(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6023706号
(P6023706)

(45)発行日　平成28年11月9日(2016.11.9)　(24)登録日　平成28年10月14日(2016.10.14)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAC
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	

請求項の数 19　(全 37 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-517396 (P2013-517396)
(86)(22)出願日　平成23年7月7日(2011.7.7)
(65)公表番号　特表2013-532978 (P2013-532978A)
(43)公表日　平成25年8月22日(2013.8.22)
(86)国際出願番号　PCT/EP2011/061557
(87)国際公開番号　WO2012/004367
(87)国際公開日　平成24年1月12日(2012.1.12)
審査請求日　平成26年7月4日(2014.7.4)
(31)優先権主張番号　10169021.2
(32)優先日　平成22年7月9日(2010.7.9)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

微生物の受託番号　ATCC　PTA-11008

(73)特許権者　512333423
アデュロ・バイオテック・ホールディングス・ヨーロッパ・ベスローテン・フエンノートシャップ
ＡＤＵＲＯ　ＢＩＯＴＥＣＨ　ＨＯＬＤＩＮＧＳ，　ＥＵＲＯＰＥ　Ｂ．Ｖ．
オランダ、エン・エル－５３４９　アー・ベー　オス、クロースステルストラート、９、エル・イクス・１１０１
(74)代理人　110001195
特許業務法人深見特許事務所

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＤ２７に対するアゴニスト抗体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトＣＤ２７に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントであって、
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５、６および７の全てを含む抗体重鎖可変領域、ならびに、
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８、９および１０の全てを含む抗体軽鎖可変領域
を含み、ここにおいて前記抗体またはその抗原結合フラグメントはＣＤ２７に対するアゴニスト活性を呈する、抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２】
そのリガンドＣＤ７０よりも効果的にヒトＣＤ２７を活性化することができる、請求項１に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項３】
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３というアミノ酸配列を備える重鎖可変領域と、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４というアミノ酸配列を備える軽鎖可変領域とを備える、請求項１または２に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項４】
ハイブリドーマｈＣＤ２７．１５（受託番号ＰＴＡ－１１００８）によって産生されるモノクローナル抗体ｈＣＤ２７．１５である、請求項１－３のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項５】
ヒト化されたものである、請求項１－４のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結

合フラグメント。
【請求項６】
少なくとも１０$^{-6}$MのＫ$_D$を有するヒトＣＤ２７に結合する、請求項１－５のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項７】
－１００ｎM以下のＫ$_D$を有するヒトＣＤ２７に結合し；かつ
－１０ｎM以下のＩＣ$_{50}$を有するヒトＣＤ７０へのヒトＣＤ２７の結合をブロックする、請求項１－６のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項８】
請求項１－７のいずれか１項に記載の抗体または抗原結合フラグメントとヒトＣＤ２７におけるエピトープへの結合に競合する、ヒト抗体もしくはヒト化抗体またはそれらの抗原結合フラグメントであって、
－１０$^{-6}$M以下のＫ$_D$を有するヒトＣＤ２７に結合し；
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３というアミノ酸配列を備える重鎖とＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４というアミノ酸配列を備える軽鎖とを有する抗体と同じＫ$_D$を有するヒトＣＤ２７に結合し；
－１０ｎM以下のＩＣ$_{50}$を有するヒトＣＤ７０へのヒトＣＤ２７の結合をブロックする、という特性のうち１つ以上を有する、抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項９】
－キメラ抗体もしくはその抗原結合フラグメント；または
－Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、二重特異性ｍＡｂ、および二重特異性抗体からなる群から選択される抗体フラグメントである、請求項１－８のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項１０】
請求項１－９のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをエンコードする単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１１】
ｈＣＤ２７．１５の重鎖および軽鎖をエンコードするＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ　１および２を備える、請求項１０に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１２】
請求項１０または１１に記載のポリヌクレオチドを備える発現ベクター。
【請求項１３】
請求項１２に記載の発現ベクターまたは請求項１０もしくは１１に記載のポリヌクレオチドを備える宿主細胞。
【請求項１４】
請求項１－９のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを産生する方法であって、
ａ）請求項１－９のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをエンコードするポリヌクレオチドを備える発現ベクターを備える宿主細胞を、ポリヌクレオチドが発現される条件下の培地中で好適な調節性配列の制御下で培養し、これにより軽鎖および重鎖可変領域を備えるポリペプチドを産生することと；
ｂ）宿主細胞または培地からポリペプチドを回収することとを備える、方法。
【請求項１５】
医薬的に許容される担体または希釈液と組合わせた、請求項１－９のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを備える組成物。
【請求項１６】
制がん剤をさらに備える、請求項１５に記載の組成物。
【請求項１７】
療法および診断で用いるための、請求項１－９のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項１８】
療法は、
－ＣＤ２７$^{+}$細胞の増殖および／もしくは生存の刺激；
－癌の治療；または
－自己免疫疾患の治療、を備える、請求項１７に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項１９】
フローサイトメトリ、ウェスタンブロット法、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、および免疫組織化学で用いるための、請求項１－９のいずれか１項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ヒトＣＤ２７に結合する、単離された抗体またはそのフラグメント、そのような抗体をエンコードするポリヌクレオチド、および当該抗体を産生する宿主細胞に関する。抗体を用いて、リンパ球増殖および／または生存を刺激し、癌を治療し、かつ自己免疫または移植拒絶と戦うことができる。さらに、抗体を診断ツールおよびインビトロ剤として用いて、ＣＤ２７$^{+}$細胞の増殖および／または生存を促進することができる。
【背景技術】
【０００２】
ＴＮＦ受容体ファミリーメンバーであるＣＤ２７は、ヒトＴ細胞上の膜分子として同定された（van Lier et al., 1987, J Immunol 139:1589-96）。現在の証拠によると、ＣＤ２７は、これもＴＮＦファミリーメンバーである単一のリガンドＣＤ７０を有する（Goodwin et al., 1993, Cell 73:447-56）。ＣＤ２７およびＣＤ７０も、マウス系統中で同定され、クローン化されている（Gravestein et al., 1993, Eur J Immunol 23:943-50; Tesselaar et al., J Immunol 159:4959-65）。
【０００３】
ＣＤ２７は、造血細胞、特にリンパ球系列の細胞、すなわちＴ、Ｂ、およびＮＫ細胞によって排他的に発現される。ヒト系統では、αβＴ細胞系列中のＣＤ２７発現は、胸腺細胞の正の選択の際に誘導され、かつ未感作の従来のＣＤ４$^{+}$およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞中に維持される（Vanhecke et al., 1997, J Immunol 159:5973-83）。Ｔ細胞抗原受容体（ＴＣＲ）を介したＴ細胞の活性化により、ＣＤ２７発現が過渡的な態様で増す（van Lier et al., 1987, J Immunol 139:1589-96）。次に、ＣＤ２７は、活性化されたＴ細胞の表面から脱落し、（慢性）Ｔ細胞活性化用の血清マーカー中にＣＤ２７の可溶形態を検出することができる（Hintzen et al., 1991, J Immunol 147:29-35）。末梢Ｔ細胞のうち、持続的な抗原刺激によってＣＤ２７の発現が永久的に失われ、最終分化エフェクタ／記憶Ｔ細胞を特徴づける一方で、中心記憶Ｔ細胞はＣＤ２７を維持する（Baars et al., 1995, J Immunol 154:17-25; Hamann et al., 1997, J Exp Med 186:1407-18）。ＣＤ２７は、胸腺の発生の際にヒトγδＴ細胞上でも発現され、誘導される（Offner F et al, 1997, J Immunol 158:4634-41）。さらに、ＣＤ２７発現が失われることは、慢性的に刺激されるγδＴ細胞の顕著な特徴である（Gioia C et al., 2002, J Immunol 168:1484-9）。一般的に、ＣＤ２７は、細胞活性化および分化段階の鋭敏なマーカーであり、ヒトの臨床診断および研究においてそのようなものとして用いられる。
【０００４】
マウスでは、ＣＤ２７は、造血幹細胞、多能性先祖、および一般的なリンパ性前駆物質上に見られた（Medina et al., 2001, Nat Immunol 2:718-24; Wiesmann et al., 2000, Immunity 12:193-9）。
【０００５】
ＣＤ２７は元々、ＴＣＲ刺激に対する増殖的応答を増すヒトＴ細胞コスティミュラトリ分子として定義された（van Lier et al., 1987, J Immunol 139:1589-96）。ＣＤ７０の

存在が、ＣＤ２７が媒介する同時刺激の時期および残存率を決める。免疫活性化すると、樹枝状細胞、Ｔ、Ｂ、およびＮＫ細胞は、抗原、Toll様受容体アゴニスト、または炎症性サイトカインの存在を条件として、過渡的にＣＤ７０を発現する。

【０００６】

抗ＣＤ２７ｍＡｂ　ＣＬＢ－ＣＤ２７／１（９Ｆ４）によるＣＤ２７の刺激は、ＴＣＲ刺激に対するヒトＴ細胞の増殖的応答を増した（Van Lier et al., 1987, J Immunol 139:1589-96）。これは、架橋された抗ＣＤ２７ｍＡｂ　１Ａ４またはＣＤ７０を発現する形質転換体を用いて確認された。これに対し、ＣＤ２７またはＣＤ７０に向けられた抗体はこの増殖を妨げる可能性がある。ＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$Ｔ細胞の両者とも、ＣＤ２７の同時刺激に応答した（Goodwin et al., 1993, Cell 73:447-56; Kobata et al., 1994, J Immunol 153:5422-32; Hintzen et al., 1995, J Immunol 154:2612-23）。マウスの研究は、未感作ＣＤ８$^+$およびＣＤ４$^+$αβＴ細胞のコスティミュラトリ受容体としてのＣＤ２７の役割をはっきりと支持する。マウスＴ細胞については、ＣＤ２７は、ＴＣＲが媒介する活性化の際のそれらの生存を主に促進するが、ヒトＴ細胞では、これは、加えて、細胞周期進入および／または活性を促進する（Borst et al., 2005, Curr Op Immunol 17:275-281; Nolte et al., 2009, Immunol Rev 229:216-231で検討された）。

【０００７】

一時的にＣＤ７０をアップレギュレートする急性感染で起こるようなその過渡的な関与の際、ＣＤ２７は、器官をプライミングするＣＤ８$^+$エフェクタＴ細胞プールの生成、組織エフェクタ部位でのその維持、記憶細胞へのその変換、および記憶機能を行使するその潜在性を支持する（Hendriks et al., 2003, J Exp Med 198:1369-1380; Hendriks et al., 2005, J Immunol 175:1666-75, Xiao et al, 2008, J Immunol 181: 1071-82）。マウスモデル中のＣＤ７０ブロック抗体についての研究は、ＣＤ２７－ＣＤ７０相互作用が、たとえばタンパク質免疫処置、ウィルス感染、および同種移植後のＣＤ８$^+$エフェクタＴ細胞の生成への重要な寄与をなすことができるという概念を支持する（Taraban et al., 2004, J Immunol 173:6542-46; Bullock and Yagita, 2005, J Immunol 174:710-17; Yamada et al., 2005, J Immunol 174:1357-1364; Schildknecht et al., 2007, Eur J Immunol 37:716-28）。

【０００８】

未成熟樹枝状細胞におけるＣＤ７０の遺伝形質転換発現は、ウィルスまたは腫瘍に対する免疫学的寛容を、ＰＢＳ中のＭＨＣクラスＩ－制限ペプチドを用いた免疫処置に対するＣＤ８$^+$Ｔ細胞応答性に変換するには十分であった。同様に、アゴニスト可溶ＣＤ７０は、そのようなペプチド免疫処置に対するＣＤ８$^+$Ｔ細胞応答を促進し（Rowley et al., 2004, J Immunol 172:6039-6046）、ＣＤ７０遺伝形質転換マウスでは、ＴＣＲ刺激に応答したＣＤ４$^+$およびＣＤ８$^+$エフェクタ細胞形成が大幅に容易化された（Arens et al. 2001, Immunity 15:801-12; Tesselaar et al., 2003, Nat Immunol 4:49-54; Keller et al. 2008, Immunity 29: 334-346）。マウスリンパ腫モデルでは、腫瘍拒絶は、ＣＤ７０遺伝形質転換または活性化抗マウスＣＤ２７抗体の注射によって改善された（Arens et al., 2003, J Exp Med 199:1595-1605; French et al., 2007, Blood 109: 4810-15; Sakanishi and Yagita, 2010, Biochem. Biophys. Res. Comm. 393: 829-835; WO2008/051424）。

【０００９】

一般的に、リンパ性細胞上でのＣＤ２７発現は生存の潜在性と関連付けられる。顕著な例は、長期にわたって持続するＴ細胞がＣＤ２７発現のために選択された、癌およびＡＩＤＳ患者におけるヒト養子Ｔ細胞療法に由来する。さらに、腫瘍湿潤リンパ球上でのＣＤ７０発現は抗腫瘍免疫応答にはっきりと相関し、これは、腫瘍内でのエフェクタＴ細胞の生存を潜在的に反映している（Ochsenbein et al., 2004, J Exp Med 200:1407-17; Huang et al., 2006, J Immunol 176:7726-35）。

【００１０】

従来のＣＤ４$^+$Ｔ細胞については、ＣＤ２７が同様に一次的および二次的応答を促進す

る（Hendriks et al., 2000, Nat Immunol 1:433-40; Xiao et al, 2008, J Immunol 181: 1071-82）。さらに、ＣＤ２７同時刺激は、Ｔヘルパー１の発達のためのＩＬ－１２の独立した経路を助け、かつＣＤ４$^+$Ｔ細胞がＣＤ８$^+$Ｔ細胞の記憶プログラミングのための助けを与えられるようにする（Soares et al., 2007, J Exp Med 204:1095-106; Xiao et al, 2008, J Immunol 181: 1071-8）。Ｃ５７ＢＬ／６マウスでは、ＣＤ２７刺激は、Ｔｈ１型ＣＤ４$^+$Ｔ細胞分化と一貫して関連付けられ（Arens et al. 2001, Immunity 15: 801-12; Soares et al., 2007, J Exp Med 204:1095-106; Xiao et al, 2008, J Immunol 181: 1071-82）、インビトロヒトＣＤ４$^+$Ｔ細胞では、ＣＤ２７は、ＩＬ－１２の存在下でのＴｈ１の発達を促進したが、ＩＬ－４の存在下では分化誘導効果は有しなかった（van Oosterwijk et al., 2007, Int Immunol 19:713-18）。

【００１１】

さらに、ＣＤ２７刺激は、ヒト調節性Ｔ細胞生成および／または機能を促進することが実証された（Jacquot et al., 1997, Cell Immunol 179:48-54）。ヒトの自然調節性Ｔ細胞のうち、高いＣＤ２７発現は、最も高い抑制性活性を有する細胞を特徴づけ、ＣＤ２７の高い部分母集団は、ラパマイシン治療の際に優先的に増幅される（Koenen et al., 2005, J Immunol 174:7573-83; Coenen et al., 2006, Blood 107:1018-23）。最近の観察は、ＣＤ２７$^+$Ｔｒｅｇ部分母集団がＴｈ１７細胞に分化することができると示唆する（Koenen et al., 2008, Blood 112: 2340-52）。興味深いことに、ＣＤ７０$^+$Ｂリンパ腫細胞は、腫瘍内Ｔ細胞上でのＣＤ２７トリガによってＴｒｅｇ形成を刺激し、かつＴｈ１７の分化を妨げることがわかった（Yang et al., 2007, Blood 110:2537-44; Yang et al., 2009, Cancer Res 69:5522-30）。

【００１２】

Ｂ細胞を安置する際、ＣＤ２７の発現はないが、これは胚中心およびヒトにおけるＢ細胞活性化の際に誘導され、これはその後、記憶Ｂ細胞および形質細胞上に維持される（Agematsu et al., 2000 Immunol Today 21:204-206; Jung et al., 2000, Eur J Immunol 30:2437-2443）。ＣＤ２７は、Ｂ細胞上のコスティミュラトリ受容体としても働く。ヒトＢ細胞を有するインビトロ系統では、ＣＤ２７－ＣＤ７０相互作用はＩｇ分泌を一貫して刺激する（Agematsu et al., 1997, Eur J Immunol 27:2073-79; Jacquot et al., 1997, J Immunol 159:2652-7）。

【００１３】

ヒトＮＫ細胞は、成熟エフェクタ細胞を同定するＣＤ２７発現が欠如しているＣＤ２７発現に基づいて、２つの機能性部分集合に細分化可能である（Sugita et al., 1992, J Immunol 149:1199-203; Vossen et al., 2008, J Immunol 180:3739-45）。データは、Ｔ細胞についてのＮＫ細胞中のＣＤ２７のための同様の同時刺激的役割を示唆する（Takeda et al., 2000, J Immunol 164; 1741-1745）。ＮＫ細胞上でのＣＤ２７の活性化の機能的効果は、ＣＤ７０発現腫瘍細胞の増大したＮＫ媒介死滅によって確立された。ＣＤ２７媒介ＮＫ細胞活性化は、ＣＤ８$^+$抗腫瘍免疫の生成も促進した（Aulwurm et al., 2006, Int J Cancer 118:1728-1735; Kelly et al., 2002, Nat Immunol 3:83-90）。最近、ＮＫＴ細胞は、樹枝状細胞上でのＣＤ７０の誘導によるＣＤ８$^+$Ｔ細胞免疫を促進することが示された（Taraban et al., 2008, J Immunol 139:1589-96）。

【００１４】

さらに、ＣＤ２７は、非ホジキンリンパ腫および慢性リンパ性白血病に由来する腫瘍細胞上に高度に発現される（Ranheim et al., 1995, Blood 85:3556-3565; van Oers et al., 1993, Blood 82: 3430-3436）。可溶ＣＤ２７は、リンパ性悪性疾患のための血清マーカーとして用いられる（Van Oers et al., 1993, Blood 82:3430-6）。

【００１５】

本発明に至った研究では、ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂがＣＤ２７$^+$細胞の増殖および／または生存を刺激することが見出された。ＣＤ２７$^+$細胞の向上した増殖および／または生存は、異なる療法的使用の基礎を形成する。ＣＤ２７を活性化するモノクローナル抗体は公知である。２つの活性化抗ヒトＣＤ２７抗体が記載されている（Van Lier et al., 198

7, J. Immunol. 1987, 139:1589-96; Kobata et al., 1994, J. Immunol. 153: 5422-5432）。さらに、活性化抗マウスＣＤ２７抗体が記載されている（French et al., 2007, Blood 109: 4810-15; WO2008/051424; Sakanishi and Yagita, 2010, Biochem. Biophys. Res. Comm. 393: 829-835）。ｈＣＤ２７．１５は独特の抗ヒト抗体であり、これは、１Ａ４および９Ｆ４に対して、そのリガンドＣＤ７０よりも効果的にヒトＣＤ２７を活性化することができる。ｈＣＤ２７．１５のこれらの特性の結果、１Ａ４、９Ｆ４、およびＦｃ-ＣＤ７０と比較して、ＣＤ８＋およびＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖に対して大幅に増大した効果が得られる。単独でまたは他の剤と組合わせた人間へのｈＣＤ２７．１５の投与を、たとえば癌の治療に用いることができる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１６】

このように、発明は、ｈＣＤ２７．１５と同じエピトープに結合する結合化合物に関する。ｈＣＤ２７．１５を産生するハイブリドーマは、２０１０年６月２日にＡＴＣＣに寄託され、受託番号ＰＴＡ－１１００８を与えられた。

【００１７】

発明は、この特定的なエピトープへの結合が$CD27^+$細胞の増殖および／または生存を刺激することが分かったのと同じエピトープを結合するすべての分子に関する。

【００１８】

１つの実施形態では、発明は、結合化合物であって、ＣＤ２７に結合し、かつ

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５、６、および７からなる群から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、もしくは当該配列のうちいずれかの変異体を備える抗体重鎖可変領域；ならびに／または

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８、９、および１０からなる群から選択される少なくとも１つのＣＤＲ、もしくは当該配列のうちいずれかの変異体を備える抗体軽鎖可変領域

を備える、結合化合物に関する。

【００１９】

１つの実施形態では、発明は、結合化合物であって、ＣＤ２７に結合し、かつ

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５、６、および７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５および７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６および７、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５および６からなる群から選択されるＣＤＲの組合せ、もしくは当該配列のうちいずれかの変異体を備える抗体重鎖可変領域；ならびに／または

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８、９、および１０、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８および１０、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９および１０、ならびにＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８および９からなる群から選択されるＣＤＲの組合せ、もしくは当該配列のうちいずれかの変異体を備える抗体軽鎖可変領域

を備える、結合化合物に関する。

【００２０】

１つの実施形態では、発明は、以上開示されたＣＤＲの組合せを有する重鎖および軽鎖可変領域の任意の組合せであって、特に

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８、９、および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５、６、および７、

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５、６、および７、

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５、６、および７、

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８および９とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５、６、および７、

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８、９、および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５および７、

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５および７、

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５および７、

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８および９とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５および７、

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８、９、および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６および７、

－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６および７、
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６および７、
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８および９とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６および７、
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８、９、および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５および６、
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５および６、
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９および１０とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５および６、
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８および９とのＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５および６、
の組合せに関する。

【００２１】

１つの実施形態では、発明は、結合化合物であって、ＣＤ２７に結合し、かつ
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５、６、および７のＣＤＲ、もしくは当該配列のうちいずれかの変異体を備える抗体重鎖可変領域；ならびに／または
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８、９、および１０のＣＤＲ、もしくは当該配列のうちいずれかの変異体を備える抗体軽鎖可変領域
を備える、結合化合物に関する。

【００２２】

１つの実施形態では、結合分子は、ＣＤ２７に結合し、かつ
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３というアミノ酸配列を備える重鎖可変領域と、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４というアミノ酸配列を備える軽鎖可変領域と
を備える。

【００２３】

１つの実施形態では、結合化合物は、ハイブリドーマｈＣＤ２７．１５によって産生されるようなモノクローナル抗体ｈＣＤ２７．１５（受託番号ＰＴＡ－１１００８）であるかまたはそのヒト化されたものである。

【００２４】

１つの実施形態では、結合化合物は、抗体のフラグメント、変異体、または誘導体である。

【００２５】

そのさらなる局面に従うと、発明は、発明の結合化合物をエンコードする単離されたポリヌクレオチドに関する。発明はさらに、当該ポリヌクレオチドを備える発現ベクターおよび発現ベクターを備える宿主細胞に関する。１つの実施形態では、発明は、ｈＣＤ２７．１５の重鎖および軽鎖をそれぞれエンコードするＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ１および２の単離されたポリヌクレオチドに関する。

【００２６】

１つの実施形態では、結合化合物は、
－約１００ｎＭ以下のK_Dを有するヒトＣＤ２７を結合し；かつ
－約１０ｎＭ以下のIC_{50}を有するヒトＣＤ７０へのヒトＣＤ２７の結合をブロックする。

【００２７】

１つの実施形態では、発明は、ヒトＣＤ２７上の結合エピトープについて、上記結合化合物のいずれかと競合する結合化合物に関し、
－約１００ｎＭ以下のK_Dを有するヒトＣＤ２７を結合し；
－ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３というアミノ酸配列を備える重鎖と、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４というアミノ酸配列を備える軽鎖とを有する抗体とほぼ同じK_Dを有するヒトＣＤ２７に結合し；
－約１０ｎＭ以下のIC_{50}を有するヒトＣＤ７０へのヒトヒトＣＤ２７の結合をブロックする
という特徴のうち１つ以上を有する。

【００２８】

結合化合物は、

－キメラ抗体もしくはそのフラグメント；
－ヒト抗体もしくはそのフラグメント；
－ヒト化抗体もしくはそのフラグメント；または
－Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、二重特異性ｍＡｂ、および二重特異性抗体からなる群から選択される抗体フラグメント
のうちいずれか１つであり得る。

【００２９】
その別の局面に従うと、発明は、発明の結合化合物をエンコードする単離されたポリヌクレオチドに関する。１つの実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、ｈＣＤ２７．１５の重鎖および軽鎖をエンコードするＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ　１および２を備える。

【００３０】
発明は、ポリヌクレオチドを備える発現ベクター、および発現ベクターまたはポリヌクレオチドを備える宿主細胞にも関する。

【００３１】
そのさらなる局面に従うと、発明は、発明の結合化合物を産生する方法であって、
ａ）発明の結合化合物をエンコードするポリヌクレオチドを備える発現ベクターを備える宿主細胞を、ポリヌクレオチドが発現される条件下の培地中で好適な調節性配列の制御下で培養し、これにより軽鎖および重鎖可変領域を備えるポリペプチドを産生することと；
ｂ）宿主細胞または培地からポリペプチドを回収することと
を備える方法に関する。

【００３２】
発明は、医薬的に許容される担体または希釈液と組合せて結合化合物を備える組成物にさらに関する。そのような組成物は、１つの実施形態では、１つよりも多くの結合化合物を備えてもよい。１つの実施形態では、組成物は、発明の１つ以上の結合化合物に加えて、１つ以上の他の活性化合物を備える。そのような組合せ組成物を、たとえば癌の治療で組合せ療法に用いることができる。その場合、結合化合物は、通常の制がん剤のうち１つ以上と組合される。他の組合せ療法には他の付加的活性化合物を用いる。組合せ療法には、同じ組成物中に２つ以上の活性化合物を有することが義務付けられているわけではない。このように、発明の一部も、結合化合物と他の活性化合物との組合せられたまたはその後の使用であり、ここでは、結合化合物および他の活性化合物は同時にまたは後に投与される。

【００３３】
発明は、療法および診断における、ならびに他の非療法的目的のための、結合化合物の使用にさらに関する。

【００３４】
１つの実施形態では、療法は$CD27^+$細胞の増殖および／または生存の刺激を備える。１つの実施形態では、療法は癌の治療を備える。１つの実施形態では、療法は自己免疫疾患の治療を備える。

【００３５】
発明の結合化合物は、非療法的適用例で用いられる場合、たとえば、フローサイトメトリ、ウェスタンブロット法、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、および免疫組織化学などの技術に適用可能である。

【００３６】
以下では、これらの結合化合物を「ｈＣＤ２７．１５ベースの結合化合物」と称する。この文言は、上述のようなｈＣＤ２７．１５が認識するＣＤ２７のエピトープに結合するあらゆる化合物を包含することが意図される。そのような化合物は、ｈＣＤ２７．１５、もしくはそのフラグメント、変異体、もしくは誘導体のＣＤＲ領域のうち１つ以上を有する抗体、またはモノクローナル抗体ｈＣＤ２７．１５もしくはそのヒト化されたもの、またはこのエピトープに結合可能な他の分子であり得る。

【図面の簡単な説明】
【００３７】
【図１】抗ｈＣＤ２７抗体の特徴付け；Ａ．ｐＣＩ－ｎｅｏ－ｈＣＤ２７（ＣＨＯ－Ｋ１．ＣＤ２７）を用いて安定的にトランスフェクトされたＣＨＯ－Ｋ１へのｈＣＤ２７．１５の結合；抗ｈＣＤ２７　５７７０３（R&D systems）および抗ｈＣＤ２７　１Ａ４（Beckman Coulter）は陽性対照である；抗体はＣＨＯ－Ｋ１対照細胞（データ示さず）とは反応しなかった；Ｂ．ｐＣＩ－ｎｅｏ－ｈＣＤ７０（ＣＨＯ－Ｋ１．ＣＤ７０）を用いて安定的にトランスフェクトされたＣＨＯ－Ｋ１細胞への可溶組換ｈＣＤ２７－Ｆｃ融合タンパク質の結合に対するｈＣＤ２７．１５の効果；Ｃ．ＣＨＯ－Ｋ１．ＣＤ２７への組換ｈＣＤ７０－ｍＣＤ８融合タンパク質の結合に対するｈＣＤ２７．１５の効果、の図である。
【図２】ｈＣＤ２７．１５は、ＮＦ－κＢ活性化につながるＣＤ２７シグナリングを誘導する；ヒト胎児腎臓細胞（ＨＥＫ２９３Ｔ）は、ｈＣＤ２７エンコードベクターまたは対照ベクターでＮＦ－κＢ－ルシフェラーゼレポータ構築物を発現するように過渡的にトランスフェクトされた；細胞は、ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂ（１０μｇ／ｍｌ）の存在または不在下で２０時間刺激された；ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂを用いた刺激は、ルシフェラーゼ活性によって読出されるような特異的ＣＤ２７誘導ＮＦ－κＢ活性化を顕した；（Ａ）ｍＡｂ　ｈＣＤ２７．１５またはアイソタイプ対照ｍＡｂを用いたｈＣＤ２７発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の刺激後のルシフェリン生物発光によって読出されるようなルシフェラーゼ活性の絶対値；データは１回の実験（＋ＳＤ）からの３倍の測定値を表わす；有意性は両側スチューデントｔ－検定を用いて測定された；（Ｂ）ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂを用いてｈＣＤ２７または対照ベクターを発現するようにトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞の刺激後のルシフェラーゼ活性の倍誘導；データは３回の独立した実験から得られた（Ｎ＝３　＋ＳＤ）；（Ｃ）ｈＣＤ２７．１５は他のｈＣＤ２７アゴニストよりも優れている；ＣＤ２７およびＮＦ－κＢ－ルシフェラーゼレポータを発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、可溶アゴニスト組換ＣＤ７０タンパク質（Ｆｃ－ｍＣＤ７０、２μｇ／ｍｌ）、ｍＡｂ　ｈＣＤ２７．１５（１０μｇ／ｍｌ）、またはｈＣＤ２７に向けられた他のｍＡｂの等しい濃度で刺激された；ルシフェラーゼ活性は示された時点で読出された；データは１回の実験（＋ＳＤ）からの３倍の測定値を表わす；有意性は両側スチューデントｔ－検定を用いて測定された、図である。
【図３】ｈＣＤ２７．１５は増殖を誘導し、および／またはＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｔ細胞の生存を促進する；ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｔ細胞は、ヒトＰＢＭＣからＭＡＣＳ（陰性選択）によって単離され、１×１０^{5}細胞／ウェルの濃度で９６ウェルプレート中で培養された；刺激は図に示すように加えられ、増殖は［^{3}Ｈ］チミジン組入れによって判断された、図である。
【図４】ｈＣＤ２７．１５は増殖を誘導し、および／または未感作ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の生存を促進する；未感作ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞はヒトＰＢＭＣから精製され、ＣＦＳＥで標識付けられ、ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂ（１０μｇ／ｍｌ）の存在または不在下で抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８ｍＡｂで６日間刺激された；ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂは、各分裂周期の細胞の百分率によって特徴づけられるような細胞分裂（Ａ）、および各分裂周期の細胞の絶対数によって特徴づけられるような合計生細胞収率（Ｂ）を刺激し；データは４つの健常な個体の細胞を用いた４回の独立した実験から得られた（Ｎ＝４＋／－ＳＥＭ）、図である。
【図５】ｈＣＤ２７．１５は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を刺激して特異的なサイトカインを産生する；未感作ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞は図３に示すように単離され、ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂ（１０μｇ／ｍｌ）の存在または不在下で抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８ｍＡｂで刺激された；（Ａ）７２時間の培養後、細胞の上澄みを採取し、Luminex assayを用いてサイトカインを測定した；（Ｂ）細胞数は、７２時間の培養後に著しく異なることはなく、このことは、あるサイトカインの分泌の定性的な差を示す；（Ａ，Ｂ）データは３つの健常な個体の細胞を用いた３回の独立した実験から得られた（Ｎ＝３＋／－ＳＥＭ）、図である。
【図６】ｈＣＤ２７．１５の可変領域配列を示す；パネルＡおよびＢは、ｈＣＤ２７．１

５の重鎖および軽鎖可変配列のアミノ酸配列をそれぞれ示す、図である。

【発明を実施するための形態】

【００３８】

療法

１つの実施形態では、発明の療法は、ｈＣＤ２７．１５、特にｈＣＤ２７．１５ｍＡｂベースの結合化合物を有する、Ｔｒｅｇ、Ｔｈ１７細胞、またはＴｈ１細胞などのＣＤ２７$^{+}$、ＣＤ４$^{+}$、またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞サブセットを標的にすることを備える。ｈＣＤ２７．１５、特にｈＣＤ２７．１５ｍＡｂベースの結合化合物を有するこれらのＣＤ２７$^{+}$細胞を標的にすることは、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞サイトカイン産生およびＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の性質がＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答を助けるように命令し、このことは、癌および自己免疫を含むさまざまな病状を治療するのに有益である。例は、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病などのリンパ球由来の腫瘍；膵癌、大腸癌、および前立腺癌のような充実性腫瘍によって形成されるが、これらに制限されるものではない。この目的のため、ｈＣＤ２７．１５を、単独でまたは他の制がん剤と組合せて、被験者に直接服用させることができる。自己免疫における使用の例は、関節リウマチ、全身エリテマトーデス、および乾癬を含むが、これらに制限されるものではない。

【００３９】

さらに、療法は、ウィルス性および細菌感染などの感染症に向けられてもよい。例は、ｈＣＤ２７．１５を、単独でまたは他の抗感染薬剤と組合せて、インフルエンザウィルスまたはＣＭＶウィルスに感染した被験者に投与することを含むが、これに制限されるものではない。

【００４０】

１つの実施形態では、ｈＣＤ２７．１５、特にｈＣＤ２７．１５ｍＡｂベースの結合化合物による免疫系の刺激を用いてワクチン応答を増すことができる。ｈＣＤ２７．１５刺激と組合せて用いることができるワクチンの非限定的例は、癌または病原体へのＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞応答を引き出すように設計される、ＤＮＡ、細胞ベースの、またはペプチドベースのワクチンを含む。この目的のため、ｈＣＤ２７．１５、特にｈＣＤ２７．１５抗体ベースの結合化合物を、予防接種前、予防接種後の適切な時に投与することができるか、またはワクチンの中に処方することができる。

【００４１】

現在最新の技術は、ＣＤ２７$^{+}$細胞の単離および異なる細胞サブセットの単離を可能にする。ｈＣＤ２７．１５による、患者の体外のそのような単離された細胞のサブセットの刺激の後、それらを患者または別の患者に後に養子導入することができる。１つの実施形態では、細胞のサブセットは、自己免疫疾患に罹患した患者から単離することができ、優れた抑制特性を実証することが示されているＣＤ２７$^{+}$調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）によって形成される。

【００４２】

モノクローナル抗体ｈＣＤ２７．１５は、ＣＤ２７$^{+}$細胞の増殖および／または生存を促進する。最新技術は、広範囲の体液および器官からの細胞（のサブセット）の単離を用いる。ｈＣＤ２７．１５の刺激特性に基づくと、ｈＣＤ２７．１５ベースの結合化合物をインビトロ細胞系で用いて、ＣＤ２７$^{+}$細胞の増殖および／または生存を促進することができる。非限定的な例は、寿命が短いことが実証されているＴｒｅｇを形成する。他の例は、記憶Ｂ細胞および活性化されたＴ細胞を形成する。

【００４３】

ｈＣＤ２７．１５、特にｈＣＤ２７．１５ｍＡｂベースの結合化合物によるＣＤ２７$^{+}$細胞の刺激および増殖をこのように用いてＴｒｅｇ母集団をエクスビボで増やすことができ、これを、患者の過度に活性化された免疫系を抑制するように患者に養子移植することができる。このような方策を用いて、活性化された免疫系に苦しむ患者を治療することができる。このように、たとえばこの策を用いて、移植拒絶を防止し、かつ自己免疫および炎症性疾患を治療することができる。

【００４４】
別の例は、腫瘍関連のリンパ球の単離である。そのようなリンパ球は、抗腫瘍活性を隠し持っているが、腫瘍およびその環境によって活性化を抑制されている。これらのリンパ球の単離、ｈＣＤ２７．１５、特にｈＣＤ２７．１５ｍＡｂベースの結合化合物を用いる体外でのその後の活性化および患者への養子導入は、向上した抗腫瘍応答を発することが期待される。
【００４５】
ｈＣＤ２７．１５、特にｈＣＤ２７．１５抗体ベースの結合化合物をインビボで適用して、ＣＤ２７$^{+}$腫瘍細胞を標的にすることもできる。ｈＣＤ２７．１５、特にｈＣＤ２７．１５抗体ベースの非修飾結合化合物を、たとえば、ＣＤ２７$^{+}$悪性腫瘍の患者に注射して、抗体依存細胞毒性または他の免疫エフェクタメカニズムを引き出すことができる。ｈＣＤ２７．１５、特にｈＣＤ２７．１５抗体ベースの結合化合物を、標的にされたＣＤ２７＋腫瘍細胞を殺すように毒素または他の適切な薬剤とコンジュゲートすることもできる。
【００４６】
診断
ｈＣＤ２７．１５ベースの結合化合物は、たとえば、特異的細胞、組織上の、または血清中のＣＤ２７の発現を検出するために、診断アッセイにおいても有用なことがある。診断適用例には、ｈＣＤ２７．１５ベースの結合化合物は、典型的に、検出可能な部分で（直接にまたは間接的に）標識付けされる。ビオチン、蛍光色素、ラジオヌクレオチド、酵素、ヨウ素、および生合成標識というカテゴリに一般的にグループ分け可能な数多くの標識を利用可能である。
【００４７】
ある範囲の異なる患者の血清および他の体液中に存在する可溶ＣＤ２７は、患者の疾患の重さと相関することが示されている。たとえば、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、および非ホジキンリンパ腫に罹患した患者は、可溶ＣＤ２７の増加した血清レベルを実証した。ｈＣＤ２７．１５の実証された結合特性に基づくと、ｈＣＤ２７．１５ベースの結合化合物を体液中の可溶ＣＤ２７を検出する診断ツールとして用いることができる。
【００４８】
本発明のｈＣＤ２７．１５ベースの結合化合物を、競合結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイなどの任意の公知のアッセイ法で用いてもよい。Zola, Monoclonal Antibodies. A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。
【００４９】
ｈＣＤ２７．１５ベースの結合化合物をインビボ診断アッセイにも用いてもよい。一般的に、結合化合物は放射性核種で標識付けられるので、抗原またはそれを発現する細胞は、免疫シンチグラフィまたは陽電子放射断層撮影法を用いて局所化することができる。
【００５０】
非療法的使用
発明の別の局面に従うと、結合化合物は他の非療法的使用を有する。ｈＣＤ２７．１５ベースのこれらの結合化合物の非療法的使用は、フローサイトメトリ、ウェスタンブロット法、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、および免疫組織化学を含む。
【００５１】
この発明のｈＣＤ２７．１５ベースの結合化合物を、たとえば、プロテインＡ－セファロースカラムへの固定を介して親和性精製試薬として用いてもよい。
【００５２】
定義
「抗体」という用語は、その受容体へのリガンドの結合を阻害する、または受容体のリガンド誘導シグナリングを阻害することによってなどして、所望の生物学的活性を呈する

抗体の任意の形態を指す。本件では、生物学的活性はＣＤ２７に対するアゴニスト活性を備える。このように、「抗体」はもっとも広い意味で用いられ、具体的には、（完全長モノクローナル抗体を含む）モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、および多特異的抗体（たとえば二重特異性抗体）をカバーするが、これらに限定されるものではない。

【００５３】

「抗体フラグメント」および「抗体結合フラグメント」は、典型的には親抗体の抗原結合または可変領域の少なくとも一部（たとえば１つ以上のＣＤＲ）を含む抗体の抗原結合フラグメントおよび類似体を意味する。抗体フラグメントは、親抗体の結合特異性の少なくともいくらかを保持する。典型的には、抗体フラグメントは、親結合活性がモル基準で発現される場合、その活性の少なくとも１０％を保持する。好ましくは、抗体フラグメントは、標的に対する親抗体の結合親和性の少なくとも２０％、５０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％以上を保持する。抗体フラグメントの例は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、およびＦｖフラグメント；二重特異性抗体；線状抗体；一本鎖抗体分子、たとえばｓｃ－Ｆｖ、unibodies（Genmabの技術）;nanobodies（Domantisの技術）；ドメイン抗体（Ablynxの技術）;ならびに抗体フラグメントから形成される多特異的抗体を含むが、これらに限定されるものではない。改変された抗体変異体は、Holliger and Hudson, 2005, Nat. Biotechnol. 23:1126-1136で検討される。

【００５４】

「Ｆａｂフラグメント」は、１本の軽鎖と、１本の重鎖のＣＨ１および可変領域とからなる。Ｆａｂ分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。

【００５５】

「Ｆｃ」領域は、抗体のC_H1およびC_H2ドメインを備える２つの重鎖フラグメントを含有する。２つの重鎖フラグメントは、２つ以上のジスルフィド結合によって、およびC_H3ドメインの疎水性相互作用によってともに保持される。

【００５６】

「Ｆａｂ’フラグメント」は、１本の軽鎖と、V_HドメインおよびC_H1ドメインならびにC_H1ドメインとC_H2ドメインとの間の領域も含有する１本の重鎖の部分とを含有し、これにより、２つのＦａｂ’フラグメントの２本の重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合を形成してＦ（ａｂ’）$_2$分子を形成することができる。

【００５７】

「Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント」は、２本の軽鎖と、C_H1ドメインとC_H2ドメインとの間の定常部位の一部を含有する２本の重鎖とを含有し、これにより２本の重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合が形成される。このように、Ｆ（ａｂ’）$_2$ フラグメントは、２本の重鎖の間のジスルフィド結合によってともに保持される２つのＦａｂ’フラグメントからなる。

【００５８】

「Ｆｖ領域」は、重鎖および軽鎖の両者からの可変領域を備えるが、定常部位を欠いている。

【００５９】

「一本鎖Ｆｖ抗体」（または「ｓｃＦｖ抗体」）は、これらのドメインが単一のポリペプチド鎖中に存在する、抗体のV_HおよびV_Lドメインを備える抗体フラグメントを指す。一般的に、Ｆｖポリペプチドは、ｓｃＦｖが抗原結合のための所望の構造を形成できるようにするV_HドメインとV_Lドメインとの間のポリペプチドリンカーをさらに備える。ｓｃＦｖの検討については、Pluckthun, 1994, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315を参照。また、国際特許出願公開番号第ＷＯ８８／０１６４９ならびに米国特許第４，９４６，７７８号および第５，２６０，２０３号も参照。

【００６０】

「二重特異性抗体」は、２つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントである。

フラグメントは、同じポリペプチド鎖（V_H-V_LまたはV_L-V_H）中の軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続される重鎖可変ドメイン（V_H）を備える。同じ鎖上の２つのドメインの間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは別の鎖の相補ドメインと強制的に対合され、２つの抗原結合部位を作り出す。二重特異性抗体は、たとえば、ＥＰ４０４，０９７；ＷＯ９３／１１１６１；およびHolliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448により十分に記載されている。

【００６１】

「ドメイン抗体フラグメント」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントである。いくつかの事例では、２つ以上のV_H領域がペプチドリンカーと共有結合して二価ドメイン抗体フラグメントを作り出す。二価ドメイン抗体フラグメントの２つのV_H領域は同じまたは異なる抗原を標的にしてもよい。

【００６２】

本明細書中で用いられるように、抗体ｈＣＤ２７．１５は、重鎖がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３という可変領域配列を有し、かつＩｇＧ１定常部位に結合され、また軽鎖がＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４という可変領域配列を有し、かつκ定常部位に結合されるマウス抗体である。ｈＣＤ２７．１５抗体を産生するハイブリドーマは、番号ＰＴＡ－１１００８で２０１０年６月２日にＡＴＣＣに寄託された。

【００６３】

発明の抗体フラグメントは、たとえば通常は重鎖間ジスルフィド結合に係るヒンジシステインのうち少なくとも１つが本明細書中に記載のように変更される、ジスルフィド結合能力が低下した重鎖の二量化（または多量化）を許すのに十分な定常部位の部分を備えてもよい。別の実施形態では、抗体フラグメント、たとえばＦｃ領域を備えるものは、ＦｃＲｎ結合、抗体半減期変調、ＡＤＣＣ（抗体依存性細胞傷害）機能、および／または補体結合（たとえば、抗体がＡＤＣＣ機能または補体結合に必要な糖化プロファイルを有する場合）などの、無傷の抗体中に存在する場合は通常Ｆｃ領域と関連付けられる生物学的機能のうち少なくとも１つを保持する。

【００６４】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および／または軽鎖の部分が特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応の配列と同一であるかまたは同種である一方で、鎖の残余が別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応の配列と同一であるかまたは同種である抗体、ならびにそれらが所望の生物学的活性を呈する限りはそのような抗体のフラグメントを指す（たとえば、米国特許第４，８１６，５６７号およびMorrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855を参照）。

【００６５】

本明細書中で用いられるように、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト（たとえばネズミ）抗体およびヒト抗体からの配列を含有する抗体の形態を指す。そのような抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有する。一般的に、ヒト化抗体は、高可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのそれに対応し、かつＦＲ領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のそれに対応する、少なくとも１つおよび典型的には２つの可変ドメインの実質的にすべてを備える。ヒト化抗体は、任意に、免疫グロブリン定常部位（Ｆｃ）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの一部も備える。げっ歯類抗体のヒト化形態は、本質的に、親げっ歯類抗体の同じＣＤＲ配列を備える。もっとも、親和性を増したり、ヒト化抗体の安定性を増したりするために、または他の理由で、あるアミノ酸置換を含んでもよい。しかしながら、ＣＤＲループ交換は、起始抗体と同じ結合性を有する抗体という結果を均一にもたらすわけではないので、フレームワーク残基（ＦＲ）、すなわちＣＤＲループ支持に係る残基の変化もヒト化抗体に導入されて、抗原結合親和性を保全することがある(Kabat et al., 1991, J. Immunol. 147:1709)。

【００６６】
「抗体」という用語は、「完全にヒトの」抗体、すなわちヒト免疫グロブリンタンパク質配列のみを備える抗体も含む。完全にヒトの抗体は、マウス中、マウス細胞中、またはマウス細胞に由来するハイブリドーマ中で産生されればネズミ炭水化物鎖を含有することがある。同様に、「マウス抗体」または「ラット抗体」は、マウスまたはラット免疫グロブリン配列のみをそれぞれ備える抗体を指す。完全にヒトの抗体は、人間の中で、ヒト免疫グロブリン生殖細胞系配列を有する遺伝形質転換動物の中でファージ提示法または他の分子生物学的方法によって生成されてもよい。また、組換免疫グロブリンも遺伝形質転換マウス中で作られてもよい。Mendez et al., 1997, Nature Genetics 15:146-156を参照。Abgenix and Medarex technologiesも参照。

【００６７】
本発明の結合化合物は、変更されたエフェクタ機能を提供するように修飾された（またはブロックされた）Ｆｃ領域を有する抗体も含む。たとえば、米国特許第５，６２４，８２１号；ＷＯ２００３／０８６３１０；ＷＯ２００５／１２０５７１；ＷＯ２００６／００５７７０２；Presta, 2006, Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656を参照。そのような修飾を用いて免疫系のさまざまな反応を向上させるまたは抑制することができ、これには診断および療法における可能な有益な効果が伴う。Ｆｃ領域の変更は、アミノ酸変更（置換、欠失、および挿入）、糖化、または脱グリコシル化、ならびに複数のＦｃの追加を含む。Ｆｃに対する変更は、療法用抗体中の抗体の半減期を変更することもでき、半減期がより長くなる結果、投薬の頻度が少なくなり、付随して利便性が増大し、かつ材料の使用が少なくなる。Presta, 2005, J. Allergy Clin. Immunol. 116: 734-35の731を参照。

【００６８】
本発明の結合化合物は、完全なエフェクタ機能を提供する無傷のＦｃ領域を有する抗体、たとえば標的にされた細胞中で補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）または抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を誘導するアイソタイプＩｇＧ１の抗体も含む。

【００６９】
抗体は、保管の間に抗体の安定性を向上させるまたはインビボで抗体の半減期を長くする分子にコンジュゲート（たとえば共有結合）されてもよい。半減期を長くする分子の例は、アルブミン（たとえばヒト血清アルブミン）およびポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である。抗体のアルブミン結合されたおよびペグ化された誘導体は、当該技術分野で周知の技術を用いて調製可能である。たとえば、Chapman, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 54:531-545; Anderson and Tomasi, 1988, J. Immunol. Methods 109:37-42; Suzuki et al., 1984, Biochim. Biophys. Acta 788:248-255;およびBrekke and Sandlie, 2003, Nature Rev. 2:52-62を参照。

【００７０】
本発明で用いる結合化合物、特に抗体は通常、少なくともＫＤが約10^{-3}M、より通常は少なくとも10^{-6}M、典型的には少なくとも10^{-7}M、より典型的には少なくとも10^{-8}M、好ましくは少なくとも約10^{-9}M、およびより好ましくは少なくとも10^{-10}M、およびもっとも好ましくは少なくとも10^{-11}Mで結合する。たとえば、Presta, et al., 2001, Thromb. Haemost. 85:379-389; Yang, et al., 2001, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 38:17-23; Carnahan, et al., 2003, Clin. Cancer Res. (Suppl.) 9:3982s-3990sを参照。抗体親和性は、標準的分析を用いて定めてもよい。

【００７１】
本明細書中で用いるような「高可変領域」という用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。高可変領域は、たとえば軽鎖可変ドメイン中の残基２４－３４（Ｌ１）、５０－５６（Ｌ２）、および８９－９７（Ｌ３）、ならびに重鎖可変ドメイン中の３１－３５（Ｈ１）、５０－６５（Ｈ２）、および９５－１０２（Ｈ３）などの、配列整列によって規定される、「相補性決定領域」もしくは「ＣＤＲ」からのアミノ酸残基（Kabat et al., 1991, Sequences of proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.を参照）、ならびに／また

は、たとえば軽鎖可変ドメイン中の残基２６－３２（Ｌ１）、５０－５２（Ｌ２）、および９１－９６（Ｌ３）、ならびに重鎖可変ドメイン中の２６－３２（Ｈ１）、５３－５５（Ｈ２）、および９６－１０１（Ｈ３）などの、構造的に規定されるような「高可変ループ」（ＨＶＬ）からの残基（Chothia and Leskl, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917を参照）を備える。「フレームワーク」または「ＦＲ」残基は、本明細書中に定義されるような高可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【００７２】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定されおよび分離されおよび／または回復されたものである。その自然環境の汚染成分は、抗体の診断または療法的使用を妨げるであろう材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質または非タンパク質溶質を含むことがある。いくつかの実施形態では、抗体は、（１）ローリー法で定められるような抗体の９５重量％超まで、およびもっとも好ましくは９９重量％超まで、（２）スピンカップシークエネータの使用によるＮ末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも１５個の残基を得るのに十分な程度に、または（３）クーマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を用いる還元もしくは非還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによる均質性まで、精製される。単離された抗体は、組換細胞内でインサイチューで抗体を含む。というのも、抗体の自然環境の少なくとも１つの成分が存在しないであろうからである。しかしながら、普通は、単離された抗体は、少なくとも１つの精製工程で調製される。

【００７３】

「単離された」核酸分子は、少なくとも１つの汚染核酸分子から同定されかつ分離される核酸分子であり、核酸分子は普通、抗体核酸の自然源においてこれと関連付けられる。単離された核酸分子は、それが自然界で見られる形態または設定以外のものである。したがって、単離された核酸分子は、自然細胞中に存在する状態の核酸分子から区別される。しかしながら、単離された核酸分子は、たとえば、核酸分子が自然細胞とは異なる染色体位置にある抗体を普通は発現する細胞中に含有される核酸分子を含む。

【００７４】

本明細書中で用いるような「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の母集団から得られる抗体を指す。すなわち、少量存在し得る可能な自然発生する突然変異体を除いて、母集団を備える個別の抗体は同一である。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に対して向けられる高度に特異的なものである。さらに、異なる決定因子（エピトープ）に対して向けられる異なる抗体を典型的には含む従来の（ポリクローナル）抗体調製物に対して、各々のモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定因子に向けられる。「モノクローナル」という修飾語は、抗体の特質が抗体の実質的に均質な母集団から得られるものようなものであることを示し、任意の特定的な方法による抗体の産生を要件とするものとして解釈されるべきではない。たとえば、本発明に従って用いるべきモノクローナル抗体は、Kohler et al., 1975, Nature 256:495が最初に記載したようなハイブリドーマ法で作られてもよく、または組換ＤＮＡ法で作られてもよい（たとえば米国特許第４，８１６，５６７号を参照）。「モノクローナル抗体」は、たとえばClackson et al., 1991, Nature 352:624-628およびMarks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離されてもよい。本明細書中のモノクローナル抗体は、具体的には「キメラ」抗体を含む。

【００７５】

本明細書中で用いるような「免疫細胞」という用語は、造血由来であり、かつ免疫応答の役割を果たす細胞を含む。免疫細胞は、Ｂ細胞およびＴ細胞などのリンパ球、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、好塩基球、および顆粒球などの骨髄性細胞を含む。

【００７６】

本明細書中で用いられるように、「免疫抱合体」は、細菌毒素、細胞毒性薬、または放射性毒素などの療法部分にコンジュゲートする抗ＣＤ２７抗体またはそのフラグメントを指す。毒性部分は、当該技術分野で利用可能な方法を用いて発明の抗体にコンジュゲート

可能である。

【００７７】

本明細書中で用いられるように、配列「変異体」は、１つ以上のアミノ酸残基で開示される配列とは異なるが、結果的に生じる分子の生物学的活性を保持する配列を指す。発明は、ｈＣＤ２７．１５ベースの結合化合物の変異体およびｈＣＤ２７．１５の変異体に関する。

【００７８】

「保存的に修飾された変異体」または「保存的アミノ酸置換」は、この技術分野の当業者には公知のアミノ酸の置換を指し、一般的には結果的に生じる分子の生物学的活性を変更することなく作られ得る。この技術分野の当業者は、一般的にポリペプチドの非必須領域中の単一のアミノ酸置換が生物学的活性を実質的に変更しないことを認識している（たとえば、Watson, et al., Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition 1987)を参照）。そのような例示的な置換は、好ましくは、次のように、以下に述べるものに従ってなされる。

【００７９】

【表１】

例示的な保存アミノ酸置換基

元の残基	保存置換基
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

【００８０】

本明細書中で用いられるように、「約」という用語は、値がどのように測定されるかまたは定められるかに部分的に依存する、当業者が定めるような特定の値についての許容可能な誤差範囲内にある値、すなわち測定システムの限界を指す。たとえば、「約」は、当

該技術分野での実践につき１のまたは１を超える標準偏差内を意味する可能性がある。これに代えて、「約」または「本質的に備える」は、２０％までの範囲を意味する可能性がある。さらに、特に生物系または生物学的プロセスについては、該用語は、値の１桁までまたは値の５倍までを意味する可能性がある。特定の値が出願および請求項で与えられ、特に他に述べられなければ、「約」または「本質的に備える」の意味は、その特定の値についての許容可能な誤差範囲内にあると想定されるべきである。

【００８１】

リガンド／受容体、抗体／抗原、または他の結合対を指す際の「特異的に」結合するは、たとえばタンパク質の異種母集団中のＣＤ２７および／または他の生物製剤などのタンパク質の存在を定める結合反応を示す。このように、指定された条件下では、特定されたリガンド／抗原は特定の受容体／抗体に結合し、試料中に存在する他のタンパク質とは有意な量で結合しない。

【００８２】

動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官、または体液に適用されるような「投与」、「療法」、および「治療」は、動物、ヒト、被験体、細胞、組織、器官、または体液に対する外因性の医薬品、療法薬、診断薬、または組成物の接触を指す。「投与」、「療法」、および「治療」は、たとえば、療法的、薬物動態学的、診断的、研究、および実験的方法を指すことができる。細胞の治療は、流体が細胞と接する場合は、細胞に対する試薬の接触と、流体に対する試薬の接触とを包含する。「投与」、「療法」、および「治療」は、試薬、診断、結合組成物による、または別の細胞による、たとえば細胞のインビトロおよびエクスビボ治療も意味する。

【００８３】

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、ヒトＣＤ２７抗原を被験体に注射し、次に所望の配列または機能的特性を有する抗体を発現するハイブリドーマを生成する当該技術分野の知識および技能に従って作ることができる。モノクローナル抗体をエンコードするＤＮＡは、（たとえば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をエン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を用いることによって）容易に単離され、従来の手順で配列される。ハイブリドーマ細胞は、そのようなＤＮＡの好ましい源となる。一旦単離されると、ＤＮＡを発現ベクターの中に置いてもよく、それらを次に、そうしなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトして、組換宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得る。抗体の組換産生を以下により詳細に説明する。

【００８４】

抗体または抗体フラグメントは、McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554に記載の技術を用いて生成された抗体ファージライブラリから単離することができる。Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628およびMarks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597は、ファージライブラリを用いた、ネズミおよびヒト抗体それぞれの単離を記載する。後続の刊行物は、チェーンシャフリングによる高親和性（ｎＭ範囲）ヒト抗体の産生（Marks et al., 1992, Bio/Technology, 10:779-783）、ならびに非常に大きなファージライブラリを構築するための策としての無作為配列感染およびインビボ組換（Waterhouse et al., 1993, Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266）を記載する。このように、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する有望な代替策である。

【００８５】

キメラ抗体

抗体ＤＮＡも、たとえば、同種ネズミ配列の代わりに、ヒト重鎖および軽鎖定常ドメインの代わりにコード配列を用いることによって（米国特許第４，８１６，５６７号；Morrison, et al., 1984, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851）、または非免疫グロブリン

材料（たとえばタンパク質ドメイン）のためのコード配列のすべてもしくは一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することによって、修飾されてもよい。典型的には、そのような非免疫グロブリン材料は、抗体の定常ドメインの代わりに用いられるか、または抗体の１つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに用いられて、抗原に対する特異性を有する１つの抗原結合部位および異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原結合部位を備えるキメラ二価抗体を作り出す。

【００８６】

ヒト化およびヒト抗体

ヒト化抗体は、非ヒトである源からの１つ以上のアミノ酸残基を有する。非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート」残基と称され、典型的には「インポート」可変ドメインから取られる。ヒト化は、Winterおよび共同研究者の方法に一般的に従って、ヒト抗体の対応の配列に代わりにげっ歯類ＣＤＲまたはＣＤＲ配列を用いることによって行なうことができる（Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536）。したがって、そのような「ヒト化」抗体は、実質的に決して無傷ではないヒト可変ドメインが非ヒト種からの対応の配列によって置換されている抗体である。実際、ヒト化抗体は、いくつかのＣＤＲ残基および恐らくはいくつかのＦＲ残基が、非ヒト、たとえばげっ歯類抗体中の類似部位からの残基で置換される典型的にはヒト抗体である。

【００８７】

ヒト化抗体を作るのに用いるべき軽および重の両者のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低下させるのに非常に重要である。いわゆる「最良適合」法に従うと、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列を、分かっているヒト可変ドメイン配列の全ライブラリに対してスクリーニングする。次に、げっ歯類の配列にもっとも近いヒトの配列をヒト化抗体のためのヒトフレームワーク（ＦＲ）として受入れる（Sims et al., 1987, J. Immunol. 151:2296; Chothia et al., 1987, J. Mol. Biol. 196:901）。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定の小群のすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークを用いる。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に用いてもよい（Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285; Presta et al., 1993, J. Immnol. 151:2623）。

【００８８】

抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的性質の保持により抗体がヒト化されることがさらに重要である。この目標を達成するため、好ましい方法に従うと、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いた、親配列およびさまざまな概念上のヒト化産生物の分析のプロセスによって調製される。一般的に三次元免疫グロブリンモデルを利用可能であり、これは当業者に馴染みがある。選択された候補免疫グロブリン配列の考えられる三次元立体配座構造を図示し、表示するコンピュータプログラムを利用可能である。これらの表示を調べると、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の分析、すなわち、その抗原を結合する候補免疫グロブリンの能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このように、ＦＲ残基をレシピエントおよびインポート配列から選択して組合せ、これにより標的抗原に対する増大した親和性などの所望の抗体特性が達成される。一般的に、ＣＤＲ残基は、抗原結合に影響を及ぼすのに直接にかつもっとも実質的に係る。

【００８９】

抗体のヒト化は、単純明快なタンパク質工学の課題である。ほぼすべてのネズミ抗体をＣＤＲグラフティングによってヒト化することができ、その結果、抗原結合が保持される。Lo, Benny, K.C., editor, in Antibody Engineering: Methods and Protocols, volume 248, Humana Press, New Jersey, 2004を参照。

【００９０】

これに代えて、免疫処置されると、内因性免疫グロブリン産生がなくてもヒト抗体の全レパートリを産生することができる遺伝形質転換動物（たとえばマウス）を産生すること

が今や可能である。たとえば、キメラおよび生殖細胞系突然変異マウス中の抗体重鎖結合領域（ＪＨ）遺伝子の同型接合のホモである欠失の結果、内因性抗体産生が完全に阻害されると記載されている。そのような生殖細胞系突然変異マウス中へのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの導入の結果、抗原チャレンジの際にヒト抗体が産生される。たとえば、Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551; Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-258; Bruggermann et al., 1993, Year in Immunology 7:33;およびDuchosal et al., 1992, Nature 355:258を参照。ヒト抗体は、ファージ提示ライブラリに由来する可能性もある（Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., J. Mol. Biol. 1991, 222:581-597; Vaughan et al., 1996, Nature Biotech 14:309）。

【００９１】

ヒト化抗ＣＤ２７抗体のアミノ酸配列変異体は、ヒト化抗ＣＤ２７抗体のＤＮＡに適切なヌクレオチド変更を導入することによって、またはペプチド合成によって調製される。そのような変異体は、たとえば、ヒト化抗ＣＤ２７抗体について示されるアミノ酸配列内の残基からの欠失、および／またはその中への挿入、および／またはその置換を含む。欠失、挿入、および置換の任意の組合せは、最終構築物が所望の特性を有するならば、最終構築物に到達するようになされる。アミノ酸の変化は、糖化部位の数または位置を変更するなど、ヒト化抗ＣＤ２７抗体の翻訳後プロセスも変更することがある。

【００９２】

突然変異誘発に好ましい場所であるヒト化抗ＣＤ２７抗体ポリペプチドのある残基または領域の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085に記載のように、「アラニン系統的変異導入法」と呼ばれる。ここで、残基または標的残基の群が同定され（たとえば、Arg、Asp、His、Lys、およびGluなどの荷電残基）、中性のまたは負に荷電したアミノ酸（もっとも好ましくはアラニンまたはポリアラニン）によって置換えられてＣＤ２７抗原とのアミノ酸の相互作用に影響を及ぼす。置換に対する機能感受性を実証するアミノ酸残基は次に、置換部位に、またはその代わりに、さらなるまたは他の変異体を導入することによって洗練される。このように、アミノ酸配列の変形を導入する部位が予め定められる一方で、突然変異体それ自体の性質を予め定める必要はない。たとえば、所与の部位での突然変異体のはたらきを分析するため、Ala置換またはランダム突然変異誘発が標的コドンまたは領域で行なわれ、発現したヒト化抗ＣＤ２７抗体の変異体が所望の活性についてスクリーニングされる。

【００９３】

普通、ヒト化抗ＣＤ２７抗体のアミノ酸配列変異体は、重鎖または軽鎖のいずれかの元のマウス抗体アミノ酸配列とのアミノ酸配列同一性を少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、およびもっとも好ましくは少なくとも９５％、９８％、または９９％有するアミノ酸配列を有する。この配列に対する同一性または相同性は、本明細書中では、必要に応じて配列を整列し空隙を導入して最大百分率配列同一性を達成した後に、いずれの保存的置換も配列同一性の一部として考慮せずに、ヒト化残基と同一の候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義される。Ｎ末端、Ｃ末端、または内部延長、欠失、または抗体配列への挿入のいずれも、配列同一性または相同性に影響すると解釈されてはならない。２つの配列の間の同一性の百分率は、SeqMan II（DNAstar Inc, version 5.05）などのコンピュータアプリケーションを用いて定めることができる。このプログラムを用いて、２つの配列を、Smith and Waterman (1981)(Journal of Molecular Biology 147: 195-197)の最適整列アルゴリズムを用いて整列させることができる。２つの配列の整列後、２つの配列の間の同一のヌクレオチドの数を、整列された配列の長さからすべての空隙の長さを引いたもので除算することによって、百分率同一性を算出することができる。

【００９４】

ヒト化抗ＣＤ２７抗体中で望ましいとして本明細書中で同定される特性を有する抗体を、増大したインビトロ生物活性または好適な結合親和性についてスクリーニングすること

ができる。ヒトＣＤ２７上のエピトープに結合する抗体についてスクリーニングするため、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載のものなどの慣用クロスブロッキングアッセイを行なうことができる。同じエピトープに結合する抗体は、そのようなアッセイにおいてクロスブロックする可能性があるが、すべてのクロスブロッキング抗体が必ずしも正確に同じエピトープで結合するわけではない。というのも、クロスブロッキングは、重なり合うエピトープでの抗体結合、または近隣の重なり合わないエピトープすらによる抗体結合の立体障害の結果として生じることがあるためである。

【００９５】

これに代えて、抗体が対象のエピトープに結合するか否かを判断するために、たとえばChampe et al., 1995, J. Biol. Chem. 270:1388-1394に記載のようなエピトープマッピングを行なうことができる。Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085に記載のような「アラニン系統的変異導入法」またはヒトＣＤ２７中のアミノ酸残基の点突然変異誘発の何らかの他の形態も用いて、本発明の抗ＣＤ２７抗体の機能的エピトープを判断してもよい。本発明の抗体と同じエピトープに結合する付加的な抗体は、たとえば、エピトープへの結合のためのＣＤ２７に対して挙げられた抗体のスクリーニングによって、またはエピトープ配列を備えるヒトＣＤ２７のフラグメントを備えるペプチドによる動物の免疫処置によって、得られることがある。同じ機能的エピトープに結合する抗体は、ブロッキング受容体結合などの同様の生物学的活性を呈すると予測され得、抗体の機能分析によってそのような活性を確認することができる。

【００９６】

標準的な分析を用いて抗体親和性を定めてもよい。たとえばヒト化抗体などの好ましい結合化合物は、約１×１０$^{-7}$以下；好ましくは約１×１０$^{-8}$以下；より好ましくは約１×１０$^{-9}$以下；およびもっとも好ましくは約１×１０$^{-10}$以下、または１×１０$^{-11}$Ｍすらの Ｋｄ値を有するヒトＣＤ２７を結合するものである。

【００９７】

ヒト化抗体は、ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、およびＩｇＥを含む免疫グロブリンの任意のクラスから選択可能である。好ましくは、抗体はＩｇＧ抗体である。ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４を含むＩｇＧの任意のアイソタイプを用いることができる。ＩｇＧアイソタイプの変異体も企図される。ヒト化抗体は、１つより多くのクラスまたはアイソタイプからの配列を備えてもよい。所望の生物活性を生成する必要な定常ドメイン配列の最適化は、実施例に記載の生物学的アッセイで抗体をスクリーニングすることによって容易に達成される。

【００９８】

同様に、いずれかのクラスの軽鎖を本明細書中の組成物および方法で用いることができる。具体的には、カッパ、ラムダ、またはその変異体が本組成物および方法において有用である。

【００９９】

発明の抗体および抗体フラグメントは、細胞毒性薬などの細胞毒性ペイロード、または^{99}Ｔｃ、^{90}Ｙ、^{111}Ｉｎ、^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、^{131}Ｉ、^{11}Ｃ、^{15}Ｏ、^{13}Ｎ、^{18}Ｆ、^{35}Ｓ、^{51}Ｃｒ、^{57}Ｔｏ、^{226}Ｒａ、^{60}Ｃｏ、^{59}Ｆｅ、^{57}Ｓｅ、^{152}Ｅｕ、^{67}Ｃｕ、^{217}Ｃｉ、^{211}Ａｔ、^{212}Ｐｂ、^{47}Ｓｃ、^{109}Ｐｄ、^{234}Ｔｈ、ならびに^{40}Ｋ、^{157}Ｇｄ、^{55}Ｍｎ、^{52}Ｔｒ、および^{56}Ｆｅなどのラジオヌクレオチドとコンジュゲートされてもよい。そのような抗体コンジュゲートは、その表面上に標的（その抗体の抗原）を発現する細胞を選択的に標的にして殺す免疫療法で用いられてもよい。例示的な細胞毒性薬は、リシン、ビンカアルカロイド、メトトレキサート、シュードモナス、外毒素、サポリン、ジフテリア毒素、シスプラチン、ドキソルビシン、アブリン毒素、ゲロニン、およびヨウシュヤマゴボウ抗ウィルスタンパク質を含む。

【０１００】

発明の抗体および抗体フラグメントは、希土類キレート、フルオレセインおよびその誘

導体、ローダミンおよびその誘導体、イソチオシアナート、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、ｏ－フタルアルデヒド、フルオレスカミン、^{152}Ｅｕ、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェリン、ルミナール標識、イソルミナール標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、イミダゾール標識、アクリジニウム塩（acridimium salt）標識、シュウ酸エステル標識、エクオリン標識、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、ビオチン／アビジン、スピン標識、および安定遊離基などの蛍光体を含む蛍光または化学ルミネセンス標識とコンジュゲートされてもよい。

【０１０１】

Hunter et al., 1962, Nature 144:945; David et al., 1974, Biochemistry 13:1014; Pain et al., 1981, J. Immunol. Meth. 40:219；およびNygren, J., 1982, Histochem. and Cytochem. 30:407に記載の方法を含む、さまざまな部分に発明の抗体分子またはタンパク質分子をコンジュゲートするための当該技術分野で公知の任意の方法を用いてもよい。抗体およびタンパク質をコンジュゲートするための方法は、従来のものであり、かつ当該技術分野で周知である。

【０１０２】

抗体精製

組換技術を用いる際、抗体は、細胞間でペリプラズム間隙で産生可能であるか、または直接に媒質内に分泌可能である。抗体を細胞間で産生する場合、第１の工程として、たとえば遠心分離または限外濾過によって、宿主細胞または溶解されたフラグメントのいずれかである粒子状の残屑を除去する。Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167は、大腸菌のペリプラズム間隙に分泌される抗体を単離するための手順を記載する。概略的には、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム（ｐＨ３．５）、ＥＤＴＡ、およびフッ化フェニルメチルスルホニル（ＰＭＳＦ）の存在下で約３０分に亘って溶かす。遠心分離によって細胞残屑を除去できる。抗体を媒質の中に分泌する場合、一般的に、そのような発現系からの上澄みを、市販のタンパク質濃度フィルタ、たとえば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いてまず濃縮する。ＰＭＳＦなどのプロテアーゼ阻害剤を以上の工程のいずれに含んでタンパク質加水分解を阻害してもよく、偶発的な汚染物の成長を防止するために抗生物質を含んでもよい。

【０１０３】

細胞から調製される抗体組成物は、たとえば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、および親和性クロマトグラフィを用いて精製可能である。なお、親和性クロマトグラフィが好ましい精製技術である。親和性リガンドとしてのプロテインＡの好適性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンＦｃ領域の種およびアイソタイプに依存する。プロテインＡは、ヒトＩｇ．ガンマ１、Ｉｇ．ガンマ２、またはＩｇ．ガンマ４重鎖（Lindmark et al., 1983, J. Immunol. Meth. 62:1-13）ベースの抗体を精製するのに用いることができる。プロテインＧはすべてのマウスアイソタイプおよびヒト．ガンマ．３（Guss et al., 1986, EMBO J 5:1567-1575）に推奨される。親和性リガンドが付くマトリックスはアガロースであることがもっとも多いが、他のマトリックスを利用可能である。

【０１０４】

コントロールドポアガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンなどの機械的に安定したマトリックスは、アガロースで達成できるよりも高い流量および短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを備える場合、Bakerbond ABX（登録商標）樹脂（J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.）が精製に有用である。回収すべき抗体に依存して、イオン交換カラム上の分別、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカ上クロマトグラフィ、ヘパリン上クロマトグラフィ、（ポリアスパラギン酸カラムなどの）アニオンまたはカチオン交換樹脂上SEPHAROSE（登録商標）クロマトグラフィ、クロマト分画、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、および硫酸アンモニウム沈殿などのタンパク質精製のための他の技術も利用可能である。

【０１０５】

１つの実施形態では、レクチン基質（たとえばレクチン親和性カラム）への吸着を用いて糖タンパク質を精製して、フコース含有糖タンパク質を調製物から除去して、これによりフコースを含まない糖タンパク質を富化してもよい。

【０１０６】

製剤処方

発明は、ＣＤ２７結合化合物の製剤処方を備える。医薬または無菌組成物を調製するため、結合化合物、特に抗体またはそのフラグメントは、医薬的に許容される担体または賦形剤と混ぜられる。たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984)を参照。療法薬および診断薬の処方は、たとえば、凍結乾燥粉末、スラリー、水溶液、または懸濁液の形態の生理学的に許容可能な担体、賦形剤、または安定剤と混合することによって調製されてもよい（たとえば、Hardman, et al., 2001, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.), 1993, Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.), 1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.), 1990, Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie, 2000, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY）を参照。

【０１０７】

単独でまたは通常の制がん剤などの別の薬と組合せて投与される結合化合物、特に抗体、組成物の毒性および療法的効能は、たとえばLD_{50}（母集団の５０％にとって致死の用量）およびED_{50}（母集団の５０％において療法的に有効な用量）を判断するための、細胞培養または実験動物における標準的な製薬手順で判断することができる。毒性効果と療法的効果との間の用量比は療法的指標であり、これは、LD_{50}とED_{50}との間の比率として表現することができる。これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータを、ヒトでの使用のための調剤範囲の処方に用いることができる。そのような化合物の調剤は、好ましくは、毒性がほとんどまたはまったくない、ED_{50}を含む血中濃度の範囲内にある。調剤は、用いられる調剤形態および利用される投与経路に依存してこの範囲内で異なってもよい。

【０１０８】

好適な投与経路は、筋肉内、静脈内、または皮下投与などの非経口的投与と、経口投与とを含む。医薬組成物で用いられる、または本発明の方法を実践するための、抗体などの結合化合物の投与は、経口摂食、吸入、局所塗布、または皮膚、皮下、腹腔内、非経口的、動脈内もしくは静脈内注射などのさまざまな従来のやり方で行なうことができる。１つの実施形態では、発明の結合化合物は静脈内投与される。別の実施形態では、発明の結合化合物は皮下投与される。

【０１０９】

これに代えて、たとえば、作用部位への直接の結合化合物の注射を介してなど、しばしばデポーまたは徐放性製剤で、全身というよりもむしろ局所的な態様で結合化合物を投与してもよい。さらに、標的にされた薬剤送達系に抗体を投与してもよい。

【０１１０】

抗体、サイトカイン、および小分子の適切な用量を選択する際の手引を利用可能である（たとえば、Wawrzynczak, 1996, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.), 1991, Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.), 1993, Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, et al., 2003, New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgrom, et al., 1999, New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon, et al., 2001, New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz, et al., 2000, New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh, et al., 2003, New Engl. J. Me

d. 348:24-32; Lipsky, et al., 2000, New Engl. J. Med. 343:1594-1602を参照）。

【０１１１】

適切な用量の判断は、たとえば、治療に影響すると当該技術分野で公知であるもしくは疑われている、または治療に影響すると予測される、パラメータまたは因子を用いて臨床医によってなされる。一般的に、用量は、最適用量よりいくぶん少ない量で始まり、その後、任意の好ましくない副作用に対して所望のまたは最適の効果が達成されるまで小さな増分ずつ増やされる。重要な診断尺度は、たとえば、炎症または産生される炎症性サイトカインのレベルの症状の尺度を含む。

【０１１２】

好ましい用量計画案は、顕著な不所望の副作用を回避する最大用量または用量頻度に係るものである。週単位の用量合計は、一般的に、少なくとも０．０５μｇ／体重ｋｇ、より一般的には少なくとも０．２μｇ／ｋｇ、もっとも一般的には少なくとも０．５μｇ／ｋｇ、典型的には少なくとも１μｇ／ｋｇ、より典型的には少なくとも１０μｇ／ｋｇ、もっとも典型的には少なくとも１００μｇ／ｋｇ、好ましくは少なくとも０．２ｍｇ／ｋｇ、より好ましくは少なくとも１．０ｍｇ／ｋｇ、もっとも好ましくは少なくとも２．０ｍｇ／ｋｇ、最適には少なくとも１０ｍｇ／ｋｇ、より最適には少なくとも２５ｍｇ／ｋｇ、およびもっとも最適には少なくとも５０ｍｇ／ｋｇである（たとえば、Yang, et al., 2003, New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold, et al., 2002, New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liu, et al., 1999, J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji, et al., 2003, Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144を参照）。たとえば、ペプチドミメティック、天然産物、または有機化学物質などの小分子療法の所望の用量は、モル／ｋｇベースの抗体またはポリペプチドについてとほぼ同じである。

【０１１３】

本明細書中で用いられるように、「阻害する」または「治療する」または「治療」は、疾患と関連付けられる症状の進行の遅延および／または当該疾患とともに進行するであろうもしくは進行すると予期されるそのような症状の重さの軽減を含む。該用語はさらに、既存の症状を軽減すること、付加的な症状を予防すること、およびそのような症状の元となる原因を軽減するまたは予防することを含む。このように、該用語は、疾患を有する脊椎被験体に有益な結果が与えられることを示す。

【０１１４】

本明細書中で用いられるように、「療法上有効な量」または「有効な量」という用語は、単独でまたは付加的な療法薬と組合せて細胞、組織、または被験体に投与されると、治療すべき疾患または症状を予防するまたは軽減するのに有効な抗ＣＤ２７抗体またはそのフラグメントの量を指す。療法上有効な用量はさらに、たとえば、関連の病状の治療、治癒、予防、もしくは軽減、またはそのような状態の治療、治癒、予防、もしくは軽減率の上昇などの症状の軽減という結果をもたらすのに十分な化合物のその量を指す。単独で投与される個々の活性成分に適用される場合、療法上有効な用量とはその成分のみを指す。組合せに適用される場合、療法上有効な用量とは、組合せで、連続的に、または同時に投与されても、療法的効果という結果をもたらす活性成分の組合せ量を指す。療法の有効な量は、典型的には少なくとも１０％だけ；通常は少なくとも２０％だけ；好ましくは少なくとも約３０％；より好ましくは少なくとも４０％、およびもっとも好ましくは少なくとも５０％だけ、症状を小さくする。

【０１１５】

第２の療法薬を用いる同時投与または治療のための方法は当該技術分野で周知である。たとえば、Hardman, et al. (eds.), 2001, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (eds.), 2001, Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (eds.), 2001, Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PAを参照。

【０１１６】
発明の医薬組成物は、細胞毒性剤、化学療法剤、細胞増殖抑制剤、抗脈管形成剤、もしくは代謝拮抗剤、腫瘍標的剤、免疫刺激もしくは免疫修飾剤、または細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、もしくはさもなければ毒性剤にコンジュゲートする抗体を含むが、それらに限定されない他の剤も含有してもよい。医薬組成物は、外科手術、化学療法、および放射線療法などの他の療法とともに用いることもできる。
【０１１７】
［図および表の説明］
［図１］　抗ｈＣＤ２７抗体の特徴付け；Ａ．ｐＣＩ－ｎｅｏ－ｈＣＤ２７（ＣＨＯ－Ｋ１.ＣＤ２７）を用いて安定的にトランスフェクトされたＣＨＯ－Ｋ１へのｈＣＤ２７．１５の結合；抗ｈＣＤ２７　５７７０３（R&D systems）および抗ｈＣＤ２７　１Ａ４（Beckman Coulter）は陽性対照である；抗体はＣＨＯ－Ｋ１対照細胞（データ示さず）とは反応しなかった；Ｂ．ｐＣＩ－ｎｅｏ－ｈＣＤ７０（ＣＨＯ－Ｋ１．ＣＤ７０）を用いて安定的にトランスフェクトされたＣＨＯ－Ｋ１細胞への可溶組換ｈＣＤ２７－Ｆｃ融合タンパク質の結合に対するｈＣＤ２７．１５の効果；Ｃ．ＣＨＯ－Ｋ１.ＣＤ２７への組換ｈＣＤ７０－ｍＣＤ８融合タンパク質の結合に対するｈＣＤ２７．１５の効果。
【０１１８】
［図２］　ｈＣＤ２７．１５は、ＮＦ－κＢ活性化につながるＣＤ２７シグナリングを誘導する；ヒト胎児腎臓細胞（ＨＥＫ２９３Ｔ）は、ｈＣＤ２７エンコードベクターまたは対照ベクターでＮＦ－κＢ－ルシフェラーゼレポータ構築物を発現するように過渡的にトランスフェクトされた；細胞は、ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂ（１０μｇ／ｍｌ）の存在または不在下で２０時間刺激された；ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂを用いた刺激は、ルシフェラーゼ活性によって読出されるような特異的ＣＤ２７誘導ＮＦ－κＢ活性化を顕した；（Ａ）ｍＡｂ　ｈＣＤ２７．１５またはアイソタイプ対照ｍＡｂを用いたｈＣＤ２７発現ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の刺激後のルシフェリン生物発光によって読出されるようなルシフェラーゼ活性の絶対値；データは１回の実験（＋ＳＤ）からの３倍の測定値を表わす；有意性は両側スチューデントｔ－検定を用いて測定された；（Ｂ）ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂを用いてｈＣＤ２７または対照ベクターを発現するようにトランスフェクトされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞の刺激後のルシフェラーゼ活性の倍誘導；データは３回の独立した実験から得られた（Ｎ＝３　＋ＳＤ）；（Ｃ）ｈＣＤ２７．１５は他のｈＣＤ２７アゴニストよりも優れている；ＣＤ２７およびＮＦ－κＢ－ルシフェラーゼレポータを発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞は、可溶アゴニスト組換ＣＤ７０タンパク質（Ｆｃ－ｍＣＤ７０、２μｇ／ｍｌ）、ｍＡｂ　ｈＣＤ２７．１５（１０μｇ／ｍｌ）、またはｈＣＤ２７に向けられた他のｍＡｂの等しい濃度で刺激された；ルシフェラーゼ活性は示された時点で読出された；データは１回の実験（＋ＳＤ）からの３倍の測定値を表わす；有意性は両側スチューデントｔ－検定を用いて測定された。
【０１１９】
［図３］　ｈＣＤ２７．１５は増殖を誘導し、および／またはＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｔ細胞の生存を促進する；ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｔ細胞は、ヒトＰＢＭＣからＭＡＣＳ（陰性選択）によって単離され、１×１０^{5}細胞／ウェルの濃度で９６ウェルプレート中で培養された；刺激は図に示すように加えられ、増殖は［^{3}Ｈ］チミジン組入れによって判断された。
【０１２０】
［図４］　ｈＣＤ２７．１５は増殖を誘導し、および／または未感作ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の生存を促進する；未感作ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞はヒトＰＢＭＣから精製され、ＣＦＳＥで標識付けられ、ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂ（１０μｇ／ｍｌ）の存在または不在下で抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８ｍＡｂで６日間刺激された；ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂは、各分裂周期の細胞の百分率によって特徴づけられるような細胞分裂（Ａ）、および各分裂周期の細胞の絶対数によって特徴づけられるような合計生細胞収率（Ｂ）を刺激し；データは４つの健常な個体の細胞を用いた４回の独立した実験から得られた（Ｎ＝４＋／－ＳＥＭ）。
【０１２１】

［図５］　ｈＣＤ２７．１５は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を刺激して特異的なサイトカインを産生する；未感作ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞は図３に示すように単離され、ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂ（１０μｇ／ｍｌ）の存在または不在下で抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８ｍＡｂで刺激された；（Ａ）７２時間の培養後、細胞の上澄みを採取し、Luminex assayを用いてサイトカインを測定した；（Ｂ）細胞数は、７２時間の培養後に著しく異なることはなく、このことは、あるサイトカインの分泌の定性的な差を示す；（Ａ，Ｂ）データは３つの健常な個体の細胞を用いた３回の独立した実験から得られた（Ｎ＝３＋／－ＳＥＭ）。

【０１２２】

［図６］　ｈＣＤ２７．１５の可変領域配列を示す；パネルＡおよびＢは、ｈＣＤ２７．１５の重鎖および軽鎖可変配列のアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【０１２３】

[表１]　ｈＣＤ２７．１５および１Ａ４ＣＤ２７（対照）のＫＤ、EC_{50}、およびIC_{50}値の概略。

【０１２４】

[表２]　市販のアゴニスト抗ＣＤ２７抗体。

[表３]　Biacoreを用いて（アゴニスト抗体１Ａ４および９Ｆ４を含む）異なる抗ｈＣＤ２７抗体およびＦｃ－ｍＣＤ７０の結合部位を判断する交差競合アッセイ。まず、異なる抗ｈＣＤ２７抗体をＣＭ５チップ上に固定し（「固定」と称する）、ｒｈＣＤ２７－Ｆｃキメラ結合（R&D systems, cat. no. 382-CD）の結合の後、第２の抗体を注射した（「遊離」と称する）。このチェッカーボード分析に基づき、抗体を７つの（Ａ－Ｇ）エピトープ群に分割した。「＋」は同時結合を示す一方で、「－」は第２の抗体の結合が第１の抗体による捕捉後は不可能であることを示した。ｎｄは判定されずを示す。

【０１２５】

[表４]　この発明のネズミ抗ヒトｈＣＤ２７．１５抗体の配列ＩＤ番号。

【実施例】

【０１２６】

実施例１

免疫処置および抗ＣＤ２７抗体の選択

ＣＤ２７ｃＤＮＡを用いたマウスの免疫処置

アゴニスト活性を隠し持っているヒトＣＤ２７タンパク質に対する抗体を単離するため、リガンド結合部位に結合する抗ＣＤ２７抗体の組のうちのそのような抗体を見出すと仮説を立てた。抗ｈＣＤ２７抗体を生成するため、ｈＣＤ２７の完全長の開いた読み枠をエンコードするｃＤＮＡをｐＣＩ－ｎｅｏベクター（Promega, Madison, WI）にサブクローン化した。得られたベクターの発現は、ＣＨＯ－Ｋ１細胞（American Type Culture Collection, Manassas, VA）中へのｐＣＩ－ｎｅｏ－ｈＣＤ２７の過渡的なトランスフェクションと、１０μｇ／ｍｌのマウス抗ｈＣＤ２７　ＩｇＧ１（BD Pharmingen #555439）およびその後のヤギ抗マウスＩｇＧ１－ＦＩＴＣ（１：１００）（Southern Biotechnology, Birmingham, AL）を用いたフローサイトメトリとによって確認された。

【０１２７】

製造者の指示に従ってHelios遺伝子銃（BioRad, Hercules, CA）およびDNA coated gold bullets（BioRad）を用いた遺伝子銃免疫処置によってマウスを免疫した。概略的には、１μｍの金粒子を、２：１：１の比率で、ｐＣＩ－ｎｅｏ－ｈＣＤ２７　ｃＤＮＡ、ならびにマウスＦｌｔ３ＬおよびマウスＧＭ－ＣＳＦのための市販の発現ベクター（両者ともAldevron, Fargo, NDから）で被覆した。合計１μｇのプラスミドＤＮＡを用いて５００μｇの金粒子を被覆した。

【０１２８】

具体的に、７－８週齢のメスのＢＡＬＢ／Ｃマウスを遺伝子銃で耳に免疫し、両耳に１発を３周期受けた。２つのＤＮＡ免疫処置後のマウス血清中の細胞－ＥＬＩＳＡによって約１：４，０００の抗ｈＣＤ２７タイターを検出した。細胞－ＥＬＩＳＡでは、すべてのインキュベーション工程の後にＰＢＳＴ（０．０１％のTween 20を含むＰＢＳ）での洗浄

工程を行なった。組織培養プレートに親ＣＨＯ－Ｋ１またはＣＨＯ－Ｋ１.ｈＣＤ２７細胞を接種し（４０，０００細胞／ウェル）、３７℃で一晩インキュベートした。翌日、培地を除去し、細胞をマウス血清（の希釈液）で３７℃で１時間インキュベートした。次に、ＰＢＳＴで細胞を洗浄し、１：１，０００のヤギ抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰ（Southern Biotechnology, #1030-05）で３７℃で１時間インキュベートした。

【０１２９】

その後、ＰＢＳＴで細胞を６回洗浄し、１００μｌのOptiEIA　ＴＭＢ基質（BD Biosciences, Franklin Lake, NJ）で抗ｈＣＤ２７免疫活性を視覚化した。１００μｌの０．５ＭのH_2SO_4で反応を止め、４６０および６２０ｎｍで吸光度を読取った。ｈＣＤ２７に対する反応性を実証したマウスに、最終の４回目の免疫をし、４日後に殺処分した。

【０１３０】

赤血球欠損脾臓細胞母集団を前述のように調製し（Steenbakkers et al., 1992, J. Immunol. Meth. 152: 69-77; Steenbakkers et al., 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134）、－１４０℃で凍結した。

【０１３１】

Ｂ細胞を産生する抗ｈＣＤ２７抗体の選択

抗ｈＣＤ２７抗体を産生するＢ細胞クローンを選択するため、１．５×10^7個の赤血球欠損脾細胞をモノサイトの代わりに欠損させた。Ｔ２５－フラスコ中の密集度まで成長した、照射された（３，０００ＲＡＤ）ＣＨＯ－Ｋ１.ｈＣＤ２７遺伝形質転換体への結合によってｈＣＤ２７特異性Ｂ細胞を選択した。非特異的Ｂ細胞を欠損させるための広範な洗浄の後、製造者の指示に従うトリプシン処理によって、結合したＢ細胞を集めた（Invitrogen, cat. no. 25200-056）。次に、Steenbakkers et al., 1994, Mol. Biol. Rep. 19: 125-134に記載のようにＢ細胞を培養した。概略的に、選択されたＢ細胞を、７．５％（ｖ／ｖ）Ｔ細胞上澄み、および９６ウェル平底組織培養プレート中２００μｌのＤＭＥＭ　Ｆ１２／Ｐ／Ｓ／１０％ＢＣＳの最終容積中で、５０，０００個の照射された（２，５００ＲＡＤ）ＥＬ－４　Ｂ５栄養細胞と混合した。

【０１３２】

８日目に、上述のような細胞－ＥＬＩＳＡによってｈＣＤ２７反応性について上澄みをスクリーニングした。１３のｈＣＤ２７－反応性上澄みを同定し、ｈＣＤ２７とｈＣＤ７０との間の相互作用を抑制するそれらの能力について試験した。細胞－ＥＬＩＳＡでは、すべてのインキュベーション工程の後にＰＢＳＴ（０．０１％のTween 20を含むＰＢＳ）を用いた洗浄工程を行なった。親ＣＨＯ－Ｋ１またはＣＨＯ－Ｋ１.ｈＣＤ２７細胞を組織培養プレートに接種し（４０，０００細胞／ウェル）、３７℃で一晩インキュベートした。翌日、培地を除去し、細胞をマウス血清（の希釈液）で３７℃で１時間インキュベートした。次に、ＰＢＳＴで細胞を洗浄し、１：１，０００のヤギ抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰ（Southern Biotechnology, #1030-05）で３７℃で１時間インキュベートした。その後、ＰＢＳＴで６回細胞を洗浄し、１００μｌのＴＭＢ Stabilized Chromagen（Invitrogen, cat. no. SB02）で抗ｈＣＤ２７免疫反応性を視覚化した。１００μｌの０．５ＭのＨ２ＳＯ４で反応を止め、４６０および６２０ｎｍで吸光度を読取った。

【０１３３】

さらに、２つの競合アッセイを用いて上澄みのブロッキング性を研究した。ＣＨＯ－Ｋ１.ＣＤ２７アッセイは以下の原則に従って働く：ＣＨＯ－Ｋ１.ＣＤ２７細胞を９６ウェルプレートに接種し（４０，０００細胞／ウェル）、３７℃で一晩インキュベートした。媒質除去の後、５０μｌの組換ｈＣＤ７０（ＣＤ７０（ｈ）－ｍｕＣＤ８融合タンパク質（Ancell, cat. no. ANC-537)）（０．５μｇ／ｍｌ）および５０μｌの抗ｈＣＤ２７抗体含有上澄みを加えた。室温での１時間のインキュベーションの後、ＰＢＳＴでウェルを３回洗浄した。次に、１００μｌ／ウェルのストレプトアビジン－ＨＲＰコンジュゲート（BD Pharmingen, cat. no. 554066）（１：５，０００）を加え、３７℃で１時間細胞をインキュベートした。６回のＰＢＳＴでの最終洗浄の後、以上で概要を述べたようにＥＬＩＳＡを展開した。陽性対照：抗ｈＣＤ２７、クローン５７７０３（R&D systems, cat.

no. MAB382）、および抗ｈＣＤ２７、クローン１Ａ４（Beckman Coulter, cat. no. IM2034）。ＣＨＯ－Ｋ１．ＣＤ７０アッセイは以下の原則に従って働く：ＣＨＯ－Ｋ１．ＣＤ７０細胞を４０，０００細胞／ウェルの密度で９６ウェルプレートに接種した。３００μｌの媒質／ウェルを加えることによって同じ量のプレートをブロックし、すべてのプレートを３７℃で一晩インキュベートした。翌日、プレートをさっとはたくことによって、媒質のみを含有するプレートを空にし、５０μｌ／ウェルの組換可溶ｈＣＤ２７－Ｆｃ融合タンパク質（ｒｈＣＤ２７／Ｆｃキメラ（０．５μｇ／ｍｌ）（R&D systems cat. no. 382-CD））を加えた。これらのプレートに５０μｌの抗体含有媒質／血清または媒質を加えた。１時間の室温でのインキュベーションの後、１００μｌのｒｈＣＤ２７－Ｆｃ／抗体混合物を、媒質除去済みのＣＨＯ－Ｋ１／ＣＤ７０プレートに移した。これらのプレートを室温で１時間インキュベートし、次にＰＢＳＴで３回洗浄した。１００μｌの抗ヒトＩｇ（Ｈ＋Ｌ）－ＨＲＰコンジュゲート（１：２，５００）をすべてのウェルに加え（Promega, cat. no. W4031）、細胞を３７ＩＣで１時間インキュベートした。６回のＰＢＳＴでの最終洗浄の後、以上で概要を述べたようにＥＬＩＳＡを展開した。

【０１３４】

陽性対照：抗ｈＣＤ２７、クローン５７７０３（R&D systems, cat. no. MAB382）、および抗ｈＣＤ２７、クローン１Ａ４（Beckman Coulter, cat. no. IM2034）。

【０１３５】

すべての上澄みは、ｈＣＤ２７とｈＣＤ７０との間の相互作用をブロックした抗体を含有することを実証した。その後、公開された手順に従って、ｈＣＤ２７反応性上澄みからのＢ細胞クローンを小規模電気融合によって固定した（Steenbakkers et al., 1992, J. Immunol. Meth. 152: 69-77; Steenbakkers et al., 1994, Mol. Biol. Rep. 19:125-34）。具体的に、Ｂ細胞を10^6個のＳｐ２／０－Ａｇ１４骨髄腫細胞と混合し、ＤＭＥＭＦ１２媒質で洗浄することによって血清を除去した。プロナーゼ溶液（Calbiochem, cat. no. 4308070.536）で３分間細胞を処理し、Electrofusion Isomolarバッファ（Eppendorf, cat. no. 53702）で洗浄した。３０ｓ、２ＭＨｚ、４００Ｖ／ｃｍの交番電界によって５０μｌの融合チャンバ中で電気融合を行ない、その後に１０μｓ、３ｋＶ／ｃｍの方形高電界パルスと、再び３０ｓ、２ＭＨｚ、４００Ｖ／ｃｍの交番電界とを与えた。

【０１３６】

チャンバの中身をハイブリドーマ選択的媒質に移し、限定的な希釈条件下で９６ウェルプレートで培養基培養した。融合に続く１２日目に、上述のようなｈＣＤ２７反応性およびｈＣＤ７０ブロッキング活性についてハイブリドーマ上澄みをスクリーニングした。ｈＣＤ２７を認識し、ブロッキング活性を実証した上澄み中の抗体を分泌する７つのハイブリドーマを単離し、それらの完全性を保護するために限定された希釈によってサブクローン化した。より一層の分析のために抗体ｈＣＤ２７．１５を選択した。

【０１３７】

実施例２

抗ｈＣＤ２７抗体の精製および特徴付け

ハイブリドーマを産生する抗ｈＣＤ２７の安定化および抗ｈＣＤ２７抗体の精製

２周の限定的な希釈により、ｈＣＤ２７．１５ハイブリドーマについてクローン細胞母集団を得た。安定したハイブリドーマを、血清を含まない媒質中で７－１０日間培養した；上澄みを採取し、０．２２μＭのニトロセルロース膜を通して濾過した。製造者の指示に従ってProsep Aスピンカラム（Millipore, cat. no. LSK2ABA60）を用いて抗体を精製した。ＰＤ－１０ゲル濾過カラム（GE Healthcare）を用いてバッファをＰＢＳと交換した。Amicon Ultra-15遠心分離フィルタユニット（Millipore, Billerica, MA）を用いて抗体を濃縮し、分光測定法を用いて定量化した。マウスモノクローナル抗体アイソタイピングテストキット（Roche, #11493027001）を用いて、すべてのｈＣＤ２７抗体の（サブ）－アイソタイプがＩｇＧ１、カッパであると判定した。

【０１３８】

結合分析

精製されたｈＣＤ２７抗体を用いる細胞ベースのＥＬＩＳＡ実験を行なって、細胞的に発現されたｈＣＤ２７へのｈＣＤ２７の結合活性を判断した。この細胞－ＥＬＩＳＡでは、すべてのインキュベーション工程の後にＰＢＳＴ（０．０１％のTween 20を含むＰＢＳ）での洗浄工程を行なった。組織培養プレートにＣＨＯ－Ｋ１.ｈＣＤ２７細胞を接種し（４０，０００細胞／ウェル）、３７℃で一晩インキュベートした。次の日、培地を除去し、精製された抗体（の希釈液）で細胞を３７℃で１時間インキュベートした。次に、ＰＢＳＴで細胞を洗浄し、１：１，０００のヤギ抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰ（Southern Biotechnology, #1030-05）で３７℃で１時間インキュベートした。その後、ＰＢＳＴで細胞を６回洗浄し、１００μｌのＴＭＢ Stabilized Chromagen（Invitrogen, cat. no. SB02）で抗ｈＣＤ２７免疫反応性を視覚化した。１００μｌの０．５ＭのH_2SO_4で反応を止め、４６０および６２０ｎｍで吸光度を読取った。図１Ａに示すように、異なるｈＣＤ２７抗体（ｈＣＤ２７．１５および対照）は、異なる結合強さでｈＣＤ２７に結合した。合計結合シグナルの５０％が観察される濃度を表わす、算出したEC_{50}を表１に表す。

【０１３９】

【表２】

表１

	KD x 1E-9 (M)	EC_{50} (ng/ml)	IC_{50} (ng/ml) CHO-K1.CD27	IC_{50} (ng/ml) CHO-K1.CD70
hCD27.15	122	686.5	864	1546
1A4CD27		33	93.7	370

【０１４０】

精製された抗体のブロッキング性を、２つの競合アッセイを用いて研究した。ＣＨＯ－Ｋ１.ＣＤ７０アッセイは以下の原則に従って働く：ＣＨＯ－Ｋ１．ＣＤ７０細胞を４０，０００細胞／ウェルの密度で９６ウェルプレートに接種した。３００μｌの媒質／ウェルを加えることによって同じ量のプレートをブロックし、すべてのプレートを３７℃で一晩インキュベートした。翌日、プレートをさっとはたくことによって、媒質のみを含有するプレートを空にし、５０μｌ／ウェルのｒｈＣＤ２７－Ｆｃキメラ（０．５μｇ／ｍｌ）（R&D systems cat. no. 382-CD）を加えた。これらのプレートに、精製されたｈＣＤ２７．１５抗体の５０μｌの異なる希釈液を加えた。１時間の室温でのインキュベーションの後、１００μｌのｒｈＣＤ２７Ｆｃ／抗体混合物を媒質除去済みのＣＨＯ－Ｋ１／ＣＤ７０プレートに移した。これらのプレートを室温で１時間インキュベートし、ＰＢＳＴで３回洗浄した。１００μｌの抗ヒトＩｇ（Ｈ＋Ｌ）－ＨＲＰコンジュゲート（１：２，５００）をすべてのウェルに加え（Promega, cat. no. W4031）、プレートを３７℃で１時間インキュベートした。６回のＰＢＳＴでの最終洗浄の後、ＴＭＢ Stabilized Chromagen（Invitrogen, cat. no. SB02）（１００μｌ／ウェル）を加え、以上で概要を述べたようにＥＬＩＳＡを読出した。陽性対照：抗ｈＣＤ２７、クローン５７７０３（R&D systems, cat. no. MAB382）、および抗ｈＣＤ２７、クローン１Ａ４（Beckman Coulter, cat. no. IM2034）。図１Ｂに示すように、精製されたｈＣＤ２７．１５抗体は、ＣＨＯ－Ｋ１．ＣＤ７０細胞へのｒｈＣＤ２７Ｆｃキメラの結合をブロックした。抑制の半分が観察される濃度を表わす、ｈＣＤ２７．１５および陽性対照１Ａ４の算出したIC_{50}値を表１に提示する。

【０１４１】

ＣＨＯ－Ｋ１.ＣＤ２７アッセイは以下の原則に従って働く：ＣＨＯ－Ｋ１.ＣＤ２７細胞を９６ウェルプレートに接種し（４０，０００細胞／ウェル）、３７℃で一晩インキュベートした。媒質除去の後、５０μｌの組換マウスＣＤ７０融合タンパク質（Ｆｃ－ｍＣＤ７０）（０．５μｇ／ｍｌ）および精製された抗ｈＣＤ２７抗体の５０μｌの異なる希釈液を加えた。Ｆｃ－ｍＣＤ７０は、ヒトＩｇＧ１の二量化ドメインのＣ末端で融合されるネズミＣＤ７０（aa 41-195）融合タンパク質である。この融合タンパク質をエンコー

ドするｃＤＮＡ構築物は、Rowley and Al-Shamkhani, 2004, J Immunol 15:172: 6039-46が記載するように構築され、２９３Ｔヒト胎児腎臓細胞中でＦｃ－ｍＣＤ７０タンパク質を産生するのにこれを用いた。タンパク質は、プロテインＡ Sepharose（GE Health Care）に対する親和性クロマトグラフィによって精製された。

【０１４２】

室温での１時間のインキュベーションの後、ＰＢＳＴで３回ウェルを洗浄した。次に、１００μｌ／ウェルのストレプトアビジン－ＨＲＰコンジュゲート（BD Pharmingen, cat. no. 554066）（１：５，０００）を加え、細胞を３７℃で１時間インキュベートした。６回のＰＢＳＴでの最終洗浄の後、ＴＭＢ Stabilized Chromagen（Invitrogen, cat. no. SB02）（１００μｌ／ウェル）を加えた。１００μｌの０．５ＭのH_2SO_4の添加で反応を止めた。４６０および６２０ｎｍで吸光度を読取った。陽性対照：抗ｈＣＤ２７、クローン５７７０３（R&D systems, cat. no. MAB382）、および抗ｈＣＤ２７、クローン１Ａ４（Beckman Coulter, cat. no. IM2034）。図１Ｃに示すように、ｈＣＤ２７．１５抗体は、組換ヒトＣＤ７０とＣＨＯ－Ｋ１.ＣＤ２７細胞との間の相互作用をブロックした。算出したIC_{50}値を表１に提示する。

【０１４３】

標識なし表面プラズマ共鳴（Biacore）による速度論的分析

ｈＣＤ２７．１５抗体の結合性を、Biacore 2000 equipmentを用いる標識なし表面プラズマ共鳴を用いてより詳細に特徴付けた。ｐＨ＝４．５でのアミン結合を用いてＣＭ５センサチップに少量の抗体を結合し、ここでR_{max}は１００ＲＵを超えない。これは、高いフローレベル（３０μｌ／分）と組合せると、１：１ラングミュア結合モデルに対する良好な適合を生じるであろう。０．０１６ｎＭから１ｎＭの範囲に亘るｒｈＣＤ２７Ｆｃキメラの濃度系列を３０μｌ／分で１分間注射した。解離を５分間モニタした。ランニングバッファは、３ｍＭのＥＤＴＡおよび０．００５％のＰ２０（ＨＰＢ－ＥＰ）、ｐＨ７．４を含むＨＥＰＥＳバッファサリンである。組合せプロットは、BIAeval 3.2を用いて、ブランクフロー細胞で得られるシグナルの減算によってなされた。１：１ラングミュア結合モデルにセンサグラムをフィッティングした。抗体ｈＣＤ２７．１５は速い会合および解離を示し、その結果、程よい親和性が得られた。算出したK_D値を表１に提示する。

【０１４４】

種交差反応性

ヒトＣＤ２７またはマウスＣＤ２７をエンコードする完全長ｃＤＮＡを安定して発現するようにレトロウィルス的に形質導入されたＭＣＦ－７乳がん細胞を用いて、マウスＣＤ２７へのｈＣＤ２７抗体の結合を判断した。空のベクター－形質導入細胞が対照となった。抗体の結合は、有効化されたアゴニスト抗ｈＣＤ２７抗体１Ａ４およびＣＬＢ　ＣＤ２７／１;ならびに陽性対照としての抗マウスＣＤ２７　ＬＧ．３Ａ１０（Gravestein et al., 1995, Int Immunol. 7： 551-7）を用いたフローサイトメトリ分析によって試験した。アゴニスト活性を隠し持っていると報告されているこれらの市販の抗ｈＣＤ２７抗体を、表２に記載のように得た。

【０１４５】

【表３】

表2

抗体	社名	カテゴリ番号
9F4 (CLB-CD27/1)	Pelicluster	M1455
1A4	Beckman Coulter	IM2034

【０１４６】

ｈＣＤ２７．１５抗体はヒトＣＤ２７に結合したが、ＭＣＦ－７細胞上に発現されるマ

ウスＣＤ２７には結合しなかった。

【０１４７】

ｈＣＤ２７．１５抗体の結合部位を、交差競合Biacoreアッセイを用いて特徴付け、かつ市販のアゴニスト抗体９Ｆ４および１Ａ４と比較した。ｐＨ４．５での一般的なアミン結合を用いて、フロー細胞を、２５μｇ／ｍｌの各々の抗体に高固定レベルに固定した。次に、５μｌ／分の速度での１ｎＭのｒｈＣＤ２７Ｆｃキメラ（R&D systems, cat. no. 382-CD）の複数回のフロー細胞注射の後に、１０ｎＭの第２の抗体を注射した。発明の抗ｈＣＤ２７抗体ｈＣＤ２７．１５および２つの公知のアゴニスト抗体（１Ａ４および９Ｆ４）を一次（固定）または二次（遊離）抗体として用いた。バッファ中のＢＳＡの存在のために、アゴニスト抗ＣＤ２７抗体１Ａ４を第２の抗体としてのみ用い、固定しなかった。Ｆｃ－ｍＣＤ７０は、ヒトＩｇＧ１の二量化ドメインのＣ末端で融合されるネズミＣＤ７０（aa 41-195）の融合タンパク質である。この融合タンパク質をエンコードするｃＤＮＡ構築物は、Rowley and Al-Shamkhani, 2004, J Immunol 15:172: 6039-46が記載するように構築され、２９３Ｔヒト胎児腎臓細胞中でＦｃ－ｍＣＤ７０タンパク質を産生するようにこれを用いた。タンパク質は、プロテインＡ Sepharose（GE Health Care）に対する親和性クロマトグラフィによって精製された。

【０１４８】

すべてのフロー細胞を、５０μｌ／分で１０ｍＭのＨＣｌの６秒注射によって再生成した。第２の抗体の注射によるシグナルの増大は、第２の抗体が依然として結合可能であり、かつ一次および二次が異なる結合部位に結合することを意味する。そうでない場合は、そのことは、両方の抗体がｈＣＤ２７の同じエピトープを認識し、重なり合うエピトープを有するか、または立体障害のために同時に結合できないことを示唆する。表３に示するように、ｈＣＤ２７．１５および対照抗体を異なる結合群に分割可能である。

【０１４９】

【表４】

表3

固定 遊離	hCD27.15	9F4	1A4	Fc-mCD70
hCD27.15		-	-	-
9F4	-		+	-
1A4	n.d.	n.d.		n.d.
Fc-mCD70	+	+	-	

【０１５０】

実施例３

マウス抗ヒトＣＤ２７抗体の機能プロファイリング

ｈＣＤ２７．１５はＮＦ－κＢ活性化につながるＣＤ２７シグナリングを誘導する

完全長ヒトＣＤ２７ｃＤＮＡをｐｃＤＮＡ３発現ベクターにクローン化し、ＦｕＧＥＮＥ６トランスフェクション試薬（Roche）を用いて、ＨＥＫ２９３Ｔヒト胎児腎臓細胞（ＨＥＫ２９３Ｔ）へのトランスフェクションによって過渡的に発現させた。この構築物からのＣＤ２７発現をフローサイトメトリによって有効化した。ｈＣＤ２７．１５ｍＡｂの結合に応答するｈＣＤ２７シグナリングを読出すため、ＨＥＫ２９３細胞を、ｈＣＤ２７ｐｃＤＮＡベクターまたは空の対照ベクター、および最小限のＮＦ－κＢ－応答プロモータ（Bonehill et al., 2008, Mol Ther 16(6): 1170-80）によって駆動されるルシフェラーゼ遺伝子をエンコードするＮＦ－κＢ－ルシフェラーゼレポータ構築物とともに、過渡的に同時トランスフェクションした。トランスフェクションの２０時間後、ｈＣＤ２７

．１５ｍＡｂ（１０μｇ／ｍｌ）、（表２に記載の１０μｇ／ｍｌの）他のＣＤ２７抗体、またはＦｃＣＤ７０（２μｇ／ｍｌ）の存在または不在下で、４、８、２０、または２４時間細胞を刺激した。刺激の後、氷のように冷たいＰＢＳで細胞を洗浄し、Cell Culture Lysisバッファ（Promega, Luciferase assay system, catalog number E1500）で溶解した。製造者の計画案に従って基質を細胞溶解物に加えた後にルシフェラーゼ活性を測定した（Luminometer Centro XS3 LB 960, Berthold Technologies）。Mikrowin 2000ソフトウェアを用いてデータを分析した。図２は、ｈＣＤ２７．１５が他のｈＣＤ２７抗体およびＦｃＣＤ７０よりも強力にＣＤ２７を活性化することを図示する。

【０１５１】

ｈＣＤ２７．１５は、ヒトＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｔ細胞を同時刺激する

未感作ヒトＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｔ細胞に対する、ｈＣＤ２７．１５抗体を用いたＣＤ２７活性化の効果を、以下のように判定した。製造者の指示に従ってFicoll勾配遠心分離（Ficoll-Paque（登録商標）Plus cat. Number 17-1440-03）を用いてBuffy coatからＰＢＭＣを単離した。製造者の指示に従ってＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞単離キットII（Miltenyi cat. No 130-091-155）およびＣＤ２５マイクロビーズII（Miltenyi cat. No 130-092-983）を用いたＭＡＣＳベースの陰性選択により、手つかずのＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$Ｔ細胞をこれらのＰＢＭＣから単離した。精製されたＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$細胞を１×１０^{5}細胞／ウェルの濃度で９６ウェルプレートに接種した。培養の前に、フローサイトメトリによってＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$細胞を純度についてチェックした。図３について示すような、抗ＣＤ３（ＯＫＴ－３）、抗ＣＤ２８（１μｇ／ｍｌ:clone 15E8, Sanquin）、Ｆｃ－ＣＤ７０（２μｇ／ｍｌ）、アイソタイプ対照（ＭＯＰＣ－２１、１０μｇ／ｍｌ）、およびｈＣＤ２７．１５（１０μｇ／ｍｌ）の異なる組合せで、細胞をインキュベートした。次の日、［^{3}Ｈ］チミジン組入れによって増殖を検出した。ｈＣＤ２７．１５は、最適以下の刺激条件下でヒトＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{-}$細胞の増殖を刺激した。

【０１５２】

ｈＣＤ２７．１５は、ヒトＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を同時刺激する

未感作ヒトＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に対する、ｈＣＤ２７．１５抗体によるＣＤ２７活性化の効果を以下のように調査した。Ficoll勾配遠心分離を用いてbuffy coatからＰＢＭＣを単離した。製造者の指示に従ってBD IMag（登録商標）ヒト未感作ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞富化キット（BD cat number 558569）を用いたＭＡＣＳベースの陰性選択によって、手つかずのＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞をこれらのＰＢＭＣから単離した。抗ＣＤ８および抗ＣＤ４５ＲＡ抗体を用いたフローサイトメトリによって、選択されたＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を純度および未感作性についてチェックし、製造者の計画案に従って（Invitrogen）、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（ＣＦＳＥ、５μｍ）で標識付けた。次に、それらを１．０×１０^{5}細胞／ウェルの濃度で９６ウェルプレートに接種した。１０μｇ／ｍｌのｈＣＤ２７．１５またはアイソタイプ対照の存在下で、１０μｇ／ｍｌの可溶抗ＣＤ３　ｍＡｂ　ＣＬＢ－Ｔ３／４Ｅ（Pelicluster）（ハイブリドーマ培養のｓ／ｎを用いた）、０．０２μｇ／ｍｌの抗ＣＤ２８　ｍＡｂ　ＣＬＢ－ＣＤ２８／１（Pelicluster）で細胞を刺激した。

【０１５３】

示した日数の培養後、CASY細胞カウンタ（Scharfe System GmbH）を用いて細胞を計数し、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）を用いることによって生存度を判断し、Ｔ細胞が経た細胞分裂の数をＣＦＳＥ蛍光強度のフローサイトメトリ分析（FACS Calibur）によって評価した。図４は、ｈＣＤ２７．１５がＣＤ８$^{+}$細胞の生存および増殖を促進もしていることを図示する。

【０１５４】

ｈＣＤ２７．１５は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を刺激して特異的サイトカインを産生する

ヒト未感作ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞を、以上で示したように精製し、刺激した。７２時間の培養後に培養上澄みを取り、製造者の指示に従って27-Plex Luminex（Biorad, cat. no. 171A11127）によってサイトカイン分泌について分析した。図５Ａに示すように、ｈＣＤ２７

．１５は、ＴＮＦ－α、ＩＬ－２、ＩＦＮ－γ、ＣＸＣＬ１０、ＩＬ－１３、およびＧＭ－ＣＳＦの分泌を誘導した。さらに、細胞を用いて、ＩＬ－２およびＩＦＮγの細胞間染色を行なった。７２時間の培養の後、ＰＭＡ（conc）およびイオノマイシン（conc）で、Golgi-Plug（１μｇ／ｍｌ：BD Biosciences）の存在下で４時間細胞を培養した。ＣＤ８$^{+}$細胞の合計数はｈＣＤ２７．１５と非（none）刺激細胞との間で劇的に異ならず、このことは、サイトカインの増大した分泌が細胞あたりのサイトカインの定性的増加によって生じるにすぎないことを示す（図５Ｂ）。

【０１５５】

実施例４

ｈＣＤ２７．１５抗体配列

免疫グロブリンｃＤＮＡのクローニング

変性プライマＰＣＲベースの方法を用いて、ハイブリドーマｈＣＤ２７．１５によって発現されるマウス抗体のための可変領域をエンコードするＤＮＡ配列を判定した。TRIZOL（Invitrogen）を用いて５×１０^{6}個のハイブリドーマ細胞から合計ＲＮＡを単離し、製造者の指示に従って、Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素であるRNase H Minus、点突然変異体キット（Promega, cat. no. M368C）を用いて重鎖および軽鎖のための遺伝子特異的ｃＤＮＡを合成した。NovagenベースのＩｇ－プライマセット（Novagen, San Diego, CA）およびＴａｑポリメラーゼ（Invitrogen）を用いてV_HおよびV_L遺伝子をＰＣＲ増幅した。５００ｂｐの予期された単位複製配列サイズに一致したすべてのＰＣＲ産生物をｐＣＲ４　ＴＯＰＯベクター（Invitrogen）にクローン化し、構築物を、製造者の指示に従って、One Shot Competent Topl0大腸菌（Invitrogen）に形質転換した。

【０１５６】

ユニバーサルＭ１３順方向および逆方向プライマを用いるコロニーＰＣＲによってクローンをスクリーニングし、各反応からの少なくとも２つのクローンをＤＮＡ配列分析のために選択した。Kabat規則に従ってＣＤＲを同定した（Kabat et al., 1991. Sequnces of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication No. 91-3242）。質量分析法によってアミノ酸配列を確認した。

【０１５７】

配列を添付の図６の配列リストに開示し、表４に列挙する。

【０１５８】

【表５】

表4

SEQ ID NO:	記載
1	hCD27.15 **重鎖可変領域** (DNA)
2	hCD27.15 **軽鎖可変領域** (DNA)
3	hCD27.15 **重鎖可変領域** (AA)
4	hCD27.15 **軽鎖可変領域** (AA)
5	hCD27.15 **重鎖** CDR1 (AA)
6	hCD27.15 **重鎖** CDR2 (AA)
7	hCD27.15 **重鎖** CDR3 (AA)
8	hCD27.15 **軽鎖** CDR1 (AA)
9	hCD27.15 **軽鎖** CDR2 (AA)
10	hCD27.15 **軽鎖** CDR3 (AA)

【０１５９】

【表６】
配列リスト

SEQ1: hCD27.15 **重鎖可変領域** (DNA)

```
   1 TCAGAGGTTC GGCTGCAGCA GTCTGGGGCA GACCTTGTGA AGCCAGGGGC
  51 CTCAGTCAAG TTGTCCTGCA CAGCTTCTGG CTTCATCATT AAAGCCACCT
 101 ATATGCACTG GGTGAGGCAG AGGCCTGAAC AGGGCCTGGA GTGGATTGGA
 151 AGGATTGATC CTGCGAATGG TGAGACTAAA TATGACCCGA AGTTCCAGGT
 201 CAAGGCCACT ATAACAGCAG ACACATCCTC CAGCACAGCC TACCTGCAGC
 251 TCAACAGCCT GACATCTGAC GACACTGCCG TCTATTACTG TGCTAGATAC
 301 GCCTGGTACT TCGATGTCTG GGGCGCAGGG ACCACGGTCA CCGTCTCCTC
 351 AGCCAAAACG ACACCCCCAY CCGTTTATCC MYTGGYCCCT GGAAGC
```

SEQ2: hCD27.15 **軽鎖可変領域** (DNA)

```
   1 GACATCCAGA TGACTCAGTC TCCAGCCTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA
  51 CACTGTCACT ATCACATGTC GGGCAAGTGA GAATATTTAC AGTTTTTTAG
 101 CATGGTATCA TCAGAAACAG GGAAGGTCTC CGCAACTCCT GGTCTATCAT
 151 GCAAAAACCC TAGCAGAAGG TGTGCCATCA AGGTTCAGTG GCAGTGGATC
 201 AGGCACACAG TTTTCTCTGA AGATCAACAG CCTGCAGGCT GAAGATTTTG
 251 GGAGTTATTA CTGTCAACAT TATTATGGTA GTCCGCTCAC GTTCGGTGCT
 301 GGGACCAAGC TGGAGGTGAA ACGGGCTGAT GCTGCACCAA CTGTATCCAT
 351 CTTYCCRCCC TCCTCWGAGG AGCTAAGCTT G
```

SEQ3: hCD27.15 **重鎖可変領域** (AA)

```
EVRLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFIIKATYMHWVRQRPEQGLEWIGRIDPANGETKY
DPKFQVKATITADTSSSTAYLQLNSLTSDDTAVYYCARYAWYFDVWGAGTTVTVSSAKTT
PPXVYPXXPGS
```

SEQ4: hCD27.15 **軽鎖可変領域** (AA)

```
DIQMTQSPASLSASVGDTVTITCRASENIYSFLAWYHQKQGRSPQLLVYHAKTLAEGVPS
RFSGSGSGTQFSLKINSLQAEDFGSYYCQHYYGSPLTFGAGTKLEVKRADAAPTVSIFPP
SSEELSL
```

【０１６０】

【表７】

SEQ5: hCD27.15 **重鎖** CDR1 (AA)

GFIIKATYMH

SEQ6: hCD27.15 **重鎖** CDR2 (AA)

RIDPANGETKYDPKFQV

SEQ7: hCD27.15 **重鎖** CDR3 (AA)

YAWYFDV

SEQ8: hCD27.15 **軽鎖** CDR1 (AA)

RASENIYSFLA

SEQ9: hCD27.15 **軽鎖** CDR2 (AA)

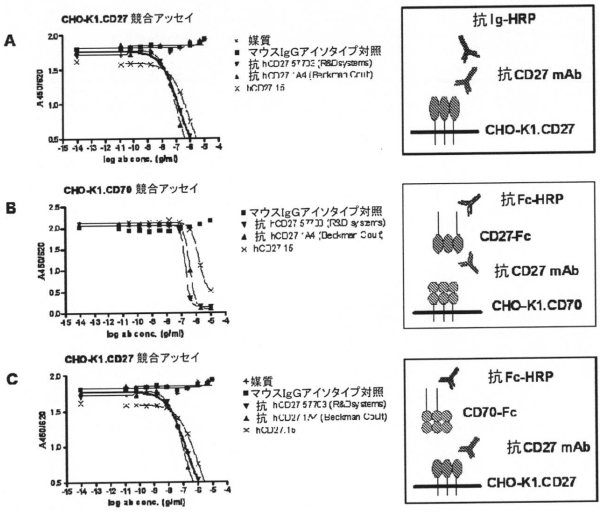
HAKTLAE

SEQ10: hCD27.15 **軽鎖** CDR3 (AA)

QHYYGSPLT

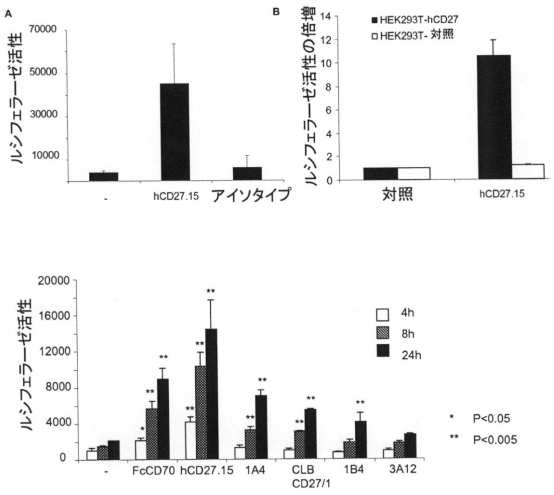
【図１】

Fig. 1



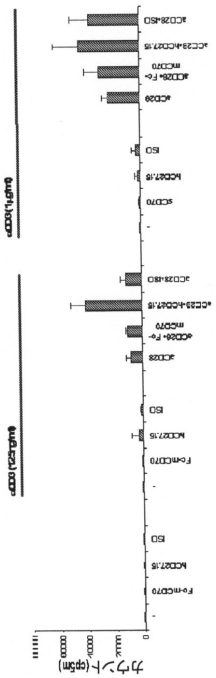
【図２】

Fig. 2



【図３】

Fig. 3



【図４】

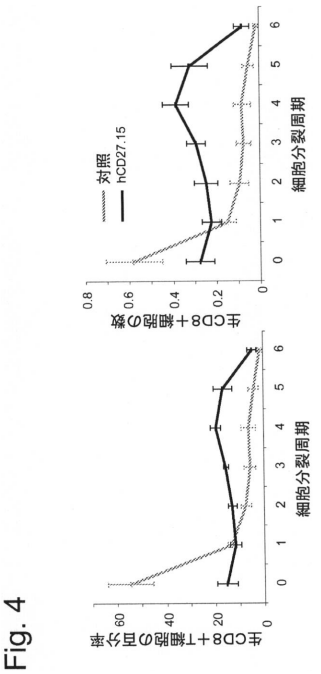


Fig. 4

【図５】

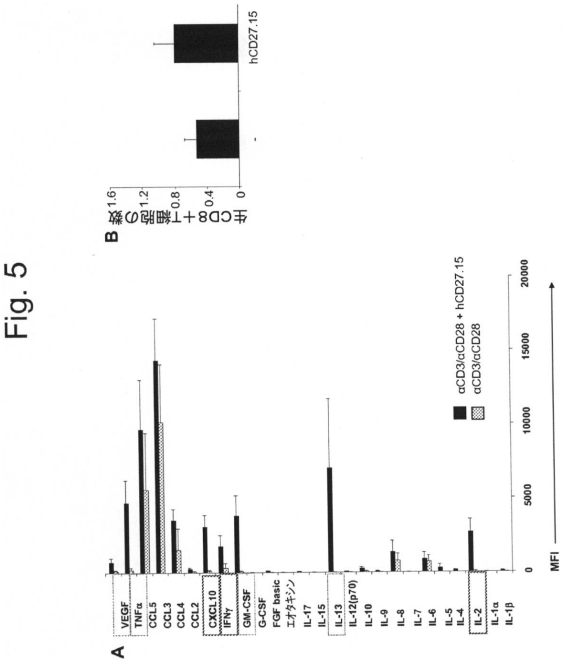


Fig. 5

【図６】

Fig. 6

A

hCD27.15 **重鎖アミノ酸配列**

<----------FWR1---------> <--CDR1--> <----FWR2---->
EVRLQQSGADLVKPGASVKLSCTAS GFIIKATYMH WVRQRPEQGLEWIG

<------CDR2-----> <-------------FWR3------------->
RIDPANGETKYDPKFQV KATITADTSSSTAYLQLNSLTSDDTAVYYCAR

<CDR3-> <----------FWR4---------->
YAWYFDV WGAGTTVTVSSAKTTPPXVYPXXPGS

B

hCD27.15 **軽鎖アミノ酸配列**

<--------FWR1---------> <--CDR1---> <---FWR2------>
DIQMTQSPASLSASVGDTVTITC RASENIYSFLA WYHQKQGRSPQLLVY

<CDR2-> <-------------FWR3------------->
HAKTLAE GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQAEDFGSYYC

<-CDR3--> <------------FWR4------------>
QHYYGSPLT FGAGTKLEVKRADAAPTVSIFPPSSEELSL

【配列表】
0006023706000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	C12N	5/10	
C12P	***21/08***	***(2006.01)***	C12P	21/08	
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	A61K	39/395	N
A61K	***45/00***	***(2006.01)***	A61K	45/00	
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	A61P	35/00	
A61P	***37/06***	***(2006.01)***	A61P	37/06	

(72)発明者 ファン・エーネナーム，ハンス
オランダ、エン・エル－５３４０ ベー・ハー オス、ペー・オー・ボックス・２０、ナムローゼ・フェンノートシャップ・オルガノン
(72)発明者 ムルダー，ウィンフリート・ロバート
オランダ、６５４１ エス・ペー、ネイメーヘン、フォールスタツラーン、２９１
(72)発明者 ボルスト，ヤネッチェ・ヘールトロイダ
オランダ、エン・エル－１０１５ デー・ベー アムステルダム、プリンセングラハト、５２
(72)発明者 フェラール，アールチェ・マリア・エリザベス
オランダ、１０５４ イェー・エー アムステルダム、オーフェルトーム、３３２－３・ハー・ヘー
(72)発明者 フィンク，ポール・マリア・フレデリクス
オランダ、６６４２ デー・ベー ブーニゲン、ワーテルドルプ、７８

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 特表２０１０－５０６９２５（ＪＰ，Ａ）
Cancer Res.(Proc. AACR 101st Ann. Meet.)，２０１０年 ４月，p.#5343

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ０７Ｋ １６／００－１６／４６
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／
ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ