえば、メクロレタミン、チオエバクロラムブシル、メルファラン、BiCNU（登録商標）（カルムスチン；BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびシスジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（たとえば、ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）およびドキシソルピシン）、抗生物質（たとえば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（AMC））、または有糸分裂阻害薬（たとえば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）でもよい。

【0081】

そうした治療部分を抗体にコンジュゲートする技術は、よく知られている。たとえば、Arnon et al., 「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Reisfeld et al. (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., 「Antibodies For Drug Delivery」, in CONTROLLED DRUG DELIVERY (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、MONOCLONAL ANTIBODIES '84: BIOLOGICAL AND CLINICAL APPLICATIONS, Pinchera et al. (eds.), 1985, pp. 475-506); 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER DETECTION AND THERAPY, Baldwin et al. (eds.

), 1985, pp. 303 - 16, Academic Press; および Thorpe et al. (1982) 「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody - Toxin Conjugates」、Immunol. Rev. 62: 119 - 158 を参照されたい。

【0082】

一実施形態では、抗体または融合分子はFc部分を含む。そうした分子のFc部分は、たとえばエフェクター機能、半減期の制御、組織への到達性の向上のため、安定性などの生物物理学的特徴の増強のため、さらに製造効率の改善（および費用削減）のため、アイソタイプまたはサブクラスが異なってもよいし、キメラまたはハイブリッドでもよいし、および/または、修飾してもよい。開示された融合タンパク質の構築に有用な多くの修飾、およびそれを行う方法については当該技術分野において公知であり、たとえば Mueller, J. P. et al. (1997) 「Humanized Porcine V CAM - Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric IgG2/G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells,」 Mol. Immun. 34(6): 441 - 452、Swann, P. G. (2008) 「Considerations For The Development Of Therapeutic Monoclonal Antibodies,」 Curr. Opin. Immun. 20: 493 - 499 (2008)、および Presta, L. G. (2008) 「Molecular Engineering And Design Of Therapeutic Antibodies,」 Curr. Opin. Immun. 20: 460 - 470 を参照されたい。いくつかの実施形態では、Fc領域は天然のIgG1、IgG2またはIgG4のFc領域である。いくつかの実施形態では、Fc領域はハイブリッド、たとえばIgG2/IgG4のFc定常領域からなるキメラである。Fc領域の修飾には、Fc受容体および補体への結合を防止するように修飾されたIgG4、1つまたは複数のFc受容体への結合を改善するように修飾されたIgG1、エフェクター機能を最小限に抑えるように修飾されたIgG1（アミノ酸変化）、グリカンを変化させた/含まないIgG1（典型的には発現宿主の変更による）、およびFcRnへのpH依存性結合を変化させたIgG1、および安定性を増強するためにヒンジ領域のアミノ酸残基番号228のセリンをプロリンに変化させた（S228P）IgG4があるが、これに限定されるものではない。Fc領域は全ヒンジ領域を含むことも、あるいは全ヒンジ領域より小さい領域を含むこともある。

【0083】

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

【0084】

別の実施形態は、FcRへの結合を抑制してあるIgG2-4ハイブリッドおよびIgG4ミュータントを含み、それらの半減期が延長される。代表的なIgG2-4ハイブリッドおよびIgG4ミュータントについては、Angal, S. et al. (1993) 「A Single Amino Acid Substitution Abolishes The Heterogeneity Of Chimeric Mouse/Human (IgG4) Antibody,」 Molec. Immunol. 30(1)

: 105 - 108 ; Mueller , J . P . et al . (1997) 「 Humanized Porcine VCAM - Specific Monoclonal Antibodies With Chimeric IgG2 / G4 Constant Regions Block Human Leukocyte Binding To Porcine Endothelial Cells , 」 Mol . Immun . 34 (6) : 441 - 452 ; および米国特許第 6 , 982 , 323 号明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、IgG1ドメインおよび/またはIgG2ドメインを欠失する。たとえば、Angal , s . et al . は、プロリンで置換したセリン241を有するIgG1およびIgG2について記載している。

【0085】

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

【0086】

精製しやすくするため、記載される分子のいずれかをペプチドなどのマーカー配列に融合してもよい。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、ヘキサ - ヒスチジンペプチド、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに相当するヘマグルチニン「HA」タグ (Wilson , I . A . et al . (1984) 「 The Structure Of An Antigenic Determinant In A Protein , 」 Cell , 37 : 767 - 778) および「flag」タグ (Knappik , A . et al . (1994) 「 An Improved Affinity Tag Based On The FLAG Peptide For The Detection And Purification Of Recombinant Antibody Fragments , 」 Biotechniques 17 (4) : 754 - 761) である。

【0087】

抗体またはその抗原結合フラグメントは、診断薬もしくは治療薬、または血清中半減期が延長されると望ましいいずれかの他の分子にコンジュゲートし得る。この抗体は、たとえば、臨床試験手順の一部として疾患、障害または感染症の発症または進行をモニターするため診断 (インビボ、インサイツまたはインビトロでの) に使用して、たとえば、特定の処置レジメンの有効性を判定してもよい。

抗体を検出可能な物質に結合することで検出を行いやすくすることができる。検出可能な物質の例として、様々な酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性物質、ポジトロン放出金属および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。検出可能な物質は、当該技術分野において公知の技術を用いて抗体に直接結合またはコンジュゲート

10

20

30

40

50

しても、あるいは、中間体（たとえば、当該技術分野において公知のリンカー）を介して間接的に結合またはコンジュゲートしてもよい。たとえば、診断で使用される抗体にコンジュゲートできる金属イオンに関する米国特許第4,741,900号明細書を参照されたい。そうした診断および検出は、以下に限定されるものではないが、様々な酵素、以下に限定されるものではないが、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、

- ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼなどの酵素；以下に限定されるものではないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどの補欠分子族複合体；以下に限定されるものではないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンなどの蛍光材料；以下に限定されるものではないが、ルミノールなどの発光材料；以下に限定されるものではないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンなどの生物発光材料；以下に限定されるものではないが、ビスマス(^{213}Bi)、炭素(^{14}C)、クロム(^{51}Cr)、コバルト(^{57}Co)、フッ素(^{18}F)、ガドリニウム(^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、ゲルマニウム(^{68}Ge)、ホルミウム(^{166}Ho)、インジウム(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、ヨウ素(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、ランタン(^{140}La)、ルテチウム(^{177}Lu)、マンガン(^{54}Mn)、モリブデン(^{99}Mo)、パラジウム(^{103}Pd)、リン(^{32}P)、プラセオジウム(^{142}Pr)、プロメチウム(^{149}Pm)、レニウム(^{186}Re 、 ^{188}Re)、ロジウム(^{105}Rh)、ルテミウム(^{97}Ru)、サマリウム(^{153}Sm)、スカンジウム(^{47}Sc)、セレン(^{75}Se)、ストロンチウム(^{85}Sr)、硫黄(^{35}S)、テクネチウム(^{99}Tc)、タリウム(^{201}Tl)、スズ(^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、トリチウム(^3H)、キセノン(^{133}Xe)、イッテルビウム(^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、イットリウム(^{90}Y)、亜鉛(^{65}Zn)などの放射性物質；様々なポジトロン断層法を用いたポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンなどの検出可能な物質に抗体を結合することにより達成することができる。

【0088】

米国特許第4,676,980号明細書でSegalにより記載されたように、分子を第2の抗体にコンジュゲートして抗体のヘテロコンジュゲートを形成してもよい。そうしたヘテロコンジュゲート抗体はさらに、ハプテン（たとえばフルオレセイン等）に結合しても、あるいは細胞マーカー（たとえば、4-1-BB、B7-H4、B7-H7、CD4、CD8、CD14、CD25、CD27、CD40、CD68、CD163、CTLA4、GITR、LAG-3、OX40、TIM3、TIM4、TLR2、LIGHT等）に結合しても、あるいはサイトカイン（たとえば、IL-7、IL-15、IL-12、IL-4、TGF- β 、IL-10、IL-17、IFN γ 、Flt3、Blys）に結合しても、あるいはケモカイン（たとえば、CCL21）等に結合してもよい。

【0089】

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

【0090】

任意のそうした抗体、融合タンパク質またはフラグメントをコードする核酸分子(DNAまたはRNA)、ならびにそうした核酸分子の送達または複製、および細胞株中でのそうした抗体、融合タンパク質またはフラグメントの発現を可能にするベクター分子も提供される。核酸は、一本鎖でも、二本鎖でもよく、一本鎖部分と二本鎖部分の両方を含んでも構わない。

【0091】

D. 好ましいモジュレーター組成物

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、「調節する」という用語は、ある作用または結果を変化させる能力に関する。特に、抗ヒトH7CR抗体のヒト化変異体、またはヒトH7CRに免疫特異的に結合する、抗体の任意の抗原結合フラグメント、もしくはH7CRに生化学特異的に結合する分子は、H7CRとその対応するリガンドとの間の結合を調節すること、および/またはH7CR-対応リガンド結合の結果として生じるシグナル伝達を調節することを可能にする。

【0092】

抗体は、H7CRを促進するアゴニスト抗体であってもよい。促進する抗体は、H7CRに結合してH7CRを介するシグナル伝達を刺激することができる。

【0093】

一実施形態では、抗体もしくはそのフラグメント、または融合分子は、H7CRに免疫特異的に結合するが、インビトロまたはレシピエント被験体または患者において、H7CRのB7-H7との相互作用を実質的に遮断することができない。本明細書で使用する場合、「H7CRのB7-H7との相互作用を実質的に遮断することができない」分子とは、本明細書に開示された任意のアッセイで測定した場合に、そうした分子の存在によって、H7CR-B7-H7相互作用が、50%未満、一層好ましくは40%未満、さらに一層好ましくは30%未満、さらに一層好ましくは20%未満、さらに一層好ましくは10%未満、さらに一層好ましくは5%未満、さらに一層好ましくは1%未満減弱されること、および最も好ましくはそうした相互作用が全く減弱されないことを意味する。そうした抗体、フラグメントおよび融合分子は、治療薬として、またはH7CR（またはB7-H7）発現に対する診断的アッセイ、細胞学的アッセイおよび組織学的アッセイにおいて特に有用である。加えて、多重特異性抗H7CR抗体、抗H7CR抗原結合フラグメント、およびB7-H7または他の細胞リガンドもしくは受容体に結合する追加の能力を有するそれらそれぞれの融合生成物は、そうしたリガンドまたは受容体を発現する細胞とH7CRを発現する細胞との共同在化を促進するのに特に有用である。

【0094】

第2の実施形態では、抗体もしくはそのフラグメント、または融合分子は、H7CRに免疫特異的に結合し、インビトロまたはレシピエント被験体または患者において、H7CRのB7-H7との相互作用を実質的に遮断することができる。本明細書で使用する場合、「H7CRのB7-H7との相互作用を実質的に遮断することができる」分子とは、本明細書に開示される任意のアッセイで測定した場合に、そうした分子の供給によって、H7CR-B7-H7相互作用が、50%超、一層好ましくは60%超、70%超、80%超、90%超、95%超、99%超減弱されること、または最も好ましくはそうした相互作用が完全に減弱されることを意味する。こうした抗体、フラグメントおよび融合分子は、B7-H7-H7CR相互作用の生物学的効果を減弱するのに特に有用である。

【0095】

好ましい実施形態は、ヒト化抗体およびフラグメント、またはヒト抗体およびフラグメントを提供する。

【0096】

最も好ましくは、そうした分子は、被験体の細胞の表面上に内因性濃度で発現した場合に、H7CRに結合するのに十分な親和性およびアビディティを有する。「内因性濃度」という用語は、正常細胞、癌細胞、または病原体感染細胞で、分子が本来（すなわち、発現ベクターまたは組換えプロモーターの非存在下で）発現するレベルをいう。

【0097】

(1) 好ましいげっ歯類抗ヒトH7CR抗体およびそのCDR

そうした分子は、ハイブリドーマ株についてヒトH7CRに免疫特異的な抗体を産生する株をスクリーニングし、次いで、場合によってはそうした株の中で調節活性（たとえば、中和活性、促進活性、変化したシグナルの伝達活性等）を示す株をスクリーニングすることにより作製することができる。一実施形態では、抗体はハムスター抗ヒトH7CRクローン：1、3、4、5および7、8である。これらの抗体は、ヒトH7CRに結合する

ことができ、かつH7CRのB7-H7との相互作用を実質的に遮断することができない。抗ヒトH7CRクローンに発現する抗体の配列を決定して、その可変ドメインを明らかにした。以下に可変ドメインのCDR配列を太字および下線で示す。

抗ヒトH7CRクローン1.3

軽鎖可変領域：

【化5】

DIVMTQSPSS LAVSAGEKVT ISCLSSQSLE SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
KLLIYHASTR LTGVDPDRFIG SGSGTDFTLT ISSVQAEDLG DYFCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号5)

10

重鎖可変領域：

【化6】

QIQIQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGFSIS TSGYYWTWIR QFPGKRLEWM
GYINYGGGTS YNPSLKSRIS ITRDTSKNQF LLHLNSVTTE DTATYCCATM
ADRFAFDVW GQGIQVTVSS (配列番号6)

抗ヒトH7CRクローン4.5

軽鎖可変領域：

【化7】

DIVMTQSPSS LAVSAGEKVT ISCLSSQSLE SSNTKRNYLN WYLQKPGQSP
KLLIYHASTR LTGVPGRFIG SGSGTDFTLT VSTVQAEDLG DYFCQHHYET
PLTFGDGTRL EIK (配列番号7)

20

重鎖可変領域：

【化8】

QIQIQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGFSIT TGGYYWNWIR QFPGKKLEWM
GYIYTSGRTS YNPSLKSRIS ITRDTSKNQF FLQLNSMTTE DTATYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTILVTVSS (配列番号8)

抗ヒトH7CRクローン7.8

軽鎖可変領域：

【化9】

DIVMTQSPSS LTVSAGEKVT ISCLSSQSLE SSNTNRNYLS WYLQRPQSP
KLLIYHASTR LTGVPGRFIG SGSGTDFTLT VSTVQAGDLG DYFCQHHYVT
PLTFGDGTRL EIK (配列番号9)

30

重鎖可変領域：

【化10】

QIQIQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGFSIT TGGYYWNWIR QFPGKKLEWM
GYIYSSGRTS YNPSLKSRIS ITRDTSKNQF FLQLNSVTTE DTATYYCADM
ADKGGWFDYW GQGTILVTVSS (配列番号10)

40

【0098】

(2) 抗ヒトH7CR抗体のコンセンサスCDR

コンセンサスCDR配列と、おそらく類似の結合性を与えると考えられる変異CDR配列とを特定するため、特定された抗体のCDRの解析を行った。そうした変異CDRは、表1に従いBl o s u m 6 2 . i i j 解析を用いてコンピューター処理した。表1は、Bl o s u m 6 2 . i i j 置換スコアである。スコアが高いほど、置換はより保存的になり、したがって置換が機能に影響を与える可能性が低くなる。

【0099】

50

【表 1】

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

10

20

【 0 1 0 0 】

1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つの変異C D Rを有する抗体および抗原結合フラグメントが開示される。相当数の異なるC D Rが特定されたため、具体的に特定されたC D Rの任意の変異体に必要とされる可能性のあるC D R残基の識別が可能になる。そうした残基を表2および表3に太字で示す。比較されたC D Rの中で異なることが分かっているこれらの残基については、表1の置換スコアが、許容される置換の内容を判定する方法となる。たとえば、特定のC D Rの特定の残基がRまたはSとして変化することが見出されている場合、RとSが-1の置換スコアを有する以上、-1以上の置換スコアを有する、RまたはSのいかなる置換も、その特定のC D Rに十分類似した結合性を有する変異C D Rを生み出して、特定のC D Rの代わりに使用される変異C D Rが機能的な抗H7C R抗体または抗原結合フラグメントを形成できる可能性が、観察された変異体（RまたはS）と同様にある（あるいはRまたはSよりも高い）。各位置について、より低い置換スコアを有する残基を選択するよりも、より高い置換スコアを有する残基を選択することが好ましい。

30

【 0 1 0 1 】

表2は、抗H7C R抗体の軽鎖C D Rの解析結果であり、観察された変異軽鎖（「LC」）抗H7C Rおよび好ましい変異軽鎖（「LC」）抗H7C Rのコンセンサス配列を示す。

【 0 1 0 2 】

【表 2】

表 2: 抗 H7CR 軽鎖 CDR																											
軽鎖 CDR1																											
抗体		配列																		配列番号							
1.3		Q	S	L	F	S	S	N	T	N	R	N	Y											29			
4.5		Q	S	L	F	S	S	N	T	K	R	N	Y											30			
7.8		Q	S	L	F	S	S	N	T	N	R	N	Y											29			
LC CDR1 コンセンサス配列:		Q	S	L	F	S	S	N	T	X ₁	R	N	Y											31			
X ₁ は		N もしくは K、または同等以上の置換スコア(すなわち、≧0)を有する置換、すなわち R、N、Q、E、K もしくは S である																									
軽鎖 CDR2																											
抗体		配列																		配列番号							
1.3		H	A	S																			32				
4.5		H	A	S																			32				
7.8		H	A	S																			32				
LC CDR2 コンセンサス配列:		H	A	S																			32				
軽鎖 CDR3																											
抗体		配列																		配列番号							
1.3		Q	H	H	Y	E	T	P	L	T														45			
4.5		Q	Q	H	Y	E	T	P	L	T														46			
7.8		Q	Q	H	Y	V	T	P	L	T														47			
LC CDR3 コンセンサス配列:		Q	X ₁	H	Y	X ₂	T	P	L	T														48			
X ₁ は		H もしくは Q、または同等以上の置換スコア(すなわち、≧0)を有する置換、すなわち R、N、Q、E もしくは H である																									
X ₂ は		E もしくは V、または同等以上の置換スコア(すなわち、≧-2)を有する置換、すなわち A、Q、E、K、M、P、S、T、Y もしくは V である																									

10

20

【 0 1 0 3 】

表 3 は、抗 H 7 C R 抗体の重鎖 C D R の解析結果であり、観察された変異抗 H 7 C R 重鎖 (「H C」) C D R および好ましい変異抗 H 7 C R 重鎖 (「H C」) C D R のコンセンサス配列を示す。

30

【 0 1 0 4 】

【表 3】

表 3:抗 H7CR 重鎖 CDR																	
重鎖 CDR1																	
抗体		配列										配列番号					
1.3		G	F	S	I	S	T	S	G						49		
4.5		G	F	S	I	T	T	G	G						50		
7.8		G	F	S	I	T	T	G	G						50		
HC CDR1 コンセンサス配列:		G	F	D	I	X ₁	T	X ₂	G						51		
X ₁ は		SもしくはT、または同等以上の置換スコア(すなわち、 $\geq +1$)を有する置換、すなわちSもしくはTである															
X ₂ は		SもしくはG、または同等以上の置換スコア(すなわち、 ≥ 0)を有する置換、すなわちA、N、GもしくはSである															
重鎖 CDR2																	
抗体		配列										配列番号					
1.3		I	N	Y	G	G	G	T						52			
4.5		I	Y	T	S	G	R	T						53			
7.8		I	Y	S	S	G	R	T						54			
HC CDR2 コンセンサス配列:		I	X ₁	X ₂	X ₃	G	X ₄	T						55			
X ₁ は		NもしくはY、または同等以上の置換スコア(すなわち、 ≥ -2)を有する置換、すなわちA、R、N、Q、E、H、K、M、S、T、Yである															
X ₂ は		Y、TもしくはS、または同等以上の置換スコア(すなわち、 ≥ -2)を有する置換、すなわちA、R、N、C、Q、E、H、I、L、K、M、F、S、T、YもしくはVである															
X ₃ は		SもしくはG、または同等以上の置換スコア(すなわち、 ≥ 0)を有する置換、すなわちA、N、GもしくはSである															
X ₄ は		GもしくはR、または同等以上の置換スコア(すなわち、 ≥ -2)を有する置換、すなわちA、R、N、D、Q、E、G、H、K、P、SもしくはTである															
重鎖 CDR3																	
抗体		配列												配列番号			
1.3		A	T	M	A	D	R	F	A	F	F	D	V				56
4.5		A	D	M	A	D	K	G	G	W	F	A	Y				57
7.8		A	D	M	A	D	K	G	G	W	F	D	Y				58
HC CDR3 コンセンサス配列:		A	X ₁	M	A	D	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	F	X ₆	X ₇				59
X ₁ は		TもしくはD、または同等以上の置換スコア(すなわち、 ≥ -1)を有する置換、すなわちN、D、Q、E、K、P、SもしくはTである															
X ₂ は		RもしくはK、または同等以上の置換スコア(すなわち、 $\geq +2$)を有する置換、すなわちRもしくはKである															
X ₃ は		FもしくはG、または同等以上の置換スコア(すなわち、 ≥ -3)を有する置換、すなわちA、R、N、D、C、Q、E、G、H、K、M、F、S、T、W、YもしくはVである															
X ₄ は		AもしくはG、または同等以上の置換スコア(すなわち、 ≥ 0)を有する置換、すなわちA、GもしくはSである															
X ₅ は		FもしくはW、または同等以上の置換スコア(すなわち、 $\geq +1$)を有する置換、すなわちF、WもしくはYである															
X ₆ は		AもしくはD、または同等以上の置換スコア(すなわち、 ≥ -4)を有する置換、すなわちA、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、L、K、M、F、P、S、T、W、YもしくはVである															
X ₇ は		VもしくはY、または同等以上の置換スコア(すなわち、 ≥ -2)を有する置換、すなわちA、R、N、D、Q、E、G、H、K、P、SもしくはTである															

【0105】

したがって、抗H7CR抗体：1．3、4．5および7．8のCDRを保有する抗体ならびにその抗原結合フラグメントに加えて、上記軽鎖および/または重鎖コンセンサス配列を有するCDRを保有する抗体およびその抗原結合フラグメントも提供される。

【0106】

抗体またはそのフラグメントは、上記クローンのいずれかにより産生されたハムスター

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体の可変重鎖および／または軽鎖のアミノ酸配列に対して、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であり、かつH7CRに対して免疫特異的結合を示す可変重鎖および／または可変軽鎖のアミノ酸配列を含む。加えて、抗体およびそのフラグメントは、上記列挙のクローンのCDRのアミノ酸配列に対して、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であり、かつH7CRに対して免疫特異的結合を示すCDRを含むことができる。2つのアミノ酸配列の同一性パーセントの判定は、BLASTタンパク質比較により判定することができる。

10

【0107】

特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、上記の好ましい抗体の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または一層好ましくは6つすべてのCDRを含有し、ヒトH7CRに結合する能力を示す。

【0108】

(3) 好ましいヒト化抗ヒトH7CR抗体およびそのCDR

抗ヒトH7CR抗体1.3および4.5の複数の好ましい軽鎖および重鎖ヒト化誘導体を調製した。

【0109】

20

(a) 抗ヒトH7CR抗体1.3のヒト化変異体

IGKV4-1*01アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH7CR抗体1.3の好ましいヒト化変異体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示す(CDRは下線で示す)：

1. VL1A IGVK4-1*01 (ヒト化1)：

【化11】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTNRNYLA WYQQKPGQPP
KLLIYHASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQHHYET
PLTFGQGTKL EIK (配列番号17)

2. VL1B IGVK4-1*01 (ヒト化2)：

30

【化12】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTNRNYLN WYQQKPGQSP
KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYYCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号18)

3. VL1C IGVK4-1*01 (ヒト化3)：

【化13】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCLSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
KLLIYHASTR LSGVPDRFIG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVG DYYCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号19)

40

【0110】

IGKV2D-28*01アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH7CR抗体1.3の好ましいヒト化変異体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示す(CDRは下線で示す)：

1. VL2A IGVK2D-28*01 (ヒト化1)：

【化14】

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTNRNYLD WYLQKPGQSP
QLLIYHASNR ASGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号20)

50

2 . V L 2 B I G K V 2 D - 2 8 * 0 1 (ヒト化 2) :

【化 1 5】

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
KLLIYHASTR ASGVPDRFSG SGSCTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号21)

3 . V L 2 C I G K V 2 D - 2 8 * 0 1 (ヒト化 3) :

【化 1 6】

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCLSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSCTDFTLK ISRVEAEDVG DYYCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号22)

10

【 0 1 1 1】

I G H V 4 - 3 1 * 0 2 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH7CR抗体
1 . 3 の好ましいヒト化変異体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示す (C D R は下
線で示す) :

1 . V H 1 A I G H V 4 - 3 1 * 0 2 (ヒト化 1) :

【化 1 7】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QHPGKGLEWI
GYINYGGGT YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCATM
ADRFAFFDVW GQGMVTVSS (配列番号23)

20

2 . V H 1 B I G H V 4 - 3 1 * 0 2 (ヒト化 2) :

【化 1 8】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QHPGKRLEWI
GYINYGGGT YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYCCATM
ADRFAFFDVW GQGMVTVSS (配列番号24)

3 . V H 1 C I G H V 4 - 3 1 * 0 2 (ヒト化 3) :

【化 1 9】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QFPGRLEWM
GYINYGGGT YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTATYCCATM
ADRFAFFDVW GQGMVTVSS (配列番号25)

30

【 0 1 1 2】

A A Y 3 3 1 9 9 . 1 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH7CR抗体 1
. 3 の好ましいヒト化変異体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示す (C D R は下線
で示す) :

1 . V H 2 A A A Y 3 3 1 9 9 . 1 (ヒト化 1) :

【化 2 0】

QVQLQESGPG LVKPAQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QYPGKGLEWI
GYINYGGGT YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYHCATM
ADRFAFFDVW GQGMVTVSS (配列番号26)

40

2 . V H 2 B A A Y 3 3 1 9 9 . 1 (ヒト化 2) :

【化 2 1】

QVQLQESGPG LVKPAQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QYPGKRLEWI
GYINYGGGT YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLTSVTAA DTATYCCATM
ADRFAFFDVW GQGMVTVSS (配列番号27)

3 . V H 2 C A A Y 3 3 1 9 9 . 1 (ヒト化 3) :

【化 2 2】

QVQLQESGPG LVKPAQTL~~SL~~ TCTVS**GFSIS** **TSGYY**WSWIR QFPGKRLEWM
GY**IN****YGGGTS** YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLTSVTAA DTATYCC**ATM**
ADRFAFFDVW GQGTMTVTSS (配列番号28)

【0 1 1 3】

抗体およびその抗原結合フラグメントは、抗ヒトH7C R抗体1．3の上記ヒト化変異体の36の組合せのいずれかを含むことができる。具体的には、そうした抗体は、表4に示す組合せを含む。

【0 1 1 4】

【表 4】

表 4				
抗ヒト H7CR 抗体 1.3 のヒト化変異体				
ヒト化変異 体番号	軽鎖	配列 番号	重鎖	配列 番号
1	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	17	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	23
2	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	17	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	24
3	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	17	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	25
4	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	17	VH2A AAY33199.1 (ヒト化 1)	26
5	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	17	VH2B AAY33199.1 (ヒト化 2)	27
6	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	17	VH2C AAY33199.1 (ヒト化 3)	28
7	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	18	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	23
8	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	18	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	24
9	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	18	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	25
10	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	18	VH2A AAY33199.1 (ヒト化 1)	26
11	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	18	VH2B AAY33199.1 (ヒト化 2)	27
12	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	18	VH2C AAY33199.1 (ヒト化 3)	28
13	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	19	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	23
14	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	19	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	24
15	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	19	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	25
16	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	19	VH2A AAY33199.1 (ヒト化 1)	26
17	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	19	VH2B AAY33199.1 (ヒト化 2)	27
18	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	19	VH2C AAY33199.1 (ヒト化 3)	28
19	VL2A IGKV2D-28*01 (ヒト化 1)	20	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	23
20	VL2A IGKV2D-28*01 (ヒト化 1)	20	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	24
21	VL2A IGKV2D-28*01 (ヒト化 1)	20	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	25
22	VL2A IGKV2D-28*01 (ヒト化 1)	20	VH2A AAY33199.1 (ヒト化 1)	26
23	VL2A IGKV2D-28*01 (ヒト化 1)	20	VH2B AAY33199.1 (ヒト化 2)	27
24	VL2A IGKV2D-28*01	20	VH2C AAY33199.1	28

【表 5】

表 4				
抗ヒト H7CR 抗体 1.3 のヒト化変異体				
ヒト化変異体番号	軽鎖	配列番号	重鎖	配列番号
	(ヒト化 1)		(ヒト化 3)	
25	VL2B IGKV2D-28*01 (ヒト化 2)	21	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	23
26	VL2B IGKV2D-28*01 (ヒト化 2)	21	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	24
27	VL2B IGKV2D-28*01 (ヒト化 2)	21	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	25
28	VL2B IGKV2D-28*01 (ヒト化 2)	21	VH2A AAY33199.1 (ヒト化 1)	26
29	VL2B IGKV2D-28*01 (ヒト化 2)	21	VH2B AAY33199.1 (ヒト化 2)	27
30	VL2B IGKV2D-28*01 (ヒト化 2)	21	VH2C AAY33199.1 (ヒト化 3)	28
31	VL2C IGKV2D-28*01 (ヒト化 3)	22	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	23
32	VL2C IGKV2D-28*01 (ヒト化 3)	22	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	24
33	VL2C IGKV2D-28*01 (ヒト化 3)	22	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	25
34	VL2C IGKV2D-28*01 (ヒト化 3)	22	VH2A AAY33199.1 (ヒト化 1)	26
35	VL2C IGKV2D-28*01 (ヒト化 3)	22	VH2B AAY33199.1 (ヒト化 2)	27
36	VL2C IGKV2D-28*01 (ヒト化 3)	22	VH2C AAY33199.1 (ヒト化 3)	28

【 0 1 1 6 】

(b) 抗ヒト H 7 C R 抗体 4 . 5 のヒト化変異体

I G K V 4 - 1 * 0 1 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒト H 7 C R 抗体 4 . 5 の好ましいヒト化変異体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示す (C D R は下線で示す) :

1 . V L 1 A I G K V 4 - 1 * 0 1 (ヒト化 1) :

【化 2 3】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTRNYLA WYQQKPGQPP
 KLLIYHASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQHYET
PLTFGQGTRLEIF (配列番号33)

2 . V L 1 B I G K V 4 - 1 * 0 1 (ヒト化 2) :

【化 2 4】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTRNYLN WYQQKPGQPP
 KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYFCQQHYET
PLTFGDGTRL EIK (配列番号34)

3 . V L 1 C I G K V 4 - 1 * 0 1 (ヒト化 3) :

【化 2 5】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCLSSQSLF SSNTRNYLN WYQQKPGQSP
 KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYFCQQHYET
PLTFGDGTRL EIK (配列番号35)

【 0 1 1 7 】

10

20

30

40

50

I G K V 2 D - 4 0 * 0 1 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒト H 7 C R 抗体 4 . 5 の好ましいヒト化変異体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示す (C D R は下線で示す) :

1 . V L 2 A I G K V 2 D - 4 0 * 0 1 (ヒト化 1) :
【化 2 6】

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTKRNYLD WYLQKPGQSP
QLLIYHASYR ASGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQQHYET
PLTFGQTRL EIK (配列番号36)

2 . V L 2 B I G K V 2 D - 4 0 * 0 1 (ヒト化 2) :
【化 2 7】

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTKRNYLN WYLQKPGQSP
KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG DYFCQQHYET
PLTFGDTRL EIK (配列番号37)

3 . V L 2 C I G K V 2 D - 4 0 * 0 1 (ヒト化 3) :
【化 2 8】

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCLSSQSLF SSNTKRNYLN WYLQKPGQSP
KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG DYFCQQHYET
PLTFGDTRL EIK (配列番号38)

【 0 1 1 8】

I G H V 4 - 3 1 * 0 2 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3 の好ましいヒト化変異体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示す (C D R は下線で示す) :

1 . V H 1 A I G H V 4 - 3 1 * 0 2 (ヒト化 1) :
【化 2 9】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIT TGGYYWSWIR QHPGKGLEWI
GYIYTSGRTY YNPSTKSRVT ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTTLVTVSS (配列番号39)

2 . V H 1 B I G H V 4 - 3 1 * 0 2 (ヒト化 2) :
【化 3 0】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QHPGKKLEWI
GYIYTSGRTS YNPSTKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTTLVTVSS (配列番号40)

3 . V H 1 C I G H V 4 - 3 1 * 0 2 (ヒト化 3) :
【化 3 1】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QFPKGKLEWM
GYIYTSGRTS YNPSTKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTTLVTVSS (配列番号41)

【 0 1 1 9】

I G H V 2 - 5 * 0 1 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3 の好ましいヒト化変異体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示す (C D R は下線で示す) :

1 . V H 2 A I G H V 2 - 5 * 0 1 (ヒト化 1) :

10

20

30

40

【化 3 2】

QITLKESGPT LVKPTQTLTL TCTFSGFSIT TGGYYVGWIR QPPGKALEWL
 ALIYTSGRTR YPSLKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTLLVTSS (配列番号42)

2 . V H 2 B I G H V 2 - 5 * 0 1 (ヒト化 2) :

【化 3 3】

QITLKESGPT LVKPTQTLTL TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QPPGKKLEWL
 ALIYTSGRTS YNPSLKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTLLVTSS (配列番号43)

10

3 . V H 2 C I G H V 2 - 5 * 0 1 (ヒト化 3) :

【化 3 4】

QIQLKESGPT LVKPTQTLTL TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QPPGKKLEWM
 ALIYTSGRTS YNPSLKSRLT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTLLVTSS (配列番号44)

【 0 1 2 0 】

抗体およびその抗原結合フラグメントは、抗ヒトH7CR抗体4.5の上記ヒト化変異体の36の組合せのいずれかを含むことができる。具体的には、そうした抗体は、表5に示す組合せを含む。

20

【 0 1 2 1 】

【表 6】

表 5				
抗ヒト H7CR 抗体 4.5 のヒト化変異体				
ヒト化変異 体番号	軽鎖	配列 番号	重鎖	配列 番号
1	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	33	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	39
2	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	33	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	40
3	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	33	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	41
4	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	33	VH2A IGHV2-5*01 (ヒト化 1)	42
5	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	33	VH2B IGHV2-5*01 (ヒト化 2)	43
6	VL1A IGKV4-1*01 (ヒト化 1)	33	VH2C IGHV2-5*01 (ヒト化 3)	44
7	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	34	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	39
8	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	34	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	40
9	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	34	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	41
10	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	34	VH2A IGHV2-5*01 (ヒト化 1)	42
11	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	34	VH2B IGHV2-5*01 (ヒト化 2)	43
12	VL1B IGKV4-1*01 (ヒト化 2)	34	VH2C IGHV2-5*01 (ヒト化 3)	44
13	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	35	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	39
14	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	35	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	40
15	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	35	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	41
16	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	35	VH2A IGHV2-5*01 (ヒト化 1)	42
17	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	35	VH2B IGHV2-5*01 (ヒト化 2)	43
18	VL1C IGKV4-1*01 (ヒト化 3)	35	VH2C IGHV2-5*01 (ヒト化 3)	44

【 0 1 2 2 】

【表 7】

表 5				
抗ヒト H7CR 抗体 4.5 のヒト化変異体				
ヒト化変異体番号	軽鎖	配列番号	重鎖	配列番号
19	VL2A IGKV2D-40*01 (ヒト化 1)	36	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	39
20	VL2A IGKV2D-40*01 (ヒト化 1)	36	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	40
21	VL2A IGKV2D-40*01 (ヒト化 1)	36	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	41
22	VL2A IGKV2D-40*01 (ヒト化 1)	36	VH2A IGHV2-5*01 (ヒト化 1)	42
23	VL2A IGKV2D-40*01 (ヒト化 1)	36	VH2B IGHV2-5*01 (ヒト化 2)	43
24	VL2A IGKV2D-40*01 (ヒト化 1)	36	VH2C IGHV2-5*01 (ヒト化 3)	44
25	VL2B IGKV2D-40*01 (ヒト化 2)	37	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	39
26	VL2B IGKV2D-40*01 (ヒト化 2)	37	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	40
27	VL2B IGKV2D-40*01 (ヒト化 2)	37	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	41
28	VL2B IGKV2D-40*01 (ヒト化 2)	37	VH2A IGHV2-5*01 (ヒト化 1)	42
29	VL2B IGKV2D-40*01 (ヒト化 2)	37	VH2B IGHV2-5*01 (ヒト化 2)	43
30	VL2B IGKV2D-40*01 (ヒト化 2)	37	VH2C IGHV2-5*01 (ヒト化 3)	44
31	VL2C IGKV2D-40*01 (ヒト化 3)	38	VH1A IGHV4-31*02 (ヒト化 1)	39
32	VL2C IGKV2D-40*01 (ヒト化 3)	38	VH1B IGHV4-31*02 (ヒト化 2):	40
33	VL2C IGKV2D-40*01 (ヒト化 3)	38	VH1C IGHV4-31*02 (ヒト化 3)	41
34	VL2C IGKV2D-40*01 (ヒト化 3)	38	VH2A IGHV2-5*01 (ヒト化 1)	42
35	VL2C IGKV2D-40*01 (ヒト化 3)	38	VH2B IGHV2-5*01 (ヒト化 2)	43
36	VL2C IGKV2D-40*01 (ヒト化 3)	38	VH2C IGHV2-5*01 (ヒト化 3)	44

【 0 1 2 3 】

開示された抗体またはそのフラグメントは、上記クローンのいずれかにより産生されたマウスモノクローナル抗体の可変重鎖および／または軽鎖のアミノ酸配列に対して、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または少なくとも 99 % 同一であり、かつヒト H7CR に対して免疫特異的結合を示す可変重鎖および／または可変軽鎖のアミノ酸配列を含む。他の抗体およびそのフラグメントは、上記列挙のクローンの CDR のアミノ酸配列に対して、少なくとも 45 %、少なくとも 50 %、少なくとも 55 %、少なくとも 60 %、少なくとも 65 %、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または少なくとも 99 % 同一であり、かつ H7CR に対して免疫特異的結合を示す CDR を含む。2 つのアミノ酸配列の同一性パーセントの判定は、BLAST タンパク質比較により判定することができる。

【 0 1 2 4 】

好ましい実施形態では、抗体は、1 つ、2 つまたは 3 つの軽鎖 CDR および 1 つ、2 つ

10

20

30

40

50

または3つの重鎖CDR（最も好ましくは3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR）を含むヒト化免疫グロブリン分子（たとえば、抗体、ダイアボディ、融合タンパク質等）であり、軽鎖CDRは、

- （１）抗ヒトH7CR抗体１．３のヒト化変異体の軽鎖CDR１；
- （２）抗ヒトH7CR抗体４．５のヒト化変異体の軽鎖CDR２；
- （３）抗ヒトH7CR抗体７．８のヒト化変異体の軽鎖CDR３；
- （４）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の軽鎖CDR１および軽鎖CDR２；
- （５）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の軽鎖CDR１および軽鎖CDR３；
- （６）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の軽鎖CDR２および軽鎖CDR３；

あるいは

- （７）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の軽鎖CDR１、軽鎖CDR２および軽鎖CDR３を含む。

【０１２５】

別の好ましい実施形態では、ヒト化免疫グロブリン分子は、１つ、２つまたは3つの軽鎖CDRおよび1つ、2つまたは3つの重鎖CDR（最も好ましくは3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR）を含み、重鎖CDRは、

- （１）抗ヒトH7CR抗体１．３のヒト化変異体の重鎖CDR１；
- （２）抗ヒトH7CR抗体４．５のヒト化変異体の重鎖CDR２；
- （３）抗ヒトH7CR抗体７．８のヒト化変異体の重鎖CDR３；
- （４）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の重鎖CDR１および重鎖CDR２；
- （５）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の重鎖CDR１および重鎖CDR３；
- （６）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の重鎖CDR２および重鎖CDR３；

あるいは

- （７）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の重鎖CDR１、重鎖CDR２および重鎖CDR３を含む。

【０１２６】

特に好ましい実施形態では、抗体は、１つ、２つまたは3つの軽鎖CDRおよび1つ、2つまたは3つの重鎖CDR（最も好ましくは3つの軽鎖CDRおよび3つの重鎖CDR）を含むヒト化免疫グロブリン分子であり、軽鎖CDRは、

- （１）抗ヒトH7CR抗体１．３のヒト化変異体の軽鎖CDR１；
- （２）抗ヒトH7CR抗体４．５のヒト化変異体の軽鎖CDR２；
- （３）抗ヒトH7CR抗体７．８のヒト化変異体の軽鎖CDR３；
- （４）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の軽鎖CDR１および軽鎖CDR２；
- （５）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の軽鎖CDR１および軽鎖CDR３；
- （６）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の軽鎖CDR２および軽鎖CDR３；

あるいは

- （７）抗ヒトH7CR抗体１．３、４．５または７．８のヒト化変異体の軽鎖CDR１、軽鎖CDR２および軽鎖CDR３を含み、かつ重鎖CDRは、

- (1) 抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3 のヒト化変異体の重鎖 C D R 1 ;
- (2) 抗ヒト H 7 C R 抗体 4 . 5 のヒト化変異体の重鎖 C D R 2 ;
- (3) 抗ヒト H 7 C R 抗体 7 . 8 のヒト化変異体の重鎖 C D R 3 ;
- (4) 抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3、4 . 5 または 7 . 8 のヒト化変異体の重鎖 C D R 1 および重鎖 C D R 2 ;
- (5) 抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3、4 . 5 または 7 . 8 のヒト化変異体の重鎖 C D R 1 および重鎖 C D R 3 ;
- (6) 抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3、4 . 5 または 7 . 8 のヒト化変異体の重鎖 C D R 2 および重鎖 C D R 3 ;

あるいは

- (7) 抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3、4 . 5 または 7 . 8 のヒト化変異体の重鎖 C D R 1、重鎖 C D R 2 および重鎖 C D R 3 を含む。

【 0 1 2 7 】

最も好ましくは、こうした C D R はそれぞれ、抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3、4 . 5 または 7 . 8 の同じヒト化変異体のものとする。

【 0 1 2 8 】

特定の実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3、4 . 5 または 7 . 8 のヒト化変異体の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または一層好ましくは 6 つすべての C D R を含み、親抗体と同じヒト H 7 C R への結合能力を示す。

【 0 1 2 9 】

E . 好ましい組成物の治療用途および予防用途

本明細書で使用する場合、「処置する」、「処置すること」、「処置」および「治療用途」という用語は、免疫反応の増大または低下から利益を受けるであろう疾患または障害の 1 つまたは複数の症状が消失、減少または軽減することをいう。本明細書で使用する場合、「治療上有効な量」とは、免疫反応の変化を媒介するのに十分な治療薬のそうした量、一層好ましくは、臨床的意義のある免疫反応の変化であり、疾患または状態の症状の減少または軽減を媒介するのに十分な治療薬のそうした量をいう。ある作用は、その大きさがレシピエント被検体の健康または予後に影響を与えるのに十分である場合、臨床的意義がある。治療上有効な量とは、疾患の進行を遅延させるまたは最小限に抑える、たとえば、癌の拡散を遅延させるまたは最小限に抑えるのに十分な治療薬の量をいう場合がある。治療上有効な量はまた、疾患の処置または管理において治療上の利益をもたらす治療薬の量をいうこともある。さらに、治療薬に関する治療上有効な量は、疾患の処置または管理に治療上の利益をもたらす、たとえば、治療用抗体の薬効を増強するのに十分で、疾患を処置または管理するのに十分な、治療薬単独または他の療法薬と組み合わせたそうした量を意味する。

【 0 1 3 0 】

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

【 0 1 3 1 】

本明細書に記載される投薬量および投与頻度は、治療上有効なおよび予防上有効なという用語により包含される。投薬量および頻度はさらに、典型的には投与される個々の治療薬または予防薬、癌の重症度および種類、投与経路のほか、患者の年齢、体重、反応および既往歴によって、各患者に特有の要因に応じて異なる。当業者であれば、そうした要因を考慮し、たとえば、文献に報告され、Physician's Desk Reference (5 6 t h E d . , 2 0 0 2) に推奨されている投与量に従うことで好適なレ

10

20

30

40

50

ジメンを選択することができる。

【0132】

1. 免疫系のアップモジュレーターの使用

一実施形態は、抗H7CR抗体（およびH7CRに結合するそうした抗体のフラグメント）またはB7-H7 Igなど、H7CRに結合することによって、T細胞増殖および/またはサイトカイン産生を促進するH7CR結合分子に関する。そうした分子を被験体に投与すると、被験体の免疫系が上方調節される。H7CR発現がナイーブT細胞表現型と関連しているので、そうした分子の投与は、T細胞のプライミングおよび活性化を亢進するのに有効であり、したがってワクチンと組み合わせることが好適となろう。さらに、アゴニスト性抗H7CR（およびB7-H7 Ig）は、免疫チェックポイントを標的とし、免疫反応を通常弱めることになる受容体を阻害する分子、すなわち抗PD-1、抗-B7-H1、抗CTLA4等と組み合わせることが極めて好適となろう。そうした抗体は、順番に投与すること、すなわち、T細胞プライミングを増強するために最初に抗H7CRを投与した後、たとえばT細胞消耗を防止するために抗PD-1を投与することが一層好適になり得る。H7CRと免疫チェックポイント遮断を標的とする二重特異性分子も意図される。

10

【0133】

免疫系の上方調節は、癌および慢性感染症（たとえば、HIV感染、AIDS等）の処置に特に望ましく、したがって、開示された分子は、そうした障害の処置に有用である。マクロファージは、HIV感染の初期段階への寄与が顕著であることが示されている（Carter, C. A. et al. (2008) 「Cell Biology Of HIV-1 Infection Of Macrophages,」 Ann. Rev. Microbiol. 62: 425 - 443; Noursadeghi, M. et al. (2006) 「HIV-1 Infection Of Mononuclear Phagocytic Cells: The Case For Bacterial Innate Immune Deficiency In AIDS,」 Lancet Infect. Dis. 6: 794 - 804）。したがって、B7-H7に結合する抗体（特にトキシンにコンジュゲートされている場合）は、HIV感染の予防または処置に有用である。

20

【0134】

本明細書で使用する場合、「癌」という用語は、制御不能な異常な細胞増殖に起因する新生物または腫瘍をいう。本明細書で使用する場合、癌は明確に白血病およびリンパ腫を含む。この用語は、遠位部位に転移する可能性があり、非癌細胞の表現型形質と異なる表現型形質、たとえば、軟寒天などの三次元支持体におけるコロニーの形成、または三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物における管状網または網状のマトリックスの形成を示す細胞が関与する疾患をいう。非癌細胞は、軟寒天においてコロニーを形成せず、三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物において明確な球状構造を形成しない。

30

【0135】

処置または予防することができる癌および関連する障害として、以下に限定されるものではないが、白血病、たとえば以下に限定されるものではないが、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄球性白血病、たとえば骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病白血病および骨髄異形成症候群、慢性白血病、たとえば以下に限定されるものではないが、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病；真性赤血球増加症；リンパ腫、たとえば以下に限定されるものではないが、ホジキン病、非ホジキン病；多発性骨髄腫、たとえば以下に限定されるものではないが、くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌性骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞白血病、孤立性形質細胞腫および髄外性形質細胞腫；ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症；意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症；良性単クローン性免疫グロブリン血症；重鎖病；骨および結合組織の肉腫、たとえば以下に限定されるものではないが、骨の肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫、骨の線維肉腫、脊索腫、

40

50

骨膜肉腫、軟部組織肉腫、血管肉腫 (a n g i o s a r c o m a) (血管肉腫 (h e m a n g i o s a r c o m a))、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫；脳腫瘍、たとえば以下に限定されるものではないが、神経膠腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起膠腫、非神経膠腫瘍、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果体芽腫、原発性脳リンパ腫；乳癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腺癌、小葉（小細胞）癌、乳管内癌、乳腺髓様癌、乳腺粘液癌、乳腺管状癌、乳腺乳頭癌、パジェット病および炎症性乳癌；副腎癌、たとえば以下に限定されるものではないが、褐色細胞腫および副腎皮質癌；甲状腺癌、たとえば以下に限定されるものではないが、乳頭または濾胞性甲状腺癌、甲状腺髓様癌および甲状腺未分化癌；膀胱癌、たとえば以下に限定されるものではないが、インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、VIP産生腫瘍、ソマトスタチン産生腫瘍およびカルチノイドまたは島細胞腫瘍；下垂体癌、たとえば以下に限定されるものではないが、クッシング病、プロラクチン産生腫瘍、先端巨大症および尿崩症；眼癌、たとえば以下に限定されるものではないが、眼のメラノーマ、たとえば虹彩メラノーマ、脈絡膜メラノーマおよび毛様体メラノーマならびに網膜芽細胞腫；腔癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌腫、腺癌およびメラノーマ；外陰癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌腫、メラノーマ、腺癌、基底細胞癌、肉腫およびパジェット病；子宮頸癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌腫および腺癌；子宮癌、たとえば以下に限定されるものではないが、子宮内膜癌および子宮肉腫；卵巣癌、たとえば以下に限定されるものではないが、上皮性卵巣癌、境界腫瘍、胚細胞腫瘍およびストローマ腫瘍；食道癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌、腺癌、腺様嚢胞癌、粘表皮癌、腺扁平上皮癌腫、肉腫、メラノーマ、形質細胞腫、疣状癌および燕麦細胞（小細胞）癌；胃癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腺癌、菌状（ポリープ状）、潰瘍性、表在性拡大型、散在性拡大型、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫および癌肉腫；結腸癌；直腸癌；肝癌、たとえば以下に限定されるものではないが、肝細胞癌および肝芽腫、胆嚢癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腺癌；以下に限定されるものではないが、乳頭状、結節性およびびまん性の胆管癌；肺癌、たとえば以下に限定されるものではないが、非小細胞肺癌、扁平上皮癌腫（類表皮癌）、腺癌、大細胞癌および小細胞肺癌；精巣癌、たとえば以下に限定されるものではないが、胚腫瘍、セミノーマ、未分化、古典的（典型的）、精母細胞性、非セミノーマ、胎児性癌、奇形腫瘍、絨毛癌（卵黄嚢腫瘍）、前立腺癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腺癌、平滑筋肉腫および横紋筋肉腫；刑罰癌；口腔癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌腫；基底癌；唾液腺癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腺癌、粘表皮癌および腺様嚢胞癌；咽頭癌、たとえば以下に限定されるものではないが、扁平上皮癌および疣状；皮膚癌、たとえば以下に限定されるものではないが、基底細胞癌、扁平上皮癌腫およびメラノーマ、表在性拡大型メラノーマ、結節性メラノーマ、悪性黒子型メラノーマ、末端黒子型メラノーマ；腎臓癌、たとえば以下に限定されるものではないが、腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行上皮癌（腎盂およびノまたは尿管）；ウィルムス腫瘍；膀胱癌、たとえば以下に限定されるものではないが、移行上皮癌腫、扁平上皮癌、腺癌、癌肉腫が挙げられる。さらに、癌は、粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽細胞腫、上皮性癌、嚢胞腺癌、気管支原性癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌および乳頭腺癌を含む（そうした障害の概説には、Fishman et al., 1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., PhiladelphiaおよびMurphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of Americaを参照）。

【0136】

したがって、開示される方法および組成物は、種々の癌または他の異常増殖性疾患、た

10

20

30

40

50

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

10

【0137】

20

癌細胞は、その発生においてメカニズムは様々であるが、一連の特有の機能的能力を獲得する。そうした能力として、アポトーシスからの逸脱、増殖シグナルの自己充足、抗増殖シグナルに対する反応性欠如、組織浸潤／転移、無限の複製能および血管新生の維持が挙げられる。「癌細胞」という用語は、前癌細胞および悪性癌細胞の両方を包含することを意図している。いくつかの実施形態では、癌とは、局所にとどまっている良性腫瘍をいう。他の実施形態では、癌とは、浸潤して隣接する身体構造を破壊し、遠位部位に転移している悪性腫瘍をいう。なお他の実施形態では、癌は特定の癌抗原（たとえば、汎癌抗原（KSA1/4）、卵巣癌抗原（CA125）、前立腺特異的抗原（PSA）、癌胎児性抗原（CEA）、CD19、CD20、HER2/neu等）と関連している。

【0138】

30

開示される抗体および抗原結合フラグメントは、上記で論じたように腫瘍への使用と同様に、単独、あるいはアジュバントとしてワクチンまたは抗菌剤と組み合わせて使用して、トキシンもしくは自己抗原または病原体（たとえば、ウイルス、たとえばHIV、HTLV、肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ワクシニアウイルス、狂犬病ウイルス；細菌、たとえばマイコバクテリア（*Mycobacteria*）、ブドウ球菌（*Staphylococci*）、連鎖球菌（*Streptococci*）、ニューモコクシ（*Pneumococci*）、髄膜炎菌（*Meningococci*）、コノコクシ（*Conococci*）、クレブシエラ（*Klebsiella*）、プロテウス（*Proteus*）、セラチア（*Serratia*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）、レジオネラ（*Legionella*）、コリネバクテリウム（*Corynebacteria*）、サルモネラ（*Salmonella*）、ビブリオ（*Vibrio*）、クロストリジウム（*Clostridia*）、バチルス（*Bacilli*）、パステレラ（*Pasteurella*）、レプトスピラ症（*Leptospirosis*）、ボルダテラ（*Bordetella*）の細菌、ならびに、特にコレラ、破傷風、ボツリヌス中毒、炭疽病、ペストおよびライム病に関連するような病原体；または真菌病原体もしくは寄生性病原体、たとえばカンジダ（*Candida*）（アルビカンス（*albicans*）、クルセイ（*krusei*）、グラブラタ（*glabrata*）、トロピカリス（*tropicalis*）等）、クリプトコッカス（*Cryptococcus*）、アスペルギルス（*Aspergillus*）（ジュミガーツ（*jumigatus*）、ニガー（*niger*）等）、ケカビ目の属（ムコール（*mucor*）、アブシディア（*abundant*）等）

40

50

bsidia)、リゾフス(rhizophus)、スポロトリクス属(Sporothrix)(シェンキー(schenkii))、ブラストミセス(Blastomyces)(デルマティティディス(dermatitidis))、パラコクシジオイデス(ブラジリエンス(brasiliensis))、コクシジオイデス(Coccidioides)(イミチス(immitis))およびヒストプラズマ(Histoplasma)(カプスラーツム(capsulatum))、エントアメーバ(Entamoeba)、ヒストリティカ(histolytica)、バランティディウム・コリ(Balantidium coli)、フォーラーネグレリア(Naegleria fowleri)、アカントアメーバ・エスピー(Acanthamoeba sp.)、ジアルジア・ランビア(Giardia lamblia)、クリプトスポリジウム・エスピー(Cryptosporidium sp.)、ニューモシステイス・カリニ(Pneumocystis carinii)、プラスモディウム・ビバックス(Plasmodium vivax)、バベシア・ミクロチ(Babesia microti)、ブルセイトリパノソーマ(Trypanosoma brucei)、クルーズトリパノソーマ(Trypanosoma cruzi)、トキソプラズマ・ゴンディ(Toxoplasma gondi)等)、スポロトリクス属(Sporothrix)、ブラストミセス(Blastomyces)、パラコクシジオイデス(Paracoccidioides)、コクシジオイデス(Coccidioides)、ヒストプラズマ(Histoplasma)、エントアメーバ(Entamoeba)、ヒストリティカ(Histolytica)、バランチジウム(Balantidium)、ネグレリア(Naegleria)、アカントアメーバ(Acanthamoeba)、ジアルジア(Giardia)、クリプトスポリジウム(Cryptosporidium)、ニューモシステイス(Pneumocystis)、プラスモディウム(Plasmodium)、バベシア(Babesia)またはトリパノソーマ(Trypanosoma)等に対する免疫反応を刺激してもよい。したがって、抗体および抗原結合フラグメントは、感染症の処置に有用である。

【0139】

抗体および抗原結合フラグメントの別の用途は、T細胞癌を有する患者のT細胞を遮断または欠乏させることである。一実施形態では、そうした遮断または欠乏は、H7CRのそのリガンドに対する結合部位に近接する部位に結合して通常のH7CR機能を障害または破壊する抗H7CR抗体を使用して達成される。そうした破壊の結果として、T細胞の有効(機能的)濃度が欠乏する。好ましい実施形態では、トキシンにコンジュゲートされた抗H7CR抗体を使用すると、T細胞への抗H7CR抗体の結合により細胞死がもたらされて、そうした欠乏が達成される。好ましくは、どちらの実施形態も、抗体のFc領域の配列は欠失(たとえば、FabまたはF(ab)₂等)または修飾されるため、その分子は、Fc受容体(FcR)結合活性が減弱するかまたは存在しない、あるいは、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性または補体依存性細胞傷害(CDC)活性が増強される。

【0140】

2. 免疫系のダウンモジュレーターの使用

代替の実施形態は、抗B7-H7抗体(およびB7-H7に結合するそうした抗体のフラグメントまたはH7CR Igなど、B7-H7に結合することによって、H7CR機能およびT細胞増殖および/またはサイトカイン産生を拮抗(すなわち、減弱または障害)する分子に関する。そうした分子の被験体への投与は、被験体の免疫系を下方調節し、特に炎症または自己免疫の処置に有用である。

【0141】

別の実施形態は、H7CRに結合し、H7CRとリガンドの相互作用を遮断し、かつH7CRを促進しない抗体を提供する。

【0142】

免疫系の下方調節は、炎症性疾患および自己免疫疾患の処置に望ましい。抗体の投与により処置され得る自己免疫障害の例として、以下に限定されるものではないが、円形脱毛

症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー - 皮膚炎、慢性疲労免疫機能障害症候群 (CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、チャーク・スト劳斯症候群、癬痕性類天疱瘡、クレスト症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状ループス、本態性混合性クリオグロブリン血症、線維筋痛症 - 線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少症紫斑病 (ITP)、IgAニューロパチー、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、視神経脊髄炎 (NMO)、1型または免疫性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、全身硬直症候群、全身性紅斑性狼瘡、紅斑性狼瘡、高安動脈炎、側頭動脈炎 / 巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、血管炎、たとえば疱疹状皮膚炎血管炎、白斑ならびにウェゲナー肉芽腫症がある。

【0143】

予防、処置または管理することができる炎症性障害の例として、喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、アレルギー性障害、敗血症性ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性骨溶解、および慢性のウイルス感染または細菌感染に起因する慢性炎症があるが、これに限定されるものではない。

【0144】

記載された抗H7CR抗体は、H7CRの抗イディオタイプペプチドまたは抗体 (Wallmann, J. et al. (2010) 「Anti-Ids in Allergy: Timeliness of a Classic Concept,」 World Allergy Organiz. J. 3 (6): 195 - 201; Nardi, M. et al. (2000) 「Antiidiotype Antibody Against Platelet Anti-GpIIb/IIIa Contributes To The Regulation Of Thrombocytopenia In HIV-1-ITP Patients,」 J. Exp. Med. 191 (12): 2093 - 2100) または模倣体 (Zang, Y. C. et al. (2003) 「Human Anti-Idiotypic T Cells Induced By TCR Peptides Corresponding To A Common CDR3 Sequence Motif In Myelin Basic Protein-Reactive T Cells,」 Int. Immunol. 15 (9): 1073 - 1080; Loiarro, M. et al. (Epub 2010 Apr 8) 「Targeting TLR/IL-1R Signalling In Human Diseases,」 Mediators Inflamm. 2010: 674363) を作製するために使用することができる。そうした分子は、H7CRの代理として働き、したがって、そうした分子を被検体に投与すると、B7-H7リガンドを結合し、それが内因性H7CR受容体に結合することを妨げることによって、被験体の免疫系を下方調節する。そうした分子は、移植片対宿主病の処置に有用である。同様に、そうした抗体とそうした受容体 / リガンドとの間の結合を増強するアゴニスト抗体は、H7CRシグナル伝達のアゴニストとして有用であり、したがって炎症および自己免疫疾患の処置に有用である。

【0145】

したがって、抗体および抗原結合フラグメントは、炎症性疾患および自己免疫疾患の処置に有用である。

【0146】

F. 投与方法

様々な送達系、たとえば、リボソーム、微小粒子、マイクロカプセルへの封入、抗体ま

10

20

30

40

50

たは融合タンパク質を発現することができる組換え細胞、受容体を介したエンドサイトーシス（たとえば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432を参照）、レトロウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての核酸の構築等が知られており、本明細書に開示される治療用または予防用組成物の投与に使用することができる。

【0147】

ヒト化抗体の投与方法としては、非経口投与（たとえば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外投与および粘膜投与（たとえば、経鼻経路および経口経路）があるが、これに限定されるものではない。特定の実施形態では、開示される抗体を筋肉内投与、静脈内投与または皮下投与する。本組成物は、任意の好都合な経路により、たとえば、注入またはボーラス注射により、上皮層または皮膚粘膜層（たとえば、口腔粘膜、直腸および腸の粘膜等）からの吸収により投与してもよく、他の生物活性薬と一緒に投与してもよい。投与は全身性でも、あるいは局所でもよい。さらに、たとえば、吸入器またはネブライザーの使用、およびエアロゾル化剤を用いた処方により経肺投与を利用してもよい。たとえば、米国特許第6,019,968号明細書；同第5,985,20号明細書；同第5,985,309号明細書；同第5,934,272号明細書；同第5,874,064号明細書；同第5,855,913号明細書；同第5,290,540号明細書；および同第4,880,078号明細書；ならびに国際公開第92/19244号パンフレット；国際公開第97/32572号パンフレット；国際公開第97/44013号パンフレット；国際公開第98/31346号パンフレット；および国際公開第99/66903号パンフレットを参照されたい。特定の実施形態では、医薬組成物は、処置を必要とする領域に局所投与することが望ましい場合がある。これは、たとえば、以下に限定されるものではないが、局所注入、注射またはインプラントにより達成することができ、前記インプラントは、多孔性物質、非多孔性物質またはゼラチン様物質、たとえばシアラステック膜または繊維などの膜である。好ましくは、開示される抗体の1つまたは複数

【0148】

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

【0149】

米国特許第5,013,556号明細書に開示されているものなど、血清中半減期が長い、すなわち、循環時間が長いリポソームの調製方法を用いて、抗体製剤を製造することができる。開示された方法に使用するのに好ましいリポソームは、すぐには循環から除去されない、すなわち、単核食細胞系(MPS)に取り込まれない。リポソームには、当業者に公知の一般的な方法を使用して調製される立体安定化リポソームが含まれる。特定の作用機序に拘泥するつもりはないが、立体安定化リポソームは、嵩高く非常にフレキシブルな親水性部分を持つ脂質成分を含み、この親水性部分は、リポソームと血清タンパク質との望ましくない反応を抑制し、血清成分によるオプソニン化を防ぎ、MPSによる認識を低下させる。立体安定化リポソームは、好ましくはポリエチレングリコールを使用して調製される。リポソームおよび立体安定化リポソームの調製については、たとえば、Be

ndas et al., 2001 *BioDrugs*, 15(4): 215 - 224; Allen et al., 1987 *FEBS Lett.* 223: 42 - 6; Klibanov et al., 1990 *FEBS Lett.*, 268: 235 - 7; Blum et al., 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1029: 91 - 7; Torchilin et al., 1996, *J. Liposome Res.* 6: 99 - 116; Litzinger et al., 1994, *Biochim. Biophys. Acta*, 1190: 99 - 107; マルヤマ (Maruyama) et al., 1991, *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 1620 - 2; Klibanov et al., 1991, *Biochim Biophys Acta*, 1062: 142 - 8; Allen et al., 1994, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 13: 285 - 309 を参照されたい。特定の臓器ターゲティング、たとえば、米国特許第 4,544,545 号明細書を参照されたい、または特定の細胞ターゲティング、たとえば、米国特許出願公開第 2005/0074403 号明細書を参照されたい、に適したリボソームを使用することもできる。組成物および方法に使用するのに特に有用なリボソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、および PEG 誘導体化ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。所望の直径を有するリボソームを得るには、リボソームを規定の細孔サイズのフィルターを通して押し出す。いくつかの実施形態では、以前に記載された方法を用いて、リボソームに抗体のフラグメント、たとえば、F(ab') をコンジュゲートしてもよい。たとえば、Martin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 286 - 288 を参照されたい。

【0150】

また、ヒト化またはキメラ抗体は、イムノリボソームとして製剤化してもよい。イムノリボソームとは、抗体またはそのフラグメントがリボソーム表面に共有結合または非共有結合したリボソーム組成物をいう。リボソーム表面に抗体を結合する化学は当該技術分野において公知である。たとえば、米国特許第 6,787,153 号明細書; Allen et al., 1995, *Stealth Liposomes*, Boca Rotan: CRC Press, 233 - 44; Hansen et al., 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1239: 133 - 144 を参照されたい。

【0151】

ヒト化抗体またはキメラ抗体は、抗体の量を表示する、アンプルまたはサッシェ (sachette) などの密封容器にパッケージすることができる。一実施形態では、抗体は、乾燥滅菌した凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として密封容器に提供され、たとえば、水または食塩水で被検体への投与に適した濃度に再構成することができる。好ましくは、抗体は、乾燥滅菌凍結乾燥粉末として、少なくとも 5 mg、一層好ましくは少なくとも 10 mg、少なくとも 15 mg、少なくとも 25 mg、少なくとも 35 mg、少なくとも 45 mg、少なくとも 50 mg、または少なくとも 75 mg の単位投薬量で密封容器に提供される。凍結乾燥抗体は、その本来の容器で 2 ~ 8 の間にて保存する必要がある。抗体は、再構成後 12 時間以内、好ましくは 6 時間以内、5 時間以内、3 時間以内または 1 時間以内に投与すべきである。代替の実施形態では、抗体は、抗体、融合タンパク質またはコンジュゲートされた分子の量および濃度を表示する密封容器に液体形態で提供される。好ましくは、液体形態の抗体は、密封容器に抗体を少なくとも 1 mg/ml、一層好ましくは少なくとも 2.5 mg/ml、少なくとも 5 mg/ml、少なくとも 8 mg/ml、少なくとも 10 mg/ml、少なくとも 15 mg/kg、少なくとも 25 mg/ml、少なくとも 50 mg/ml、少なくとも 100 mg/ml、少なくとも 150 mg/ml、少なくとも 200 mg/ml で提供される。

【0152】

また、処方用いられる正確な用量は投与経路および状態の重篤度によって異なり、開業医の判断および各患者の状況に応じて決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から外挿することができる。開示され

る抗体の場合、患者に投与される投薬量は典型的には、 0.0001 mg/kg 患者体重
 $\sim 100 \text{ mg/kg}$ 患者体重である。好ましくは、患者に投与される投薬量は、 0.00
 01 mg/kg 患者体重 $\sim 20 \text{ mg/kg}$ 患者体重、 0.0001 mg/kg 患者体重 \sim
 10 mg/kg 患者体重、 0.0001 mg/kg 患者体重 $\sim 5 \text{ mg/kg}$ 患者体重、 0
 $.0001 \sim 2 \text{ mg/kg}$ 患者体重、 $0.0001 \sim 1 \text{ mg/kg}$ 患者体重、 0.000
 1 mg/kg 患者体重 $\sim 0.75 \text{ mg/kg}$ 患者体重、 0.0001 mg/kg 患者体重 \sim
 0.5 mg/kg 患者体重、 0.0001 mg/kg 患者体重 $\sim 0.25 \text{ mg/kg}$ 患
 者体重、 $0.0001 \sim 0.15 \text{ mg/kg}$ 患者体重、 $0.0001 \sim 0.10 \text{ mg/kg}$ 患
 者体重、 $0.001 \sim 0.5 \text{ mg/kg}$ 患者体重、 $0.01 \sim 0.25 \text{ mg/kg}$ 患
 者体重または $0.01 \sim 0.10 \text{ mg/kg}$ 患者体重である。一般に、ヒト抗体は、外来
 ポリペプチドに対する免疫反応により人体内で他の種由来の抗体より長い半減期を有する
 。このため、ヒト抗体の投薬量を少なくし、投与頻度を低くすることが可能である場合が
 多い。さらに、抗体またはそのフラグメントの投薬量および投与頻度は、修飾、たとえば
 、脂質化などにより抗体の取り込みおよび組織移行性を高めることで抑えてもよい。

10

【0153】

なお別の実施形態では、本組成物は、放出制御システムまたは持続放出システムで送達
 してもよい。当業者に公知の任意の技術を使用して、1つまたは複数の抗体を含む持続放
 出製剤を製造することができる。たとえば、米国特許第4,526,938号明細書；国
 際公開第91/05548号パンフレット；国際公開第96/20698号パンフレット
 ；Ning et al., 1996, 「Intratumoral Radioimmuno-
 unotherapy of a Human Colon Cancer Xeno-
 graft Using a Sustained-Release Gel,」Rad-
 iotherapy & Oncology 39:179-189, Song et
 al., 1995, 「Antibody Mediated Lung Targeti-
 ng of Long-Circulating Emulsions,」PDA Jo-
 urnal of Pharmaceutical Science & Techno-
 logy 50:372-397；Cleek et al., 1997, 「Biode-
 gradable Polymeric Carriers for a bFGF A-
 ntibody for Cardiovascular Application,」
 Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.
 24:853-854；およびLam et al., 1997, 「Microenca-
 psulation of Recombinant Humanized Monoc-
 lonal Antibody for Local Delivery,」Proc.
 Int'l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater. 24:7
 59-760を参照されたい。一実施形態では、放出制御システムにポンプを使用しても
 よい(Langer, supra；Sefton, 1987, CRC Crit.Ref.
 Biomed.Eng. 14:20；Buchwald et al., 1980, S-
 urgery 88:507；およびSaudek et al., 1989, N.En-
 gl.J.Med. 321:574を参照)。別の実施形態では、高分子材料を使用して
 、抗体の放出制御を達成してもよい(たとえば、Medical Applicatio-
 ns of Controlled Release, Langer and Wise
 (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)
 ；Controlled Drug Bioavailability, Drug P-
 roduct Design and Performance, Smolen and
 Ball (eds.), Wiley, New York (1984)；Ranger
 and Peppas, 1983, J., Macromol.Sci.Rev.Macr-
 omol.Chem. 23:61を参照；さらに、Levy et al., 1985,
 Science 228:190；During et al., 1989, Ann.N-
 eurol. 25:351；Howard et al., 1989, J.Neuros-
 urg. 71:105)；米国特許第5,679,377号明細書；米国特許第5,9

20

30

40

50

16, 597号明細書；米国特許第5, 912, 015号明細書；米国特許第5, 989, 463号明細書；米国特許第5, 128, 326号明細書；国際公開第99/15154号パンフレット；および国際公開第99/20253号パンフレットも参照）。持続放出製剤に使用されるポリマーの例として、ポリ(2-ヒドロキシメタクリル酸エチル)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-co-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ酸無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLGA)およびポリオルトエステルがあるが、これに限定されるものではない。なお別の実施形態では、放出制御システムを治療標的(たとえば、肺)の近くに導入し、それにより必要とされるのは、全身用量のごく一部のみである(たとえば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138(1984)を参照)。別の実施形態では、Dunn et al. (米国特許第5, 945, 155号明細書を参照)に従い、放出制御インプラントとして有用なポリマー組成物を使用する。この特定の方法は、ポリマーシステムからの生理活性材料のインサイツ放出制御の治療効果に基づく。移植は一般に、治療処置を必要とする患者体内のどこで行ってもよい。別の実施形態では、被検体体内の非ポリマーインプラントを薬物送達システムとして使用する、非ポリマー持続送達システムを使用する。体内に移植すると、インプラントの有機溶媒が組成物から周囲の組織液に散逸、分散または浸出し、非ポリマー材料が徐々に凝固または沈殿して固体の微孔性マトリックスを形成する(米国特許第5, 888, 533号明細書を参照)。放出制御システムについては、Langer(1990, Science 249:1527-1533)による概説で考察されている。当業者に公知の任意の技術を使用して1つまたは複数の治療薬を含む持続放出製剤を製造することができる。たとえば、米国特許第4, 526, 938号明細書；国際公開第91/05548号パンフレットおよび国際公開第96/20698号パンフレット；Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189；Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397；Cleek et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854；およびLam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:759-760を参照されたい。

【0154】

治療用または予防用組成物が、開示される抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする核酸である特定の実施形態では、核酸を適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、たとえば、レトロウイルスベクターを使用して(米国特許第4, 980, 286号明細書を参照)、または直接注射により、または微小粒子銃を使用して(たとえば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont)、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくははトランスフェクション剤でコーティングして、または核に進入することが分かっているホメオボックス様ペプチドに連結して核酸を投与して(たとえば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868を参照)、細胞内に移行するように投与することにより、核酸をインビボ投与してコードされている抗体の発現を促進してもよい。あるいは、相同組換えにより発現させるため、核酸を細胞内に導入し、宿主細胞DNAに組み込ませてもよい。

【0155】

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

【0156】

E. 医薬組成物

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

【0157】

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

【0158】

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

【0159】

組成物は、中性形態として製剤化しても、あるいは塩形態として製剤化してもよい。薬学的に許容される塩として、アニオンとで形成される塩、たとえば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等から得られる塩、およびカチオンとで形成される塩、たとえばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等から得られる塩があるが、これに限定されるものではない。

【0160】

H. キット

別の実施形態は、開示されたヒト化抗体が入った1つまたは複数の容器を含む医療パックまたはキットを提供する。加えて、医療パックまたはキットには、疾患の処置に有用な1つまたは複数の他の予防薬または治療薬がさらに含まれていてもよい。医療パックまたはキットは、開示された医薬組成物の成分の1つまたは複数が入った1つまたは複数の容器を含んでもよい。そうした容器には任意に、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関より定められた形式の注意書が添付されていてもよい。注意書には、ヒト投与を目的とした製造、使用または販売に関するその機関の承認が反映される。

【0161】

上記の方法に使用することができるキット。一実施形態では、キットは、開示されたヒ

10

20

30

40

50

ト化抗体の1つまたは複数を含むことができる。別の実施形態では、キットは、癌の処置に有用な1つまたは複数の他の予防薬または治療薬を1つまたは複数の容器にさらに含む。別の実施形態では、キットは、癌に関連する1つまたは複数の癌抗原に結合する1つまたは複数の細胞傷害性抗体をさらに含む。ある種の実施形態では、他の予防薬または治療薬は化学療法剤である。他の実施形態では、予防薬または治療薬は、生物療法剤またはホルモン療法剤である。

【0162】

I. 診断方法

開示された抗体およびその抗原結合フラグメントは、H7CRの発現に関連する疾患、障害または感染症を検出、診断またはモニターすることなど、診断目的に使用することができる。疾患、障害または感染症、特に自己免疫疾患の検出または診断は、(a)被検体の細胞または組織サンプルにおけるH7CRの発現を、そうした抗原に免疫特異的に結合する1つまたは複数の抗体(またはそのフラグメント)を使用してアッセイすること;および(b)抗原のレベルを対照レベル、たとえば、正常組織サンプルのレベルまたは異なる時点での組織中レベルと比較することによって実施することができ、抗原の対照レベルと比較した、アッセイされた抗原レベルの上昇または低下から疾患、障害または感染症が示唆される。そうした抗体およびフラグメントは、好ましくはイムノアッセイ、たとえば酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)および蛍光活性化セルソーター(FACS)に利用される。

【0163】

一態様は、そうした抗体およびフラグメント、特にヒトH7CRに結合するそうした抗体およびフラグメントの、インビトロまたはインサイツ組織サンプルの細胞、またはインビボでの細胞におけるIHC解析の試薬としての使用に関する。以上のように、抗体およびフラグメントは、ヒトの疾患、障害または感染症の検出および診断に有用である。一実施形態では、そうした診断は、a)H7CRに免疫特異的に結合する有効量の標識抗体または抗原結合フラグメントを被検体に(たとえば、非経口、皮下または腹腔内)投与すること;b)投与後、H7CRが発現する被検体の部位に標識分子が優先的に濃縮する(および、結合していない標識分子がバックグラウンドレベルまで除去される)ことができる時間間隔を置くこと;c)バックグラウンドレベルを判定すること;およびd)被検体の標識抗体を検出することを含み、標識抗体のバックグラウンドレベルを上回る検出から、被検体が疾患、障害または感染症であることが示唆される。この実施形態では、当業者に公知のイメージングシステムを用いて検出が可能なイメージング部分で抗体を標識する。バックグラウンドレベルは、検出された標識分子の量を個々のシステムに対して以前に判定された標準値と比較するなど様々な方法により判定することができる。

【0164】

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

【0165】

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

【0166】

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

【0167】

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

10

【0168】

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

【0169】

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

20

【実施例】

【0170】

実施例1

抗ヒトH7CR抗体の特性評価およびH7CRの発現パターン
材料および方法

結合親和性の評価のために、20万個のCHO-hH7CRトランスフェクタント（図2）、ナイーブCD4+CD45RA+T細胞（図3A）またはナイーブCD8+CD45RA+T細胞（図3B）を、フローサイトメトリー緩衝液（PBS+2%FBS）100 μ lに再懸濁した。0、0.1ng、0.3ng、1ng、3ng、10ng、30ng、100ng、300ng、1 μ g、3 μ gおよび10 μ gの段階希釈したキメラ1.3および4.5を細胞に加え、4で30分間インキュベートした。次いで、細胞をフローサイトメトリー緩衝液2mlで2回洗浄し、フローサイトメトリー緩衝液100 μ lに再懸濁した。抗hIgG PE二次抗体（Biolegend）1 μ lを加え、細胞と15分間インキュベートした。次いで、サンプルを洗浄し、フローサイトメトリー緩衝液100 μ lに再懸濁した。BD Canto（BD Biosciences）をプレート形式で使用して、フローサイトメトリーデータを取得し、FlowJoソフトウェアで解析した。次いで、染色データ（MFI）をPrism 5ソフトウェアに入力して結合曲線を作成した。1部位特異的結合アルゴリズムを用いるカーブフィッティングにより、各抗体に対するそれぞれのK_Dを計算する。

30

結合特異性を示すために、5 μ g/mlのH7CR 1.3、4.5および7.8mAbを使用して、H7CRの安定なトランスフェクタントを染色した（図4）。10 μ g/mlのB7-H7mIg融合タンパク質も使用して、H7CR CHOトランスフェクタントを染色した。H7CR mAbをこの系に加え、B7-H7-H7CR相互作用に対するH7CR mAbの遮断能力を評価した（図5）。

40

ヒト扁桃腺をパラフィン包埋した切片上のH7CRに対する免疫組織化学染色を、標準プロトコルを用いて、5 μ g/mlの濃度にて4.5抗体で実施した（図6）。細胞表面染色およびフローサイトメトリーによる分析のために、細胞を表示のmAbと4で30分間インキュベートし、緩衝液で洗浄し、分析した。ヒトおよびマウスのPBMC上のH7CRの発現を、系列マーカーおよび1.3抗体染色により評価した（図7～11）。活

50

性化された単球由来DC上のB7-H7の発現を、抗B7-H7抗体染色により評価した(図12)。

【0171】

結果

ハムスター抗体1・3、4・5および7・8が、ヒトH7CRに免疫特異的に結合できることが分かった。図2に、抗H7CR抗体1・3および4・5のそれぞれの結合親和性を示す。抗体4・5のKdは、3・5nMであることが分かった。抗体1・3のKdは、5・9nMであることが分かった。ナイーブCD4およびCD8 T細胞に対するH7CR mAbの結合曲線から、両方の抗体とも受容体飽和用量が1μg/mlであることが示された(図3、パネルAおよびB)。

10

【0172】

図4(パネルA~C)に、CHO細胞の表面上に発現されたヒトH7CRに結合する抗体1・3、4・5および7・8の能力を示す。これらの抗体について、B7-H7マウスIgG2a融合タンパク質の存在下でH7CR CHOトランスフェクタントと抗体をインキュベートすることにより、H7CRのB7-H7との相互作用を遮断する抗体の能力を試験した。図5(パネル、A~D)に示すように、H7CR抗体の存在により、B7-H7 IgがH7CRに結合する能力は妨害されなかった。したがって、これら3つの抗体は、H7CRのB7-H7との相互作用を実質的に遮断することができなかった。図6に示すように、抗ヒトH7CR抗体(クローン4・5)は、ヒト扁桃腺組織の表面上に内因的に発現されたH7CRに結合できることが分かった。

20

【0173】

抗H7CR抗体により、H7CRおよびB7-H7の発現プロファイルの測定が可能になった。図7は、H7CR発現がT細胞およびNK細胞におけるナイーブT細胞表現型と関連していることを示す。図8(パネルA~H)は、4つの健常PMBcドナー(ドナー1、パネルAおよびB;ドナー2、パネルCおよびD;ドナー3(パネルEおよびF)およびドナー4(パネルGおよびH))のH7CRおよびB7-H7の発現プロファイルを示す。図9(パネルA~H)は、4つの健常PMBcドナー(ドナー1、パネルAおよびB;ドナー2、パネルCおよびD;ドナー3(パネルEおよびF)およびドナー4(パネルGおよびH))のH7CRおよびB7-H7の発現プロファイルを示す。図10(パネルA~AD)は、ヒトの単球、CD8+CD3+リンパ球、CD8-CD3+リンパ球、CD16+NK細胞およびCD3-CD8-細胞による、H7CRおよびB7-H7の発現を示す。図11(パネルA~AD)は、カニクイザルの単球、CD8+CD3+リンパ球、CD8-CD3+リンパ球、CD16+NK細胞およびCD3-CD8-細胞による、H7CRおよびB7-H7の発現を示し、これによりカニクイザルがインビボおよび毒物学試験に適した種であることが示される。

30

【0174】

B7-H7発現のインビトロ機能分析を行った。成熟単球由来樹状細胞について、B7-H7および他の活性化マーカーを発現するその能力を評価した。この試験(図12、パネルA~K)の結果から、そうしたマーカーの発現が確認され、成熟樹状細胞がインビトロ機能検査に適していることが示された。

40

【0175】

実施例2

抗H7CR抗体は抗原特異的記憶T細胞反応を促進する

材料および方法

抗H7CR抗体の特性評価をさらに行うために、破傷風トキソイド(TT)想起反応アッセイを行った。単球由来の未成熟DCを、1ng/mlのTNF および1μg/mlのPGE2と2日間インキュベートすることにより成熟させ、DC成熟の2日目に、50μg/mlの破傷風トキソイド(TT)の存在下で一晩インキュベートした。この樹状細胞を、X-Vivo培地で3回洗浄し、次いで、100ng/mlのTTおよび10μg/mlのH7CR1・3、4・5もしくは7・8モノクローナル抗体(図13)またはヒ

50

ト化 1 . 3 変異体 (図 2 3) の存在下、カルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル (C F S E) 標識自己 T 細胞を 1 : 2 0 の比で存在させて、2 週間インキュベートした。フローサイトメトリーを使用して、細胞増殖を C F S E の希釈によりモニターした。一部の実験では、ヒト I F N および T N F の細胞内染色を行った。ゴルジ遮断薬プレフェルジン A (e B i o s c i e n c e) を D C - T 細胞培養系に 8 時間加えた。活性化されたヒト T 細胞を回収し、冷 P B S で洗浄した。細胞表面マーカーを最初に染色した。I F N および T N F に対する細胞内染色は、製造業者 (C y t o f i x / C y t o p e r m 、 B D) のプロトコールに従って行った。

【 0 1 7 6 】

培養上清を様々な時点で収集し、製造業者のマニュアルに従って、B i o - P l e x P r o H u m a n C y t o k i n e 1 7 - P l e x キット (M 5 0 0 0 0 3 1 Y V 、 B i o R a d) による全サイトカイン分析を行った。データを収集し、B i o - P l e x 2 0 0 システム (B i o R a d) により分析した。

【 0 1 7 7 】

結果

この分析の結果 (図 1 3) から、抗 H 7 C R 抗体が抗原特異的記憶 T 細胞反応を促進することが示された。この細胞により発現されたサイトカインの性質およびレベルを決定するために、7 日目の上清を評価した。この分析の結果を図 1 4 (パネル、A - L) に示す。この結果から、抗 H 7 C R 抗体 1 . 3 、 4 . 5 および 7 . 8 が、異なったサイトカイン発現プロファイルをもたらしたことが示される。特に、抗体 1 . 3 は、高レベルの I F N 、 T N F 、 G M - C S F および I L - 1 0 をもたらし、抗体 4 . 5 は、高レベルの I L - 5 および I L - 1 3 をもたらした。

【 0 1 7 8 】

細胞をゴルジブロック (G o l g i B l o c k) (P M A およびイオノマイシンを含まない) と 5 時間インキュベートした後、細胞内染色に供し、I F N の細胞内発現およびカルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル (C S F E) 希釈を評価した。この検討の結果から、抗 H 7 C R 抗体による処置により、C F S E 希釈により示される増殖および抗原特異的 T 細胞の I F N 発現が増強されることが明らかになった (図 1 5 A および 1 5 B) 。分裂 T 細胞における I F N + のパーセントが、0 . 1 5 % (図 1 5 A ; 対照) から 0 . 9 6 % (図 1 5 B ; 抗体 1 . 3 処理) に増加した。

【 0 1 7 9 】

1 . 3 ヒト化変異体 (図 2 3) の中で、変異体 1 . 3 および 5 が、T T 特異的 T 細胞の C F S E 希釈について親キメラ 1 . 3 抗体と同等の増強を示した。

【 0 1 8 0 】

実施例 3

B 7 - H 7 : H 7 C R 相互作用は、抗原特異的ヒト T 細胞反応を調節する

材料および方法

抗原特異的 T 細胞反応に対する B 7 - H 7 : H 7 C R 経路の役割を決定するために、精製したヒト C D 4 + T 細胞を C F S E で標識し、抗原としての 5 0 μ g / m l の破傷風トキソイド (「 T T 」) とプレインキュベートした自己単球由来樹状細胞と共に培養した。この樹状細胞を X - V i v o 培地で 3 回洗浄し、次いで 1 0 0 n g / m l の T T および 1 0 μ g / m l の H 7 C R モノクローナル抗体の存在下、カルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル (C F S E) 標識自己 T 細胞を 1 : 2 0 の比で存在させて、2 週間インキュベートした。フローサイトメトリーを使用して、細胞増殖を C F S E 希釈によりモニターした。

【 0 1 8 1 】

結果

アゴニスト性抗 H 7 C R m A b が培養物中に含まれる場合に (T 細胞の H 7 C R シグナルを増幅する) 、T T 特異的 T 細胞増殖が強力に増強されることが分かった (図 1 6 A) 。B 7 : C D 2 8 相互作用を遮断する融合タンパク質である C T L A 4 - I g が細胞培

10

20

30

40

50

養の開始時に含まれると、アゴニスト性抗H7CR mAbの存在下でも、T細胞増殖が顕著に阻害された。これらの結果から、H7CR同時刺激は内因性B7：CD28相互作用に依存することが示される。

【0182】

アゴニスト性抗H7CR mAbの存在下でインキュベートした細胞は、IFN- γ (図16B、パネルA)、ならびにIL-5、IL-10、TNF- α およびIL-17 (図16B、パネルB)を含むサイトカインの産生を実質的に増強することを示した。これらの結果から、H7CR同時刺激がCD4⁺ヘルパーT細胞サブセットに特異的ではないことが示される。まとめると、これらの結果から、H7CRシグナルがpanヒトCD4⁺T細胞の増殖および分化を促進することが示され、これはCD28同時刺激に類似した特徴である。

【0183】

実施例4

抗H7CR抗体1.3および4.5のヒト化

ホモロジーモデリングによる抗体3D構造の作製および構造モデリングに基づいた親抗体プロファイルの作製を含む工程を使用して、ハムスター抗H7CR抗体1.3および4.5をヒト化した。一連のヒト化重鎖および軽鎖可変領域配列を作製したが、そのそれぞれは、親抗体配列の特異性領域をヒトフレームワーク配列の大半と合わせたものである。合計で6つのヒト化重鎖配列および6つのヒト化軽鎖配列を作製した。

【0184】

抗体1.3の可変ドメインをヒト生殖細胞系列フレームワーク配列データベースと比較し、Geneiousを用いて配列アライメントを作成した。好ましいアクセプターフレームワークは、フレームワークにわたる全体的な配列同一性、界面位置の一致、同様に分類される基準位置、および除去されなければならないN-糖鎖付加部位の存在に基づいて特定した。

【0185】

抗体の可変軽鎖および重鎖の構造モデルは、Discovery Studioで作製した。鋳型構造は、CDRを含む場合および含まない場合における1.3の軽鎖および重鎖可変ドメイン配列によるPDBデータベースの検索によって特定した。鋳型と1.3配列のアライメントおよびホモロジーに基づく構造モデリングは、MODELLER (Sali, A. et al. (1993) "Comparative Protein Modelling By Satisfaction Of Spatial Restraints," J. Molec. Biol. 234 (3): 779-815)を用いて行った。

【0186】

親抗体配列の様々な領域をヒトフレームワークの領域と合わせたいくつかのハイブリッド配列を、3Dモデルを使用して体系的に分析して、CDRの画定構造に対する影響が最小であると予測されるハイブリッド配列を特定した(Chothia, C. et al. (1987) "Canonical Structures For The Hypervariable Regions Of Immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196: 901-917; Martin, A. C. et al. (1996) "Structural Families In Loops Of Homologous Proteins: Automatic Classification, Modelling And Application To Antibodies," J. Molec. Biol. 263 (5): 800-815)。CDRループの5以内、バーニヤゾーン内、VH/VL鎖間界面内、またはCDR基準分類判定位置内にあるヒトフレームワークからのアミノ酸を含有するハイブリッド配列が特に注目された。というのは、これらのハイブリッド配列が、得られたヒト化抗体の機能に対して有害作用を有する可能性が高いと判断されるからである。

【0187】

親抗体のプロファイルは、CDR分析および構造モデリングに基づいて作成した。ヒトアクセプターフレームワークは、配列および相同性の比較に基づいて特定した。ヒト化抗体は、親抗体配列の部分をヒトフレームワーク配列と融合する、複数のハイブリッド配列を作成することにより設計した。3Dモデルを使用して、これらのヒト化配列を視覚およびコンピューターモデリングによって系統的に分析し、抗原結合を保持する可能性が最も高いと思われる配列を分離した。目標は、元の抗体特異性を保持しながら、最終的なヒト化抗体中のヒト配列の量を最大にすることであった。

【0188】

Collier de Perlesは、可変ドメインの2D表示であり、可変ドメインのストランドおよびループのアミノ酸位置に関する情報を提供する(Ruiz, M. et al. (2002)「IMGT Gene Identification And Colliers de Perles Of Human Immunoglobulins With Known 3D Structures」Immunogenetics 53(10-11):857-883)。抗体1.3軽鎖および重鎖可変領域のCollier de Perlesをそれぞれ、図17Aおよび図17Bに示す。図18Aおよび18Bはそれぞれ、抗体4.5の軽鎖および重鎖可変領域のCollier de Perlesを示す。鎖の3つのCDRループを図の一番上に示す。可変軽鎖または重鎖領域には遊離Cys残基もN連結糖鎖付加部位もない。

【0189】

抗体1.3のヒト化

ハムスター抗体1.3可変ドメインをヒト生殖細胞系列データベースと比較した配列アライメントを作成した。全体的な配列同一性、界面位置の一致、同様に分類される基準位置に基づいて、2つの生殖細胞系列ファミリーを軽鎖のための可能なアクセプターフレームワークとして特定した、すなわちIGKV4-1*01およびIGKV2D-28*01である。Jセグメント遺伝子を、FR4およびJセグメントにわたって親配列と比較し、軽鎖のためにIGKJ2*01を選択した。親1.3VL鎖とこれらのアクセプターフレームワークとのアライメントを表6に示す。異なる残基を下線で示す。

【0190】

【表8】

表6					
可変軽鎖	配列番号	配列			
		10	20	30	40
ハムスター1.3	60	DIVMTQSPSS	LAVSAGEKVT	ISCLSSQSLF	SSNTNRNYLN
IGKV4-1*01	61	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSVL	YSSNNKNYLA
IGKV2D-28*01	62	DIVMTQSPLS	LPVTPGEPAS	ISCRSSQSLL	HSN-GYNYLD
		50	60	70	80
ハムスター1.3	63	WYLQKPGQSP	KLLIYHASTR	LTGVPDRFIG	SGSGTDFTLT
IGKV4-1*01	64	WYQQKPGQPP	KLLIYWASTR	ESGVPDRFSG	SGSGTDFTLT
IGKV2D-28*01	65	WYLQKPGQSP	QLLIYLGSNR	ASGVPDRFSG	SGSGTDFTLK
		90	100	110	
ハムスター1.3	66	ISSVQAEDLG	DYYCQHHYET	PLTFGDGTKL	EIK
IGKV4-1*01	67	ISSLQAEDVA	VYYCQQYST	PYT	
IGKV2D-28*01	68	ISRV E AEDVG	VYYC MO ALQT	PYT	
IGKJ2*01	69	FGQGTKL EIK			

【0191】

ハムスター抗体1.3の重鎖は、生殖細胞系列IGHV4-31*02に最も類似していることが分かった。抗体1.3重鎖に最も近い生殖細胞系列の上位50には、1.3重鎖と同じ長さのCDRH3はない。したがって、全体類似性、CDRの長さ、およびCDR基準構造に基づいて、第2のアクセプターフレームワーク(AAY33199.1)として、再編成された重鎖を選択した。Jセグメント遺伝子を、FR4およびJセグメン

トにわたって親配列と比較し、重鎖のためにIGHJ3*01を選択した。親VH鎖とこれらのアクセプターフレームワークとのアライメントを表7に示す。異なる残基を下線で示す。

【0192】

【表9】

表7					
可変重鎖	配列番号	配列			
		10	20	30	40
ハムスター1.3	70	QIQQLQESGPG	LVKPSQSLSL	TCSVTGFSIS	TSGYYWTWIR
IGHV4-31*02	71	Q <u>V</u> QLQESGPG	LVKPSQ <u>T</u> LSL	TC <u>T</u> <u>V</u> <u>SG</u> GSIS	<u>SG</u> GYYSWIR
AAV33199.1	72	Q <u>V</u> QLQESGPG	LVKP <u>AQ</u> <u>T</u> LSL	TC <u>T</u> <u>V</u> <u>SG</u> GSIS	<u>SV</u> NYYSWIR
		50	60	70	80
ハムスター1.3	73	QFPGKRLEWM	GYINYGGGTS	YNPSLKSRIS	ITRDTSKNQF
IGHV4-31*02	74	Q <u>H</u> PGK <u>G</u> LEW <u>I</u>	GYI <u>Y</u> <u>Y</u> <u>SG</u> <u>ST</u> <u>Y</u>	YNPSLKSR <u>VT</u>	IS <u>V</u> DTSKNQF
AAV33199.1	75	Q <u>Y</u> PGK <u>G</u> LEW <u>I</u>	GYI <u>Y</u> <u>Y</u> <u>RG</u> <u>ST</u> <u>Y</u>	YNPSLKSR <u>VT</u>	IS <u>V</u> DTSKNQF
		90	100	110	120
ハムスター1.3	76	LLHLNSVTTE	DTATYCCATM	ADRFADFVW	GQGIQVTVSS
IGHV4-31*02	77	<u>SL</u> <u>KL</u> <u>SS</u> VT <u>AA</u>	DTA <u>V</u> <u>Y</u> <u>Y</u> CA <u>R</u>		
AAV33199.1	78	<u>SL</u> <u>KL</u> <u>T</u> SVT <u>AA</u>	DTA <u>V</u> <u>Y</u> <u>H</u> CA <u>R</u>	<u>RTMTGA</u> FD <u>I</u> <u>W</u>	GQGT <u>TM</u> VTVSS
IGHJ3*01	79			<u>DA</u> FDVW	GQGT <u>TM</u> VTVSS

【0193】

軽鎖については、2つのアクセプターフレームワーク、IGKV4-1*01およびIGKV2D-28*01のそれぞれに関して3つのヒト化鎖を作製し、それによって、6つのヒト化1.3軽鎖を形成させた。各アクセプターフレームワークに関する第1のヒト化鎖(VL1A、VL2A)は、最も多くのヒトフレームワークを含有する(ヒト化軽鎖1)。各アクセプターフレームワークに関する第2のヒト化鎖(VL1B、VL2B)は、ヒトフレームワーク配列と融合した親配列をある量含有し、これにより元のCDRコンフォメーションの保持が容易になるはずである(ヒト化軽鎖2)。アクセプターフレームワークのそれぞれに関する第3のヒト化鎖(VL1C、VL2C)は、ヒトフレームワークと融合した親配列を一層多く含有し、これにより元の抗体特異性およびCDR構造の維持が容易になるはずである(ヒト化軽鎖3)。これらの鎖のアミノ酸配列は、以下に示すとおりである。

【0194】

IGKV4-1*01アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH7CR抗体1.3のヒト化変異体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(CDRは下線で示す)：

1. VL1A IGVK4-1*01(ヒト化1)：

【化35】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTNRNYLA WYQQKPGQPP
 KLLIYHASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQHHYET
PLTFGQGTKL EIK (配列番号17)

2. VL1B IGVK4-1*01(ヒト化2)：

【化36】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTNRNYLN WYQQKPGQSP
 KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYYCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号18)

3. VL1C IGVK4-1*01(ヒト化3)：

【化37】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCLSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
 KLLIYHASTR LSGVPDRFIG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVG DYVCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号19)

【0195】

I G K V 2 D - 2 8 * 0 1 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH7CR抗体1.3のヒト化変異体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(CDRは下線で示す) :

1 . V L 2 A I G K V 2 D - 2 8 * 0 1 (ヒト化1) :

【化38】

10

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTNRNYLD WYLQKPGQSP
 QLLIYHASNR ASGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号20)

2 . V L 2 B I G K V 2 D - 2 8 * 0 1 (ヒト化2) :

【化39】

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
 KLLIYHASTR ASGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号21)

20

3 . V L 2 C I G K V 2 D - 2 8 * 0 1 (ヒト化3) :

【化40】

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCLSSQSLF SSNTNRNYLN WYLQKPGQSP
 KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG DYVCQHHYET
PLTFGDGTKL EIK (配列番号22)

【0196】

重鎖については、上記に特定したIGHV4-31*02およびAAY33199.1アクセプターフレームワークのそれぞれに関して、3つのヒト化鎖を作製した。軽鎖と類似の様式で、各アクセプターフレームワークに関する第1のヒト化鎖(VH1A、VH2A)は、最も多くのヒト配列を含有する(ヒト化1)。各アクセプターフレームワークに関する第2のヒト化鎖(VH1B、VH2B)は、元のCDRコンフォメーションの保持を容易にするはずである(ヒト化2)。アクセプターフレームワークのそれぞれに関する第3の鎖(VH1C、VH2C)は、元の抗体特異性およびCDR構造の維持を容易にするはずである(ヒト化3)。これらの鎖のアミノ酸配列は、以下に示すとおりである。

30

【0197】

IGHV4-31*02アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH7CR抗体1.3のヒト化変異体の重鎖可変領域のアミノ酸配列(CDRは下線で示す) :

1 . V H 1 A I G H V 4 - 3 1 * 0 2 (ヒト化1) :

【化41】

40

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QHPGKGLEWI
 GYINYGGGT YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCATM
ADRAFFDVW GQGTMTTVSS (配列番号23)

2 . V H 1 B I G H V 4 - 3 1 * 0 2 (ヒト化2) :

【化42】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QHPGKRLEWI
 GYINYGGGT YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYCCATM
ADRAFFDVW GQGTMTTVSS (配列番号24)

3 . V H 1 C I G H V 4 - 3 1 * 0 2 (ヒト化3) :

50

【化 4 3】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QFPGKRLEWM
GYINYGGSTS YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTATYCCATM
ADRFAFFDVW GQGTMTTVSS (配列番号25)

【0198】

AA Y 3 3 1 9 9 . 1 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3 のヒト化変異体の重鎖可変領域のアミノ酸配列 (C D R は下線で示す) :

1 . V H 2 A AA Y 3 3 1 9 9 . 1 (ヒト化 1) :

【化 4 4】

QVQLQESGPG LVKPAQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QYPGKGLEWI
GYINYGGSTY YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYHCATM
ADRFAFFDVW GQGTMTTVSS (配列番号26)

2 . V H 2 B AA Y 3 3 1 9 9 . 1 (ヒト化 2) :

【化 4 5】

QVQLQESGPG LVKPAQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QYPGKRLWEI
GYINYGGSTS YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLTSVTAA DTATYCCATM
ADRFAFFDVW GQGTMTTVSS (配列番号27)

3 . V H 2 C AA Y 3 3 1 9 9 . 1 (ヒト化 3) :

【化 4 6】

QVQLQESGPG LVKPAQTLST TCTVSGFSIS TSGYYWSWIR QFPGKRLEWM
GYINYGGSTS YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLTSVTAA DTATYCCATM
ADRFAFFDVW GQGTMTTVSS (配列番号28)

【0199】

好ましい抗体およびその抗原結合フラグメントは、抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3 の上記ヒト化変異体の 3 6 の組合せのいずれかを含む。具体的には、そうした抗体は、表 4 に示す組合せを含有する。抗ヒト H 7 C R 抗体 1 . 3 に関する 3 6 種のそうしたヒト化変異体すべてについて、C H O 細胞の表面上に異所性に発現されたヒト H 7 C R 分子に結合するこれらの個々の能力を評価し、3 6 種のうちの 2 8 種が、そうしたヒト H 7 C R 分子に結合できることが分かった。

【0200】

抗 H 7 C R 抗体 4 . 5 のヒト化

ハムスター抗体 4 . 5 可変ドメインをヒト生殖細胞系列データベースと比較した配列アライメントを作成した。全体的な配列同一性、界面位置の一致、同様に分類される基準位置に基づいて、2 つの生殖細胞系列ファミリーを軽鎖のための可能なアクセプターフレームワークとして特定した、すなわち I G K V 4 - 1 * 0 1 および I G K V 2 D - 4 0 * 0 1 である。J セグメント遺伝子を、F R 4 および J セグメントにわたって親配列と比較し、軽鎖のために I G K J 5 * 0 1 を選択した。親 1 . 3 の V L 鎖とこれらのアクセプターフレームワークとのアライメントを表 8 に示す。異なる残基を下線で示す。

【0201】

【表 10】

表8			
可変軽鎖	配列番号	配列	
		10	20 30 40
ハムスター4.5	80	DIVMTQSPSS LAVSAGEKVT ISCLSSQSLF SSNTKRNYLN	
IGKV4-1*01	81	DIVMTQSP <u>DS</u> LAVS <u>L</u> GERAT <u>IN</u> CKSSQSVL <u>Y</u> SSNNK <u>NYLA</u>	
IGKV2D-40*01	82	DIVMTQ <u>T</u> PLS L <u>PV</u> <u>TP</u> GE <u>PAS</u> I <u>SC</u> RSSQSL <u>LL</u> <u>DS</u> DDGNT <u>YLD</u>	
		50	60 70 80
ハムスター4.5	83	WYLQKPGQSP KLLIYHASTR LTGVPGRFIG SGSGTDFTLT	
IGKV4-1*01	84	WY <u>Q</u> QKPGQ <u>PP</u> KLLIY <u>W</u> ASTR <u>ES</u> GVP <u>DR</u> F <u>S</u> G SGSGTDFTLT	
IGKV2D-40*01	85	WYLQKPGQSP <u>Q</u> LLIY <u>TL</u> SYR <u>AS</u> GVP <u>DR</u> F <u>S</u> G SGSGTDFTLK	
		90	100 110
ハムスター4.5	86	VSTVQAEDLG DYFCQQHYET PLTFGDGTRL EIK	
IGKV4-1*01	87	ISS <u>L</u> QAED <u>VA</u> <u>VY</u> YC <u>QY</u> Y <u>ST</u> <u>PY</u> T	
IGKV2D-40*01	88	IS <u>R</u> VEAED <u>VG</u> <u>VY</u> YCM <u>QRI</u> E <u>F</u> P	
IGKJ5*01	89	<u>I</u> TFG <u>Q</u> GTRL EIK	

10

【0202】

ハムスター抗体4.5の重鎖は、生殖細胞系列IGHV4-31*02に最も類似していることが分かった。抗体4.5重鎖に最も近い生殖細胞系列の上位50の中で、類似した基準構造を有する第2のアクセプターフレームワークはIGHV2-5*01である。Jセグメント遺伝子を、FR4およびJセグメントにわたって親配列と比較し、重鎖のためにIGHJ5*01を選択した。親VH鎖とこれらのアクセプターフレームワークとのアライメントを表9に示す。異なる残基を下線で示す。

20

【0203】

【表 11】

表9			
可変重鎖	配列番号	配列	
		10	20 30 40
ハムスター4.5	90	QIQQLQESGPG LVKPSQSLSL TCSVTGFSIT TGGYYWNWIR	
IGHV4-31*02	91	<u>QV</u> QLQESGPG LVKPSQ <u>TL</u> SL T <u>C</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> G <u>G</u> S <u>I</u> S <u>S</u> G <u>G</u> Y <u>W</u> <u>S</u> WIR	
IGHV2-5*01	92	QI <u>TL</u> KESG <u>P</u> T LVK <u>P</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> L T <u>C</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>S</u> G <u>F</u> <u>S</u> <u>L</u> S <u>T</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>G</u> WIR	
		50	60 70 80
ハムスター4.5	93	QFPGKKLEWM GYIYTSGRIS YNPSLKSRIS ITRDTSKNQF	
IGHV4-31*02	94	<u>Q</u> <u>H</u> PGK <u>G</u> LEW <u>I</u> GYI <u>Y</u> <u>S</u> G <u>S</u> <u>T</u> <u>Y</u> YNPSLKSR <u>V</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>F</u>	
IGHV2-5*01	95	<u>Q</u> <u>P</u> PGK <u>A</u> LEW <u>L</u> <u>A</u> LIY <u>W</u> NDD <u>K</u> R Y <u>S</u> PSLKSR <u>L</u> <u>T</u> I <u>T</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>N</u> <u>Q</u> <u>V</u>	
		90	100 110 120
ハムスター4.5	96	FLQLNSMTE DTATYYCADM ADKGGWFAYW GQGLTVTVSS	
IGHV4-31*02	97	<u>SL</u> <u>KL</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>AA</u> DTAV <u>Y</u> <u>Y</u> CA-- -- <u>R</u>	
IGHV2-5*01	98	<u>VL</u> <u>T</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>V</u> DTATYYCA-- -- <u>HR</u>	
IGHJ5*01	99	<u>N</u> <u>W</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>W</u> GQGLTVTVSS	

30

40

【0204】

軽鎖については、2つのアクセプターフレームワーク、IGKV4-1*01およびIGKV2D-40*01のそれぞれに関して3つのヒト化鎖を作製し、それによって、6つのヒト化4.5軽鎖を形成させた。各アクセプターフレームワークに関する第1のヒト化鎖（VL1A、VL2A）は、最も多くのヒトフレームワークを含有する（ヒト化軽鎖1）。各アクセプターフレームワークに関する第2のヒト化鎖（VL1B、VL2B）は、ヒトフレームワーク配列と融合した親配列をある量含有し、これにより元のCDRコンフォメーションの保持が容易になるはずである（ヒト化軽鎖2）。アクセプターフレーム

50

ワークのそれぞれに関する第3のヒト化鎖（V L 1 C、V L 2 C）は、ヒトフレームワークと融合した親配列を一層多く含有し、これにより元の抗体特異性およびC D R構造の維持が容易になるはずである（ヒト化軽鎖3）。これらの鎖のアミノ酸配列は、以下に示すとおりである。

【0205】

I G K V 4 - 1 * 0 1 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH 7 C R抗体4.5のヒト化変異体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（C D Rは下線で示す）：

1 . V L 1 A I G K V 4 - 1 * 0 1（ヒト化1）：

【化47】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTRNYLA WYQQKPGQPP
KLLIYHASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQHYET
PLTFGQGTRLEIK (配列番号33)

10

2 . V L 1 B I G K V 4 - 1 * 0 1（ヒト化2）：

【化48】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLF SSNTRNYLN WYQQKPGQPP
KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYFCQQHYET
PLTFGDGTRL EIK (配列番号34)

3 . V L 1 C I G K V 4 - 1 * 0 1（ヒト化3）：

【化49】

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCLSSQSLF SSNTRNYLN WYQQKPGQSP
KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA DYFCQQHYET
PLTFGDGTRL EIK (配列番号35)

20

【0206】

I G K V 2 D - 4 0 * 0 1 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH 7 C R抗体4.5のヒト化変異体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（C D Rは下線で示す）：

1 . V L 2 A I G K V 2 D - 4 0 * 0 1（ヒト化1）：

【化50】

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTRNYLD WYLQKPGQSP
QLLIYHASYR ASGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG VYYCQQHYET
PLTFGQGTRL EIK (配列番号36)

30

2 . V L 2 B I G K V 2 D - 4 0 * 0 1（ヒト化2）：

【化51】

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLF SSNTRNYLN WYLQKPGQSP
KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG DYFCQQHYET
PLTFGDGTRL EIK (配列番号37)

3 . V L 2 C I G K V 2 D - 4 0 * 0 1（ヒト化3）：

【化52】

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCLSSQSLF SSNTRNYLN WYLQKPGQSP
KLLIYHASTR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLK ISRVEAEDVG DYFCQQHYET
PLTFGDGTRL EIK (配列番号38)

40

【0207】

重鎖については、上記で特定したI G H V 4 - 3 1 * 0 2およびI G H V 2 - 5 * 0 1アクセプターフレームワークのそれぞれに関して3つのヒト化鎖を作製した。軽鎖と類似の様式で、各アクセプターフレームワークに関する第1のヒト化鎖（V H 1 A、V H 2 A）は、最も多くのヒト配列を含有する（ヒト化1）。各アクセプターフレームワークに関する第2のヒト化鎖（V H 1 B、V H 2 B）は、元のC D Rコンフォメーションの保持を容易にするはずである（ヒト化2）。アクセプターフレームワークのそれぞれに関する第3の鎖（V H 1 C、V H 2 C）は、元の抗体特異性およびC D R構造の維持を容易にする

50

はずである（ヒト化3）。これらの鎖のアミノ酸配列は、以下に示すとおりである。

【0208】

I G H V 4 - 3 1 * 0 2 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH7CR抗体4.5のヒト化変異体の重鎖可変領域のアミノ酸配列（CDRは下線で示す）：

1. V H 1 A I G H V 4 - 3 1 * 0 2（ヒト化1）：

【化53】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIT TGGYYWSWIR QHPGKGLEWI
GYIYTSGRTY YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTLVTVSS (配列番号39)

2. V H 1 B I G H V 4 - 3 1 * 0 2（ヒト化2）：

10

【化54】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QHPGKKLEWI
GYIYTSGRTS YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTLVTVSS (配列番号40)

3. V H 1 C I G H V 4 - 3 1 * 0 2（ヒト化3）：

【化55】

QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QPPGKKLEWM
GYIYTSGRTS YNPSLKSRVT ISRDTSKNQF SLKLSSVTAA DTAVYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTLVTVSS (配列番号41)

【0209】

20

I G H V 2 - 5 * 0 1 アクセプターフレームワークに由来する、抗ヒトH7CR抗体4.5のヒト化変異体の重鎖可変領域のアミノ酸配列（CDRは下線で示す）：

1. V H 2 A I G H V 2 - 5 * 0 1（ヒト化1）：

【化56】

QITLKESGPT LVKPTQTLTL TCTFSGFSIT TGGYYVGWIR QPPGKALEWL
ALIYTSGRTR YPSLKSRILT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTLVTVSS (配列番号42)

2. V H 2 B I G H V 2 - 5 * 0 1（ヒト化2）：

【化57】

QITLKESGPT LVKPTQTLTL TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QPPGKKLEWL
ALIYTSGRTS YNPSLKSRILT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTLVTVSS (配列番号43)

30

3. V H 2 C I G H V 2 - 5 * 0 1（ヒト化3）：

【化58】

QIQLKESGPT LVKPTQTLTL TCTVSGFSIT TGGYYWNWIR QPPGKKLEWM
ALIYTSGRTS YNPSLKSRILT ITKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCADM
ADKGGWFAYW GQGTLVTVSS (配列番号44)

【0210】

好ましい抗体およびその抗原結合フラグメントは、抗ヒトH7CR抗体4.5の上記ヒト化変異体の36の組合せのいずれかを含むことができる。具体的には、そうした抗体は、表5に示す組合せを含む。抗ヒトH7CR抗体4.5の36種のそうしたヒト化変異体すべてについて、細胞の表面上で内因的に発現されるヒトH7CR分子に結合するそれらの個々の能力を評価し、すべてのものが、そうしたヒトH7CR分子に結合できることが分かった。

40

【0211】

実施例5

抗体1.3はインビボでT細胞機能を増強する

材料および方法

NOD-SCID Il2rg-/- (NSG) マウス (Jackson Lab) に、1500~2000万個のヒトPBMCまたは1000万個の精製ナイーブCD4+ヒ

50

トT細胞を腹腔内に移入した。0日目および2日目に、300 μ gの対照またはH7CR mAb1.3を各マウスに腹膜接種した。移入6日後に、脾細胞を摘出した。ヒトCD45、CD3およびCD8の染色によりヒトT細胞を検出した。細胞分裂をモニターするために、移入前にhPBMCをCFSEで標識した。

【0212】

結果

フローサイトメトリー分析から、ヒトCD4+およびCD8+の両T細胞において、CFSE希釈集団の細胞数が増加したことにより証明されるように、抗体1.3がヒト抗マウス異種反応性T細胞を増殖させることが明らかになった。(図19A~19D)。

【0213】

10

実施例6

抗体1.3は、インビボ、すなわち異種GvDHモデルでCD40L、IFN およびCD107aの発現を増大させる

材料および方法

NOD-SCID Il2rg-/- (NSG)マウス(Jackson Lab)に、1500~2000万個のヒトPBMCまたは1000万個の精製ナイーブCD4+ヒトT細胞を腹腔内に移入した。0日目および2日目に、300 μ gの対照またはH7CR mAb1.3を各マウスに腹膜接種した。移入6日後に、脾細胞を摘出した。ヒトCD45、CD3およびCD8の染色によりヒトT細胞を検出した。PMAとイオノマイシンでインビトロにて脾細胞を再刺激して、IFN- またはCD107aを産生する細胞を検出した。細胞分裂をモニターするために、移入前にhPBMCをCFSEで標識した。

20

【0214】

結果

図20A-20HはFACS分析の散布図であり、抗体1.3を注入したNSGマウスにおいて、CD40L、IFN およびCD107aの発現が増大したことが示されている。1.3抗体により、対照抗体処置マウスに比較して、CD4+T細胞の膜結合型CD40Lの発現およびIFN- の産生が顕著に増強された。また、1.3抗体処置により、細胞溶解活性を示すCD8+T細胞上のCD107aの発現、ならびにIFN- の産生も増大した。要約すると、1.3抗体処置により、異種反応性CD4+およびCD8+T細胞の増殖およびエフェクター機能が亢進した。

30

【0215】

実施例7

抗体1.3の変異体の特性評価

材料および方法

PBSで希釈した1 μ g/mlのH7CRECDヒトIgG1 Fc融合タンパク質100 μ lを、平底96ウェルプレート(Costar 9017)上に4 で一晩固定化した。プレートをPBS+0.1%PS-20で2回洗浄し、200 μ l/ウェルのPBS-10%FBSで室温にて1時間ブロックした。PBS-10%FBSで希釈した、ヒトIgG4 Fcキメラ1.3および14種の選択した1.3ヒト化変異体を各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、1 μ g/mlの抗ヒトIgG4 HRP(Southern Biotech)100 μ lを各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。プレートを6回洗浄し、TMB基質(SurModics)100 μ lを各ウェルに5~15分間加えた。停止液(0.1M硫酸)100 μ lを各ウェルに加えた。プレートに対して、PerkinElmer EnVision 2104 Multilabel Readerにより450nmの吸光度を読み取った。

40

【0216】

抗体1.3の14種の変異体の結合親和性を、H7CR融合タンパク質に対するELISAアッセイを用いて検討した。

【0217】

50

結果

結合親和性の結果を表 10 に示す。

【 0 2 1 8 】

【 表 1 2 】

表 10

抗体	重鎖	軽鎖	EC ₅₀ (nM)
キメラ			0.055
V1	1A 配列番号 23	1A 配列番号 17	0.84
V2	1B 配列番号 24	1A 配列番号 17	0.23
V3	1C 配列番号 25	1A 配列番号 17	0.38
V4	2A 配列番号 26	1A 配列番号 17	1.08
V5	2B 配列番号 27	1A 配列番号 17	0.28
V6	2C 配列番号 28	1A 配列番号 17	0.30
V7	1B 配列番号 24	1B 配列番号 18	1.01
V8	1C 配列番号 25	1B 配列番号 18	0.74
V9	2B 配列番号 27	1B 配列番号 18	2.43
V10	2C 配列番号 28	1B 配列番号 18	1.18
V11	1B 配列番号 24	1C 配列番号 19	1.04
V12	1C 配列番号 25	1C 配列番号 19	0.75
V13	2B 配列番号 27	1C 配列番号 19	0.45
V14	2C 配列番号 28	1C 配列番号 19	0.32

【 0 2 1 9 】

図 2 1 A および 2 1 B は、(左から右に) ヒト化抗体 1 . 3、陰性対照、O K T 3、O K T 3 + C D 2 8、固定化ヒト化抗体、固定化陰性対照、および固定化 O K T 3 で処理した休止期 P M B C または刺激 P M B C のドットプロットである。ヒトキメラ 1 . 3 抗体への曝露で、サイトカイン産生の統計的に有意な増加は観察されなかった。結果として、1 . 3 抗体処理は、このインビトロ環境において T 細胞サイトカインストームを誘導しない。

【 0 2 2 0 】

10

20

30

40

50

キメラ 1 . 3 抗体の配列は以下のとおりである：
重鎖核酸配列：

【化 5 9】

ATGGAATGGTCCTGGGTGTTCTTCTTCTGTCCTGACCAACCGGCGTGCACTCCCAG
ATCCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTCGTGAAGCCTTCCCAGTCCCTGTCCCTGACC
TGCAGCGTGACCGGCTTCTCCATCTCCACCTCCGGCTACTACTGGACCTGGATCCGGCAG
TTCCCTGGCAAGCGGCTGGAATGGATGGGCTACATCAACTACGGCGGAGGCACCTCCTA
CAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCTCCATCACCCGGGATACCTCCAAGAACCAGTTCCT
GCTGCACCTGAACTCCGTGACAACCGAGGACACCGCCACCTACTGCTGCGCTACCATGGC
CGACAGATTTCGCTTCTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCATCCAAGTGACCGTGTCTCTCCGC
TTCCACCAAGGGCCCCCTCTGTGTTTCTTCTGCCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCTGAGTCT
ACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTCTGG
AACTCTGGCGCTCTGACCTCTGGCGTGACACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTAGCGGC
CTGTACTCCCTGTCTCTCCGTCTGTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACA
CCTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAATCTAAG
TACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCTCTGCCCTGAATTTCTGGGCGGACCCTCCGTGTTTC
TGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCG
TGGTGGTGGATGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC
GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCTACCG
GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGT
GCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCTAAG
GGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAA
GAATCAGGTGTCACTGACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGA
ATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACT
CCGACGGCTCCTTCTTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAG
GCAACGTGTTCTCCTGCTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT
CCCTGAGCCTGTCCCCCGGCTGATGA (配列番号100)

10

20

30

【 0 2 2 1】

軽鎖核酸配列：

【化 6 0】

ATGTCCGTGCCCACCCAGGTGCTGGGATTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCA
 GATGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGGCTGTGTCTGCTGGCGA
 GAAAGTGACCATCTCCTGCCTGTCCTCCCAGTCCCTGTTCTCCTCCAACACCAACC
 GGAAGTACCTGAACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTAAGCTGCTGAT
 CTACCACGCCTCCACCAGACTGACCGGCGTGCCCGATAGATTCATCGGCTCTGGC
 TCCGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCGTGCAGGCCGAGGACCTGGGCG
 ACTACTACTGCCAGCACCCTACGAGACACCCCTGACCTTTGGCGACGGCACCAA
 GCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCTTCC
 GACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCT
 ACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCA
 ACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGT
 CCAGCACCCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT
 GCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGG
 GCGAGTGCTGATGA (配列番号101)

10

20

【 0 2 2 2】

重鎖タンパク質配列：

【化 6 1】

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQIQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGFSISTSGYYWTWI
 RQFPGKRLEWMGYINYGGGTSYNPSLKSRI SITRDT SKNQFLHLNSVTTEDTATYCC
 ATMADRFAFFDVWGQGIQVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSN
 TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQE
 DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPG** (配列番号11)

30

【 0 2 2 3】

軽鎖タンパク質配列：

【化 6 2】

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCDIVMTQSPSSLA VSAGEKVTISCLSSQSLFSSNTNRNY
 LNWYLQKPGQSPKLLIYHASTRLTGVPDRFIGSGSGTDFTLTIS SVQAEDLGDYYCQH
 HYETPLTFGDGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
 TKSFNRGEC** (配列番号12)

40

【 0 2 2 4】

実施例 8

ヒト化 H 7 C R 抗体 4 . 5 変異体

50

材料および方法

36種の変異体に由来する5 μ g/mlの抗体を、H7CR-GFP融合タンパク質をトランスフェクトしたCHO細胞と共に、室温で30分間インキュベートした。次いで、細胞をフローサイトメトリー緩衝液2mlで2回洗浄し、フローサイトメトリー緩衝液100 μ lに再懸濁した。抗hIgG PE二次抗体(Biolegend)1 μ lを加え、細胞と共に15分間インキュベートした。次いで、サンプルを洗浄し、フローサイトメトリー緩衝液100 μ lに再懸濁した。プレート形式でBD Canto (BD Biosciences)を用いて、フローサイトメトリーデータを取得し、FlowJoソフトウェアで分析した。X軸はH7CR-GFPの発現を示し、Y軸はトランスフェクタントへの変異体の結合を示す。

10

【0225】

結果

H7CR抗体4.5の36種のヒト化変異体について、H7CRに対する結合特異性をアッセイした。結果を図23に示す。36種の4.5ヒト化変異体はすべて、H7CRに対する結合特異性を維持している。

【0226】

【表 1 3】

表 11: 4.5 抗体のヒト化変異体

4.5 ヒト化変異体

変異体番号	重鎖	軽鎖
1	HC1-1 (配列番号 39)	LC1-1 (配列番号 33)
2	HC1-1 (配列番号 39)	LC1-2 (配列番号 34)
3	HC1-1 (配列番号 39)	LC1-3 (配列番号 35)
4	HC1-1 (配列番号 39)	LC2-1 (配列番号 36)
5	HC1-1 (配列番号 39)	LC2-2 (配列番号 37)
6	HC1-1 (配列番号 39)	LC2-3 (配列番号 38)
7	HC1-2 (配列番号 40)	LC1-1 (配列番号 33)
8	HC1-2 (配列番号 40)	LC1-2 (配列番号 34)
9	HC1-2 (配列番号 40)	LC1-3 (配列番号 35)
10	HC1-2 (配列番号 40)	LC2-1 (配列番号 36)
11	HC1-2 (配列番号 40)	LC2-2 (配列番号 37)
12	HC1-2 (配列番号 40)	LC2-3 (配列番号 38)
13	HC1-3 (配列番号 41)	LC1-1 (配列番号 33)
14	HC1-3 (配列番号 41)	LC1-2 (配列番号 34)
15	HC1-3 (配列番号 41)	LC1-3 (配列番号 35)
16	HC1-3 (配列番号 41)	LC2-1 (配列番号 36)
17	HC1-3 (配列番号 41)	LC2-2 (配列番号 37)
18	HC1-3 (配列番号 41)	LC2-3 (配列番号 38)
19	HC2-1 (配列番号 42)	LC1-1 (配列番号 33)
20	HC2-1 (配列番号 42)	LC1-2 (配列番号 34)
21	HC2-1 (配列番号 42)	LC1-3 (配列番号 35)
22	HC2-1 (配列番号 42)	LC2-1 (配列番号 36)

【 0 2 2 7 】

10

20

30

40

【表 1 4】

23	HC2-1 (配列番号 42)	LC2-2 (配列番号 37)
24	HC2-1 (配列番号 42)	LC2-3 (配列番号 38)
25	HC2-2 (配列番号 43)	LC1-1 (配列番号 33)
26	HC2-2 (配列番号 43)	LC1-2 (配列番号 34)
27	HC2-2 (配列番号 43)	LC1-3 (配列番号 35)
28	HC2-2 (配列番号 43)	LC2-1 (配列番号 36)
29	HC2-2 (配列番号 43)	LC2-2 (配列番号 37)
30	HC2-2 (配列番号 43)	LC2-3 (配列番号 38)
31	HC2-3 (配列番号 44)	LC1-1 (配列番号 33)
32	HC2-3 (配列番号 44)	LC1-2 (配列番号 34)
33	HC2-3 (配列番号 44)	LC1-3 (配列番号 35)
34	HC2-3 (配列番号 44)	LC2-1 (配列番号 36)
35	HC2-3 (配列番号 44)	LC2-2 (配列番号 37)
36	HC2-3 (配列番号 44)	LC2-3 (配列番号 38)

10

20

【0 2 2 8】

キメラ 4 . 5 抗体の配列データは以下のとおりである。

【0 2 2 9】

重鎖核酸配列：

【化 6 3】

ATGGAATGGTCCTGGGTGTTCTCCTGTTCTTCCTGTCCGTGACCACCGGCGTGCACTC
CCAGATCCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTCGTGAAGCCTTCCCAGTCCCTG
TCCCTGACCTGCAGCGTGACCGGCTTCTCTATCACAACCGGCGGCTACTACTGGA
ACTGGATCCGGCAGTTCCCCGGCAAGAACTGGAATGGATGGGCTACATCTATA
CCAGCGGCCGGACCTCCTACAACCCCAGCCTGAAGTCCCGGATCTCCATCACCCG
GGACACCTCCAAGAACCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACTCCATGACCACCGAGGAC
ACCGCCACCTACTACTGCGCCGACATGGCCGATAAGGGCGGATGGTTTCGCTTACT
GGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCCCTCCGT
GTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCAGATCCACCTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCT
GCCTCGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAATCTGGCGC
CCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTTCAGCTGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACT
CCCTGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCAAGACCTACAC
CTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAATC
TAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTCCTTGCCCAGCCCCTGAATTTCTGGGCGGACCTT
CTGTGTTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCC
CGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGTGCAGTT
CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGA
GGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG
GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC
AGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAG
GTGTACACACTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCACTG
ACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCA
ACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTTCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGG
CAACGTGTTCTCCTGCTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG
AAGTCCCTGAGCCTGTCCCCCGGCTGATGA (配列番号13)

10

20

30

【0 2 3 0】

軽鎖核酸配列：

【化 6 4】

ATGTCCGTGCCCACCCAGGTGCTGGGATTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCA
GATGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGGCTGTGTCTGCTGGCGA
GAAAGTGACCATCTCCTGCCTGTCCTCCCAGTCCCTGTTCTCCAGCAACACCAAG
CGGAACTACCTGAACTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCTAAGCTGCTGA
CTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCGTGTCTACCGTGCAGGCCGAGGACCTGGGC
GACTACTTCTGCCAGCAGCACTACGAGACACCCCTGACCTTTGGCGACGGCACCC
GGCTGGAAATCAAGAGAACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCTTC
CGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTCTGTGCCTGCTGAACAACTTC
TACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGC
AACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTG
TCCTCTACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCC
TGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGGG
GCGAGTGCTGATGA (配列番号14)

10

【 0 2 3 1】

重鎖タンパク質配列：

20

【化 6 5】

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQIQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGFSITTGGYYWNW
IRQFPGKKLEWMGYIYTSGRTSYNPSLKSIRISITRDTSKNQFFLQLNSMTTEDTATYY
CADMADKGGWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGKITYTCNVDHKPS
NTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ
EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKGLPSSIEKTKAKKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPG** (配列番号15)

30

【 0 2 3 2】

軽鎖タンパク質配列：

【化 6 6】

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCDIVMTQSPSSLAVSAGEKVTISCLSSQSLFSSNTRNY
LNWYLQKPGQSPKLLIYHASTRLTGVPGRFIGSGSGTDFTLTVSTVQAEDLGDFCQ
QHYETPLTFGDGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC** (配列番号16)

40

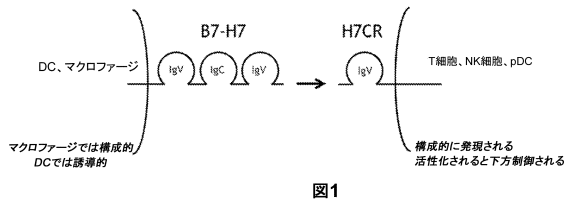
【 0 2 3 3】

本明細書に言及した刊行物および特許はすべて、1つ1つの刊行物または特許出願を、その全体を援用するために具体的に個々に示してあるのと同じ程度に本明細書に援用する。本発明についてその特定の実施形態と共に記載してきたが、本発明はさらに修正を行う

50

ことができ、本出願は、一般に本発明の原理に従う本発明の任意の変更、使用または適合を包含することを意図しており、さらに本発明の属する技術分野において既知または一般的な慣行の範囲内にあり、上記に記載した本質的特徴に適用し得る本開示からの逸脱を含むことが理解されよう。

【図 1】



【図 2】

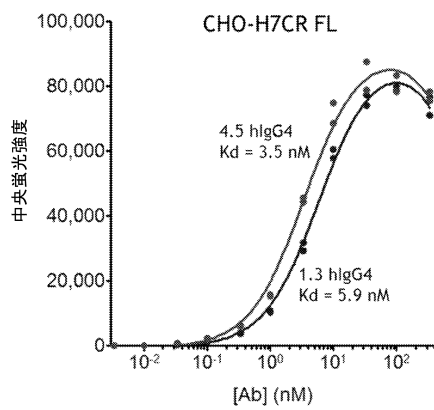
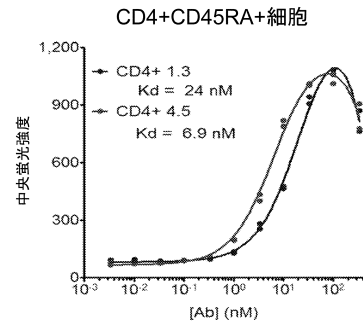


図 2

【図 3 A - 3 B】

A



B

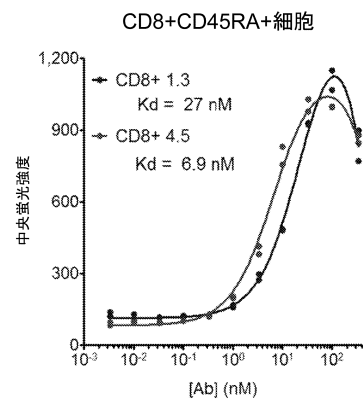


図 3

【図4A - 4C】

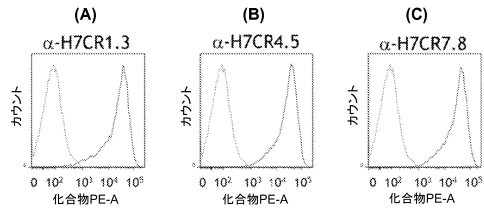


図4

【図5A - 5D】

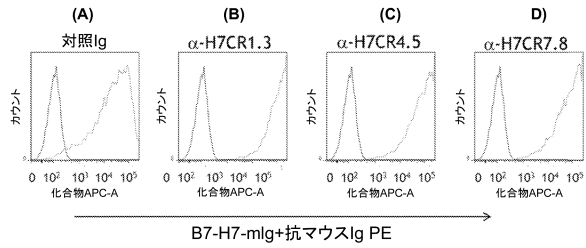


図5

【図7】

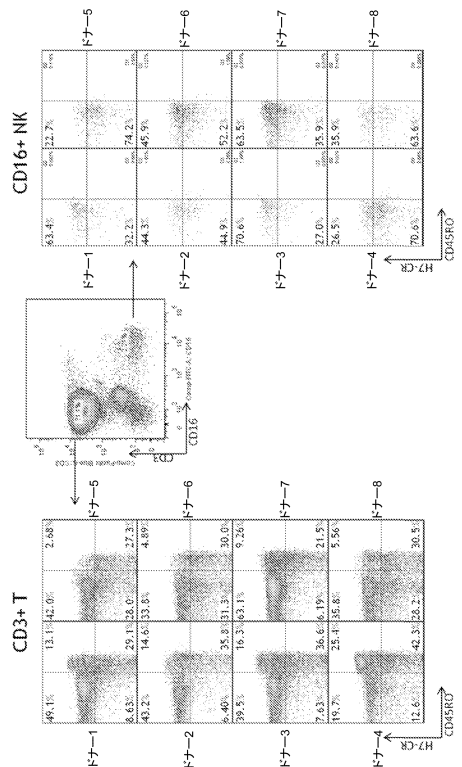


図7

【図6】

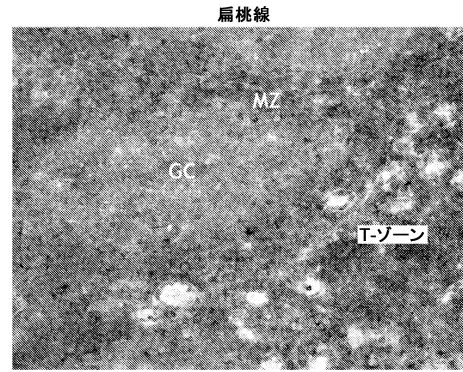


図6

【図8A - 8H】

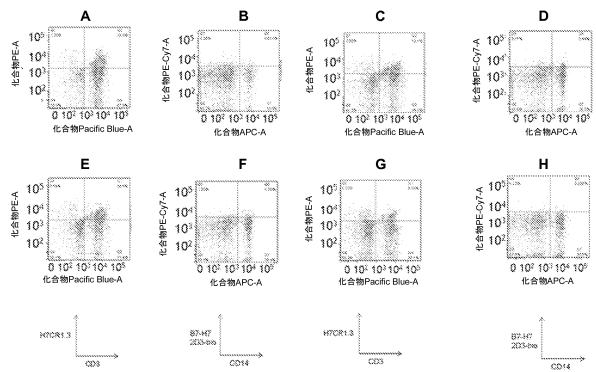


図8

【図9A - 9H】

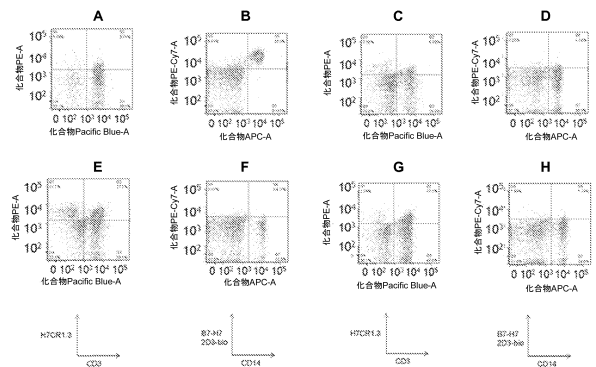
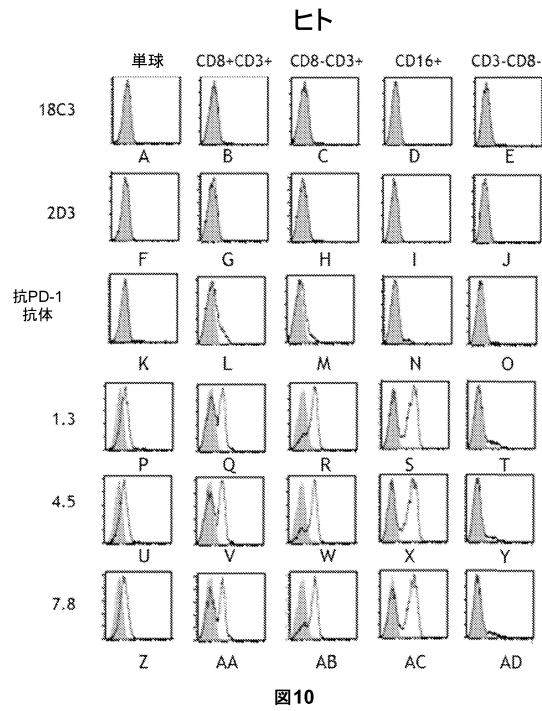
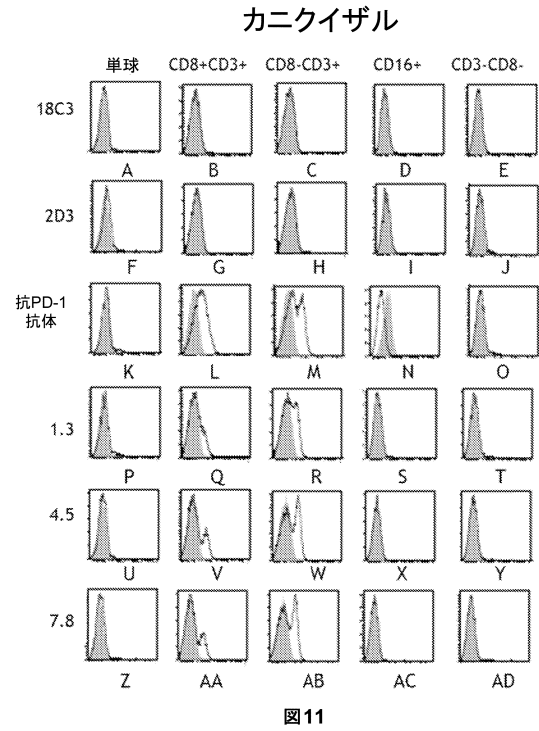


図9

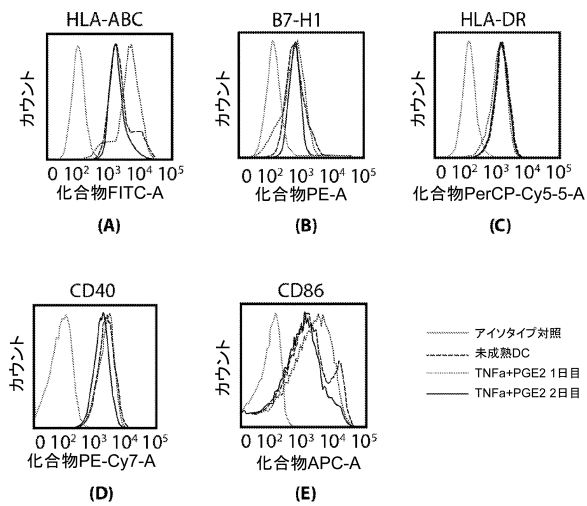
【図10A - 10D】



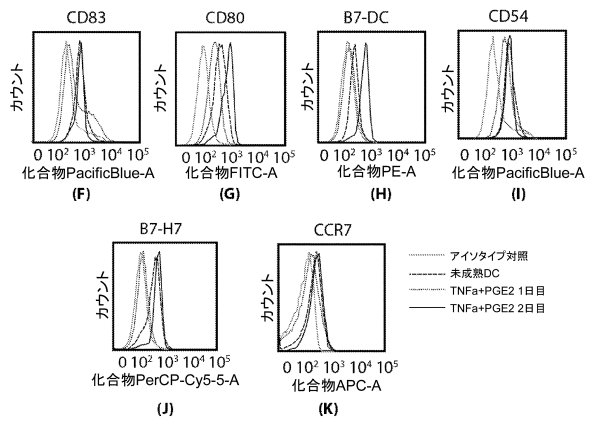
【図11A - 11D】



【図12A - 12E】



【図12F - 12K】



【図 13】

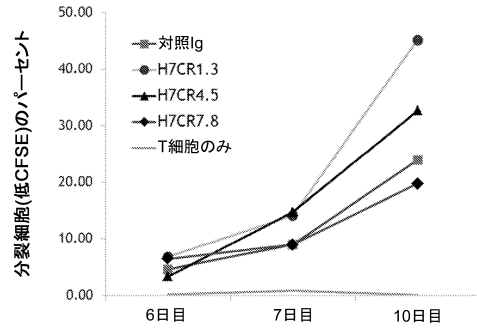


図 13

【図 14 A - 14 B】

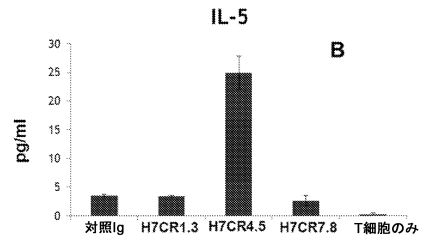
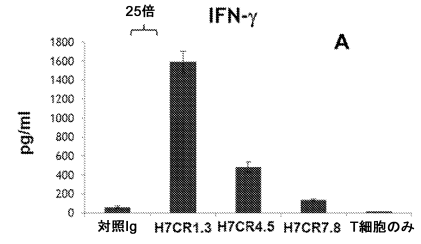


図 14

【図 14 C - 14 D】

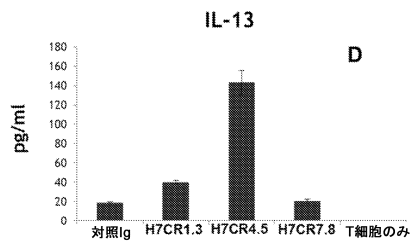
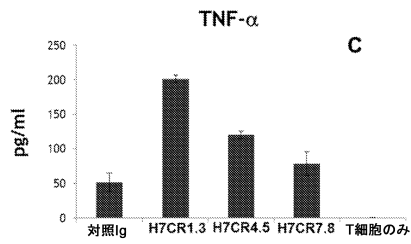


図 14 (続き)

【図 14 E - 14 F】

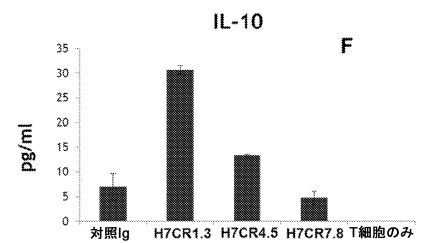
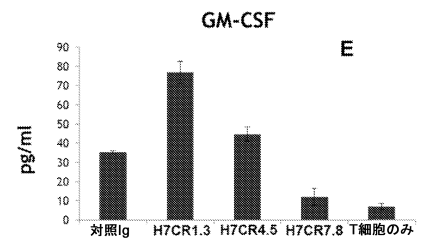


図 14 (続き)

【図 14 G - 14 H】

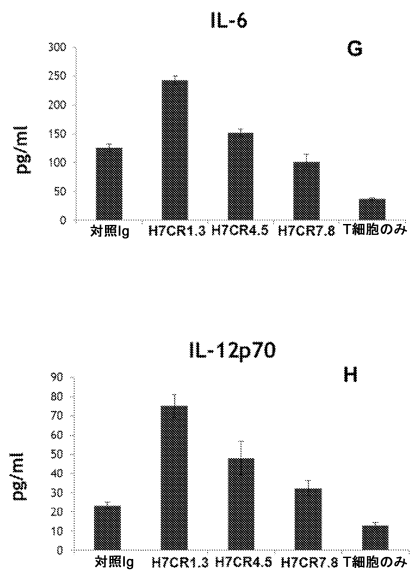


図14 (続き)

【図 14 I - 14 J】

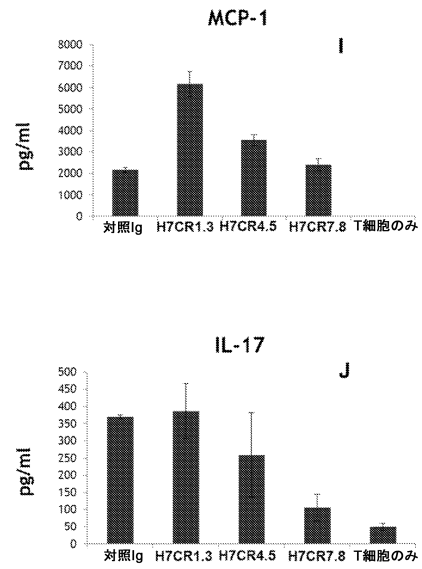


図14 (続き)

【図 14 K - 14 L】

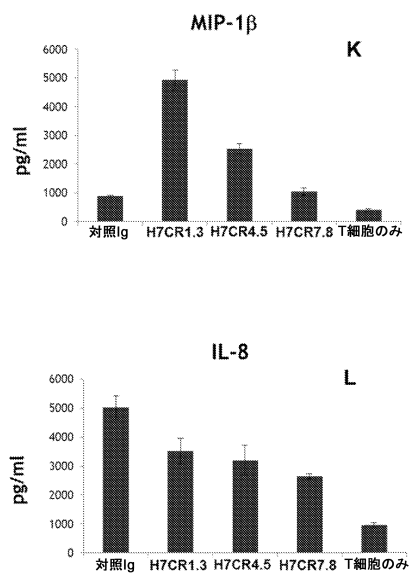


図14 (続き)

【図 15 A - 15 B】

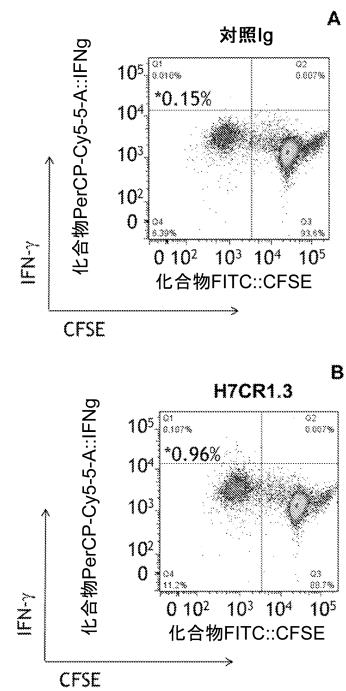
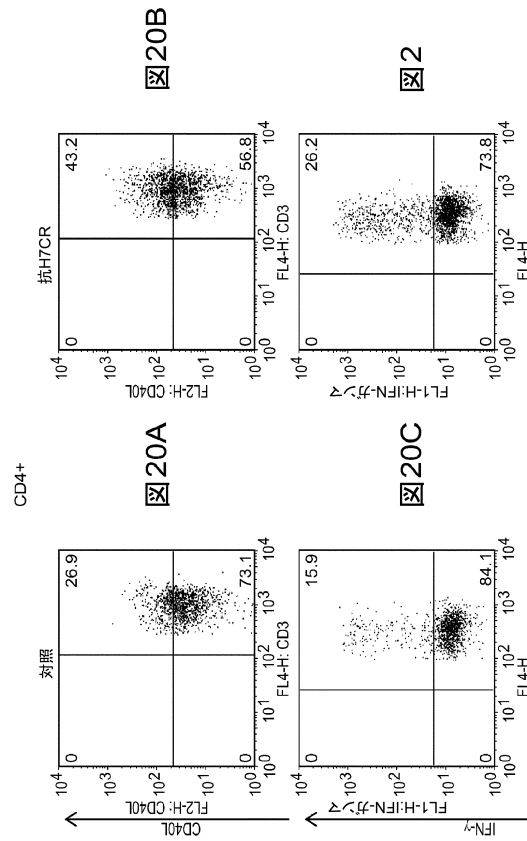
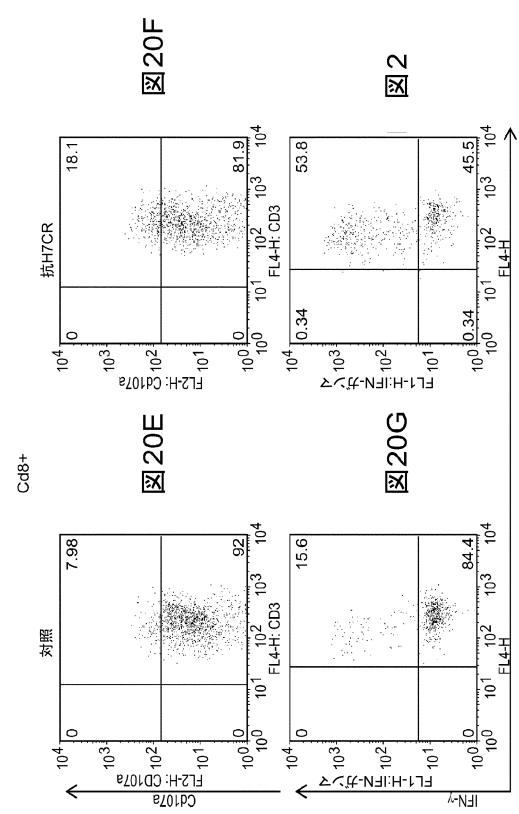


図15

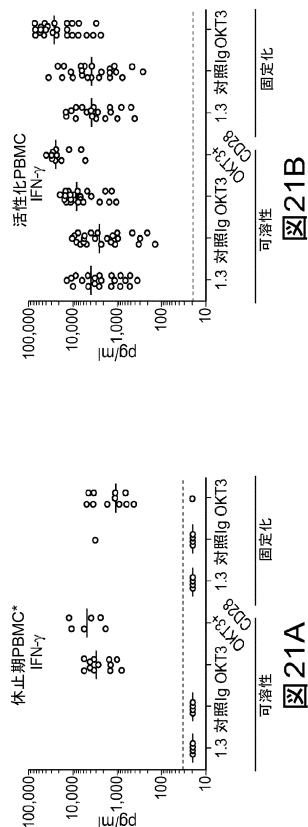
【図20A - 20D】



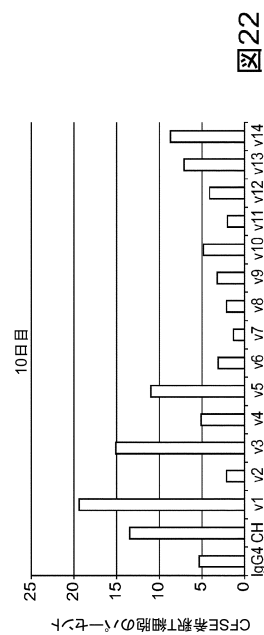
【図20E - 20H】



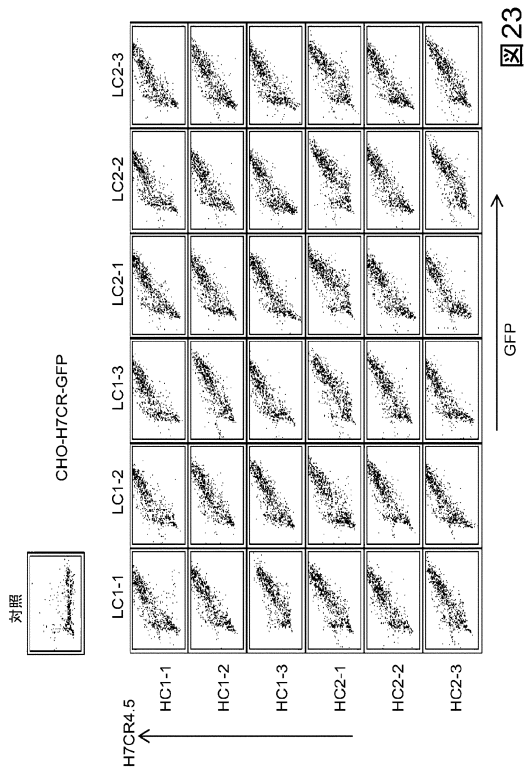
【図21A - 21B】



【図22】



【 図 2 3 】



【 配列表 】

0006359031000001 . app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/574	(2006.01)	G 0 1 N 33/574	A

(31)優先権主張番号 61/827,279
 (32)優先日 平成25年5月24日(2013.5.24)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/827,269
 (32)優先日 平成25年5月24日(2013.5.24)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
 (74)代理人 230113332
 弁護士 山本 健策
 (72)発明者 ランガーマン, ソロモン
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 2 1 5, ボルチモア, クロス カントリー ブールバード 6 6 0 6
 (72)発明者 リウ, リンダ
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 0 2 9, クラークスビル, ティベラリー コート 6 5 1 2
 (72)発明者 ヤオ, シェン
 アメリカ合衆国 メリーランド 2 1 0 0 4, コロンビア, ブライス オーバールック コート 1 1 7 4 8
 (72)発明者 チェン, リーピン
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 5 1 4, ハムデン, カンターベリー ロード 5 1

審査官 西村 亜希子

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 1 / 0 2 0 0 2 4 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K 1 6 /
 C 1 2 N 1 5 /
 C 1 2 Q 1 / 6 8
 J S T P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A / M E D L I N E / W P I D S / B I O S I S (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q