

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年2月5日(05.02.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/016267 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/070084
- (22) 国際出願日: 2014年7月30日(30.07.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-158533 2013年7月31日(31.07.2013) JP
- (71) 出願人: 学校法人順天堂(JUNTENDO EDUCATIONAL FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1138421 東京都文京区本郷2-1-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 森本 幾夫(MORIMOTO, Chikao); 〒1138421 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学内 Tokyo (JP). 波多野 良(HATANO, Ryo); 〒1138421 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学内 Tokyo (JP). 山田 健人(YAMADA, Taketo); 〒1680072 東京都杉並区高井戸東2丁目1番26号 Tokyo (JP). 大沼 圭(OHNUMA, Kei); 〒1138421 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 規則 13 の 2 に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則 13 の 2.4(d)(i) 及び 48.2(a)(viii))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: ANTI-HUMAN CD26 MONOCLONAL ANTIBODY OR ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF

(54) 発明の名称: 抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片

(57) Abstract: Provided is an anti-human CD26 antibody that is usable in immunostaining and enables, for example, the analysis of the expression of CD26 in a cancer tissue, an immune tissue, etc. in order to select a patient to whom a therapy is applicable, monitor a therapeutic effect, etc. An anti-human CD26 monoclonal antibody or an antigen-binding fragment thereof, characterized by binding to an epitope that is recognized by a monoclonal antibody produced by: a hybridoma deposited as NITE BP-01642; a hybridoma deposited as NITE BP-01643; or a hybridoma deposited as NITE BP-01644.

(57) 要約: 治療適用患者の選択や治療効果の追跡等のために、がん組織や免疫組織等におけるCD26の発現の解析等を可能にする、免疫染色に用いることも可能な、抗ヒトCD26抗体を提供する。受託番号NITE BP-01642として寄託されたハイブリドーマ、受託番号NITE BP-01643として寄託されたハイブリドーマ、又は受託番号NITE BP-01644として寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体によって認識されるエピトープに結合することを特徴とする、抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片に関する。



WO 2015/016267 A1

明 細 書

発明の名称：

抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片

技術分野

[0001] 本発明は、抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片等に関する。

背景技術

[0002] ヒトCD26はTa1というマウスモノクローナル抗体と反応するヒト末梢血T細胞表面抗原として報告され、その後、活性化T細胞に強く発現することから、T細胞活性化抗原として確立された（非特許文献1、非特許文献2）。一方、以前から、肝臓や腸管粘膜細胞表面にペプチダーゼ酵素活性が存在することが知られており、ジペプチジルペプチダーゼIV（DPPIV）として研究されていたが、1992年、遺伝子クローニングにより、DPPIVとCD26とが同一のものであることが示された（非特許文献2）。CD26は766のアミノ酸よりなり、N末端が細胞質内に存在する、いわゆるII型の膜糖タンパク質である（非特許文献3）。細胞質内には6つのアミノ酸残基のみが存在するが、既存のシグナル関連モチーフ構造は存在しない。アミノ酸配列から予想されるCD26の平均分子量は約88kDaであるが、48～324残基の領域が糖鎖修飾を受けるため、生体では約110kDaの糖タンパク質として検出される。630番目のセリン残基を活性中心として、セリンプロテアーゼであるDPPIV酵素活性を有し、基質となるペプチドのN末端から2番目のプロリン又はアラニンをそのC末端側で切断する。

[0003] CD26は末梢血リンパ球ではメモリーT細胞上に強く発現している（非特許文献4、非特許文献5）。静止期にあるT細胞上のCD26の発現をフローサイトメトリーで検討すると、その発現強度は3相性のパターンを示し、CD26を高発現する集団（CD26^{high}又はCD26^{bright}という）と

、CD26を中程度に発現する集団（CD26^{int}又はCD26^{intermediate}という）と、CD26を発現しない集団（CD26^{negative}という）との3つの集団に分けることができる。ここで、CD26^{high}の集団が免疫応答において特に重要な役割を果たしていると考えられている（非特許文献4）。CD26^{high}の集団はCD45ROを発現するメモリーT細胞に属し、破傷風トキソイドのようなメモリー抗原に反応するほか、B細胞の抗体産性を誘導し、MHCクラスI特異的なキラーT細胞の誘導活性をも有する（非特許文献4）。CD26陽性T細胞はIL-2、IFN- γ 等のサイトカインを分泌するT_H1型の細胞である。この細胞は血管内皮細胞間の遊走能を有し、炎症部位への移動、集積を起こし、炎症局所で重要な役割を果たしていると考えられている（非特許文献3、非特許文献6、非特許文献7）。

また、本発明者らは、CD8陽性T細胞においても、CD26共刺激によって細胞障害活性が制御されていることを発見した（非特許文献8）。さらに、本発明者らは、ヒト末梢血単核球をNOD/Shi-scid-IL2R γ^{null} マウス（NOGマウス）に移植して異種GVHD（移植片対宿主病）を発症したモデルを用いて、抗ヒトCD26ヒト化抗体によるT細胞の活性化制御が、GVHDの予防や治療に極めて有効であることを発見した（非特許文献9）。CD26は、様々ながん、例えば、肺がん、大腸がん、悪性中皮腫、腎がん、前立腺がん、甲状腺がん、消化管間質腫瘍（GIST）、T細胞性悪性リンパ腫、グリオーマ等にも発現している（非特許文献10）。CD26陽性の消化管間質腫瘍（GIST）患者では予後が非常に悪いことも報告されている（非特許文献11）。

本発明者らは、腎がん、悪性中皮腫、悪性リンパ腫等においてCD26抗体が極めて有効な抗腫瘍効果を発揮することを報告し、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110を開発して、フランスにて、CD26陽性悪性中皮腫及びその他のCD26陽性腫瘍をターゲットとした第I相臨床試験を行なっている（抗ヒトCD26ヒト化抗体療法）（特許文献1、非特許文献12、非特許文献13）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2008/114876号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Fox DA, Hussey RE, Fitzgerald KA, et al. (1984) Ta1, a novel 105 KD human T cell activation antigen defined by a monoclonal antibody. J Immunol 133: 1250-1256

非特許文献2：Tanaka T, Camerini D, Seed B, et al. (1992) Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. J Immunol 149: 481-486

非特許文献3：Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C (2008) Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. Trends in immunology 29: 295-301

非特許文献4：Morimoto C, Schlossman SF (1998) The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. Immunol Rev 161: 55-70

非特許文献5：Dang NH, Torimoto Y, Sugita K, et al. (1990) Cell surface modulation of CD26 by anti-1F7 monoclonal antibody. Analysis of surface expression and human T cell activation. J Immunol 145: 3963-3971

非特許文献6：Masuyama J, Yoshio T, Suzuki K, et al. (1999) Characterization of the 4C8 antigen involved in transendothelial migration of CD26hi T cells after tight adhesion to human umbilical vein endothelial cell monolayers. J Exp Med 189: 979-990

非特許文献7：Ohnuma K, Inoue H, Uchiyama M, et al. (2006) T-cell activation via CD26 and caveolin-1 in rheumatoid synovium. Mod Rheumatol 16: 3-13

非特許文献8：Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Morimoto C (2013) CD26-mediated co-stimulation in human CD8+ T cells provokes effector function via pro-inflammatory cytokine production. Immunology 138:

165-172

非特許文献9 : Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Yamada T, Morimoto C (2013) Prevention of acute graft-versus-host disease by humanized anti-CD26 monoclonal antibody. *Br J Haematol* 162: 263-277

非特許文献10 : Havre PA, Abe M, Urasaki Y, Ohnuma K, Morimoto C, Dang NH (2008) The role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in cancer. *Front Biosci* 13: 1634-1645

非特許文献11 : Umio Yamaguchi, et al. (2008) Distinct Gene Expression-Defined Classes of Gastrointestinal Stromal Tumor. *Journal of Clinical Oncology* vol. 26, number 25, 4100-4108

非特許文献12 : Inamoto T, Yamada T, Ohnuma K, et al. (2007) Humanized anti-CD26 monoclonal antibody as a treatment for malignant mesothelioma tumors. *Clin Cancer Res* 13: 4191-4200

非特許文献13 : Aoe K, Amatya VJ, Fujimoto N, et al. (2012) CD26 overexpression is associated with prolonged survival and enhanced chemosensitivity in malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res* 18: 1447-1456

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 近年、治療薬の有効性や副作用を予測するために、治療薬とセットで使われる診断薬（いわゆる「コンパニオン診断薬」ともいう）を、治療薬とともに早期から開発する動きが活発化している。コンパニオン診断薬は、標的分子の発現や変異の有無、薬剤代謝酵素の遺伝子多型等の診断に利用することができる。抗ヒトCD26ヒト化抗体を用いた治療に関しても、例えば、治療適用患者の選択や治療効果の追跡等のために、がん組織や免疫組織等におけるCD26の発現の解析等を行うことが望ましい。かかる解析等を可能にする、免疫染色に用いることも可能な、抗ヒトCD26抗体の開発の必要性が存在する。

[0007] しかしながら、本発明者らがこれまでに開発したマウス抗ヒトCD26モノクローナル抗体（4G8、1F7、5F8、2F9、16D4B、9C11（これらのクローンの詳細は本実施例を参照されたい））は、免疫染色に用いることはできない。

また、免疫染色用に研究用試薬として市販されている様々な抗ヒトCD26モノクローナル抗体を検討したところ、MBL社のマウス抗ヒトCD26モノクローナル抗体クローン44-4（カタログ番号D068-1）で免疫染色を行っても、明瞭な染色性は示さず、染色される箇所バラツキが大きいことから、信頼できるものではなかった。

一方、市販されている抗ヒトCD26ポリクローナル抗体の検討を行った結果、R&D Systems社のヤギ抗ヒトCD26ポリクローナル抗体（カタログ番号AF1180；<http://www.rndsystems.com/Products/AF1180>）及びNovus社のウサギ抗ヒトCD26ポリクローナル抗体（カタログ番号NB100-59021；http://www.novusbio.com/CD26-Antibody_NB100-59021.html）は、病理組織の臨床診断に耐え得る明瞭な染色性を示すことが判明した。しかしながら、これらの抗ヒトCD26抗体はポリクローナル抗体であるため、ロット差が一番の問題となる。すなわち、ポリクローナル抗体では、異なるロットの抗体で染色すると、染色強度や染色パターンに違いが生じるおそれがあることから、例えば安定した結果が常に必要とされる臨床診断薬に、ポリクローナル抗体を用いることは適切ではない。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、鋭意検討の結果、上記課題を解決する、新規抗ヒトCD26モノクローナル抗体を見出し、本発明を完成させた。

[0009] すなわち、本発明の目的は、

- （１）・受託番号NITE BP-01642として寄託されたハイブリドーマ、
- ・受託番号NITE BP-01643として寄託されたハイブリドーマ、又は

・受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 4として寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体によって認識されるエピトープに結合することを特徴とする、

抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を提供することによって、達成される。

(2) また、(1) に記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、一態様において、

前記抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、

・受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 2として寄託されたハイブリドーマ

、

・受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 3として寄託されたハイブリドーマ

、又は

・受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 4として寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体の相補性決定領域を有することを特徴とする、

抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片であることが好ましい。

(3) また、(1) 又は(2) に記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、一態様において、

前記抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、

・受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 2として寄託されたハイブリドーマ

、

・受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 3として寄託されたハイブリドーマ

、又は

・受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 4として寄託されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする、

抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片であることが好ましい。

(4) また、(1)～(3)のいずれかに記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、一態様において、

抗ヒトCD26ヒト化抗体であるYS110に対して実質的に結合の競合を示さないことを特徴とする、
抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片であることが好ましい。

(5) 本発明は、別の態様において、ヒトCD26を検出するための組成物であって、

(1)～(4)のいずれかに記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を含むことを特徴とする、
組成物を提供する。

(6) また、(5)に記載のヒトCD26を検出するための組成物は、一態様において、

前記ヒトCD26の検出が免疫染色による検出であることを特徴とする、
組成物であることが好ましい。

(7) また、(6)に記載のヒトCD26を検出するための組成物は、一態様において、

前記ヒトCD26の検出が、固定組織標本に対して行われることを特徴とする、
組成物であることが好ましい。

(8) また、(7)に記載のヒトCD26を検出するための組成物は、一態様において、

前記固定組織標本が、ホルマリンを用いた処理により固定されているか、及び／又は、パラフィン包埋されていることを特徴とする、
組成物であることが好ましい。

(9) 本発明は、別の態様において、ヒトCD26の検出方法であって、

(1)～(4)のいずれかに記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を、対象由来の試料に接触させるステップ、及び

前記試料に含まれ得るヒトCD26を、免疫染色によって検出するステップ

を含むことを特徴とする、

検出方法を提供する。

(10) 本発明は、別の態様において、ヒトCD26関連疾患を罹患しているか、又は、その疑いのある患者への、ヒトCD26関連疾患の治療用抗体の投与の適合性の判定方法であって、

(1)～(4)のいずれかに記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を、対象由来の試料に接触させるステップ、及び

前記試料に含まれ得るヒトCD26を、免疫染色によって検出するステップ

を含むことを特徴とする、

判定方法を提供する。

(11) また、(10)に記載の判定方法は、一態様において、

さらに、前記免疫染色におけるヒトCD26の検出の程度に応じて、ヒトCD26関連疾患の治療用抗体の投与の適合性を判定するステップ

を含むことを特徴とする、

判定方法であることが好ましい。

(12) また、(10)又は(11)に記載の判定方法は、一態様において

、
前記ヒトCD26関連疾患が、がん、免疫病、ウイルス性疾患又は代謝疾患であることを特徴とする、

判定方法であることが好ましい。

(13) また、(12)に記載の判定方法は、一態様において、

前記がん、免疫病、ウイルス性疾患又は代謝疾患が、悪性中皮腫、肝臓がん、腎がん、前立腺がん、大腸がん、肺がん、甲状腺がん、T細胞性悪性リンパ腫、消化管間質腫瘍(GIST)、グリオーマ、自己免疫疾患、移植片対宿主病(GVHD)、コロナウイルスに起因する疾患、及び、糖尿病、か

らなる群から選択されることを特徴とする、
判定方法であることが好ましい。

(14) 本発明は、別の態様において、ヒトCD26の検出のための、(1)～(4)のいずれかに記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片の使用を提供する。

(15) 本発明は、別の態様において、受託番号NITE BP-01642として寄託されたハイブリドーマ、受託番号NITE BP-01643として寄託されたハイブリドーマ、及び、受託番号NITE BP-01644として寄託されたハイブリドーマからなる群から選択されることを特徴とするハイブリドーマを提供する。

以上述べた本発明の一又は複数の特徴を、適宜、任意に組み合わせたものも、本発明に含まれることはいうまでもない。

発明の効果

[0010] 本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、対象由来の試料におけるヒトCD26の検出、好ましくは、免疫染色によるヒトCD26の検出に用いることができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]抗ヒトCD26モノクローナル抗体を含む、ハイブリドーマの培養上清のスクリーニング結果に関する図である。図1Aは、フローサイトメトリーによる一次スクリーニング結果に関する。各ハイブリドーマクローンの培養上清をJurkat-CD26WTと混和した後、二次抗体(PE標識抗マウスIgG抗体)で染色し、フローサイトメーターでヒトCD26への結合を解析した。図には代表的なクローンによるヒトCD26への結合のヒストグラムを示した。なお、MFIは平均蛍光強度の略語であり、データとして取り込んだ全細胞それぞれの蛍光強度の総和を全細胞数で割った値(=平均値)を示す。フローサイトメトリーのヒストグラムは横軸が蛍光強度、縦軸が細胞数を示しており、蛍光強度が高いほど、一つの細胞あたりにヒトCD26抗体がたくさん結合していることを意味する。図1Bは、Enzyme

-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) による二次スクリーニング結果に関する。非変性の可溶性ヒトCD26 (「sCD26」ともいう) 及びウレアバッファーで処理した変性可溶性ヒトCD26をプレートにそれぞれ固相化し、各ハイブリドーマクロンの培養上清を添加して、結合させた。次いで、二次抗体 (西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 結合抗マウスIgG抗体) を反応させ、プレートリーダーで、450nmにおける吸光値 (吸収波長) を測定した。図には代表的なクローンによる結果を示した。

[図2A]各ハイブリドーマクロン若しくはMBL社のクローン44-4の培養上清、又は、R&D Systems社の精製ポリクローナル抗体を用いた、病理組織の免疫染色の結果を示す図である。ホルマリン固定した、ヒトCD26を発現しているヒト正常組織 (肝臓、腎臓、前立腺)、及び、悪性中皮腫の各組織標本に対して、各ハイブリドーマクロンの培養上清を用いて免疫染色を行った結果である。

[図2B]各ハイブリドーマクロンの培養上清から精製したIgG画分、又は、R&D Systems社の精製ポリクローナル抗体を用いた、病理組織の免疫染色の結果を示す図である。ホルマリン固定した、ヒトCD26を発現している肝細胞がん、腎細胞がん、前立腺がん、大腸腺がん、肺腺がんの各組織標本に対して、各ハイブリドーマクロンの培養上清を精製して得たIgG画分を用いて、免疫染色を行った結果である。

[図3]抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110との競合を示す図である。Jurkat-CD26WTを未標識YS110又はコントロールヒトIgG抗体と混和した後、各ハイブリドーマクロンの培養上清をそれぞれ添加し、次いで、二次抗体 (PE標識ヤギ抗マウスIgG抗体) で染色して、フローサイトメーターでヒトCD26への結合を解析した。YS110で染色する場合のみ、AlexaFluor (登録商標) 647で直接標識したYS110を用いた。縦軸の数値が高いほど、YS110との競合が生じなかったことを意味する。

[図4]得られたクローン18及びクローン19によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体の抗原結合部位を、フローサイトメーターで解析した結果である。Jurkat-CD26WTを、未標識抗ヒトCD26モノクローナル抗体(4G8、1F7、5F8、16D4B、9C11)又はコントロールマウスIgG₁抗体とそれぞれ混和した。次いで、AlexaFluor(登録商標)647で直接標識した、クローン18又はクローン19の培養上清由来の精製IgG抗体、又は、PE標識抗マウスIgG抗体(Anti-Mouse Ig-PE)でそれぞれ染色して、フローサイトメーターでヒトCD26への結合を解析した。

[図5]得られた本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体の、ヒトCD26削除変異体に対する結合を示す図である。ヒトCD26全長、及び、5種類のヒトCD26削除変異体を、COS-7細胞にそれぞれ発現させた。次いで、AlexaFluor(登録商標)647で直接標識した、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110、クローン18又はクローン19の培養上清由来の精製IgG抗体でそれぞれ染色した後、フローサイトメーターで、ヒトCD26全長又はヒトCD26削除変異体への結合をそれぞれ解析した。数字は取込んだ全細胞数に対するAlexaFluor(登録商標)647陽性細胞数の割合を%で示したものである。

[図6]抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110との競合を示す図である。Jurkat-CD26WTを未標識YS110又はコントロールヒトIgG抗体と混和した後、各ハイブリドマクロンの培養上清をそれぞれ添加し、次いで、二次抗体(PE標識抗マウスIgG抗体)で染色してから、フローサイトメーターでヒトCD26への結合を解析した。YS110で染色する場合のみ、AlexaFluor(登録商標)647で直接標識したYS110を用いた。図にはヒトCD26への結合のヒストグラムを示した。

[図7]得られた本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体の、各種抗CD26モノクローナル抗体との競合を示す図である。Jurkat-CD26WTを各ハイブリドマクロンの培養上清(クローン16、クローン18、

クローン19)又はコントロールマウスIgG₁抗体と混和した後、AlexaFluor(登録商標)647で直接標識した、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110、抗ヒトCD26モノクローナル抗体(2F9、16D4B、9C11、クローン19の培養上清の精製IgG抗体)、又は、PE標識抗マウスIgG抗体で染色し、フローサイトメーターでヒトCD26への結合を解析した。図にはヒトCD26への結合のヒストグラムを示した。

[図8]得られた本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体の、ヒトCD26削除変異体に対する結合を示す図である。ヒトCD26全長、及び、5種類のヒトCD26削除変異体を、COS-7細胞にそれぞれ発現させた。次いで、AlexaFluor(登録商標)647で直接標識した、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110、クローン18又はクローン19の培養上清由来の精製IgG抗体でそれぞれ染色した後、フローサイトメーターでヒトCD26全長又はヒトCD26削除変異体への結合をそれぞれ解析した。図にはヒトCD26への結合のヒストグラムを示した。

発明を実施するための形態

[0012] 本明細書において、抗体は、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する、少なくとも1つの抗原認識部位を介して、糖質、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド等の標的に特異的に結合可能な免疫グロブリン分子を指してよい。抗体は、完全体のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を指してよい。抗原結合性断片は、当該抗体の機能的、構造的断片であって、当該抗体が結合可能な抗原に対する結合性を保持しているものであれば特に限定されない。抗原結合性断片の例としては、限定はされないが、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、1本鎖(ScFv)、それらの変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、及び、抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の他の修飾構造体等が挙げられる。抗体は、IgG、IgA又はIgM(又はこれらのサブクラス)等の任意のクラスであってよく、特定のクラスに限定されない。重鎖の定常ドメインの抗体アミノ酸配列により、免疫グロブリンは、異なるクラスに分類される。5つの主な免疫グロブリンのクラス：IgA

、 I g D、 I g E、 I g G 及び I g M があり、これらの幾つかは、例えば、 I g G₁、 I g G₂、 I g G₃、 I g G₄、 I g A₁ 及び I g A₂ というサブクラス (アイソタイプ) にさらに細分化され得る。異なるクラスの免疫グロブリンの対応する重鎖の定常ドメインは、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ と呼ばれている。

一態様において、本発明の抗ヒト CD 26 モノクローナル抗体は、 I g G 抗体であり、例えば、 I g G₁ 抗体又は I g G₂ 抗体等であってよい。

[0013] 抗体の可変領域は、抗体軽鎖の可変領域及び/又は抗体重鎖の可変領域を意味してよい。重鎖及び軽鎖の可変領域は、それぞれ、超可変領域としても知られる 3 つの相補性決定領域 (CDR) により連結される 4 つのフレームワーク領域 (FR) からなる。各鎖における CDR は、FR により、近傍に保持されており、他方の鎖における CDR と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。CDR を決定するための技術としては、限定はされないが、例えば、(1) 異種間配列可変性に基づくアプローチ (例えば、Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD); 及び (2) 抗原-抗体複合体の結晶構造学的研究に基づくアプローチ (Al-lazikani et al., 1997 J. Molec. Biol. 273:927-948) が挙げられる。これらの 2 つのアプローチを組合せて用いてもよい。

抗体の定常領域は、抗体軽鎖の定常領域及び/又は抗体重鎖の定常領域を意味してよい。

[0014] 「特異的に結合する」という用語は、当該技術分野において当業者に周知の用語であり、抗体等の、抗原やエピトープに対する特異的な結合を決定するための方法も周知である。例えば、特異的に CD 26 のエピトープに結合する抗体又はその抗原結合性断片は、他のエピトープ又は非エピトープ部分に結合するよりも、より大きな親和性、結合活性で、より迅速に、及び/又は、より長時間持続して、この CD 26 エピトープに結合可能であると理解される。しかしながら、第 1 の標的に特異的に結合する抗体又はその抗原結合

性断片は、第2の標的に特異的に結合することを排除しない。

[0015] モノクローナル抗体は、実質的に均一な抗体のポピュレーションから得られる抗体を意味してよい。すなわち、そのポピュレーションに含まれる個々の抗体は、若干存在し得る可能性のある天然の突然変異体を除いて同一である。モノクローナル抗体は、単一抗原部位に対するものであり、非常に特異的である。さらに、異なる抗原や異なるエピトープを標的とする典型的なポリクローナル抗体とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一のエピトープを標的とするものである。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体ポピュレーションから得られる抗体の特性を示し、特定の方法による抗体の生産を必要とするものとして限定的に解されるべきではない。

[0016] 免疫染色 (Immunostaining) とは、抗体又はその断片を用いて、組織標本中の抗原を検出する組織学 (組織化学) 的手法を指し、特定の抗原を認識する抗体を用いて可視化し、その局在を光学顕微鏡又は電子顕微鏡等を用いて観察する染色法である。本明細書において、用語「免疫染色」は、免疫組織染色又は免疫組織化学 (IHC) と互換的に用いられてもよい。

[0017] 本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、非ヒト哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ウマ、ヤギ等) の抗体、又は、それらの抗原結合性断片であってよく、一態様においては、非ヒト哺乳動物の抗体であるのが好ましい。キメラ抗体は、非ヒト (例えば、マウス) 抗体の可変領域だけを取ってきて、ヒト抗体の定常領域に導入した抗体であって、可変領域は非ヒト由来、定常領域はヒト由来の抗体を指してよい。ヒト化抗体は、抗原と直接結合する部分である超可変領域 (相補性決定領域ともいう) だけを非ヒト (例えば、マウス) 型にした抗体を指してよい。ヒト抗体は、非ヒト (例えば、マウス) 免疫グロブリン遺伝子をノックアウトした非ヒト動物 (例えば、マウス) と、ヒト免疫グロブリン遺伝子を導入した非ヒト動物どうしを交配させて、ヒト免疫グロブリンだけを産生する非ヒト動物を作製し、かかるヒト

免疫グロブリンを産生する非ヒト動物から調製した抗体を指してよい。

本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、場合により、単量体、二量体又は多量体の形態であってよい。

[0018] 本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、種々の方法で製造することができる。モノクローナル抗体の製造方法は当該技術分野で当業者に周知である（例えばSambrook, J et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)を参照）。

本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、当業者に周知の、例えば、「Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495」に記載されるようなハイブリドーマ法を使用して製造してよい。ハイブリドーマ法においては、例えば、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を、抗原である（ヒト）CD26又はその断片等で免疫する（感作する）ことにより、当該宿主動物に、当該抗原に特異的に結合する抗体を産生する細胞（抗体産生細胞）を作らせてよい。抗体力価を高めるために、例えば、完全フロイントアジュバント（CFA）、脂質系アジュバント、グルカン多糖系アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント、又は、合成コポリマー系アジュバント等を添加してもよい。抗体産生細胞は脾臓に多く存在するため、一般的には、脾臓から脾細胞を取り出した後に、脾細胞を腫瘍細胞（例えば、HGPRT（ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）酵素を欠損した9-アザグアニン耐性株であるミエロマ細胞）と細胞融合させることで不死化させて、ハイブリドーマを作製する。細胞融合は、センダイウイルス、ポリエチレングリコール又は電気刺激等により行ってよい。ハイブリドーマを作製後、例えば、HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）培地で培養することにより、脾細胞と腫瘍細胞のハイブリドーマを選択できる。選択したハイブリドーマを1個/ウェルで播種し直すことで、抗ヒトCD26モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。培養上清は、さらに、硫酸塩析法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法、又は、プロテインA/Gクロマト法を用いて精製することで、例え

ば、1 g G画分（1 g G抗体）へと精製してもよい。

免疫に用いる抗原（CD26又はその断片等）に関して、ヒトCD26は766のアミノ酸よりなり、N末端の6つのアミノ酸残基のみが細胞質内に存在することから、かかる細胞質内に存在するアミノ酸残基を少なくとも全て削除した変異タンパク質（例えば、ヒトCD26のN末端側3番目から9番目のアミノ酸残基を削除したもの）を作製することで、ヒトCD26を可溶性としてもよい。当該変異タンパク質（可溶性ヒトCD26）は、当該変異タンパク質をコードするDNAを適当な発現ベクターに組み込んで、大腸菌細胞、サルCOS細胞、又は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞等に遺伝子導入することで、培養上清中に分泌させた後に、適宜、クロマトグラフィー等で精製することができる。

一態様において、精製した可溶性ヒトCD26は、例えばウレアバッファ（例えば、8M ウレア、20mM HEPES、50mM DTT）、グアニジン塩（例えば、6M 塩酸グアニジン）、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）（例えば、1%SDS）等の変性剤で、5～8時間、例えば、4℃～37℃で変性処理させた後に、免疫に用いてもよい。当業者は、変性に必要な時間、条件等を適宜設定することができる。ウレアバッファによる抗原の変性処理に関しては、例えば、「Torigoe T. et al., (2012) Establishment of a monoclonal anti-pan HLA class I antibody suitable for immunostaining of formalin-fixed tissue: usually high frequency of down-regulation in breast cancer tissue. Pathology International 62; 303 - 308」を参照してもよい。

[0019] 一実施態様において、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、例えば、本発明のハイブリドーマ（すなわち、千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託したハイブリドーマであるクローン19（受託番号NITE BP-01642）、クローン18（受託番号NITE BP-01643）、クローン16（受託番号NITE BP-01644）（

受託日（寄託日）は、いずれも、2013年7月3日）から産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片であってよい。あるいは、これらのハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体によって認識（結合）されるエピトープに結合する抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片であってよい。これらのハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体と、当該抗体によって認識されるエピトープに結合する抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片とは、実質的に又は完全に同一のエピトープを認識し結合するのが好ましい。実質的に同一のエピトープとは、抗体又はその抗原結合性断片の結合性には影響を与えないアミノ酸の修飾、置換、付加、欠失等を有するエピトープを指してもよい。あるいは、これらのハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体の相補性決定領域を有する抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片も、本発明の範囲内に含まれる。これらのハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体と、当該抗体の相補性決定領域を有する抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片とは、実質的に又は完全に同一の相補性決定領域を有するのが好ましい。実質的に同一の相補性決定領域とは、抗体又はその抗原結合性断片の結合性には影響を与えないアミノ酸の修飾、置換、付加、欠失等を受けている相補性決定領域を指してもよい。

[0020] あるいは、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されるような、遺伝子組換え技術により作製されてもよい。あるいは、ファージディスプレイ技術を用いて作製してもよい（例えば、米国特許第5,565,332号；第5,580,717号；第5,733,743号及び第6,265,150号）。本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片をコードするDNAは、モノクローナル抗体の重鎖又は軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブの使用といった、従来的な方法を使用することで、単離し、配列決定することが

できる。当該DNAを単離後に発現ベクターに組み込んで、大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、又は、当該発現ベクターが導入されない限り免疫グロブリンタンパク質を産生しないミエローマ細胞等の宿主細胞に遺伝子導入することにより、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を産生させてもよい。

[0021] 本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体の抗原結合性断片は、当該抗体の機能的、構造的断片であって、当該抗体が結合可能な抗原に対する結合性を保持しているものであれば特に限定されない。抗原結合性断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、1本鎖（ScFv）、それらの変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、二重特異性抗体、及び、抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の他の修飾構造体等が挙げられる。これらは、当業者に公知の製造方法に基づいて、遺伝子組換え技術又は化学合成技術等により製造してもよい。

例えば、抗原結合性断片は、完全体の抗体のタンパク質消化を介して得ることができ（例えば、Morimoto et al., 1992, J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117等）、又は組換え宿主細胞（例えば、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞等の真核生物、又は、大腸菌等の原核生物）により直接産生させてもよい。例えば、Fab'-SH断片を大腸菌から直接回収し、化学的に結合させることによってF(ab')₂断片を形成させてもよい（Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167）。また、F(ab')₂は、F(ab')₂分子の組み立てを促進するロイシンジッパーGCN4を使用して形成させてもよい。また、scFvを化学合成技術で生産する場合には、自動合成機を使用することができる。scFvを遺伝子組換え技術で生産する場合には、scFvをコードするポリヌクレオチドを含む適切なプラスミドを、適切な宿主細胞（例えば、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞等の真核生物、又は、大腸菌等の原核生物）に導入することができる。目的のscFvをコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのライゲーション等の周知の操作により作製してもよい。その

結果生じる s c F v は、当該技術分野で公知の標準的なタンパク質精製技術を使用して単離してもよい。

[0022] 本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、所望により、修飾してもよい。抗体の生物学的特性における実質的な修飾は、(a) 例えばシート又はヘリックスコンホメーション等の、修飾領域におけるアミノ酸配列の三次元的な構造；(b) 標的部位での分子の電荷又は疎水性の状態；又は、(c) 側鎖の容積の維持に対する修飾の効果、を変化させる修飾（例えば、アミノ酸残基の置換、欠失、付加等）によって達成してもよい。

本明細書において、アミノ酸とは、その最も広い意味で用いられ、天然のアミノ酸、例えばセリン (Ser)、アスパラギン (Asn)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、アラニン (Ala)、チロシン (Tyr)、グリシン (Gly)、リシン (Lys)、アルギニン (Arg)、ヒスチジン (His)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、グルタミン (Gln)、トレオニン (Thr)、システイン (Cys)、メチオニン (Met)、フェニルアラニン (Phe)、トリプトファン (Trp)、プロリン (Pro) のみならず、アミノ酸変異体及び誘導体といった、非天然アミノ酸も含まれる。当業者であれば、この広い定義を考慮して、本明細書におけるアミノ酸として、例えばL-アミノ酸；D-アミノ酸；アミノ酸変異体、アミノ酸誘導体等の化学修飾されたアミノ酸；ノルロイシン、 β -アラニン、オルニチン等、生体内でタンパク質の構成材料とならないアミノ酸；及び当業者に公知のアミノ酸の特性を有する、化学的に合成された化合物等が挙げられることを当然に理解する。非天然アミノ酸の例としては、 α -メチルアミノ酸 (α -メチルアラニン等)、D-アミノ酸 (D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸等)、ヒスチジン様アミノ酸 (2-アミノ-ヒスチジン、 β -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン、 α -フルオロメチル-ヒスチジン、 α -メチル-ヒスチジン等)、側鎖に余分なメチレンを有するアミノ酸 (「ホモ」アミノ酸) 及び側鎖中

のカルボン酸官能基アミノ酸がスルホン酸基で置換されるアミノ酸（システイン酸等）等が挙げられる。

例えば、天然に存在するアミノ酸残基は、一般的な側鎖特性に基づいて、次のグループに分類され得る：

- (1) 疎水性：Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；及び
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

抗体又はその抗原結合性断片を構成するアミノ酸配列の非保存的置換は、これらのグループの1つに属するアミノ酸を他のグループに属するアミノ酸と交換することにより行ってもよい。より保存的な置換は、これらのグループの1つに属するアミノ酸を同一グループの他のアミノ酸と交換することにより行ってもよい。同様に、アミノ酸配列の欠失又は置換を適宜行ってもよい。

また、抗体の適切な立体構造を維持するのには関与しない任意のシステイン残基を置換することにより（通常はセリンと置換する）、分子の酸化安定性を向上させ、異常な架橋形成を防いでもよい。逆に、抗原結合性断片がFv断片等の抗体断片である場合、システイン結合を抗原結合性断片に付加することにより、抗原結合性断片の安定性を向上させることができる。

抗体又はその抗原結合性断片を構成するアミノ酸の修飾は、1つ以上のアミノ酸の変化又は修飾であってもよく、可変領域等の領域の完全な再設計であってもよい。可変領域における変化は、結合親和性及び/又は特異性を変化させ得る。一実施態様において、1～5個以下の保存的なアミノ酸置換をCDR上で行ってよい。他の実施態様において、1～3個以下の保存的なアミノ酸置換をCDR3上で行ってよい。さらなる別の実施態様において、CDRはCDRH3及び/又はCDRL3であってもよい。

抗体又はその抗原結合性断片を構成するアミノ酸の修飾としては、例えば、糖によるグリコシル化、アセチル化又はリン酸化等の翻訳後修飾であってもよい。抗体は、その定常領域における保存された位置でグリコシル化され得る。抗体のグリコシル化は、通常、N-結合型又はO-結合型のいずれかである。N-結合型は、アスパラギン残基の側鎖に対する糖質部分の結合を意味する。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン、アスパラギン-X-スレオニン、及び、アスパラギン-X-システイン（式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖に対する糖質部分を酵素的に付加するための認識配列である。これらのトリペプチド配列のいずれかが抗体又はその抗原結合性断片に存在することにより、潜在的なグリコシル化部位が存在する。O-結合型グリコシル化は、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又は、キシロースのいずれかの、ヒドロキシアミノ酸（例えば、セリン又はスレオニン）への結合であってよく、場合により、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンへの結合であってもよい。グリコシル化の条件（グリコシル化を、生物学的手法を用いて行う場合には、例えば、宿主細胞や細胞培地の種類、pH等）を、当業者は目的に応じて適宜、選択することができる。

本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、さらに、当業者に公知の技術常識に基づいて、その他の修飾方法により、単独又は組み合わせて、修飾されてよい。

[0023] 本明細書において、CD26はヒトCD26であることが好ましく、抗CD26抗体は抗ヒトCD26抗体であることが好ましい。本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、CD26（好ましくは、ヒトCD26）に結合するのが好ましい。

一実施態様において、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、その他の抗体、好ましくは抗CD26抗体とセットで（すなわち、同時又は異時に組み合わせて）用いてよい。例えば、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、治療用抗体

である抗ヒトCD26抗体（抗ヒトCD26ヒト化抗体であるのが好ましく、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110であるのがさらに好ましい。）やその他の抗ヒトCD26抗体（例えば、本発明者らがこれまでに開発した抗ヒトCD26モノクローナル抗体4G8、1F7、5F8、2F9、16D4B又は9C11等であってよい。）に対して実質的に結合の競合を示さない（交叉反応性を有さない）、すなわち、非競合的にCD26に結合することが好ましい。あるいは、逆に、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、これらの抗体と結合の競合を示す（交叉反応性を有する）、すなわち、競合的にCD26に結合することが好ましい。

また、競合的アッセイを用いて、2つの抗体（抗体の一方は、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用い、抗体の他方は、比較しようとしている抗体を用いてよい。）が同一又は立体的に重複するエピトープを認識することにより同じエピトープに結合するかどうかを決定することができる。例えば、抗原であるCD26をマルチウェルプレート上に固定し、非標識抗体が標識抗体の結合を遮断する性能を測定してもよい。そのような競合的アッセイのための一般的な標識は、放射性標識又は酵素標識であってよい。さらに、当業者に周知のエピトープマッピング技術を用いることにより、抗体が結合するエピトープを決定することができる。

[0024] 本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、当業者に公知の方法に従って、精製又は単離されてよい。精製又は単離の方法の例としては、電気泳動的、分子生物学的、免疫学的又はクロマトグラフィー的手法等が挙げられ、具体的には、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、又は、逆相HPLCクロマトグラフィー、あるいは、等電点電気泳動等が挙げられる。

[0025] 本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体もしくはその抗原結合性断片、又は、それを含む本発明のヒトCD26を検出するための組成物を適用する（例えば、接触させる）対象は、限定はされないが、哺乳動物（ヒト、非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウサギ、ウシ、ウマ

、ヒツジ、ヤギ、ブタ等）；非哺乳動物（例えば、魚類、爬虫類、両生類又は鳥類）、植物、昆虫、細菌、又はそれらに由来する（生物）試料（すなわち、細胞（培養細胞を含む）、組織、器官、臓器、それらの断片又はそれらを含む物質）であってよい。あるいは、当該対象は、人工的な環境（例えば *in vitro* 反応系等）であってよい。本発明における対象は、哺乳動物、特にヒト、に由来する試料であるのが好ましい。一態様において、かかる試料は、CD26を発現している腫瘍細胞又は免疫細胞等の組織を含むか、含んでいたか、又は、含む疑いを有することが好ましい。

[0026] 本発明のヒトCD26を検出するための組成物は、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を含み、かつ、CD26を検出し得る組成物であれば、特に限定されない。本明細書において、CD26（の発現）を検出するとは、定性的にCD26を検出してもよいし、又は、定量的にCD26を検出する（すなわち、CD26の発現量を測定する）ことを意味してもよい。

一態様において、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片はCD26の過剰発現を検出できるのが望ましい。CD26の過剰発現とは、CD26を通常は発現している細胞又は組織に関して、それらの細胞又は組織内での通常のCD26の発現量と比較してCD26の発現量が増加していること、及び、CD26を通常は発現していない組織又は細胞内でCD26が発現していることの両方が含まれると理解される。

本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体もしくはその抗原結合性断片、又は、それを含むヒトCD26を検出するための組成物は、一態様において、

CD26の対象内の動態（分布）、発現、局在性等の検出又は解析；

CD26の発現量の変化又は異常（例えば、対照群である正常組織と比較しての、CD26の発現量の増加又は減少）の検出又は解析；

ヒトCD26関連疾患を同定する指標となる情報の検出又はそれに基づく診断；

治療用抗体である抗ヒトCD26抗体（抗ヒトCD26ヒト化抗体であるのが好ましく、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110であるのがさらに好ましい。）を用いたヒトCD26関連疾患の治療に適し得る患者（好ましくはヒト）の選択；又は、

治療用抗体である抗ヒトCD26抗体（抗ヒトCD26ヒト化抗体であるのが好ましく、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110であるのがさらに好ましい。）を用いたヒトCD26関連疾患の治療中又は治療後の治療効果（例えば、経過観察、治療有効性の確認、又は、患者（例えば再発例や抗体治療無効例）におけるヒトCD26の発現評価）の追跡；等に利用できる。

例えば、対照群である正常組織におけるCD26の発現量に比べて、試料においてCD26が高発現している場合、当該試料の由来となる対象（好ましくはヒト）がヒトCD26関連疾患に罹患しているか、又は、ヒトCD26関連疾患への罹患リスクが高いと決定、診断され得る。また、例えば治療用抗体を用いてヒトCD26関連疾患に罹患する患者を治療中又は治療後に、治療の対象となる病変部位を採取して、CD26の発現量の推移を測定、観察することにより、当該ヒトCD26関連疾患の進行度や悪性度を判定したり、当該治療抗体による治療の有効性の指標とすることができる。

本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体もしくはその抗原結合性断片、又は、それを含む本発明のヒトCD26を検出するための組成物は、CD26を標的とした治療方針や治療結果への影響に関して安定した結果が求められる、臨床診断薬又は患者層別マーカーとして有利に用いることができる。

[0027] 本発明のヒトCD26を検出するための組成物を調製するために、必要に応じて、例えば、薬理的に許容し得る担体、賦形剤、希釈剤、添加剤、崩壊剤、結合剤、被覆剤、潤滑剤、滑走剤、滑沢剤、可溶化剤、溶剤、ゲル化剤、防腐剤等を添加してよい。これらの添加剤は、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片の活性を阻害せず、検出対象と

なる抗原CD26と非反応性であるのが好ましい。添加剤は、当業者に標準的なものを用いてよく、限定はされないが、例えば、生理的食塩水、トリス緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、水、又は、アルブミン製剤、油/水エマルジョン等のエマルジョン等であってよい。

[0028] また、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、ヒトCD26の検出方法に用いることができ、具体的には、上述のようなCD26の検出、発現量の解析又は追跡、患者の選択等に用いることができる。例えば、本発明のヒトCD26の検出方法は、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を、対象由来の試料に接触させるステップ、及び、前記試料に含まれ得るヒトCD26を、免疫染色によって検出するステップを含んでよい。

本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、ヒトCD26関連疾患の治療用抗体である抗ヒトCD26抗体（抗ヒトCD26ヒト化抗体であるのが好ましく、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110であるのがさらに好ましい。）の投与前又は投与開始後に、対象由来の試料に接触させることで、CD26の発現を検出してもよい。例えば、当該治療用抗体を複数回投与することを意図している場合には、治療用抗体の投与間隔、投与回数を適宜調整してよく、治療の合間に、1回又は複数回、ヒトCD26関連疾患を罹患しているか、又は、その疑いのある患者の対象由来の試料におけるヒトCD26の発現を検出してもよい。本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片が認識（結合）するエピトープが、当該治療用抗体が認識（結合）するエピトープと異なる場合には、結合の競合を示さない（交叉反応が生じない）ことから、当該治療用抗体の投与開始後にも、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いて、CD26を正確に検出、評価し得るので有利である。

本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片の必要量や濃度、検出する対象由来の試料の調製の条件、当該試料と抗体との接

触条件、検出条件等は、目的に応じて、当業者が適宜、選択しかつ決定することができる。

[0029] また、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、ヒトCD26関連疾患を罹患しているか、又は、その疑いのある患者への、ヒトCD26関連疾患の治療用抗体の投与の適合性の判定方法に用いることができる。例えば、当該判定方法は、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を、対象由来の試料に接触させるステップ、及び、当該試料に含まれ得るヒトCD26を、免疫染色によって検出するステップを含んでよく、場合により、当該免疫染色におけるヒトCD26の検出の程度に応じて、ヒトCD26関連疾患の治療用抗体の投与の適合性を判定するステップをさらに含んでよい。「ヒトCD26の検出の程度に応じて」という用語は、治療用抗体の投与の適合性の判定基準と関係し、その判定基準を、当業者は目的に応じて任意に設定することができる。例えば、試料においてCD26が検出された場合にヒトCD26関連疾患の治療用抗体の適用を肯定的に判断し、一方、検出されなかった場合には否定的に判断するという判定基準を設けてもよい。ヒトCD26関連疾患を罹患しているか、又は、その疑いのある患者とは、好ましくはヒト患者であって、ヒトCD26関連疾患を現在罹患しているか、過去に罹患していたか、又は、現在もしくは将来、ヒトCD26関連疾患に罹患する可能性がある患者を意味してよい。ヒトCD26関連疾患の治療用抗体は、抗ヒトCD26抗体であってよく、好ましくは抗ヒトCD26ヒト化抗体であってよく、さらに好ましくは抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110であってよい。

[0030] 本発明において、ヒトCD26関連疾患とは、CD26の発現が関連する疾患又は状態を指してよく、CD26が発現している細胞の増殖が関連する疾患又は状態であってもよい。ヒトCD26関連疾患は、限定はされないが、例えば、がん、免疫病、ウイルス性疾患、代謝疾患、又は、炎症性疾患であってよい。

当該がんとしては、限定はされないが、良性腫瘍、あるいは、原発性又は

転移性の、かつ、浸潤性又は非浸潤性の、癌、肉腫、中皮腫等が挙げられる。当該がんは、例えば、悪性中皮腫、肝臓がん、腎がん、前立腺がん、大腸がん、肺がん、甲状腺がん、T細胞性悪性リンパ腫、消化管間質腫瘍（GIST）、グリオーマ、又は、CD26の発現を伴うその他の悪性腫瘍であってよい。

当該免疫病は、例えば、自己免疫疾患（例えば、関節リウマチ、多発性硬化症、又は、バセドー病）、移植片対宿主疾患（GVHD）、又は、CD26の発現を伴うその他の免疫病であってよい。なお、自己免疫疾患とは、限定はされないが、異物を認識し排除するための役割を持つ免疫系が、自分自身の正常な細胞や組織に対しても過剰に反応し攻撃を加えることで生じる疾患又は状態を意味してよい。

当該ウイルス性疾患は、例えば、コロナウイルスに起因する疾患であってよい。

当該代謝疾患は、例えば、糖尿病、又は、メタボリックシンドロームであってよい。

本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いてCD26を検出するのに用いる対象由来の試料とは、CD26を発現する、上述のヒトCD26関連疾患を有するか、有していたか、有する可能性のある細胞、組織、器官、臓器、それらの断片又はそれらを含む物質であるのが好ましい。

[0031] 抗体又はその抗原結合性断片の、CD26への結合親和性を決定する方法は、当該技術分野において当業者に公知の方法を用いてよい。例えば、結合親和性は、Biacore（登録商標）バイオセンサー、KinExAバイオセンサー、シンチレーション近接アッセイ、ELISA、ORIGEN免疫測定法（ORIGEN社）、フローサイトメトリー、蛍光消光、蛍光転移、酵母ディスプレイ、及び/又は、免疫染色を使用して決定してよい。さらに、結合親和性は、適切なバイオアッセイを用いてスクリーニングしてもよい。CD26への結合親和性が高い抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗

原結合性断片を選択するために、これらの方法を単独又は組み合わせて、検出量（CD26の発現量）が高いものをスクリーニングし、絞り込んでもよい。

好ましい一実施態様において、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、CD26（有利には、ヒトCD26）を検出するのに用いることができ、免疫染色に適しているのが特に好ましい。

[0032] 一実施態様において、CD26のフローサイトメトリーによる結合親和性の評価は、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を、未標識で評価の対象とする標本（ここで、標本とは、例えば、個体、臓器、組織、細胞又はそれらの断片等を含む生物試料を指してよい。）と結合させた後、蛍光色素結合二次抗体で検出することもでき、又は、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片に蛍光色素（例えば、AlexaFluor（登録商標）647等）を直接標識して検出することもできる。

[0033] 一実施態様において、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を用いたCD26の免疫染色は、評価の対象とする標本を固定して作製した、固定組織標本に対して行われるのが好ましい。「固定」とは、標本を、自己融解や腐敗による劣化から保護するための化学処理を意味してよい。かかる固定により、生化学反応が停止し、場合により物理的強度や化学的安定性が向上することも期待される。

[0034] 固定は、主には、研究、検査を目的として、生物試料の変性、劣化等を防いで、できるだけその形態を天然の状態に近いまま維持することを目的として行われてよい。固定により、生物試料中の内在性の生体分子、特にタンパク質分解酵素を不活化させ；外来性の損傷から保護し；場合により、細菌等の微生物に対して毒性を示すか、又は、生物試料を微生物が栄養にしにくい形態に化学的に修飾し；及び／又は、生物組織自体の強度や安定性を向上させることが好ましい。

固定の種類（固定剤の選択等）や条件（固定する標本の大きさ、標本の切

片作製手段、標本の変形防止手段、固定剤の量、固定時間、固定に使用する容器、固定の温度、時間、pH等)を、目的に応じて当業者は適宜選択することができる。生物試料中の内在性の生体分子の不活化の手段として、例えば、それらの生体分子を変性させてもよい。また、ゲルやゾルの状態にある生物試料を完全に固体とすることで形態を固定化して安定化させてもよい。このような固定には、温度や圧力による物理的な変性(例えば、煮沸やマイクロウェーブ照射による熱凝固、又は、凍結等)を利用してもよいが、固定剤による化学的な処理が好ましい。固定剤(固定液)は、単独で、又は、組み合わせる用いてもよく、適宜、pH変化を和らげる緩衝剤、浸透圧又は粘性を調節する塩や糖などと組み合わせる用いてもよい。

固定液は、限定はされないが、例えば、アルデヒド系固定液、酸を含む固定液、金属塩を含む固定液、又は、脱水剤・有機溶媒系固定液等が挙げられる。アルデヒド系固定液としては、限定はされないが、10~25%ホルマリン(ホルムアルデヒド飽和水溶液)固定液を用いてもよく、場合により、例えば、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、酢酸ナトリウム、臭化アンモニウム、塩化カルシウム又は硫酸亜鉛等を添加物として加えてもよい。あるいは、10%リン酸緩衝ホルマリン固定液、4%パラホルムアルデヒド固定液、又は、1~5%グルタルアルデヒド固定液等を用いてもよい。酸を含む固定液としては、限定はされないが、例えば、ブアン固定液(例えば、ピクリン酸飽和水溶液:ホルマリン:氷酢酸=15:5:1で含む)、ザンボニ固定液、又は、2%オスミウム液固定液(四酸化オスミウムを用いる)等が挙げられる。金属塩を含む固定液としては、限定はされないが、例えば、亜鉛固定液又はHolland固定液等が挙げられる。脱水剤・有機溶媒系固定液としては、限定はされないが、例えば、アルコール(エタノール等)固定液、アルコール・ホルマリン混合液、FAA固定液(例えば、ホルマリン:氷酢酸:50%エタノール=1:1:18で含む)、又は、アセトン固定液等が挙げられる。好ましい固定液としては、10~25%ホルマリン固定液、2~5%パラホルム固定液、80~100%エタノール、80~100%

メタノール又は100%アセトン等が挙げられる。

固定する標本の大きさとしては、組織片は薄く、小さい方が、固定剤（固定液）が浸透しやすいので一般には好ましく、標本の表面積が大きい方が好ましい。一態様において、標本の厚さは、1.5cm以下が好ましく、5mm以下であることがより好ましい。固定剤の量としては、特に限定はされないが、標本に対して十分量があればよく、例えば、5倍～10倍以上あればよい。固定時間は、固定剤の種類、標本の大きさや性質により異なり得る。固定が不十分な場合、組織収縮、細部構造の崩壊が生じ得、一方、固定が過剰な場合、組織片の脆弱化による組織収縮や膨化が生じ得る。当業者は、適宜、固定の最適な時間を決定でき、例えばそれは、6時間～48時間であってよい。固定の温度は、例えば、4℃又は室温であってよい。高温である場合、固定時間は短くなり得るが、温度が高すぎると標本が硬化するおそれが生じ得る。

固定するための手法としては、生物試料を固定液に浸けておく浸漬法の他に、十分量の固定液を心臓等に注入し血流に乗せる灌流法が挙げられ、後者は、例えば、マウス等を用いた *in vivo* 病態モデル実験で用いてもよい。

[0035] 固定された生物試料は標本として保存することができ、あるいは、さらに、例えば、切り出し、脱水、包埋、薄切、及び／又は染色等を行った後に、例えば光学顕微鏡等で観察することができる。

切り出しは、標本のサイズが大きい場合に顕微鏡で観察できるサイズに標本を小さくし、あるいは、標本中の病変部や正常部が観察しやすくなるように行ってよく、適宜、標本を切断してよい。

顕微鏡で標本を観察できるように、又は、標本中に存在する中空部位を埋めて標本の変形を防ぐために、適当な包埋剤（例えば、パラフィン、セロイジン等）中に標本を包埋して標本に強度を与えてよい。包埋の手法としては、限定はされないが、例えば、パラフィン包埋法、セロイジン包埋法、OC Tコンパウンド包埋法、ゼラチン包埋法、又は、合成樹脂包埋法等が挙げら

れ、これらのすべてが当業者に公知である。一態様において、パラフィン包埋法が好ましい。包埋を行う際に、水分が標本中に存在すると、その部分に包埋剤が浸透しないので、当該水分をアルコール（エタノール等）を用いて除去してもよい。

例えば、パラフィン包埋法を用いる場合には、脱水過程で標本中に浸透したアルコールを除去するために、キシレン又はクロロホルム等による透徹を行うことが好ましい。次いで、パラフィンを標本中に浸透させてパラフィンのみが含まれるようにしたら、冷却して標本を硬化させ、パラフィンブロックを作製してよい。

標本を薄切にするためにはミクロトームを用いてもよい。

顕微鏡下での標本の観察を容易にするために、薄い組織切片にした標本を染色する（抗原CD26を認識する抗体を用いた抗原抗体反応を可視化する。）ことが好ましい（以下、可視化に関して、当該抗体は、場合により、抗原結合性断片であってもよいことが当業者には理解される。）。

[0036] また、例えば、パラフィン包埋法を用いてパラフィンブロックを作製した場合には、例えば、キシレン、アルコール（エタノール等）を用いて脱パラフィンを行った後、場合により、標本中の目的抗原（CD26）を賦活化することで、染色を強化してよい。

例えば、ホルマリンで固定しパラフィンに包埋させた標本では、その標本作製過程において組織や細胞中に存在する抗原をマスキングする架橋結合が生じ、抗原の免疫原性が失われ、これによって、抗体による抗原認識が阻害され得る。したがって、かかる免疫原性の低下を防ぐために、抗原賦活化処理を行ってよい。抗原賦活化の方法としては、特に限定はされないが、例えば、ペプシン、トリプシン、プロナーゼ又はプロテインキナーゼK等のタンパク質分解酵素処理；マイクロウェーブ、オートクレーブ又は煮沸等による加熱処理；アルカリや酸（例えば塩酸又はギ酸）による処理等が挙げられる。賦活化の方法、抗原賦活溶液の種類、pH、濃度、賦活時間、賦活温度等を、目的に応じて、当業者は適宜選択し決定することができる。例えば、加

熱処理により抗原を賦活化する場合には、限定はされないが、pH 6.0～7.0のクエン酸緩衝液、pH 9.0～11.0のトリス塩酸緩衝液、トリスEDTA緩衝液、EDTA溶液、尿素、又は、市販の種々の抗原賦活溶液を使用することができ、例えば、90℃～130℃で10分間～1時間加熱してよい。タンパク質分解酵素処理により抗原を賦活化する場合には、タンパク質分解酵素の濃度を当業者は適宜決定してよく、例えば、4℃～37℃で、5分間～数時間程度、酵素処理してもよい。

[0037] 抗原抗体反応を可視化する方法（染色方法）としては、抗体に特定の酵素を標識しておき、後で、基質を反応させて形成された色素生成物の呈色を光学顕微鏡等で観察する酵素抗体法を用いてよい。光学顕微鏡で観察する場合、例えば、染色される部分（シグナル部分）と染色されない部分（ノイズ部分）のコントラスト（シグナル／ノイズ比）を、目視で観察してもよい。また、バーチャルスライドを作成し、染色部位の定量的解析を行う事で、染色部分を評価してもよい。

酵素抗体法は、大まかには、抗原に直接反応する抗体（一次抗体）を標識し、抗原抗体反応を1度しか行わない直接法と、標識していない一次抗体を用いて1度目の抗原抗体反応を行い、一次抗体自体を抗原とする別の抗体（二次抗体）を標識して、さらに反応させて2回以上（多くは2回、場合により3回）抗原抗体反応を行う間接法とが挙げられる。また、間接法の変法として、ペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ抗体の可溶性免疫複合体（PAP）を用いるPAP法（Sternberger LA et al. (1970). "The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes". J Histochem Cytochem 18 (5): 315-33. PMID 4192899.）、LAB（Linked Avidin-Biotin）法、アビジン・ビオチン複合体を用いるABC法（Hsu S M, Raine L, Fanger H (1981). "Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and u

n labeled antibody (PAP) procedures". J Histochem Cytochem 29 (4): 577-80.)、ストレプトアビジンを用いるLSAB (Linked Streptavidin-Biotin) 法、TSA (tyramide signal amplification) 法、又は、CARD (catalyzed reporter deposition) 法等を用いてもよい。

酵素抗体法での発色方法としては、限定はされないが、例えば、標識酵素としてペルオキシダーゼ (西洋ワサビパーオキシダーゼ等) を発色基質のジアミノベンジジン (DAB) と反応させるDAB法 (褐色に染色) (Graham RC Jr, Karnovsky MJ. (1966). "The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique". J Histochem Cytochem 14 (4): 291-302) ; ニッケルイオン存在下でDAB法を行う、より高感度の、ニッケルDAB法 ; ペルオキシダーゼを発色基質のアミノエチルカルバゾール (AEC) と反応させる方法 (赤色に染色) ; あるいは、標識酵素としてアルカリホスファターゼを、発色基質のBCIP/NBTと反応させる方法 (青紫色に染色)、発色基質のFast Redと反応させる方法 (赤色に染色)、又は、発色基質のFast Blueと反応させる方法 (青色に染色) 等を挙げてもよい。

一実施態様において、染色方法がDAB法である場合、染色前に、抗原賦活化した標本を、例えば過酸化水素水含有メタノール等に浸すことで、標本中の内在性ペルオキシダーゼの不活化を行なうことが好ましい。

染色の手法、温度、染色時間等の各種条件を、当業者は目的に応じて、適宜、選択し、決定することができる。染色は、例えば、一次抗体として、本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を標本に添加して、例えば、4℃～室温で1時間から一晩反応させた後に当該一次抗体を洗浄し、次いで、二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗体又はアルカリホスファターゼ標識抗体を添加して、例えば、4℃～室温で30分間から一晩反応させた後に当該二次抗体を洗浄してから、発色させてもよい。あるいは、検出感度を高めるために、ABC法を利用してもよい。あるいは、

検出感度を高めるために、標識していない一次抗体（本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片）を用いて1度目の抗原抗体反応を行い、次いで、一次抗体自体を抗原とする標識していない二次抗体を用いて2度目の抗原抗体反応を行い、次いで、二次抗体自体を抗原とする、ペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼで標識した三次抗体を添加し、例えば、4℃～室温で1時間から一晩反応させた後に、当該三次抗体を洗浄してから発色させてもよい。

[0038] あるいは、抗原抗体反応を可視化する方法としては、上述の抗原抗体反応の他に、抗体に放射性同位元素を結合（「標識」という）しておき、後で印画紙に感光させるオートラジオグラフィ法；金粒子等の可視物質に抗体を結合させておき、電子顕微鏡等で観察する金コロイド法；又は、抗体に蛍光色素を標識しておき、抗原抗体反応の後で励起波長を当てて蛍光発色させ蛍光顕微鏡で観察する蛍光抗体法を用いてもよい。

[0039] 別の実施態様において、本発明は、ハイブリドーマ（すなわち、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに寄託したハイブリドーマであるクローン19（受託番号NITE BP-01642）、クローン18（受託番号NITE BP-01643）、クローン16（受託番号NITE BP-01644）（受託日は、いずれも、2013年7月3日））に関するが、これらのハイブリドーマは、細胞分裂による子孫を含み、子孫は、突然変異等により親細胞と必ずしも同一でなくてもよい。

[0040] 別の実施態様において、本発明は、抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片をコードするDNA（ポリヌクレオチド）、当該DNAを含むベクター、又は、当該ベクターを含む宿主細胞をも提供する。それらの製造方法、取得方法、ベクターや宿主細胞の種類は、当業者に周知である。

[0041] 本発明のハイブリドーマ、抗ヒトCD26モノクローナル抗体、その抗原結合性断片、当該抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片をコードするDNA（ポリヌクレオチド）、当該DNAを含むベクター、

又は、当該ベクターを含む宿主細胞は単離されている、すなわち、天然には存在しない形態をしていてよく、人工的に精製したものであってよい。一実施態様において、これらは、他の不純物を含まず、実質的に純粋（pure）であるのが好ましい。

[0042] 技術的に矛盾しない限り、本明細書に記載の、あらゆる態様の任意の一又は複数、を、適宜組み合わせ、本発明を実施してよいことを当業者は理解する。さらに、技術的に矛盾しない限り、本明細書に記載の、好ましい又は有利なあらゆる態様を、適宜組み合わせ、本発明を実施することが好ましいであろうことを当業者は理解する。

[0043] 本明細書中に引用される文献は、参照により、それらのすべての開示が、明確に本明細書に援用されているとみなされるべきであって、当業者は、本明細書の文脈に従って、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく、それらの文献における関連する開示内容を、本明細書の一部として援用して理解できる。

[0044] 本明細書中に引用される文献は、本出願の出願日前の関連技術の開示のみを目的として提供され、本発明者らが、先行発明又は任意の他の理由によって、かかる開示に先行する権利を持たないことを自認するものとして解釈されてはならない。これらの文献のすべての記述は、本出願人が入手可能であった情報に基づいており、これらの記述内容が正確であるという自認を何ら構成しない。

[0045] 本明細書において用いられる用語は、特定の実施態様を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

[0046] 本明細書において用いられる「を含む（comprise）」という用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記載された事項（部材、ステップ、要素又は数字等）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素又は数字等）が存在することを排除しない。「を含む」という用語は、「からなる（consist of）」及び／又は「実質的に～からなる（consist essentially

o f)」という用語で記載される態様を包含する。

[0047] 異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語及び科学用語を含む。）は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書及び関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、又は、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

[0048] 本発明の実施態様は模式図を参照しつつ説明される場合があるが、模式図である場合、説明を明確にするために、誇張されて表現されている場合がある。

[0049] 第1の、第2の等の用語が種々の要素を表現するために用いられるが、これらの要素はこれらの用語自身によって限定されるべきではないことが理解される。これらの用語は一つの要素を他の要素と区別するためのみに用いられているのであり、例えば、第1の要素を第2の要素と記し、同様に、第2の要素は第1の要素と記すことは、本発明の範囲を逸脱することなく可能である。

[0050] 本明細書において、成分含有量や数値範囲等を示すのに用いられる数値は、特に明示がない限り、用語「約」で修飾されているものと理解されるべきである。例えば、「4℃」とは、特に明示がない限り、「約4℃」を意味するものと理解され、その程度を、当業者は技術常識と本明細書の文意に従って、合理的に理解できることは当然である。

[0051] 文脈上明白に他の意味を示す場合を除き、本明細書及び請求の範囲で使用される場合、単数形で表される各態様は、技術的に矛盾しない限り、複数形であってもよいことが理解され、逆もまた真である。

[0052] 以下において、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明はいろいろな態様により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。関連技術分野の当業者は、本発明の精神又は範囲を変更させることなく、様々な改変、付

加、欠失、置換等を伴って本発明を実施できる。

実施例

[0053] 1. 研究方法

(1) 研究に用いた抗ヒトCD26抗体

抗ヒトCD26抗体として、本発明者らがこれまでに開発したマウス抗ヒトCD26モノクローナル抗体である、

(i) ヒトCD26の1~247アミノ酸に結合する4G8、

(ii) ヒトCD26の248~358アミノ酸に結合する1F7、及び、同様の部位に結合する14D10の相補性決定領域を元に作製した抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110、

(iii) ヒトCD26の358アミノ酸周辺に結合する5F8及び2F9、

(iv) ヒトCD26の450~577アミノ酸に結合する16D4B、及び、

(v) ヒトCD26の359~653アミノ酸に結合する9C11を用いた。YS110はワイズセラピューティクス株式会社（東京、日本）から入手可能である。

4G8、14D10、2F9、16D4B、9C11に関しては、例えば、「Dong RP, Tachibana K, Hegen M, et al. (1998) Correlation of the epitopes defined by anti-CD26 mAbs and CD26 function. Mol Immunol 35: 13-21」を参照されたい。

1F7に関しては、「Morimoto C, et al. (1989) 1F7, A novel cell surface molecule, involved in helper function of CD4 cells. J Immunol 143: 3430-3439」やWO 2002/092127等を参照されたい。

5F8に関しては、例えば、「Torimoto Y et al. (1992) Biochemical characterization of CD26 (dipeptidyl peptidase IV): Functional comparison of distinct epitopes recognized by various anti-CD26 monoclonal antibodies. Molecular Immunology Vol. 29, No. 2., 183-192」やWO 20

02/092127等を参照されたい。

14D10に関しては、例えば、WO 2007/014169を参照されたい。

抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110は、American Type Culture Collection (ATCC) の受託番号PTA-7695で特定され、s604069, YST-pABMC148 (x411) と命名された株により生産される抗体であり、その詳細は、例えば、特許文献1を参照されたい。

また、本研究で新たに樹立した本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体の比較対照として、免疫組織染色可能なマウス抗ヒトCD26モノクローナル抗体として市販されているMBL社のモノクローナル抗体クローン44-4 (カタログ番号D068-1) 及びR&D Systems社のヤギ抗ヒトCD26ポリクローナル抗体 (カタログ番号AF1180) を用いた。

[0054] (2) 免疫抗原 (ヒトCD26タンパク質) の調製

本発明者らが作製した可溶性ヒトCD26 (ヒトCD26 (配列番号1) のN末端側3番目から9番目のアミノ酸残基を削除したもの) を発現するプラスミドをCHO細胞株に遺伝子導入し、ヒトCD26を安定して分泌するCHO細胞株をクローン化した (Tanaka T, Duke-Cohan JS, Kameoka J, et al. (1994) Enhancement of antigen-induced T-cell proliferation by soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV. Proc Natl Acad Sci USA 91: 3082 - 3086)。可溶性ヒトCD26が分泌された培養上清を、アデノシンデアミナーゼ (ADA) を固定化したセファロースカラムに通すことで、可溶性ヒトCD26のアフィニティー精製を行った (同上文献)。精製した可溶性ヒトCD26をウレアバッファー (8M ウレア、20mM HEPES、50mM DTT) 中で5~8時間、室温で緩やかに攪拌することにより、変性化したヒトCD26を調製した。

[0055] (3) マウスへの免疫とハイブリドーマの作製

変性化した可溶性ヒトCD26の溶媒をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)

で置換した後、 $100\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ の濃度に調整し、合成コポリマー系アジュバントであるTiterMax Gold (TiterMax USA Inc.) $50\mu\text{l}$ と混合して、1匹あたり $100\mu\text{l}/\text{dose}$ でBALB/cマウスに皮下注射した。2週間ごとに合計7回皮下注射を行い、最後に尾静脈に上記の半量である $50\mu\text{l}$ を静脈注射した。3日後にマウスを解剖して得た粗精製脾細胞と、P3U1ミエローマ細胞とを、1:1で混合し、ポリエチレングリコールで細胞融合してハイブリドーマを作製した。細胞を洗浄した後、10% FCS (牛胎児血清)、5% Briclone (NICBカタログ番号BRBR001)、HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) (Invitrogen) 含有RPMI 1640培地に当該細胞を懸濁してから、96ウェル平底プレートに播種した。生育したハイブリドーマの培養上清を回収し、フローサイトメトリーとELISAによって、抗ヒトCD26抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングを行い、陽性であったハイブリドーマを選出した後、免疫染色の検討を行った。免疫染色可能であったハイブリドーマを96ウェル平底プレートに1個/ウェルで播種し直し、複数の単クローンを選出した。培養に用いる培地を無血清のGIT培地 (Wako Pure Chemicals) に置換した後、目的の抗体を含む細胞培養上清からProtein A IgG Purification Kit (Pierce) を用いてIgG画分を精製した。

[0056] (4) フローサイトメトリー

本発明者らが作製したヒトCD26を組み込んだJurkat細胞株 (Jurkat-CD26WT) (Tanaka T, Kameoka J, Yaron A, Schlossman SF, Morimoto C (1993) The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90: 4586-4590) を用いてヒトCD26への結合を検討した。一次抗体として、ハイブリドーマ培養上清もしくはMBL社の抗ヒトCD26モノクローナル抗

体クローン44-4を100 μ l/サンプル、又は、マウス抗ヒトCD26モノクローナル抗体クローン5F8を20 μ g/mlに希釈した溶液を50 μ l/サンプルで添加し、4 $^{\circ}$ Cで25分間静置した。その後、細胞を氷冷PBSで洗浄し、二次抗体としてPE標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (BD Biosciences) を400ng/mlに希釈した溶液を50 μ l/サンプルで添加し、4 $^{\circ}$ Cで25分間静置した。細胞を氷冷PBSで洗浄した後、フローサイトメーターであるFACSCalibur (BD Biosciences) で測定を行い、得られたデータをFlowJo (Tree Star) で解析した。

[0057] (5) Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

精製した可溶性ヒトCD26 (非変性ヒトCD26) 又はウレアバッファで処理した可溶性ヒトCD26 (変性ヒトCD26) を炭酸塩/重炭酸塩バッファ (CBB) で4 μ g/mlに希釈し、イムノプレート (NUNC) に50 μ l/ウェルで添加して4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。陰性コントロールとしてCBBバッファのみを添加し、可溶性ヒトCD26をコートしない群を用意した。0.05% Tween 20含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS-T) で洗浄後、3% BSA (牛血清アルブミン) 含有PBS-Tを100 μ l/ウェルで添加して、室温で1時間静置することでプレートをブロッキングした。PBS-Tで洗浄後、一次抗体としてPBS-Tで3倍に希釈したハイブリドーマ培養上清、又は、MBL社の抗ヒトCD26モノクローナル抗体クローン44-4を50 μ l/ウェル、あるいは、R&D Systems社のヤギ抗ヒトCD26ポリクローナル抗体、又は、マウス抗ヒトCD26モノクローナル抗体クローン5F8をPBS-Tで1 μ g/mlに希釈した溶液を50 μ l/ウェルで添加し、室温で1時間静置した。PBS-Tで洗浄後、二次抗体としてHRP結合ヤギ抗マウスIgG抗体 (BD Biosciences) をPBS-Tで500倍希釈した溶液 (濃度は製品に記載なし)、又は、HRP結合ロバ抗ヤギIgG抗体 (Santa C

ruz) を 160 ng/ml に希釈した溶液を $50 \mu\text{l}$ / ウェルで添加し、室温で1時間静置した。PBS-Tで洗浄後、TMBペルオキシダーゼ基質 (KPL) を $50 \mu\text{l}$ / ウェルで添加し、 $2 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ を $25 \mu\text{l}$ / ウェルで添加して反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で 450 nm の吸収波長と 570 nm のレファレンス波長とを測定した。

[0058] (6) 免疫組織染色

10～25%ホルマリン固定液又はアルコール系固定液等で固定し、パラフィンに包埋させた切片から $5 \mu\text{m}$ 厚の標本を準備し、パラフィンを溶かした後、賦活化した。賦活化の方法としては、

(1) pH 6.0 10 mM クエン酸緩衝液中で、 120°C で20分間オートクレーブするか、

(2) pH 6.0 10 mM クエン酸緩衝液中で、 100°C で10分間煮沸するか、

(3) 0.01～0.1% トリプシンで、室温又は 37°C で5～60分間処理するか、又は、

(4) 0.01～0.04% プロテインキナーゼKで、室温又は 37°C で5～30分処理する、

のいずれかで行った。図2A及び図2Bの結果は、(1)の賦活化の方法で行った。

その後、賦活化した標本を過酸化水素水含有メタノールに浸して内在性ペルオキシダーゼの不活化を行い、2.5%ウマ血清でブロッキングを行った。その後、当該標本に、一次抗体として各ハイブリドーマ若しくはMBL社の抗ヒトCD26モノクローナル抗体クローン44-4の培養上清を $100 \mu\text{l}$ / サンプル、あるいは、各ハイブリドーマの培養上清から精製したIgG抗体又はR&D Systems社のヤギ抗ヒトCD26ポリクローナル抗体を0.2% BSA含有PBSで $10 \mu\text{g/ml}$ に希釈した溶液を $100 \mu\text{l}$ / サンプルで添加し、 4°C 又は室温で1時間から一晩反応させた。洗浄後

、二次抗体としてHRP結合ウマ抗マウスIgG抗体又はHRP結合ウマ抗ヤギIgG抗体 (Vector) を100 μ l/サンプルで添加し、4 $^{\circ}$ C又は室温で30分から一晩反応させた。さらに、洗浄後、DAB (ジアミノベンジン) (Dojindo) と過酸化水素で発色させ、Axio Scope. A1光学顕微鏡 (Carl Zeiss) で観察した。

ヒトCD26の染色結果に関する評価は、病理専門医2名で行い、ヒトCD26を発現しているヒト正常組織 (肝臓、腎臓、前立腺)、及び、ヒトがん組織 (悪性中皮腫、肝細胞がん、腎細胞がん、前立腺がん、大腸腺がん、肺腺がん) のヒトCD26の染色パターンを、R&D Systems社のヤギ抗ヒトCD26ポリクローナル抗体で染色した場合とそれぞれ比較することで行った。

[0059] (7) 抗ヒトCD26ヒト化抗体及び既存の抗ヒトCD26モノクローナル抗体との競合の解析

Jurkat-CD26WTを用いて、得られた本発明の複数の抗ヒトCD26モノクローナル抗体と抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110との競合の解析を、フローサイトメトリーにより、それぞれ、行った。すなわち、Jurkat-CD26WTに、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110又はコントロールヒトIgG抗体 (献血ベニロン (登録商標) - I 静脈用、化学及血清療法研究所) を50 μ g/mlに希釈した溶液を50 μ l/サンプルで添加し、4 $^{\circ}$ Cで30分間静置した。その後、細胞を氷冷PBSで洗浄し、上述したハイブリドーマ培養上清を100 μ l/サンプルで添加し、4 $^{\circ}$ Cで25分静置した。細胞を氷冷PBSで洗浄した後、二次抗体としてPE標識ヤギ抗マウスIgG抗体を400ng/mlに希釈した溶液を50 μ l/サンプルで添加し、4 $^{\circ}$ Cで25分間静置した。細胞を氷冷PBSで洗浄した後、FACSCalibur (BD Biosciences) で測定を行った。

同様に、それぞれエピトープが異なる5種類の既存のモノクローナル抗体 (4G8、1F7、5F8、16D4B、9C11) と、下記記載の「2. 結果」において後述するクローン18又はクローン19によって産生される

抗ヒトCD26モノクローナル抗体との結合の競合解析をフローサイトメトリーにて行った（「Dong RP, Tachibana K, Hegen M, et al. (1998) Correlation of the epitopes defined by anti-CD26 mAbs and CD26 function. Mol Immunol 35: 13-21」を参照されたい。）。すなわち、Jurkat-CD26WTに、上記の5種類の抗CD26モノクローナル抗体又はコントロールマウスIgG₁抗体（BioLegend、クローンMG1-45、カタログ番号401404）を50μg/mlに希釈した溶液を50μl/サンプルで添加し、4℃で30分静置した。その後、細胞を氷冷PBSで洗浄した。Alexa Fluor（登録商標）647 Monoclonal Antibody Labeling Kit（Molecular Probes、カタログ番号A-20186）を用いて、Alexa Fluor（登録商標）647の直接標識を行った、クローン18又はクローン19の培養上清由来の精製IgG抗体を0.6μg/ml、50μl/サンプルで添加して、4℃で25分間静置した後、細胞を氷冷PBSで洗浄し、FACSCalibur（BD Biosciences）で測定を行った。

[0060] (8) エピトープマッピング

ヒトCD26全長、及び、5種類のヒトCD26削除変異体を作製し、これらのプラスミドをそれぞれCOS-7細胞に遺伝子導入して、ヒトCD26全長タンパク質及び5種類のヒトCD26変異タンパク質をそれぞれ発現させた。5種類のヒトCD26削除変異体は、それぞれ、ヒトCD26全長（1～766アミノ酸残基）のうち、1～247アミノ酸残基のみからなる削除変異体、1～358アミノ酸残基のみからなる削除変異体、1～449アミノ酸残基のみからなる削除変異体、1～577アミノ酸残基のみからなる削除変異体、1～739アミノ酸残基のみからなる削除変異体に関する（「Dong RP, Tachibana K, Hegen M, et al. (1998) Correlation of the epitopes defined by anti-CD26 mAbs and CD26 function. Mol Immunol 35: 13-21」を参照されたい。）。Alexa Fluor（登録商標）647で直接標識した、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110、クローン18又はクロー

ン19の培養上清由来の精製IgG抗体を、これらのCOS-7細胞にそれぞれ0.6 μg/ml、50 μl/サンプルで添加して、4℃で25分間静置した後、細胞を氷冷PBSで洗浄し、FACSCalibur (BD Biosciences) を用いて、ヒトCD26全長又はヒトCD26削除変異体に対する抗体の結合をそれぞれ解析した。

[0061] 2. 結果

(1) ハイブリドーマ培養上清のスクリーニング

上述のとおり、ウレアバッファーで変性処理を行った可溶性ヒトCD26を免疫させたマウスの粗精製脾細胞とP3U1ミエローマ細胞とを細胞融合させ、生育したハイブリドーマからマウス抗ヒトCD26モノクローナル抗体を含むハイブリドーマ培養上清を回収し、フローサイトメトリーによる一次スクリーニングとELISAによる二次スクリーニングを行うことで、抗ヒトCD26モノクローナル抗体を産生しているハイブリドーマの絞り込みを行った。その結果、フローサイトメトリー及びELISAによってヒトCD26を検出可能な31のハイブリドーマクローンが得られた。代表的なクローンのフローサイトメトリーの結果を図1Aに、非変性可溶性ヒトCD26及びウレアバッファーによる変性可溶性ヒトCD26に対するELISAの結果を図1Bに示した。

[0062] (2) ハイブリドーマ培養上清及び精製IgG抗体による免疫染色

上述のスクリーニングで得られた31のハイブリドーマクローンの培養上清を用いてヒトCD26の免疫染色を検討した。

まず、MBL社の抗ヒトCD26モノクローナル抗体クローン44-4は、MBL社の添付文書に則った方法で染色を試みたが (<http://ruo.mbl.co.jp/dtl/A/D068-1/>)、染色性が弱く、また、まばらにしか染色されないため、信頼性に欠け、ヒトCD26抗体療法適用患者を選択するための(コンパニオン)診断薬としては不適切であることが明らかとなった(図2A)。なお、MBL社の抗ヒトCD26モノクローナル抗体クローン44-4を用いてウェスタンブロット法を行っても、ヒトCD26を検出できなかった(デー

タは示さず。) 。

次に、本発明者らが作製した、フローサイトメトリー及びELISAに使用可能な抗ヒトCD26モノクローナル抗体を産生する上記31のハイブリドーマクローンの培養上清を用いて、ヒト正常組織（肝臓、腎臓、前立腺）、及び、悪性中皮腫の免疫染色を検討した結果、R&D Systems社のポリクローナル抗体と同様に、肝臓の毛細胆管、近位尿細管の刷子縁、前立腺の管腔側等に、ヒトCD26の染色が認められる6クローンを得た。このうち代表的な3クローン（クローン16、クローン18、クローン19）及び陰性対照例として1クローン（クローン3）を用いた免疫組織染色の結果を図2Aに示した。クローン16、クローン18、クローン19によって産生される、抗ヒトCD26モノクローナル抗体を含む培養上清のいずれもが、ヒト正常組織（肝臓、腎臓、前立腺）、及び、悪性中皮腫のいずれの組織においても、MBL社の抗ヒトCD26モノクローナル抗体クローン44-4と比較して、ヒトCD26の染色強度が高く（褐色に染色された）、バックグラウンドが低かった。

さらに、クローン18、クローン19のハイブリドーマ培養上清を精製して得たIgG画分（IgG抗体）を用いて、ヒトCD26陽性腫瘍である肝細胞がん、腎細胞がん、前立腺がん、大腸腺がん、肺腺がんの免疫染色を検討した結果、いずれのがん組織に対しても、クローン18及びクローン19由来の精製抗体が、R&D Systems社のポリクローナル抗体と同等の明瞭な染色を示すことが認められた（図2B）。

[0063] ハイブリドーマであるクローン19、クローン18、クローン16を、それぞれ、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8）に寄託した（受託日はいずれも、2013年7月3日であった。クローン19について：受託番号NITE BP-01642；クローン18について：受託番号NITE BP-01643；クローン16について：受託番号NITE BP-01644）。

[0064] (3) 抗ヒトCD26ヒト化抗体との競合の解析

ハイブリドーマである、クローン16、クローン18、クローン19の培養上清を用いて、臨床試験を行っている抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110との競合の解析を、フローサイトメトリーにより行った。その結果、クローン16、クローン19の培養上清に含まれる抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110で前処理した場合に、ヒトCD26への結合が全く阻害されなかった（すなわち、YS110と結合の競合を示さなかった）のに対し、クローン18の培養上清に含まれる抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、YS110で前処理した場合、ヒトCD26への結合が完全に阻害されることが示された（図3）。それぞれのフローサイトメトリーの解析結果を図6に示した。これらのことから、得られた3クローンの中でも特に明瞭な染色性を示したクローン19によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110で結合が阻害されずにヒトCD26を認識できることが判明したため、このクローンは、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110を投与した患者検体の臨床検査に特に有用であろう。

[0065] (4) エピトープマッピング

抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110との競合の結果をより確実なものにするために、明瞭な染色結果が得られた代表的な2クローン（クローン18、クローン19）を用いて、それぞれのエピトープの同定を行った。

その結果、クローン18によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、ヒトCD26全長タンパク質の248～358アミノ酸残基に結合するCD26モノクローナル抗体1F7によって、ヒトCD26への結合が完全に阻害された。一方、クローン19によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、ヒトCD26全長タンパク質の1～247アミノ酸残基に結合する抗ヒトCD26モノクローナル抗体4G8によって、ヒトCD26への結合が完全に阻害されることが示された（図4）。

さらに、ヒトCD26全長、及び、5種類のヒトCD26削除変異タンパ

ク質をそれぞれCOS-7細胞に発現させ、クローン18、クローン19によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体の、これらのタンパク質に対する結合を、フローサイトメトリーを用いてそれぞれ解析した。クローン18によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体はヒトCD26の1~358アミノ酸部分には結合するが、1~247アミノ酸部分には全く結合しないことから、ヒトCD26の248~358アミノ酸残基上のエピトープに結合することが判明した(図5、図8)。一方、クローン19によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、CD26全長、及び、5種類のCD26削除変異タンパク質のいずれに対しても結合したことから、ヒトCD26の1~247アミノ酸残基上のエピトープに結合することが判明した(図5、図8)。

これらの結果は、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110との競合の解析結果(図4)と完全に一致した結果であり、クローン18によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体が、ヒトCD26の248~358アミノ酸に結合する抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110で完全に阻害され、クローン19は結合が阻害されなかったこと(図3、図6)とも合致した結果であった。

また、クローン16に関して、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110との競合を解析した結果、クローン16によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、ヒトCD26の450~577アミノ酸残基に結合するCD26モノクローナル抗体(16D4B)のヒトCD26への結合をほぼ完全に阻害し、さらに、ヒトCD26の359~653アミノ酸残基に結合する抗ヒトCD26モノクローナル抗体(9C11)のヒトCD26への結合を完全に阻害することが示されたことにより(図7)、359~653アミノ酸残基上のエピトープに結合することが判明した。これらの結果も、クローン16によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体が、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110では結合が阻害されなかったこと(図3、図6)と合致していた。

[0066] 3. 考察

従来の抗ヒトCD26モノクローナル抗体では、固定組織標本の免疫染色を行うことができなかった。R&D Systems社及びNovus社の抗ヒトCD26ポリクローナル抗体のみが免疫染色に使用可能だが (<http://www.rndsystems.com/Products/AF1180> ; http://www.novusbio.com/CD26-Antibody_NB100-59021.html)、R&D Systems社の抗体は、可溶性ヒトCD26によるアフィニティー精製した抗体であるため、Novus社の抗体よりも、良好であるとされている。しかしながら、これらの抗ヒトCD26抗体はポリクローナル抗体であるため、ロット差が一番の問題となり、研究用試薬としては許容されたとしても、CD26を標的とした治療方針や治療結果への影響に関して安定した結果が求められる、臨床診断薬、患者層別マーカーとしては不適切である。

MBL社から抗ヒトCD26モノクローナル抗体クローン44-4が研究用として販売されているが (<http://ruo.mbl.co.jp/dtl/A/D068-1/>)、固定組織標本における免疫染色では染色性が極めて弱く、しかも、まばらにしか染色することができないため、安定した結果が必要不可欠な臨床診断薬としては不適切である (図2)。

今回、本発明者らは、種々のヒトCD26陽性腫瘍の免疫染色に適し、かつ、アフィニティー精製したR&D Systems社のポリクローナル抗体と同程度の染色パターンを示す、コンパニオン診断薬としても利用可能な、新規抗ヒトCD26モノクローナル抗体を同定した。

まず、ウレアバッファーで変性させた組換え可溶性ヒトCD26をマウスに免疫してハイブリドーマの作製を行った。その結果、MBL社の抗ヒトCD26モノクローナル抗体クローン44-4 (<http://ruo.mbl.co.jp/dtl/A/D068-1/>) では染色が極めて微弱であったのに対し、R&D Systems社のポリクローナル抗体と同等の染色性を発揮する、新規抗ヒトCD26モノクローナル抗体を得ることが出来た。

免疫染色可能な、代表的な3クローンのエピトープマッピングを行った結

果、それらのエピトープは非常に多様性に富んでいることが示された。クローン16又はクローン19によって産生される抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110とは異なるエピトープを持つことが明らかになった。抗ヒトCD26ヒト化抗体YS110と競合することなく、フローサイトメトリー、ELISA、及び、免疫染色に使用することができるこれらの抗体は、YS110を用いた抗ヒトCD26ヒト化抗体療法の治療適用患者の選択、抗ヒトCD26ヒト化抗体療法後の治療効果の追跡（例えば、経過観察や、再発例や抗体治療無効例におけるヒトCD26の発現評価）等のための、（コンパニオン）診断薬として特に好ましい。さらに、CD26の研究においても、これらの抗体は、YS110を投与後の、腫瘍やヒト免疫細胞におけるCD26の発現を解析（例えば、経過観察）するのに利用可能である。例えば、マウス等を用いた *in vivo* 病態モデル実験で、YS110投与後のT細胞や腫瘍におけるCD26の発現を、フローサイトメトリーや免疫染色で経過観察する際に、YS110で結合が阻害される抗体を使用すると、それらT細胞や腫瘍がCD26を発現している場合であってもCD26を正確に検出、評価できないことから、これらの抗体はCD26の研究発展にも有用である。

産業上の利用可能性

[0067] 本発明の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、医療分野及びCD26の研究分野において有利に利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] ・ 受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 2として寄託されたハイブリドーマ、
- ・ 受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 3として寄託されたハイブリドーマ、又は
- ・ 受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 4として寄託されたハイブリドーマ
- によって產生されるモノクローナル抗体によって認識されるエピトープに結合することを特徴とする、
- 抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。
- [請求項2] 請求項1に記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片であって、
- 前記抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片は、
- 、
- ・ 受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 2として寄託されたハイブリドーマ、
- ・ 受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 3として寄託されたハイブリドーマ、又は
- ・ 受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 4として寄託されたハイブリドーマ
- によって產生されるモノクローナル抗体の相補性決定領域を有することを特徴とする、
- 抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。
- [請求項3] 請求項1に記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片であって、
- 前記抗ヒトCD26モノクローナル抗体は、
- ・ 受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 2として寄託されたハイブリドーマ、

・受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 3として寄託されたハイブリドーマ、又は

・受託番号N I T E B P - 0 1 6 4 4として寄託されたハイブリドーマ

によって産生されるモノクローナル抗体であることを特徴とする、抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

[請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片であって、

抗ヒトCD26ヒト化抗体であるYS110に対して実質的に結合の競合を示さないことを特徴とする、

抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

[請求項5] ヒトCD26を検出するための組成物であって、

請求項1～3のいずれか1項に記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を含むことを特徴とする、

組成物。

[請求項6] 請求項5に記載の組成物であって、

前記ヒトCD26の検出が免疫染色による検出であることを特徴とする、

組成物。

[請求項7] 請求項6に記載の組成物であって、

前記ヒトCD26の検出が、固定組織標本に対して行われることを特徴とする、

組成物。

[請求項8] 請求項7に記載の組成物であって、

前記固定組織標本が、ホルマリンを用いた処理により固定されているか、及び／又は、パラフィン包埋されていることを特徴とする、

組成物。

[請求項9] ヒトCD26の検出方法であって、

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗ヒト CD 26 モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を、対象由来の試料に接触させるステップ、及び

前記試料に含まれ得るヒト CD 26 を、免疫染色によって検出するステップ

を含むことを特徴とする、

検出方法。

[請求項10]

ヒト CD 26 関連疾患を罹患しているか、又は、その疑いのある患者への、ヒト CD 26 関連疾患の治療用抗体の投与の適合性の判定方法であって、

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の抗ヒト CD 26 モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を、対象由来の試料に接触させるステップ、及び

前記試料に含まれ得るヒト CD 26 を、免疫染色によって検出するステップ

を含むことを特徴とする、

判定方法。

[請求項11]

請求項 10 に記載の判定方法であって、

さらに、前記免疫染色におけるヒト CD 26 の検出の程度に応じて、ヒト CD 26 関連疾患の治療用抗体の投与の適合性を判定するステップ

を含むことを特徴とする、

判定方法。

[請求項12]

請求項 10 に記載の判定方法であって、

前記ヒト CD 26 関連疾患が、がん、免疫病、ウイルス性疾患又は代謝疾患であることを特徴とする、

判定方法。

[請求項13]

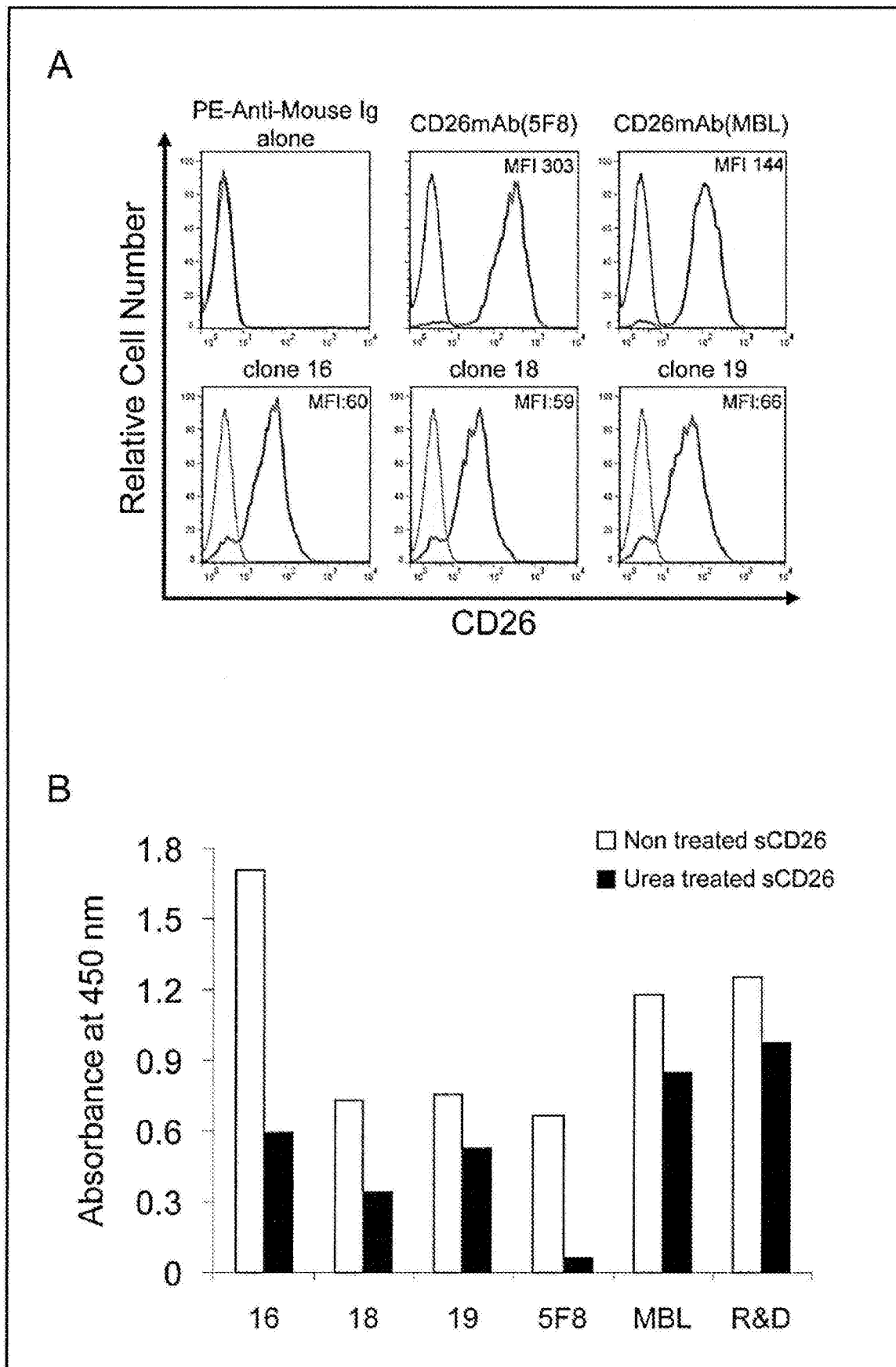
請求項 12 に記載の判定方法であって、

前記がん、免疫病、ウイルス性疾患又は代謝疾患が、悪性中皮腫、肝臓がん、腎がん、前立腺がん、大腸がん、肺がん、甲状腺がん、T細胞性悪性リンパ腫、消化管間質腫瘍（GIST）、グリオーマ、自己免疫疾患、移植片対宿主病（GVHD）、コロナウイルスに起因する疾患、及び、糖尿病、からなる群から選択されることを特徴とする、
判定方法。

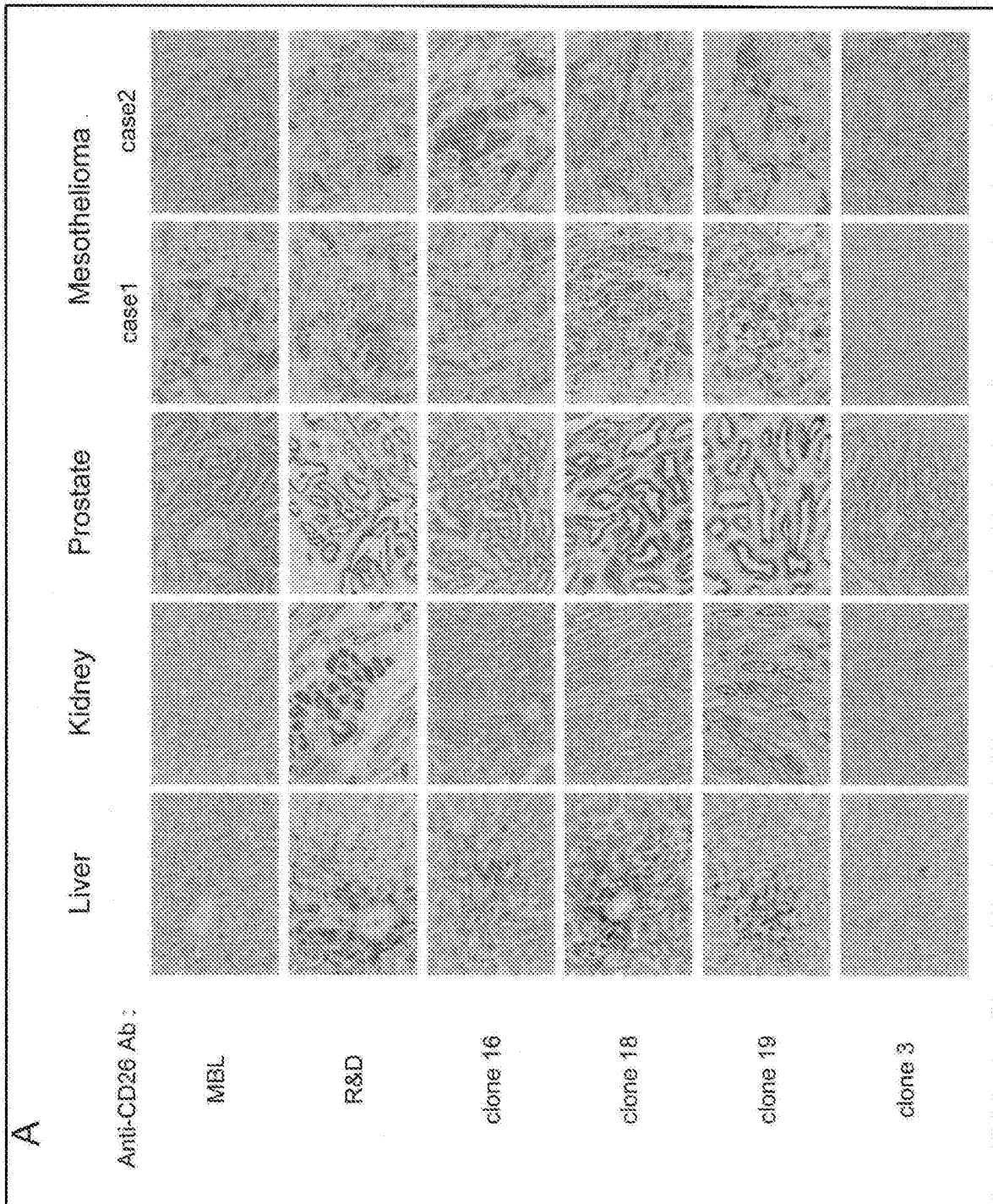
[請求項14] ヒトCD26の検出のための、請求項1から3のいずれか1項に記載の抗ヒトCD26モノクローナル抗体又はその抗原結合性断片の使用。

[請求項15] 受託番号NITE BP-01642として寄託されたハイブリドーマ、受託番号NITE BP-01643として寄託されたハイブリドーマ、及び、受託番号NITE BP-01644として寄託されたハイブリドーマからなる群から選択されることを特徴とするハイブリドーマ。

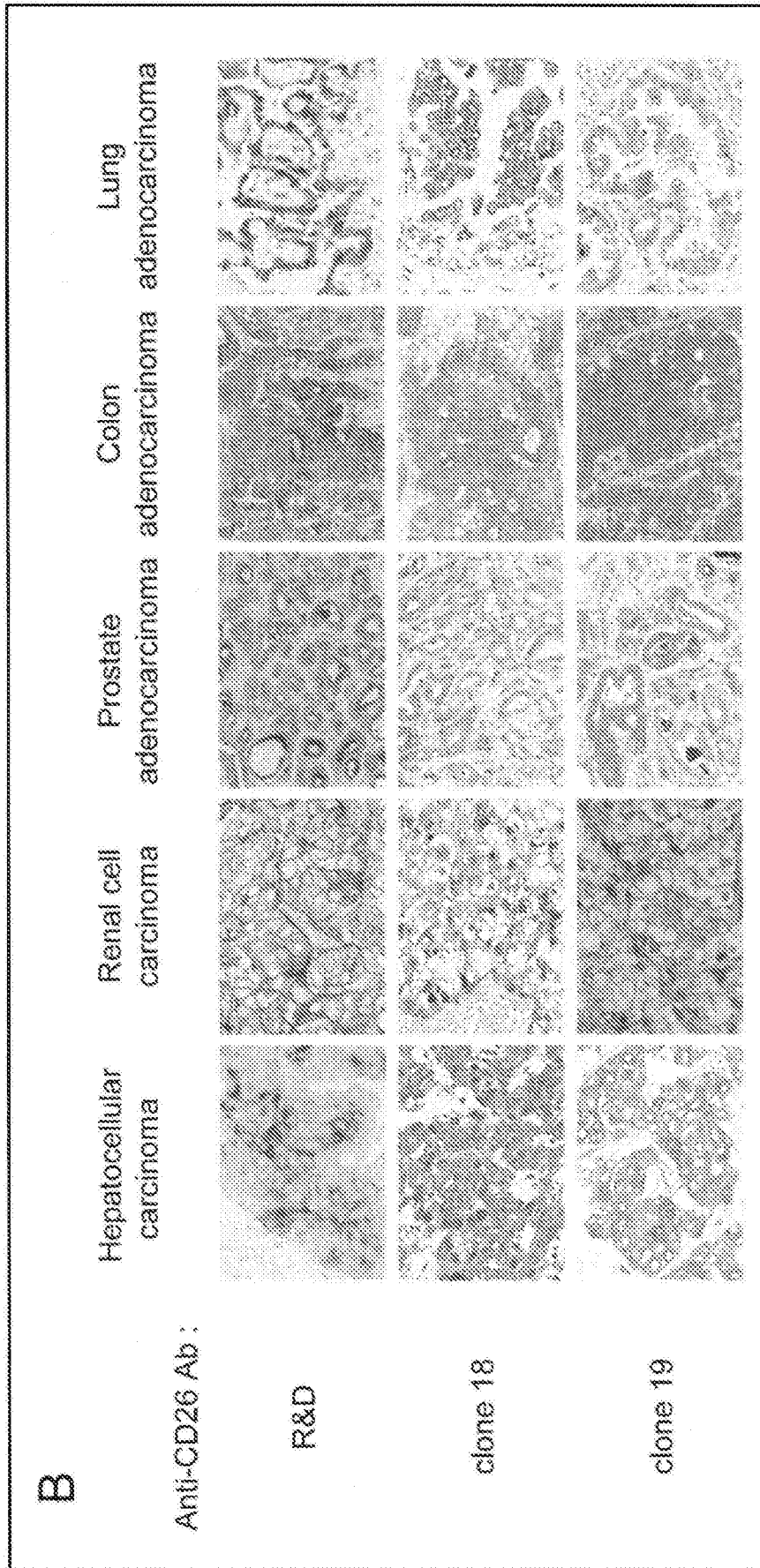
[圖1]



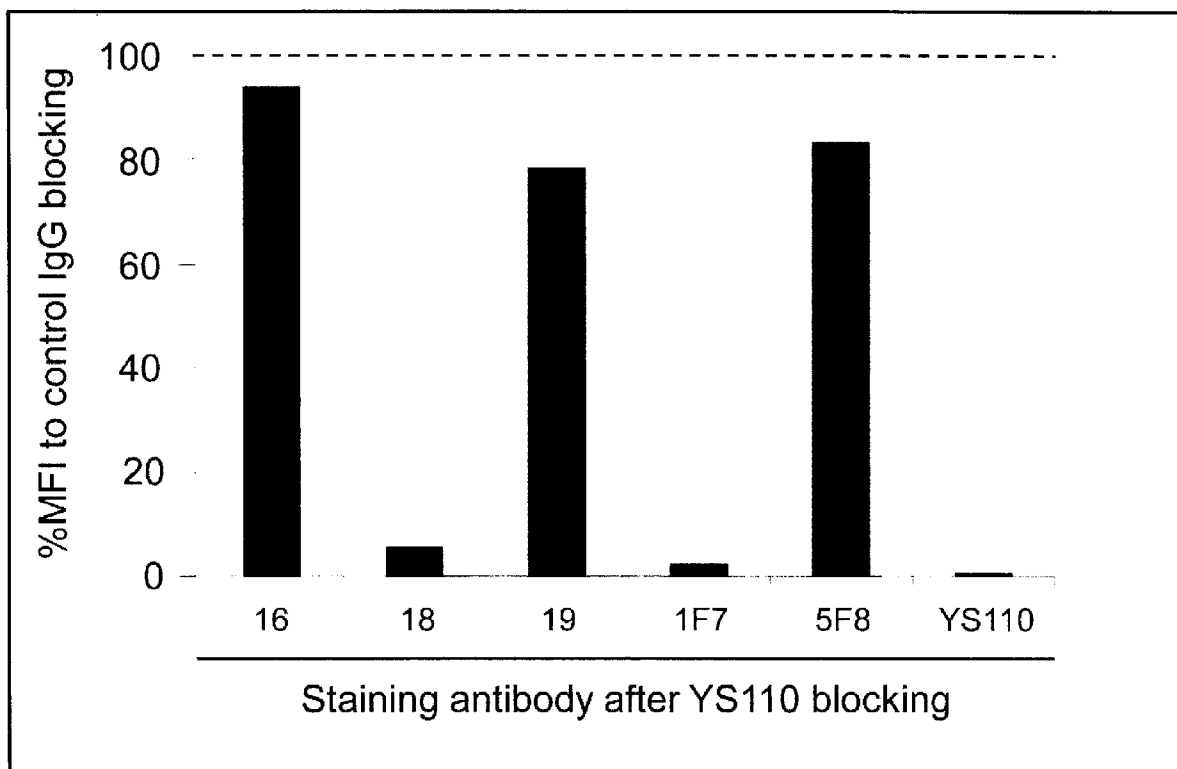
[2A]



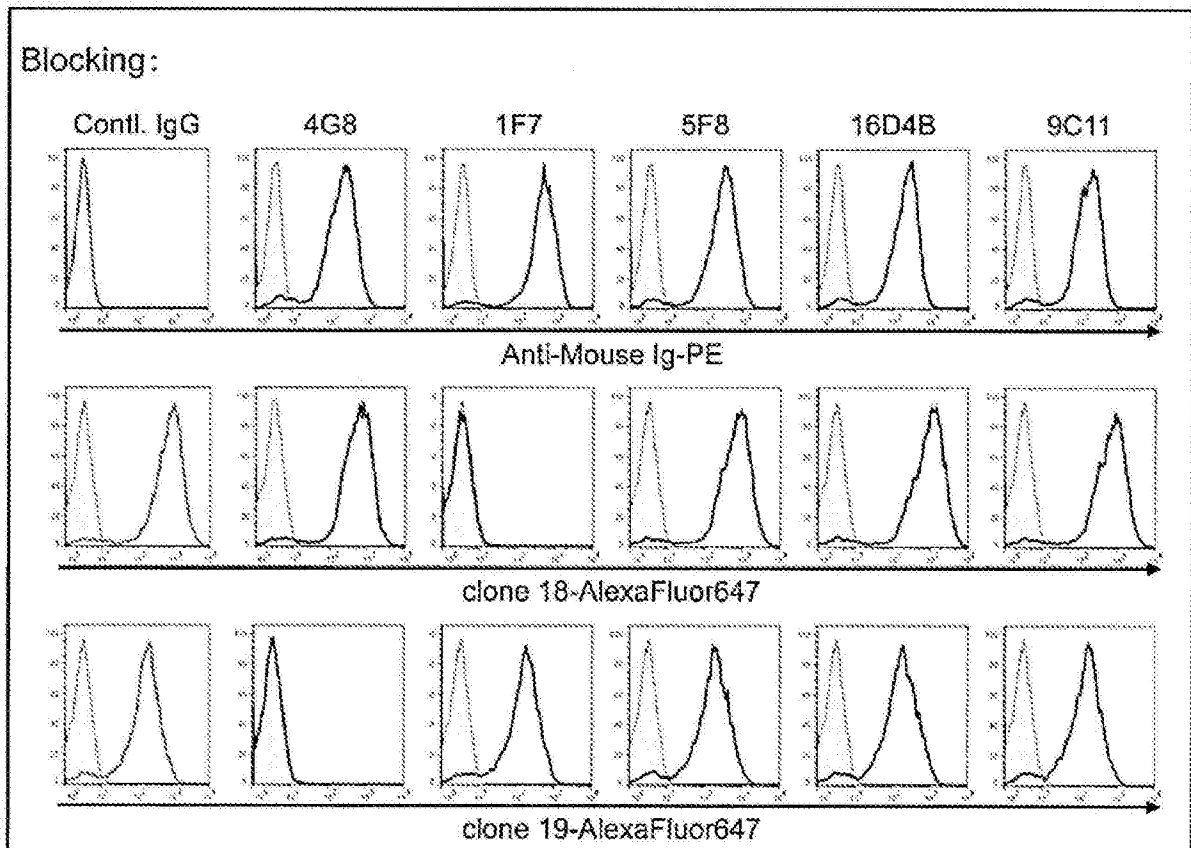
[2B]



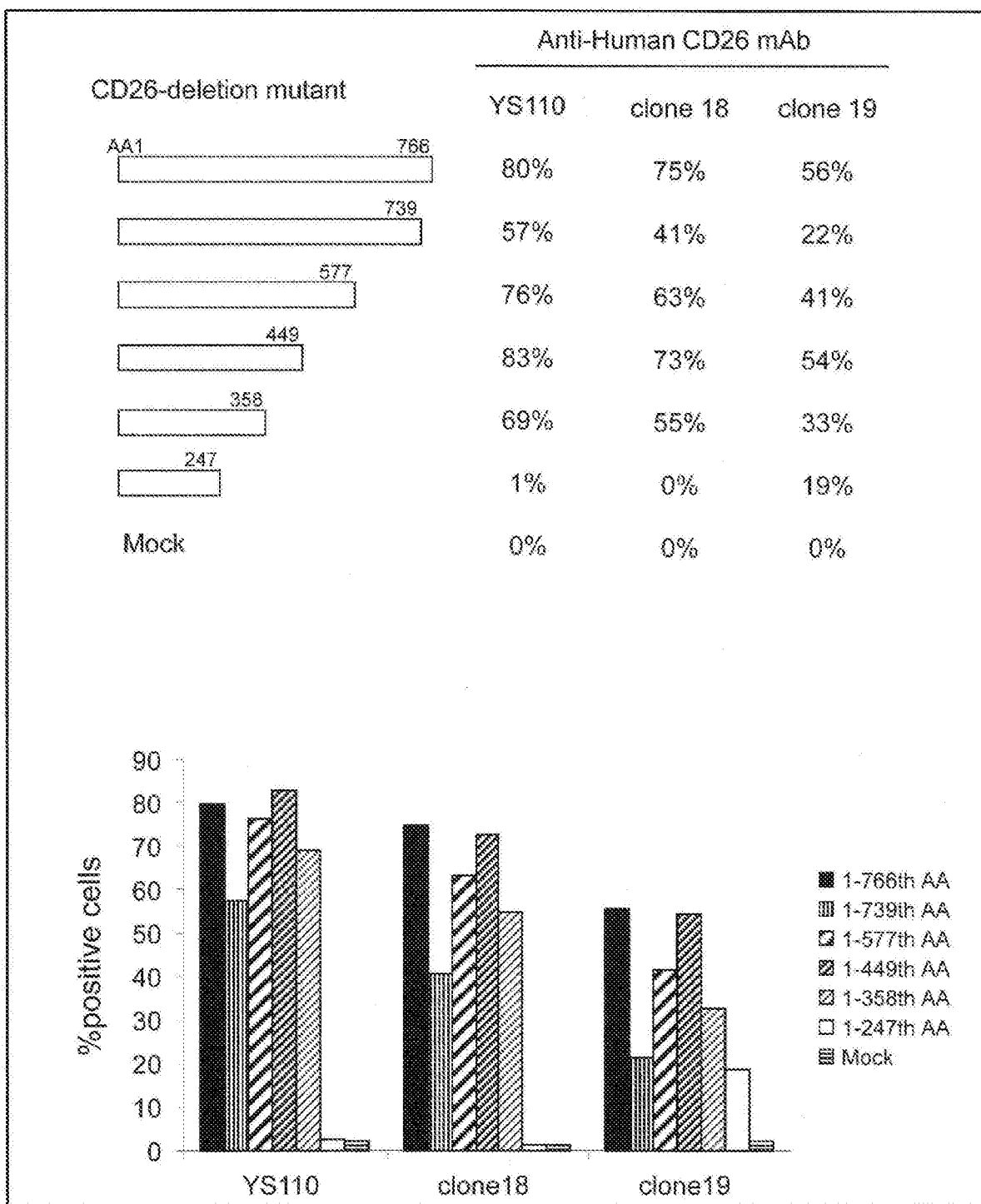
[図3]



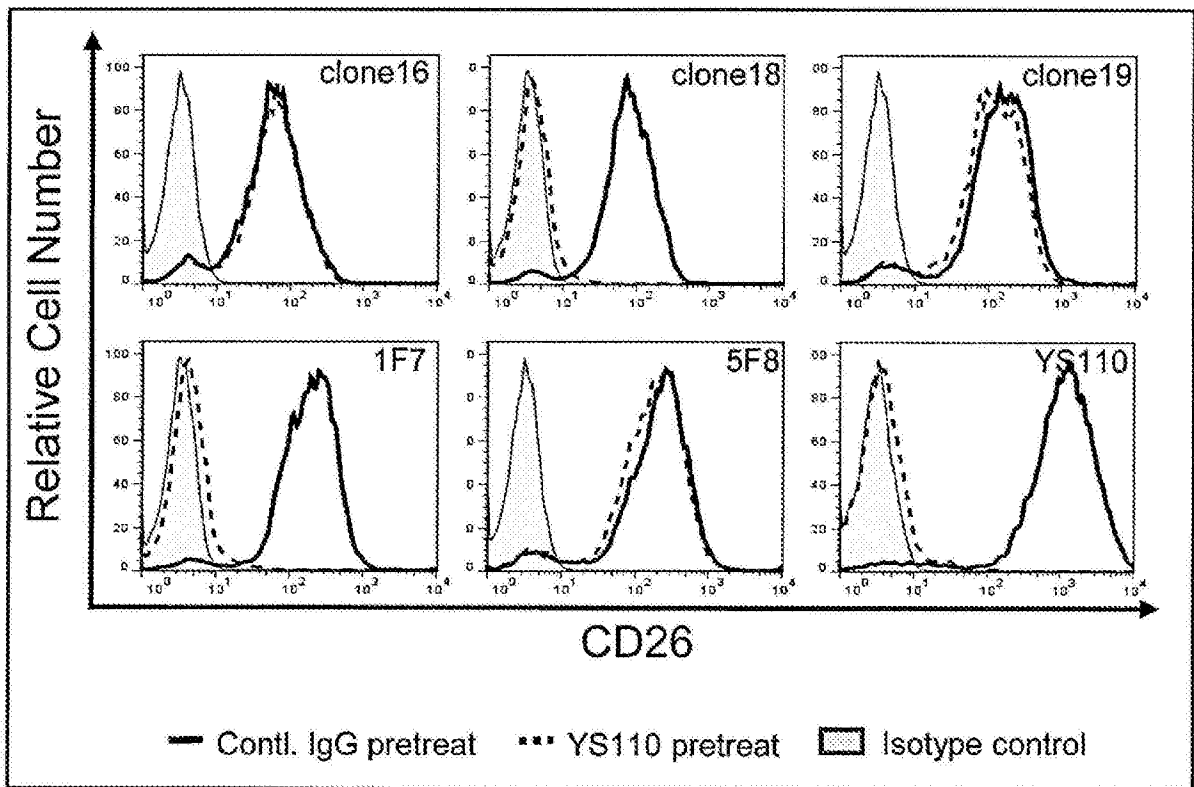
[図4]



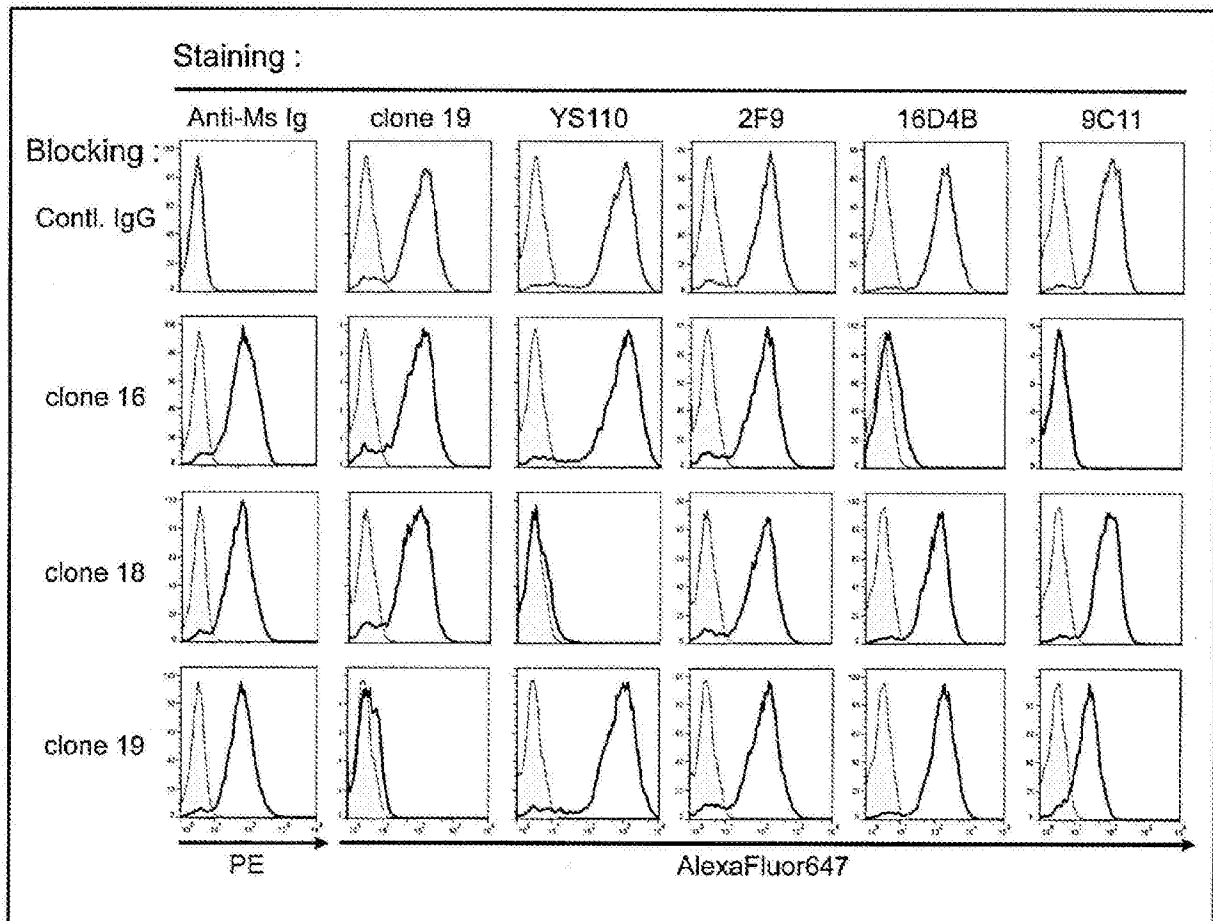
[図5]



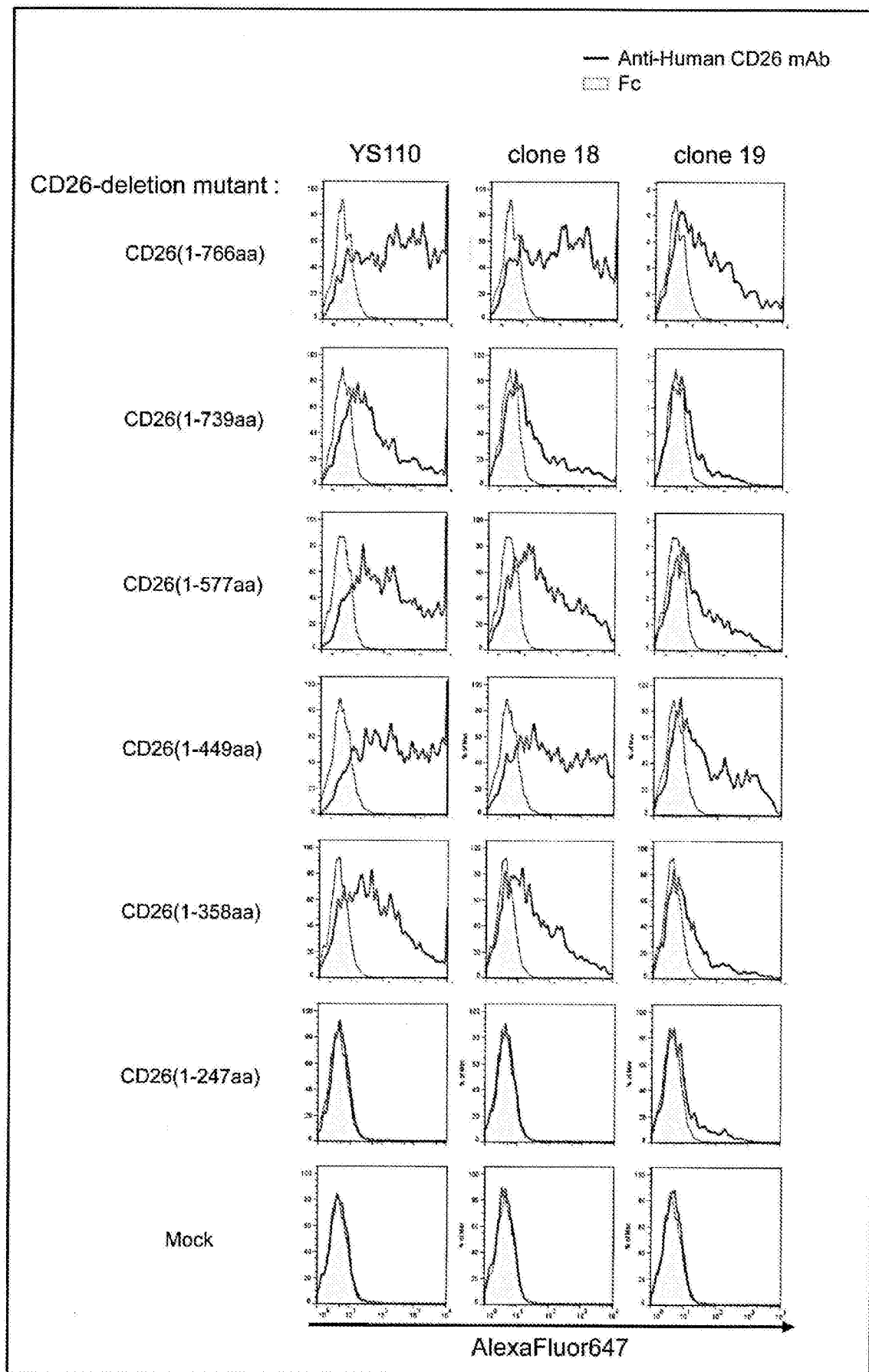
[圖6]



[圖7]



[圖8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12P21/08(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/28, C07K16/40, C12N5/10, G01N33/53, G01N33/574, G01N33/577, C12N15/09, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DONG R-.P. et al., Correlation of the epitopes defined by anti-CD26 mAbs and CD26 function, Molecular Immunology, 1998, Vol.35, p.13-21	1-15
Y	HUHN J. et al., The Adenosine Deaminase-Binding Region Is Distinct from Major Anti-CD26 mAb Epitopes on the Human Dipeptidyl Peptidase IV(CD26) Molecule, Cellular Immunology, 1999, Vol.192, p.33-40	1-15
Y	ABBOTT C. A. et al., Binding to human dipeptidyl peptidase IV by adenosine deaminase and antibodies that inhibit ligand binding involves overlapping, discontinuous sites on a predicted β propeller domain, Eur. J. Biochem, 1999, Vol.266, p.798-810	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 October, 2014 (16.10.14)		Date of mailing of the international search report 28 October, 2014 (28.10.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070084

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ULMER A. J. et al., CD26 Antigen is a Surface Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV) as Characterized by Monoclonal Antibodies Clone TII-19-4-7 and 4EL1C7, Scand. J. Immunol., 1990, Vol.31, p.429-435	1-15
Y	JP 2009-502139 A (Y's Therapeutics, Co., Ltd.), 29 January 2009 (29.01.2009), & US 2007/0105771 A1 & US 2009/0136523 A1 & EP 1907425 A & WO 2007/014169 A2 & KR 10-2008-0039929 A & CN 101282994 A	1-15

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, C07K16/40(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12P21/08(2006.01)n</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C07K16/28, C07K16/40, C12N5/10, G01N33/53, G01N33/574, G01N33/577, C12N15/09, C12P21/08</p>											
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:30%;">日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年	
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014年										
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:15%;">引用文献の カテゴリー*</th> <th style="width:65%;">引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th style="width:20%;">関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align:center;">Y</td> <td>DONG R-.P. et al., Correlation of the epitopes defined by anti-CD26 mAbs and CD26 function, Molecular Immunology, 1998, Vol.35, p.13-21</td> <td style="text-align:center;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="text-align:center;">Y</td> <td>HUHN J. et al., The Adenosine Deaminase-Binding Region Is Distinct from Major Anti-CD26 mAb Epitopes on the Human Dipeptidyl Peptidase IV(CD26) Molecule, Cellular Immunology, 1999, Vol.192, p.33-40</td> <td style="text-align:center;">1-15</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	DONG R-.P. et al., Correlation of the epitopes defined by anti-CD26 mAbs and CD26 function, Molecular Immunology, 1998, Vol.35, p.13-21	1-15	Y	HUHN J. et al., The Adenosine Deaminase-Binding Region Is Distinct from Major Anti-CD26 mAb Epitopes on the Human Dipeptidyl Peptidase IV(CD26) Molecule, Cellular Immunology, 1999, Vol.192, p.33-40	1-15
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	DONG R-.P. et al., Correlation of the epitopes defined by anti-CD26 mAbs and CD26 function, Molecular Immunology, 1998, Vol.35, p.13-21	1-15									
Y	HUHN J. et al., The Adenosine Deaminase-Binding Region Is Distinct from Major Anti-CD26 mAb Epitopes on the Human Dipeptidyl Peptidase IV(CD26) Molecule, Cellular Immunology, 1999, Vol.192, p.33-40	1-15									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<table style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p> </td> </tr> </table>			<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>							
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献</p> <p>「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&」同一パテントファミリー文献</p>										
<p>国際調査を完了した日</p> <p style="text-align:center;">16. 10. 2014</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p style="text-align:center;">28. 10. 2014</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p style="text-align:center;">日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p style="text-align:center;">北村 悠美子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:50%;">4 N</td> <td style="width:50%;">4 5 0 1</td> </tr> </table>	4 N	4 5 0 1							
4 N	4 5 0 1										

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ABBOTT C. A. et al., Binding to human dipeptidyl peptidase IV by adenosine deaminase and antibodies that inhibit ligand binding involves overlapping, discontinuous sites on a predicted β propeller domain, Eur. J. Biochem, 1999, Vol.266, p.798-810	1-15
Y	ULMER A. J. et al., CD26 Antigen is a Surface Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) as Characterized by Monoclonal Antibodies Clone TII-19-4-7 and 4EL1C7, Scand. J. Immunol., 1990, Vol.31, p.429-435	1-15
Y	JP 2009-502139 A (ワイズセラピューティクス株式会社) 2009.01.29, & US 2007/0105771 A1 & US 2009/0136523 A1 & EP 1907425 A & WO 2007/014169 A2 & KR 10-2008-0039929 A & CN 101282994 A	1-15