

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-513380

(P2013-513380A)

(43) 公表日 平成25年4月22日 (2013.4.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 L	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-542637 (P2012-542637)
 (86) (22) 出願日 平成22年12月8日 (2010.12.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年8月7日 (2012.8.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2010/003411
 (87) 国際公開番号 W02011/070443
 (87) 国際公開日 平成23年6月16日 (2011.6.16)
 (31) 優先権主張番号 61/285,018
 (32) 優先日 平成21年12月9日 (2009.12.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592236234
 アンスティテュー・ナショナル・ドゥ・ラ
 ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・
 メディカル・(イ・エヌ・エス・ウ・エー
 ル・エム)
 INSTITUT NATIONAL D
 E LA SANTE ET DE LA
 RECHERCHE MEDICALE
 (I. N. S. E. R. M.)
 フランス75654パリ・セデックス13
 、リュ・ドゥ・トルビアック101番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B 7 H 6 と結合するモノクローナル抗体およびその使用

(57) 【要約】

B 7 H 6 の N K p 3 0 との相互作用を阻害できる抗体を含む、B 7 ファミリーメンバー B 7 H 6 と特異的に結合するモノクローナル抗体が開示される。また、治療薬とコンジュゲートしている抗 B 7 H 6 モノクローナル抗体を含む抗 B 7 H 6 抗体 - 薬物コンジュゲートも開示される。抗 B 7 H 6 抗体および抗体 - 薬物コンジュゲートは、B 7 H 6 発現細胞に対して治療的効果を発揮するための方法においても、ならびに B 7 H 6 または B 7 H 6 発現細胞の検出のための診断方法においても有用である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト B 7 H 6 の細胞外ドメイン（配列番号 2 のアミノ酸残基 2 5 ～ 2 6 6）との結合について、

a) クローン名称番号 4 E 5 . 5（受託番号 C N C M I - 4 2 4 2）のハイブリドーマ；

b) クローン名称番号 9 G 9 . 2（受託番号 C N C M I - 4 2 4 3）のハイブリドーマ；

c) クローン名称番号 1 0 E 2 . 9（受託番号 C N C M I - 4 2 4 4）のハイブリドーマ；および

d) クローン名称番号 1 7 B 1 . 3（受託番号 C N C M I - 4 2 4 5）のハイブリドーマ

からなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合する、単離されたモノクローナル抗体。

【請求項 2】

マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

a) クローン名称番号 4 E 5 . 5（受託番号 C N C M I - 4 2 4 2）のハイブリドーマによって産生される抗体またはその抗原結合断片；

b) クローン名称番号 9 G 9 . 2（受託番号 C N C M I - 4 2 4 3）のハイブリドーマによって産生される抗体またはその抗原結合断片；

c) クローン名称番号 1 0 E 2 . 9（受託番号 C N C M I - 4 2 4 4）のハイブリドーマによって産生される抗体またはその抗原結合断片；および

d) クローン名称番号 1 7 B 1 . 3（受託番号 C N C M I - 4 2 4 5）のハイブリドーマによって産生される抗体またはその抗原結合断片

からなる群から選択されるマウス抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

a) クローン名称番号 4 E 5 . 5（受託番号 C N C M I - 4 2 4 2）のハイブリドーマによって産生される抗体；

b) クローン名称番号 9 G 9 . 2（受託番号 C N C M I - 4 2 4 3）のハイブリドーマによって産生される抗体；

c) クローン名称番号 1 0 E 2 . 9（受託番号 C N C M I - 4 2 4 4）のハイブリドーマによって産生される抗体；および

d) クローン名称番号 1 7 B 1 . 3（受託番号 C N C M I - 4 2 4 5）のハイブリドーマによって産生される抗体

からなる群から選択される抗体に由来するヒト化抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

ヒト B 7 H 6 細胞外ドメインとの結合について、（a）または（d）の抗体と競合し、ヒト B 7 H 6 のヒト N K p 3 0 との相互作用を阻害する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

一本鎖抗体である、請求項 1、4 および 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

A D C C 活性および C D C 活性のうち少なくとも 1 種を有する F c 領域を含む、請求項 1、2、4 および 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

F c 領域が、一本鎖 F c（s c F c）である、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体と、その抗体による結合を検出するための手段とを含む診断キット。

10

20

30

40

50

【請求項 10】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体と、医薬上許容される担体とを含む組成物。

【請求項 11】

ヒト B7H6 の細胞外ドメイン（配列番号 2 のアミノ酸残基 25 ～ 266）との結合について、

a) クローン名称番号 4E5.5（受託番号 CNCMI-4242）のハイブリドーマ；

b) クローン名称番号 9G9.2（受託番号 CNCMI-4243）のハイブリドーマ；

c) クローン名称番号 10E2.9（受託番号 CNCMI-4244）のハイブリドーマ；および

d) クローン名称番号 17B1.3（受託番号 CNCMI-4245）のハイブリドーマ

からなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体を含む抗体-薬物コンジュゲートであって、

抗体が、細胞毒性薬剤とコンジュゲートしている、抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 12】

抗体が、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体からなる群から選択される、請求項 11 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 13】

抗体が、

a) クローン名称番号 4E5.5（受託番号 CNCMI-4242）のハイブリドーマによって産生される抗体；

b) クローン名称番号 9G9.2（受託番号 CNCMI-4243）のハイブリドーマによって産生される抗体；

c) クローン名称番号 10E2.9（受託番号 CNCMI-4244）のハイブリドーマによって産生される抗体；および

d) クローン名称番号 17B1.3（受託番号 CNCMI-4245）のハイブリドーマによって産生される抗体

からなる群から選択される抗体に由来するヒト化抗体である、請求項 11 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 14】

抗体が、一本鎖抗体である、請求項 11 または 13 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 15】

抗体が、ADCC 活性および CDC 活性のうち少なくとも 1 種を有する Fc 領域を含む、請求項 11 または 13 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 16】

Fc 領域が、一本鎖 Fc (scFc) である、請求項 15 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 17】

細胞毒性薬剤が、抗チューブリン剤、DNA 副溝結合剤、DNA 副溝アルキル化剤、デュオカルマイシンおよびピューロマイシンからなる群から選択される、請求項 11 から 16 のいずれかに記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 18】

抗チューブリン剤が、ドラスタチン、ピンカアルカロイド、ポドフィラトキシン、タキサン、バッカチン誘導体、クリプトフィシン、マイタンシノイドおよびコンプレタスタチンからなる群から選択される、請求項 17 に記載の抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

抗体が、リンカーを介して細胞毒性薬剤とコンジュゲートしている、請求項 11 から 16 のいずれかに記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

【請求項 20】

リンカーが、細胞内条件下で切断可能である、請求項 19 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

【請求項 21】

切断可能なリンカーが、細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチドリinkerである、請求項 20 に記載の抗体 - 薬物コンジュゲート。

【請求項 22】

請求項 11 から 21 のいずれか一項に記載の抗体 - 薬物コンジュゲートと、医薬上許容される担体とを含む組成物。

【請求項 23】

ヒト B7H6 を発現する細胞に対するヒトナチュラルキラー (NK) 細胞活性を低下させる方法であって、

ヒト B7H6 の細胞外ドメイン (配列番号 2 のアミノ酸残基 25 ~ 266) との結合について、

a) クローン名称番号 4E5.5 (受託番号 CNCMI-4242) のハイブリドーマ; および

b) クローン名称番号 17B1.3 (受託番号 CNCMI-4245) のハイブリドーマ

からなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体の有効量と、ヒト B7H6 を発現する細胞とをヒト NK 細胞の存在下で接触させることを含み、

前記抗体が、ヒト B7H6 のヒト NK p30 との相互作用を阻害する、方法。

【請求項 24】

対象において、骨髓細胞 (BMC) 同種移植片拒絶を治療する方法であって、

ヒト B7H6 の細胞外ドメイン (配列番号 2 のアミノ酸残基 25 ~ 266) との結合について、

a) クローン名称番号 4E5.5 (受託番号 CNCMI-4242) のハイブリドーマ; および

b) クローン名称番号 17B1.3 (受託番号 CNCMI-4245) のハイブリドーマ

からなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体を、NK 細胞活性を阻害し、それによって急性 BMC 同種移植片拒絶を治療するのに有効な量で対象に投与することを含み、

前記抗体が、ヒト B7H6 のヒト NK p30 との相互作用を阻害する、方法。

【請求項 25】

抗体が、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体である、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

抗体が、

a) クローン名称番号 4E5.5 (受託番号 CNCMI-4242) のハイブリドーマによって産生される抗体; および

b) クローン名称番号 17B1.3 (受託番号 CNCMI-4245) のハイブリドーマによって産生される抗体

からなる群から選択される抗体に由来するヒト化抗体である、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 27】

抗体が、一本鎖抗体である、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 B 7 H 6 発現細胞を含む細胞集団内の B 7 H 6 発現細胞を枯渇させるか、その成長を阻害する方法であって、

前記 B 7 H 6 発現細胞を、有効量の抗体 - 薬物コンジュゲートと接触させることを含み、

前記抗体 - 薬物コンジュゲートが、ヒト B 7 H 6 の細胞外ドメイン（配列番号 2 のアミノ酸残基 25 ~ 266）との結合について、

a) クローン名称番号 4 E 5 . 5（受託番号 C N C M I - 4 2 4 2）のハイブリドーマ；

b) クローン名称番号 9 G 9 . 2（受託番号 C N C M I - 4 2 4 3）のハイブリドーマ；

c) クローン名称番号 10 E 2 . 9（受託番号 C N C M I - 4 2 4 4）のハイブリドーマ；および

d) クローン名称番号 17 B 1 . 3（受託番号 C N C M I - 4 2 4 5）のハイブリドーマ

からなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体を含み、

前記抗体が、細胞毒性薬剤とコンジュゲートしている、方法。

【請求項 29】

対象において B 7 H 6 を発現する癌を治療する方法であって、

対象に、有効量の抗体 - 薬物コンジュゲートを投与することを含み、

前記抗体 - 薬物コンジュゲートが、ヒト B 7 H 6 の細胞外ドメイン（配列番号 2 のアミノ酸残基 25 ~ 266）との結合について、

a) クローン名称番号 4 E 5 . 5（受託番号 C N C M I - 4 2 4 2）のハイブリドーマ；

b) クローン名称番号 9 G 9 . 2（受託番号 C N C M I - 4 2 4 3）のハイブリドーマ；

c) クローン名称番号 10 E 2 . 9（受託番号 C N C M I - 4 2 4 4）のハイブリドーマ；および

d) クローン名称番号 17 B 1 . 3（受託番号 C N C M I - 4 2 4 5）のハイブリドーマ

からなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体を含み、

前記抗体が、細胞毒性薬剤とコンジュゲートしている、方法。

【請求項 30】

B 7 H 6 を発現する癌が、結腸、肝臓、子宮頸部、肺、膵臓または前立腺の癌である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

B 7 H 6 を発現する癌が、原血球性白血病、B 細胞リンパ腫、T 細胞リンパ腫、単球性リンパ腫、赤白血病、パーキットリンパ腫、慢性骨髄性白血病または急性リンパ芽球性白血病である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

抗体が、ヒトまたはヒト化抗体である、請求項 28 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

抗体が、

a) クローン名称番号 4 E 5 . 5（受託番号 C N C M I - 4 2 4 2）のハイブリドーマによって産生される抗体；

b) クローン名称番号 9 G 9 . 2（受託番号 C N C M I - 4 2 4 3）のハイブリドーマによって産生される抗体；

c) クローン名称番号 10 E 2 . 9（受託番号 C N C M I - 4 2 4 4）のハイブリド

10

20

30

40

50

ーマによって産生される抗体；および

d) クローン名称番号 17B1.3 (受託番号 CNCMI-4245) のハイブリドーマによって産生される抗体

からなる群から選択される抗体に由来するヒト化抗体である、請求項 28 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

抗体が、一本鎖抗体である、請求項 28 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

B7H6 発現細胞に対する抗体依存性細胞毒性 (ADCC) を誘導する方法であって、前記 B7H6 発現細胞を、ヒト B7H6 の細胞外ドメイン (配列番号 2 のアミノ酸残基 25 ~ 266) との結合について、

a) クローン名称番号 4E5.5 (受託番号 CNCMI-4242) のハイブリドーマ；

b) クローン名称番号 9G9.2 (受託番号 CNCMI-4243) のハイブリドーマ；

c) クローン名称番号 10E2.9 (受託番号 CNCMI-4244) のハイブリドーマ；および

d) クローン名称番号 17B1.3 (受託番号 CNCMI-4245) のハイブリドーマ

からなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体の有効量と接触させることを含み、

前記接触が、ADCC 活性を有する Fc 受容体を発現する NK 細胞または CD8⁺ T 細胞の存在下で行われ、前記抗体が、前記 Fc 受容体と結合できる Fc 領域を含む、方法。

【請求項 36】

B7H6 発現細胞に対する補体依存性細胞毒性 (CDC) を誘導する方法であって、前記 B7H6 発現細胞を、ヒト B7H6 の細胞外ドメイン (配列番号 2 のアミノ酸残基 25 ~ 266) との結合について、

a) クローン名称番号 4E5.5 (受託番号 CNCMI-4242) のハイブリドーマ；

b) クローン名称番号 9G9.2 (受託番号 CNCMI-4243) のハイブリドーマ；

c) クローン名称番号 10E2.9 (受託番号 CNCMI-4244) のハイブリドーマ；および

d) クローン名称番号 17B1.3 (受託番号 CNCMI-4245) のハイブリドーマ

からなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体の有効量と接触させることを含み、

前記接触が、補体の存在下で行われ、前記抗体が、CDC 活性を有する Fc 領域を含む、方法。

【請求項 37】

対象において B7H6 を発現する癌を治療する方法であって、

対象に、ヒト B7H6 の細胞外ドメイン (配列番号 2 のアミノ酸残基 25 ~ 266) との結合について、

a) クローン名称番号 4E5.5 (受託番号 CNCMI-4242) のハイブリドーマ；

b) クローン名称番号 9G9.2 (受託番号 CNCMI-4243) のハイブリドーマ；

c) クローン名称番号 10E2.9 (受託番号 CNCMI-4244) のハイブリドーマ；および

d) クローン名称番号 17B1.3 (受託番号 CNCMI-4245) のハイブリド

10

20

30

40

50

ーマ

からなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体の有効量を投与することを含み、

前記抗体が、A D C C 活性およびC D C 活性のうち少なくとも1種を有するF c 領域を含む、方法。

【請求項38】

抗体が、ヒトまたはヒト化抗体である、請求項35から37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

抗体が、

a) クローン名称番号4 E 5 . 5 (受託番号C N C M I - 4 2 4 2) のハイブリドーマによって産生される抗体；

b) クローン名称番号9 G 9 . 2 (受託番号C N C M I - 4 2 4 3) のハイブリドーマによって産生される抗体；

c) クローン名称番号1 0 E 2 . 9 (受託番号C N C M I - 4 2 4 4) のハイブリドーマによって産生される抗体；および

d) クローン名称番号1 7 B 1 . 3 (受託番号C N C M I - 4 2 4 5) のハイブリドーマによって産生される抗体

からなる群から選択される抗体に由来するヒト化抗体である、請求項35から37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

抗体が、一本鎖抗体である、請求項35から37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項41】

F c 領域が、一本鎖F c (s c F c) である、請求項35から37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

B 7 H 6 発現細胞が、癌細胞である、請求項35または36に記載の方法。

【請求項43】

癌細胞が、結腸癌細胞、肝臓癌細胞、子宮頸癌細胞、肺癌細胞、膵臓癌細胞または前立腺癌細胞である、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

癌細胞が、原血球性白血病細胞、B細胞リンパ腫細胞、T細胞リンパ腫細胞、単球性リンパ腫細胞、赤白血病細胞、パーキットリンパ腫細胞、慢性骨髄性白血病細胞または急性リンパ芽球性白血病細胞である、請求項42に記載の方法。

【請求項45】

B 7 H 6 を発現する癌が、結腸、肝臓、子宮頸部、肺、膵臓または前立腺の癌である、請求項37に記載の方法。

【請求項46】

B 7 H 6 を発現する癌が、原血球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、単球性リンパ腫、赤白血病、パーキットリンパ腫、慢性骨髄性白血病または急性リンパ芽球性白血病である、請求項37に記載の方法。

【請求項47】

B 7 H 6 の細胞性発現を検出する方法であって、

(1) 試験されるヒト細胞を含む生物学的試料を、ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメイン (配列番号2のアミノ酸残基25 ~ 266) との結合について、

a) クローン名称番号4 E 5 . 5 (受託番号C N C M I - 4 2 4 2) のハイブリドーマ；

b) クローン名称番号9 G 9 . 2 (受託番号C N C M I - 4 2 4 3) のハイブリドーマ；

c) クローン名称番号1 0 E 2 . 9 (受託番号C N C M I - 4 2 4 4) のハイブリド

10

20

30

40

50

ーマ；および

d) クローン名称番号 17B1.3 (受託番号 CNCMI-4245) のハイブリドーマ

からなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体と接触させること、および

(2) 前記抗体の結合を検出し、前記抗体の結合が細胞上の B7H6 の存在を示し、それによって、細胞が B7H6 を発現するかどうかを検出すること

を含む、方法。

【請求項 48】

生物学的試料が、無傷のヒト細胞を含む、請求項 47 に記載の方法。

10

【請求項 49】

生物学的試料が、試験される細胞の膜画分を含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 50】

抗体を、放射性同位元素、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識および生物発光標識からなる群から選択される検出可能な標識を用いて標識する、請求項 47 から 49 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 51】

B7H6 を発現する癌を有する疑いのある対象を診断する方法であって、

(1) 検出可能な標識とコンジュゲートしているモノクローナル抗体であって、ヒト B7H6 の細胞外ドメイン (配列番号 2 のアミノ酸残基 25~266) との結合について、

20

a) クローン名称番号 4E5.5 (受託番号 CNCMI-4242) のハイブリドーマ；

b) クローン名称番号 9G9.2 (受託番号 CNCMI-4243) のハイブリドーマ；

c) クローン名称番号 10E2.9 (受託番号 CNCMI-4244) のハイブリドーマ；および

d) クローン名称番号 17B1.3 (受託番号 CNCMI-4245) のハイブリドーマからなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体を、前記対象に投与すること、および

(2) 前記対象内の前記抗体の分布を検出すること

30

を含む、方法。

【請求項 52】

癌が、結腸、肝臓、子宮頸部、肺、膵臓または前立腺の癌である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

a) クローン名称番号 4E5.5 (受託番号 CNCMI-4242) のハイブリドーマ；

b) クローン名称番号 9G9.2 (受託番号 CNCMI-4243) のハイブリドーマ；

c) クローン名称番号 10E2.9 (受託番号 CNCMI-4244) のハイブリドーマ；および

40

d) クローン名称番号 17B1.3 (受託番号 CNCMI-4245) のハイブリドーマ

からなる群から選択される抗体産生細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示内容が参照によりその全文で本明細書に組み込まれる 2009 年 1 月 2 月 9 日に提出された米国仮出願出願番号第 61/285,018 号の利益を主張する。

50

【 0 0 0 2 】

本発明は、抗体、特に、B 7 H 6 と表される腫瘍細胞リガンドと結合するモノクローナル抗体に関する。本発明はまた、抗体の使用にも関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

B 7 ファミリー

正および負の共刺激シグナルは、リンパ球活性の調節において重要な役割を果たし、これらのシグナルを媒介する分子は、免疫調節薬の有効な標的であるとわかっている。例えば、C D 2 8、原型 T 細胞共刺激分子は、抗原提示細胞 (A P C) の表面上の B 7 - 1 または B 7 - 2 と相互作用する際に、T 細胞受容体 (T c R) 結合に応じて T 細胞増殖および分化を促進するシグナルを放出するが、C D 2 8 相同体細胞毒性 T リンパ球抗原 - 4 (C T L A - 4) は、T 細胞増殖およびエフェクター機能の阻害を媒介する。(Chambers et al., Ann. Rev. Immunol., 19:565-594, 2001; Egen et al., Nature Immunol., 3:611-618, 2002 参照のこと。)

【 0 0 0 4 】

B 7 ファミリーに対して相同性を有するいくつかの分子が、発見されており (Abbas et al., Nat. Med., 5:1345-6, 1999; Coyle et al., Nat. Immunol., 2: 203-9, 2001; Carrreno et al., Annu. Rev. Immunol., 20: 29-53, 2002; Liang et al., Curr. Opin. Immunol., 14: 384-90, 2002)、リンパ球活性化におけるそれらの役割は解明され始めたところである。これらの新規共刺激対抗受容体として、B 7 h 2、P D - L 1、P D - L 2、B 7 - H 3 および B 7 - H 4 が挙げられる。

【 0 0 0 5 】

公知の B 7 ファミリーメンバーの発現は、主として抗原提示細胞に制限されている。研究によって、B 7 ファミリーメンバーは、リンパ球で同族 (cognate) 受容体と相互作用して、細胞媒介性免疫応答の調節において重要な役割を果たす正または負の共刺激シグナルを提供するリンパ球系細胞上の対抗 (counter) 受容体であると示されている。

【 0 0 0 6 】

N K 細胞および N K p 3 0

ナチュラルキラー (N K) 細胞は、免疫系において活性なリンパ球のサブセットであり、ヒト末梢血中の単核細胞の平均約 1 5 % に相当する。N K 細胞は、致死的に放射線照射したマウスが同種株または親株骨髓細胞 (B M C) の同種移植片を拒絶できたという知見によって、1 9 7 1 年に最初に機能的に説明された。(Cudowicz and Bennett, J. Exp. Med. 134:83-102, 1971; Cudowicz and Bennett, J. Exp. Med. 135:1513-1528, 1971 参照のこと。) C u d o w i c z および B e n n e t t は、放射線照射された F 1 ハイブリッド H - 2 - ヘテロ接合体マウス (A x B) が、親の H - 2 - ホモ接合体 B M C (A または B) を拒絶できたことを観察した。この知見は、移植抗原は共優性に遺伝すると考えられ、子孫は、親の主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) 決定基に対して絶対的に寛容性であるという移植の古典的法則と矛盾するものであった。(Cudowicz and Bennett, J. Exp. Med. 134:83-102, 1971 参照のこと。) この事象に関与する細胞は、放射線抵抗性であり、リンパ球系細胞と同一であることがわかり、これは、後に、1 9 7 5 年に、インビトロ (in vitro) で、M H C に制限されない方法で腫瘍の自発的死滅を媒介するその能力を特性決定された。(Herberman and Ortaldo, Science, 214:24-30, 1981; Ortaldo and Herberman, Annu. Rev. Immunol. 2:359-394, 1984; Trinchieri, Adv. Immunol. 47:187-376, 1989; Murphy et al., J. Natl. Cancer Inst. 85:1475-1482, 1993 参照のこと。) N K 細胞単独で、骨髓移植片拒絶の特異性を媒介し得るというさらなる証拠は、1 9 8 7 年に、T 細胞および B 細胞を発生させることができない重症複合免疫不全症 (S C I D) のマウスが通常の N K 細胞機能を有するということが観察されたときに現れた。(Murphy et al., J. Exp. Med. 165:1212-1217, 1987 参照のこと。)

【 0 0 0 7 】

N K 細胞は、現在、自然免疫の重要な武器に相当し、腫瘍およびウイルスに感染した細

10

20

30

40

50

胞に対する免疫監視において主な役割を果たすと理解されている。しかし、NK細胞は、活性化されない限り、十分な数で存在する場合であっても、その通常の機能の実施において無力である。実際、NK細胞活性の低下が、癌および感染性疾患と関連している [Yamazaki et al., *Oncology Reports* 9:359-363, 2002; Rosenberg et al., *Cancer Research* 51:5074-5079 (suppl.), 1991; Britteenden et al., *Cancer* 77:1226-1243, 1996; 米国特許第 5, 082, 833 号および同第 4, 883, 662 号参照のこと。] 逆に、上記のように、NK細胞活性は、BMC同種移植片の急性拒絶を媒介する。したがって、NK細胞活性のレベルは、免疫関連障害において重要な役割を果たすと思われる。

【0008】

NK細胞活性は、通常、MHCクラスI分子と、阻害性および活性化受容体との間の相互作用によって調節される。(例えば、Barao and Murphy, *BB&MT* 9:727-741, 2003参照のこと。)「自己喪失」仮説は、元々、MHCクラスI分子を欠く腫瘍細胞は、NK細胞による死滅に対して感受性であるという知見に基づいたものである。(Ljunggren and Karre, *Immunol. Today* 11:237-244, 1990; Ohlen et al., *J. Immunol.* 145:52-58, 1990参照のこと。)研究者は、ヒトNK細胞は、クラスI欠損エプスタインバーウイルス形質転換Bリンパ芽球様細胞株を溶解することをさらに観察した。(Storkus et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2361-2364, 1989。)また、クラスI遺伝子をクラスI欠損標的細胞にトランスフェクトすることが、これらの細胞をNK細胞媒介性溶解に対して部分的または完全に抵抗性にするともわかった。(Storkus et al., 前掲; Shimizu and DeMars, *Eur. J. Immunol.*, 19:447-451, 1989参照のこと。)しかし、MHCクラスIは、NK細胞媒介性細胞毒性から保護するために、常に必要であるわけではなく、MHCクラスIによる認識が、NK細胞による細胞溶解を常に防ぐわけではない。(Barao and Murphy, 前掲。)近年、種々のMHCクラスI特異的阻害性および活性化受容体ならびに非MHCクラスI特異的活性化受容体が同定された。これらの受容体は、例えば、同種間BMTおよび癌療法などの治療アプローチと関連している。(同文献を参照のこと。)

【0009】

MHCクラスI欠損または陰性標的に対するNK細胞の細胞毒性を媒介できる非MHCクラスI特異的活性化受容体は、一部は、天然細胞毒性受容体(NCR)として知られるNK細胞特異的免疫グロブリン様分子の異種ファミリーによって表される。(例えば、Moretta et al., *Annu. Rev. Immunol.* 19:197-223, 2001; Diefenbach and Raulet, *Immunol. Rev.*, 181:170-184, 2001参照のこと。)(例えば、腫瘍細胞またはウイルス感染細胞上の)MHCクラスI発現の不在下では、NK細胞上のこれらの活性化受容体の連結(ligation)が標的細胞死滅を引き起こす。1つのこのような活性化受容体として、NKp30があり、これは、成熟ナチュラルキラー(NK)細胞で選択的に、構成的に発現され、とりわけ、CD3 との結合によってシグナル伝達する(Barao and Murphy, 前掲参照のこと)。NKp30が結合する標的細胞リガンドは、これまでに同定されていない。

【0010】

このNK細胞による自然認識のシステムは、同種間骨髄移植(BMT)、癌療法またはその他のNK細胞関連障害の治療において臨床適用のための潜在的に強力なツールに相当する。(例えば、Barao and Murphy, 前掲参照のこと。)例えば、NKp30の刺激性活性化または阻害性活性化は、NK細胞活性を調節し、NK細胞活性と関連している疾患または障害を治療するために有用であろう。特に、NKp30を誘発することによるNK細胞活性の増強は、癌および感染性疾患などの不十分なNK細胞活性を特徴とする疾患または障害の治療にとって有用であろうが、NKp30を遮断することによるNK細胞活性の阻害は、例えば、BMC同種移植片拒絶などのNK細胞媒介性障害の治療にとって有用であろう。

【0011】

B7ファミリーの最新のメンバーであるB7H6が最近見出され、NKp30の対抗受容体、すなわち、活性化性(activatory)受容体としてヒトの天然の細胞毒性に関与する成熟ナチュラルキラー(NK)細胞上に選択的に発現される受容体として特性決定された

[Brandt et al., J. Exp. Med., 206(7): 1495-1503, 2009]。B 7 H 6 は、正常ヒト組織では検出されなかったが、ヒト腫瘍細胞上では発現された。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、当技術分野では、B 7 H 6 のNK p 3 0 との相互作用を阻害できる抗体を同定する必要がある。共刺激シグナルおよび免疫応答を調節するその能力に基づいて、このような抗体には治療の潜在力がある。さらに、B 7 H 6 タンパク質と結合する抗体は、細胞毒性薬剤とコンジュゲートしており、B 7 H 6 を発現する細胞を標的とするよう使用される場合には有用であろう。これらおよびその他の使用は非常に望ましいものである。本発明は、本明細書における教示から当業者に明らかなはずのこれらおよびその他の使用のための組成物および方法を提供する。

10

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明の一の態様は、ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基25～266）と特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体を提供する。一実施形態では、抗体は、ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基25～266）との結合について、クローン名称4 E 5 . 5（受託番号C N C M I - 4 2 4 2）のハイブリドーマによって産生される抗体と競合する。別の実施形態では、抗体は、ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基25～266）との結合について、クローン名称9 G 9 . 2（受託番号C N C M I - 4 2 4 3）のハイブリドーマによって産生される抗体と競合する。別の実施形態では、抗体は、ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基25～266）との結合について、クローン名称1 0 E 2 . 9（受託番号C N C M I - 4 2 4 4）のハイブリドーマによって産生される抗体と競合する。別の実施形態では、抗体は、ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基25～266）との結合について、クローン名称1 7 B 1 . 3（受託番号C N C M I - 4 2 4 5）のハイブリドーマによって産生される抗体と競合する。

20

【0014】

特定の実施形態では、上記の抗B 7 H 6 モノクローナル抗体は、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である。いくつかの実施形態では、該抗体は、ヒトB 7 H 6 細胞外ドメインとの結合について競合し、ヒトB 7 H 6 とNK p 3 0 との相互作用を阻害する。該阻害は、完全な遮断である場合も、部分的な遮断である場合もあり、相互作用を中和する場合も、低減する場合もある。適した抗体としてさらに、一本鎖抗体が挙げられる。具体化されるその他のバリエーションとして、A D C C 活性およびC D C 活性のうち少なくとも1種を有するF c 領域を含む抗体が挙げられる。いくつかのこのようなバリエーションにおいて、F c 領域は、一本鎖F c（s c F c）である。ヒトB 7 H 6 と結合する具体化されるモノクローナル抗体の各々が、抗体と、医薬上許容される媒体とを含む組成物として適している。このような抗体は、抗体による結合を検出する診断キットに適している。

30

【0015】

別の態様では、本発明は、ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメイン（アミノ酸残基25～266配列番号2）と特異的に結合するモノクローナル抗体を含む抗体-薬物コンジュゲートを提供し、ここで、抗体は細胞毒性薬剤とコンジュゲートしている。いくつかの実施形態では、抗体-薬物コンジュゲートの抗体部分は、ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基25～266）との結合について、クローン名称4 E 5 . 5（受託番号C N C M I - 4 2 4 2）のハイブリドーマによって産生される抗体；クローン名称9 G 9 . 2（受託番号C N C M I - 4 2 4 3）のハイブリドーマによって産生される抗体；クローン名称1 0 E 2 . 9（受託番号C N C M I - 4 2 4 4）ハイブリドーマによって産生される抗体；またはクローン名称1 7 B 1 . 3（受託番号C N C M I - 4 2 4 5）のハイブリドーマによって産生される抗体と競合する抗体である。モノクローナル抗体は

40

50

、例えば、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体であり得る。適した抗体として、さらに一本鎖抗体が挙げられる。特定のバリエーションでは、抗体は、A D C C 活性およびC D C 活性のうち少なくとも1種を有するF c 領域を含む。いくつかのこのようなバリエーションでは、F c 領域は、一本鎖F c (s c F c) である。細胞毒性薬剤は、例えば、抗チューブリン剤、D N A 副溝結合剤、D N A 副溝アルキル化剤、デュオカルマイシンまたはピューロマイシンであり得る。適した抗チューブリン剤として、例えば、ドラスタチン、ビンカ (vinc) アルカロイド、ポドフィラトキシン (podophyllatoxin) 、タキサン、バッカチン誘導体、クリプトフィシン (cryptophysin) 、マイタンシノイドまたはコンプレタスタチンが挙げられる。特定の実施形態では、抗体は、リンカーを介して薬物とコンジュゲートしており、いくつかの場合には、リンカーは、細胞内条件下で切断可能である。適した切断可能なリンカーとして、細胞内プロテアーゼによって切断可能なものを含むペプチドリinkerが挙げられる。具体化される抗体 - 薬物コンジュゲートのいずれも、抗体 - 薬物コンジュゲートと、医薬上許容される媒体とを含む組成物として適している。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 6 】

別の関連態様では、本発明は、ヒトB 7 H 6 とヒトN K p 3 0 との相互作用を阻害することによって、ヒトB 7 H 6 を発現する細胞に対する、ナチュラルキラー (N K) 細胞活性を低下させる方法を提供する。このような方法は、一般に、ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメインとの結合について、クローン名称4 E 5 . 5 (受託番号C N C M I - 4 2 4 2) のハイブリドーマによって産生される抗体またはクローン名称1 7 B 1 . 3 (受託番号C N C M I - 4 2 4 5) のハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体の有効量と、ヒトB 7 H 6 を発現する細胞とをヒトN K 細胞の存在下で接触させることを含み、ここで、該抗体は、ヒトB 7 H 6 のヒトN K p 3 0 との相互作用を阻害する。

【 0 0 1 7 】

別の関連態様では、本発明は、ヒトB 7 H 6 のヒトN K p 3 0 との相互作用を阻害することによって、対象において、骨髓細胞 (B M C) 同種移植片拒絶を治療する方法を提供する。このような方法は、一般に、ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメインとの結合について、クローン名称4 E 5 . 5 (受託番号C N C M I - 4 2 4 2) のハイブリドーマによって産生される抗体またはクローン名称1 7 B 1 . 3 (受託番号C N C M I - 4 2 4 5) のハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体を、N K 細胞活性を阻害し、それによって急性B M C 同種移植片拒絶を治療するのに有効な量で対象に投与することを含み、ここで、該抗体は、ヒトB 7 H 6 のヒトN K p 3 0 との相互作用を阻害する。

【 0 0 1 8 】

ヒトN K 細胞活性を低下させる方法およびB M C 同種移植片拒絶を治療する方法は両方とも、抗体がヒトまたはヒト化モノクローナル抗体である特定の実施形態を含む。これらの方法はまた、抗体が一本鎖抗体である実施形態を含む。

【 0 0 1 9 】

その他の関連態様では、本発明は、抗体 - 薬物コンジュゲートを使用して、細胞集団内のB 7 H 6 発現細胞を枯渇させるか、その成長を阻害する方法を提供する。方法は、一般に、B 7 H 6 発現細胞を、(a) ヒトB 7 H 6 の細胞外ドメイン (配列番号2 のアミノ酸残基2 5 ~ 2 6 6) との結合について、クローン名称4 E 5 . 5 (受託番号C N C M I - 4 2 4 2) のハイブリドーマによって産生される抗体；クローン名称9 G 9 . 2 (受託番号C N C M I - 4 2 4 3) のハイブリドーマによって産生される抗体；クローン名称1 0 E 2 . 9 (受託番号C N C M I - 4 2 4 4) のハイブリドーマによって産生される抗体；またはクローン名称1 7 B 1 . 3 (受託番号C N C M I - 4 2 4 5) のハイブリドーマによって産生される抗体と競合する抗体と、(b) 抗体とコンジュゲートしている細胞毒性薬剤とを含む、抗体 - 薬物コンジュゲートの有効量と接触させることを含む。

【 0 0 2 0 】

別の関連態様は、抗体 - 薬物コンジュゲートを使用して対象において B 7 H 6 を発現する癌を治療する方法を提供する。この方法は、一般に、(a) ヒト B 7 H 6 の細胞外ドメイン (配列番号 2 のアミノ酸残基 2 5 ~ 2 6 6) との結合について、クローン名称 4 E 5 . 5 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 2) のハイブリドーマによって産生される抗体 ; クローン名称 9 G 9 . 2 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 3) のハイブリドーマによって産生される抗体 ; クローン名称 1 0 E 2 . 9 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 4) のハイブリドーマによって産生される抗体 ; またはクローン名称 1 7 B 1 . 3 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 5) のハイブリドーマによって産生される抗体と競合する抗体と、(b) 抗体とコンジュゲートしている細胞毒性薬剤とを含む抗体 - 薬物コンジュゲートの有効量を対象に投与することを含む。癌が、結腸、肝臓、子宮頸部、肺、膵臓または前立腺の癌である実施形態が含まれる。その他の治療に適した B 7 H 6 を発現する癌として、原血球性白血病、B 細胞リンパ腫、単球性リンパ腫、赤白血病、パーキットリンパ腫および慢性骨髄性白血病が挙げられる。

10

【 0 0 2 1 】

細胞集団内の B 7 H 6 発現細胞を枯渇させるか、その成長を阻害する方法および / または対象において B 7 H 6 を発現する癌を治療する方法の両方において、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体は、抗体 - 薬物コンジュゲートを含む抗体にとって適している。また、これら両方法のための抗体 - 薬物コンジュゲートを含む抗体に一本鎖抗体を使用することも適している。

20

【 0 0 2 2 】

その他の関連態様では、B 7 H 6 発現細胞に対する抗体依存性細胞毒性 (A D C C) を誘導する方法を提供する。これらの方法は、一般に、B 7 H 6 発現細胞を、ヒト B 7 H 6 の細胞外ドメイン (配列番号 2 のアミノ酸残基 2 5 ~ 2 6 6) との結合について、クローン名称 4 E 5 . 5 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 2) のハイブリドーマによって産生される抗体 ; クローン名称 9 G 9 . 2 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 3) のハイブリドーマによって産生される抗体 ; クローン名称 1 0 E 2 . 9 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 4) のハイブリドーマによって産生される抗体 ; またはクローン名称 1 7 B 1 . 3 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 5) のハイブリドーマによって産生される抗体と競合する抗体の有効量と接触させることを含み、ここで、該接触は、A D C C 活性を有する F c 受容体を発現する N K または C D 8 + T 細胞の存在下で行われ、該抗体は、F c 領域と結合できる F c 領域を含む。

30

【 0 0 2 3 】

その他の関連態様では、B 7 H 6 発現細胞に対する補体依存性細胞毒性 (C D C) を誘導する方法を提供する。これらの方法は、一般に、B 7 H 6 発現細胞を、ヒト B 7 H 6 の細胞外ドメイン (配列番号 2 のアミノ酸残基 2 5 ~ 2 6 6) との結合について、クローン名称 4 E 5 . 5 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 2) のハイブリドーマによって産生される抗体 ; クローン名称 9 G 9 . 2 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 3) のハイブリドーマによって産生される抗体 ; クローン名称 1 0 E 2 . 9 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 4) のハイブリドーマによって産生される抗体 ; またはクローン名称 1 7 B 1 . 3 (受託番号 C N C M I - 4 2 4 5) のハイブリドーマによって産生される抗体と競合する抗体の有効量と接触させることを含み、ここで、該接触は補体の存在下で行われ、該抗体は C D C 活性を有する F c 領域を含む。

40

【 0 0 2 4 】

B 7 H 6 発現細胞に対する A D C C を誘導する方法および / または B 7 H 6 発現細胞に対する C D C を誘導する方法の両方において、実施形態は、ヒトまたはヒト化抗体を含む。また、一本鎖抗体も含まれる。別のバリエーションは、一本鎖 F c (s c F c) である F c 領域を含む。いずれかの方法について、いくつかの実施形態では、B 7 H 6 を発現する癌は、癌細胞である。癌細胞は、例えば、結腸癌細胞、肝臓癌細胞、子宮頸癌細胞、肺癌細胞、膵臓癌細胞、前立腺癌細胞、原血球性白血病細胞、B 細胞リンパ腫細胞、単球性リンパ腫細胞、赤白血病細胞、パーキットリンパ腫細胞または慢性骨髄性白血病細胞であ

50

り得る。

【0025】

別の関連態様は、B7H6を発現する癌を治療する方法を提供する。該方法は、一般に、対象に、ヒトB7H6の細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基25～266）との結合について、クローン名称4E5.5（受託番号CNCM I-4242）のハイブリドーマによって産生される抗体；クローン名称9G9.2（受託番号CNCM I-4243）のハイブリドーマによって産生される抗体；クローン名称10E2.9（受託番号CNCM I-4244）のハイブリドーマによって産生される抗体；またはクローン名称17B1.3（受託番号CNCM I-4245）のハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体の有効量を投与することを含み、ここで、抗体は、ADC活性およびCDC活性のうち少なくとも1種を有するFc領域を含む。適したモノクローナル抗体として、ヒト抗体、ヒト化抗体および一本鎖抗体が挙げられる。特定のバリエーションでは、Fc領域は、一本鎖Fc（scFc）である。治療に適しているB7H6を発現する癌として、例えば、結腸、肝臓、子宮頸部、肺、膵臓または前立腺の癌が挙げられる。その他の適したB7H6を発現する癌として、例えば、原血球性白血病、B細胞リンパ腫、単球性リンパ腫、赤白血病、パーキットリンパ腫および慢性骨髄性白血病が挙げられる。

10

【0026】

別の関連態様は、細胞性発現B7H6を検出する方法を提供し、ここで、抗体の結合が、細胞上のB7H6の存在を示す。一般に、この方法は、（1）試験されるヒト細胞を含む生物学的試料を、ヒトB7H6の細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基25～266）との結合について、クローン名称4E5.5（受託番号CNCM I-4242）のハイブリドーマによって産生される抗体；クローン名称9G9.2（受託番号CNCM I-4243）のハイブリドーマによって産生される抗体；クローン名称10E2.9（受託番号CNCM I-4244）のハイブリドーマによって産生される抗体；またはクローン名称17B1.3（受託番号CNCM I-4245）のハイブリドーマによって産生される抗体と競合するモノクローナル抗体と接触させることと、（2）抗体の結合を検出することとを含み、ここで、結合は、細胞上のB7H6の存在を示し、細胞がB7H6を発現するかどうかを検出する。いくつかの実施形態では、生物学的試料は、無傷のヒト細胞または試験される細胞の膜画分である。特定の実施形態では、抗体を検出可能な標識で標識する。適した標識として、放射性同位体、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識または生物発光標識が挙げられる。

20

30

【0027】

関連態様では、本発明は、B7H6を発現する癌を有する疑いのある対象を診断する方法を提供する。この方法は、一般に、ヒトB7H6の細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基25～266）との結合について、クローン名称4E5.5（受託番号CNCM I-4242）のハイブリドーマによって産生される抗体；クローン名称9G9.2（受託番号CNCM I-4243）のハイブリドーマによって産生される抗体；クローン名称10E2.9（受託番号CNCM I-4244）のハイブリドーマによって産生される抗体；またはクローン名称17B1.3（受託番号CNCM I-4245）のハイブリドーマによって産生される抗体と競合する、検出可能な標識とコンジュゲートしているモノクローナル抗体を対象に投与することと、（2）対象内の該抗体の分布を検出することを含む。適した適用として、結腸、肝臓、子宮頸部、肺、膵臓または前立腺の癌の診断が挙げられる。

40

【0028】

別の態様では、本発明はまた、クローン名称4E5.5（受託番号CNCM I-4242）のハイブリドーマ；クローン名称9G9.2（受託番号CNCM I-4243）のハイブリドーマ；クローン名称10E2.9（受託番号CNCM I-4244）のハイブリドーマ；またはクローン名称17B1.3（受託番号CNCM I-4245）のハイブリドーマからなる群から選択される抗体産生細胞を提供する。

50

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の詳細な記載

I. 概説

本発明は、細胞表面タンパク質のB7ファミリーのメンバーと結合する抗B7H6抗体、特に、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体の同定および特性決定に関する。

【0030】

B7H6ポリペプチドは、最初に、NKp30の対抗受容体、成熟ナチュラルキラー（NK）細胞で選択的に発現され、活性化性受容体としてヒト天然細胞毒性に關与している受容体として同定された（その全文が出典明示により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2009/0220502号を参照のこと）。ヒトB7H6をコードする例示的ヌクレオチド配列は、配列番号1によって提供され、コードされるポリペプチドは配列番号2に示される。配列番号2のB7H6ポリペプチドは、およそ242個のアミノ酸残基（配列番号2の残基25～266）の細胞外ドメイン、およそ18個のアミノ酸残基（配列番号2の残基267～284）の膜貫通ドメインおよびおよそ158個のアミノ酸残基（配列番号2の残基285～454）の細胞内ドメインを含む。B7H6はまた、およそ117個のアミノ酸残基のIgVドメイン（配列番号2の残基25～141）およびおよそ97個のアミノ酸残基のIgCドメイン（配列番号2の残基142～238）も有する。ITIMモチーフ（SaYtPL、配列番号2のアミノ酸残基293～298）；SH2結合モチーフ（YqLQ、配列番号2のアミノ酸残基229～332）；およびSH3結合モチーフ（PdapiLPvSP、配列番号2のアミノ酸残基418～427）を含む、B7H6の細胞内ドメイン内にいくつかの可能性あるシグナル伝達モチーフもある。

【0031】

本発明は、ヒトB7H6タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体の産生およびそれらの抗体の特性の特性決定から生じるものである。アイソタイプIgG1を有するヒトB7H6に対する5種のマウスモノクローナル抗体をハイブリドーマから産生した。抗体を4E5.5、5E1.4、9G9.2、10E2.9および17B1.3と名づけた。競合アッセイによって、特定の抗体によって異なるエピトープが認識されることが示された。抗B7H6mAbのうち2種、17B1.3および4E5.5は、NKp30Fc結合およびDOMSP30活性化の阻害によって示されるように、NKp30：B7H6相互作用を部分的に遮断する。これらの研究は構造を機能と関連付けており、実施例に記載されている。種々のモノクローナル抗体が、生化学的アッセイおよび診断アッセイにおいて有用な試薬であり、ならびに治療的価値を有すると示されている。

【0032】

したがって、本発明は、mAb4E5.5、5E1.4、9G9.2、10E2.9および/または17B1.3と同一または同様の特異性および特徴を有するヒトB7H6細胞表面タンパク質と結合するモノクローナル抗体を含む。本明細書に記載されるように、マウス抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を産生し、競合実験において異なるエピトープと結合することを示した。したがって、本発明の一態様は、B7H6との結合について、これらの抗体と競合できる抗体（例えば、mAb4E5.5、9G9.2、10E2.9および17B1.3から選択される抗体と同一のB7H6エピトープと結合できる抗体）を提供する。さらに、いくつかの抗体は、B7H6-NKp30相互作用を達成すると示した。したがって、いくつかの実施形態では、本発明の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体は、NKp30のB7H6媒介性活性化を阻害する。

【0033】

本発明は、非ヒト抗B7H6抗体由来のヒト化抗体（例えば、マウス抗体に由来するヒト化抗体）、中和抗体、ヒトモノクローナル抗体およびそれらの抗原結合断片をさらに提供する。例示的抗体断片として、F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFvおよび最小認識単位が挙げられる。中和抗体は、B7H6と結合し、その結果、NKp30とのその相互作用は、阻害または遮断される。例えば、急性骨髄細胞（B

M C) 同種移植片拒絶などにおいて、NK細胞媒介性応答を阻害するために使用するための、ヒトB7H6の細胞外ドメインとの結合について競合するモノクローナル抗体は、本発明の範囲内にあり、ここで、抗体は、NK細胞活性を遮断し、BMC同種移植片拒絶を治療するのに有効な量で投与される。

【0034】

本発明に従う抗B7H6抗体は、B7H6発現細胞、特に、B7H6を発現する癌細胞に細胞毒性薬剤を標的とするために使用してもよい。このような抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートは、B7H6を発現する癌を有する対象などの対象に投与された場合に、B7H6発現細胞に対して臨床上有益な効果をもたらす。抗体は、一般に、単独で投与されるが、その他の治療薬と組み合わせて投与される場合もある。通常の実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体は、細胞毒性薬剤とコンジュゲートされており、その結果、得られた抗体-薬物コンジュゲートは、細胞によって取り込まれるか、インターナライズされる場合に、B7H6発現細胞(例えば、B7H6を発現する癌細胞)に対して細胞毒性または細胞分裂阻害効果を発揮する。

10

【0035】

したがって、いくつかの態様では、本発明は、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートを含む。抗体部分は、本明細書に記載される同一または同様の特異性および特徴を有するヒトB7H6細胞表面タンパク質と結合し、薬物コンジュゲート部分は、治療薬となる。抗ヒトB7H6抗体-薬物コンジュゲートは、B7H6を発現する癌を有する対象に投与された場合に、B7H6発現細胞に対して臨床上有益な効果を発揮する。通常、薬物コンジュゲート部分は、細胞毒性薬剤となり、B7H6発現細胞に対して細胞毒性または細胞分裂阻害効果を発揮する。これらの抗体-薬物コンジュゲートについて、抗体部分は、B7H6上の特定のエピトープを認識する。特定のバリエーションでは、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートは、B7H6-NKp30相互作用に影響を及ぼす。例えば、いくつかの実施形態では、本発明に従う抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートは、NKp30の活性化を阻害する。

20

【0036】

その他の実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体は、B7H6発現細胞に対する抗体依存性細胞毒性(ADCC)または補体依存性細胞毒性(CDC)を誘導するために使用されるエフェクター機能を有するFc領域を含む。本発明は、ADCCの誘導において使用するためのADCC活性を有するFc領域を含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を含む。この用途のために、一般に、B7H6発現細胞を、細胞溶解性活性を有するFc受容体を発現する細胞溶解性免疫エフェクター細胞の存在下で、Fc領域を含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体の有効量と接触させる。細胞溶解性Fc受容体(例えば、FcγRIIIまたはCD16)を発現する免疫エフェクター細胞は、例えば、NK細胞ならびに特定のCD8⁺T細胞を含む。CDC活性を有するFc領域を含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体がCDCの誘導に有用である実施形態では、一般に、B7H6発現細胞を、補体の存在下で、CDC活性を有するFc領域を含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体の有効量と接触させる。本明細書において特許請求される抗体および方法を使用する死滅のために標的とされ得るB7H6発現細胞として、いくつか例を挙げると、例えば、結腸癌細胞、肝臓癌細胞、子宮頸癌細胞、肺癌細胞、膵臓癌細胞、前立腺癌細胞、原血球性白血病細胞、B細胞リンパ腫細胞、単球性リンパ腫細胞、赤白血病細胞、パーキットリンパ腫細胞および慢性骨髄性白血病細胞などの例えば、癌細胞が挙げられる。

30

40

【0037】

本発明のこれらおよびその他の態様は、以下の詳細な説明を参照すると明らかとなる。さらに、種々の参考文献が以下に特定されており、その全文が出典明示により本明細書に組み込まれる。

【0038】

II. 定義

別に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術および科学用語は、

50

記載される方法および組成物に関する当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。本明細書において、以下の用語および語句は、別に明記されない限り、それに帰する意味を有する。

【0039】

本明細書において、「a」、「an」および「the」は、文脈が明確に他を示すのではない限り、複数の指示物を含む。

【0040】

「ポリペプチド」は、天然に生成したものであろうと、合成によって製造されたものであろうと、ペプチド結合によって連結しているアミノ酸残基のポリマーである。約10個未満のアミノ酸残基のポリペプチドは、一般に、「ペプチド」と呼ばれる。

10

【0041】

「タンパク質」は、1つまたは複数のポリペプチド鎖を含む高分子である。タンパク質はまた、炭水化物基などの非ペプチド構成要素を含む場合もある。炭水化物およびその他の非ペプチド置換基が、タンパク質が産生される細胞によってタンパク質に付加されている場合もあり、細胞の種類に応じて変わる。本明細書において、タンパク質は、そのアミノ酸骨格構造の点で定義される。炭水化物基などの置換基は、一般に、特定されないが、それにもかかわらず、存在する場合もある。

【0042】

「単離されたポリペプチド」とは、夾雑する細胞構成成分、例えば、炭水化物、脂質または自然界においてポリペプチドに結合しているその他のタンパク質性不純物を本質的に含まないポリペプチドである。通常、単離されたポリペプチドの調製物は、高度に精製された形態の、すなわち、少なくとも約80%純粋な、少なくとも約90%純粋な、少なくとも約95%純粋な、95%超純粋な、例えば、96%、97%もしくは98%以上純粋な、または99%超純粋なポリペプチドを含有する。特定のタンパク質調製物が、単離されたポリペプチドを含有することを示す1つの方法は、タンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびゲルのクマシーブリリアントブルー染色後の単一バンドの出現によってである。しかし、用語「単離された」とは、二量体などの代替の物理的形態、または代替としてグリコシル化された形態もしくは誘導体化された形態の同一のポリペプチドの存在を排除しない。

20

【0043】

本明細書において、用語「アミノ末端」および「カルボキシル末端」は、ポリペプチド内の位置を示すために使用される。文脈が許す場合には、これらの用語は、ポリペプチドの特定の配列または部分に関して、近接または相対位置を示すために使用される。例えば、ポリペプチド内の参照配列に対してカルボキシル末端に位置する特定の配列は、参照配列のカルボキシル末端に近接して位置しているが、必ずしも、完全ポリペプチドのカルボキシル末端にあるわけではない。

30

【0044】

用語「発現」とは、遺伝子産物の生合成を指す。例えば、構造遺伝子の場合には、発現は、構造遺伝子のmRNAへの転写およびmRNAの1種または複数のポリペプチドへの翻訳を伴う。

40

【0045】

本明細書において、用語「免疫調節物質」は、サイトカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、共刺激分子、造血因子などおよびこれらの分子の合成類似体を包含する。

【0046】

本明細書において、用語「抗体」とは、免疫グロブリンポリペプチドおよび免疫グロブリンポリペプチド、すなわち、免疫グロブリンファミリーのポリペプチドの免疫学的に活性な部分または特異的抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位(例えば、B7H6の細胞外ドメイン)を含有するそれらの断片を指す。

【0047】

「抗イディオタイプ抗体」とは、免疫グロブリンの可変領域ドメインと結合する抗体で

50

ある。これに関連して、抗イディオタイプ抗体は、抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体の可変領域と結合し、したがって、抗イディオタイプ抗体は、B 7 H 6 のエピトープを模倣する。

【0048】

「抗体断片」とは、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab などといった抗体の一部である。抗体断片は、構造にかかわらず、無傷の抗体によって認識される同一抗原と結合する。例えば、抗 B 7 H 6 モノクローナル抗体断片は、B 7 H 6 のエピトープと結合する。

【0049】

用語「抗体」とは、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」断片、軽鎖可変領域からなるポリペプチド、軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリinkerによって連結している組換え一本鎖抗体（「scFvタンパク質」）、超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位などといった遺伝子操作された無傷の抗体または断片ならびに合成抗原結合ペプチドおよびポリペプチドも包含する。

【0050】

「キメラ抗体」とは、げっ歯類抗体に由来する可変ドメインと相補性決定領域とを含有するが、抗体分子の残部はヒト抗体に由来する組換えタンパク質である。

【0051】

「ヒト化抗体」とは、モノクローナル抗体の非ヒト（例えば、マウス）相補性決定領域が、非ヒト免疫グロブリンの重鎖および軽鎖可変鎖からヒト可変ドメインに移植されている組換えタンパク質である。非ヒト（例えば、マウス）抗体に由来する、ヒトにおいて治療的に使用するためのヒト化抗体、例えば、ヒトタンパク質と結合するか、またはそれを中和するものの構築は、当業者の技能の範囲内にある。

【0052】

本明細書において、用語「Fc断片」、「Fc領域」または「Fcドメイン」とは、同義語であり、細胞上の抗体受容体および補体の C 1 q 成分との結合に関与する抗体の一部を指す。Fc は、タンパク質結晶を容易に形成する抗体の断片である「結晶性断片」の略である。タンパク質分解消化によって最初に記載された、別個のタンパク質断片が、免疫グロブリンタンパク質の全体的な一般構造を規定する場合もある。文献において最初に規定されたように、Fc断片は、ジスルフィド結合している重鎖ヒンジ領域、 C_H2 および C_H3 ドメインからなる。しかし、より最近、この用語は、 C_H3 、 C_H2 と、第2のこのような鎖とジスルフィド結合二量体を形成するのに十分なヒンジの少なくとも一部とからなる一本鎖に適用された。免疫グロブリン構造および機能の概説については、Putnam, The Plasma Proteins, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), pp. 49-140 および Padlan, Mol. Immunol. 31:169-217, 1994 を参照のこと。本明細書において、用語 Fc は、天然に存在する配列の変異体を包含する。

【0053】

本明細書において、用語「一本鎖 Fc」、「一本鎖 Fc ドメイン」および「scFc」は、同義語であり、2つの Fc モノマーが二量体形成して、Fc 受容体と結合できる機能的、二量体 Fc ドメインを形成できるよう、柔軟性 (flexible) リンカーによって連結している2つの Fc ドメインモノマーを含むポリペプチド融合物を指す。一本鎖 Fc ポリペプチドは、「Single Chain Fc, Methods of Making, and Methods of Treatment」と題された国際 PCT 特許出願公開第 WO 08 / 013124 2 号にさらに記載され、その開示内容は、参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

【0054】

本明細書において、用語「ADCC 活性を有する Fc 領域」とは、Fc 受容体を発現する細胞溶解性免疫エフェクター細胞（例えば、NK 細胞または $CD8^+T$ 細胞）上の細胞溶解性 Fc 受容体（例えば、Fc $\gamma R1$ ）の結合を介して抗体依存性細胞毒性 (ADCC) を媒介できる Fc ドメインを指す。

【0055】

10

20

30

40

50

用語「補体」とは、抗原結合抗体とともに、細胞を溶解する能力を示す正常血清中の構成要素を総称する。補体は、協力して、順序だてて作用し、その効果を発揮する血清タンパク質の群からなる。

【0056】

本明細書において、用語「古典的な補体経路」および「古典的な補体系」とは、同義語であり、補体の活性化のための特定の経路を指す。古典的経路は、開始のために抗原-抗体複合体を必要とし、C1からC9と表される9種の主要タンパク質構成要素の順序だった活性化を伴う。活性化プロセス中のいくつかの工程では、生成物は、その後の工程を触媒する酵素である。このカスケードは、比較的小さい初期シグナルによる多量の補体の増幅および活性化を提供する。

10

【0057】

本明細書において、用語「CDC活性を有するFc領域」とは、C1q補体タンパク質の結合および古典的補体系の活性化を介して補体依存性細胞毒性(CDC)を媒介できるFcドメインを指す。

【0058】

本明細書において、用語「薬剤」とは、要素、化合物または例えば、医薬品、治療用化合物もしくは薬理的化合物を包含するその他の分子実体を意味する。薬剤は、天然であっても、合成であっても、その組合せであってもよい。「治療薬」は、単独または別の薬剤と組み合わせてのいずれかで(例えば、プロドラッグと組み合わせたプロドラッグ変換酵素)、細胞または組織に対して(例えば、B7H6を発現する癌細胞などのB7H6を発現する細胞または組織に対して)治療的(例えば、有益な)効果を発揮する薬剤である。本発明の特定の態様では、「治療薬」とは、治療にとって有用であるコンジュゲートを生成するよう抗体とコンジュゲートしている薬剤である。治療薬の例として、薬物、毒素、免疫調節物質、キレート剤、ホウ素化合物、光活性薬または色素および放射性同位体が挙げられる。いくつかのバリエーションでは、抗体とコンジュゲートさせるための治療薬は、細胞毒性または細胞分裂阻害効果を発揮する薬剤である。

20

【0059】

細胞に対する薬剤の効果に関して「細胞毒性効果」とは、細胞を死滅させることを意味する。「細胞分裂阻害効果」とは、細胞増殖の阻害を意味する。「細胞毒性薬剤」とは、細胞に対して細胞毒性または細胞分裂阻害効果を有し、それによって、細胞集団内の細胞をそれぞれ枯渇させるか、またはその成長を阻害する薬剤を意味する。

30

【0060】

「検出可能な標識」とは、抗体部分とコンジュゲートさせて、診断にとって有用な分子を生成できる分子または原子である。検出可能な標識の例として、キレート剤、光活性薬、放射性同位体、蛍光剤、常磁性イオンまたはその他のマーカー部分が挙げられる。

【0061】

本明細書において、用語「親和性タグ」とは、第2のポリペプチドと結合させて、第2のポリペプチドの精製もしくは検出を提供または基質との第2のポリペプチドの結合のための部位を提供できるポリペプチドセグメントを示すよう使用される。原則として(In principal)、抗体もしくはその他の特定の結合剤を利用可能である任意のペプチドまたはタンパク質を、親和性タグとして使用できる。親和性タグとして、ポリヒスチジントラクト、プロテインA(Nilsson et al., EMBO J. 4:1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3, 1991)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(Smith and Johnson, Gene 67:31, 1988)、Glu-Glu親和性タグ(Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952, 1985)、サブスタンスP、FLAGペプチド(Hopp et al., Biotechnology 6:1204, 1988)、ストレプトアビジン結合ペプチドまたはその他の抗原性エピトープもしくは結合ドメインが挙げられる。全般的には、Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95, 1991を参照のこと。親和性タグをコードするDNA分子は、商業的供給業者(例えば、Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)から入手可能である。

40

50

【 0 0 6 2 】

「裸の抗体」とは、治療薬とコンジュゲートしていない、抗体断片とは対照的な全抗体である。裸の抗体は、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方ならびにキメラおよびヒト化抗体などの特定の組換え抗体を包含する。

【 0 0 6 3 】

用語「モノクローナル抗体」とは、それが製造される方法ではなく、任意の真核細胞もしくは原核細胞クローンまたはファージクローンを包含する単細胞クローンに由来する抗体を指す。したがって、本明細書において、用語「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマ技術によって製造された抗体に制限されない。

【 0 0 6 4 】

「イムノコンジュゲート」とは、抗体の治療薬または検出可能な標識とのコンジュゲートである。

【 0 0 6 5 】

用語「エピトープ」とは、免疫グロブリン (immunoglobulin) または T 細胞受容体との特異的結合が可能な任意のタンパク質決定基を指す。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面集団 (surface groupings) からなり、通常、特定の三次元構造特徴ならびに特定の電荷特徴を有する。さらに詳しくは、本明細書において、用語「B7H6 エピトープ」とは、動物、好ましくは、哺乳類、最も好ましくは、マウスまたはヒトにおいて抗原活性または免疫原活性を有する B7H6 ポリペプチドの一部を指す。免疫原活性を有するエピトープは、動物において抗体反応を誘発する B7H6 ポリペプチドの一部である。抗原活性を有するエピトープは、当技術分野で周知の任意の方法によって、例えば、イムノアッセイによって決定される、抗体が免疫特異的に結合する B7H6 ポリペプチドの一部である。抗原性エピトープは、必ずしも免疫原性であるわけではない。「不連続エピトープ」は、B7H6 タンパク質の一次配列における少なくとも 2 つの別個の領域から形成される立体構造的エピトープである。立体構造的エピトープは、変性溶媒の存在下では (例えば、ウエスタンブロット分析において) 特異的に結合する能力を失う。

【 0 0 6 6 】

本明細書において、「NK 細胞活性」とは、NK 細胞細胞溶解性活性を指す。このような活性を検出および / またはモニタリングするために、それだけには限らないが、本明細書に提供される実施例に記載されるアッセイを包含する当業者に周知の多数のアッセイがある。

【 0 0 6 7 】

本明細書において、語句「B7H6 および NK p30 の相互作用」とは、B7H6 受容体および / または NK p30 の刺激ならびに関連細胞内シグナル伝達をもたらす、機能的 B7H6 受容体の、NK 細胞上の NK p30 との直接的な物理的相互作用 (例えば、結合) および / またはその他の間接的な相互作用を指す。

【 0 0 6 8 】

本明細書において、用語「遮断抗体」とは、B7H6 および NK p30 の相互作用を干渉する (すなわち、阻害する) 抗体および / または例えば、細胞溶解性活性によって測定される、B7H6 の NK 細胞活性を誘発する能力を干渉する抗体を指す。阻害は、完全である必要はなく、「部分的」、すなわち、対照または標準に対する相対測定値としての活性の減少または低減であってもよい。

【 0 0 6 9 】

本明細書において、語句「B7H6 発現細胞の存在を特徴とする疾患または障害」とは、少なくとも幾分かは、B7H6 を発現する病原性細胞を伴う任意の疾患または障害を指す。このような病原性細胞として、例えば、特定の腫瘍細胞が挙げられる。したがって、B7H6 発現細胞の存在を特徴とする通常疾患または障害として、特定の癌が挙げられる。このような疾患および障害は、本明細書にさらに記載されるような B7H6 発現細胞を標的とするための特定の治療法に特に適している。

10

20

30

40

50

【0070】

用語「NK p 30を発現する細胞によって媒介される疾患または障害」および「NK p 30を発現する細胞の活性の増大と関連している疾患または障害」は、本明細書において同義的に使用され、少なくとも幾分かは、NK p 30を発現する細胞の細胞溶解性活性によって媒介される病理を有する任意の疾患または障害を指す。いくつかのバリエーションでは、NK p 30を発現する細胞によって媒介される疾患または障害として、少なくとも幾分かは、NK細胞細胞溶解性活性によって媒介される病理を有する「NK細胞媒介性疾患または障害」がある。このような疾患または障害の一例として、骨髓細胞(BMC)同種移植片の急性拒絶がある。このような疾患または障害は、本明細書にさらに記載されるようなNK細胞活性を阻害するための特定の治療法に特に適している。

10

【0071】

本明細書に記載される、対象に、遮断性抗B7H6抗体を投与することによる、NK p 30を発現する細胞によって媒介される疾患もしくは障害の治療との関連で、または本明細書に記載される、対象に、抗B7H6抗体もしくは抗体-薬物コンジュゲートを投与することによる、B7H6発現細胞の存在を特徴とする疾患もしくは障害の治療との関連で、用語「有効量」とは、対象において疾患または障害の1種または複数の臨床症状または診断症状の発生を阻害するか、またはそれを寛解させるのに十分であるこのような分子の量を指す。「有効な投与計画」で本発明の方法に従って、有効量の薬剤を投与する。用語「有効な投与計画」とは、疾患または障害の治療または予防を達成するのに適当な投与される薬剤の量の組合せおよび投与頻度を指す。

20

【0072】

標準分析法の不正確さのために、分子量およびポリマーの長さは、近似値であると理解される。このような値が、「約」Xまたは「およそ」Xとして表される場合には、Xという示される値は、±10%まで正確であると理解されよう。

【0073】

III. B7H6タンパク質に対する抗体

一態様では、本発明は、ヒトB7H6のエピトープと(例えば、配列番号2の残基25~266に示されるアミノ酸配列に由来するポリペプチドセグメントと)特異的に結合する抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を提供する。いくつかのバリエーションでは、提供される抗ヒトB7H6モノクローナル抗体は、B7H6-NK p 30相互作用を阻害できる。阻害は、B7H6-NK p 30相互作用の完全な遮断である必要はなく、対照または標準に対する相対測定値としての活性の減少または低減であってもよい。特定の実施形態では、本発明に従うモノクローナル抗ヒトB7H6抗体は、ヒトB7H6抗原との結合について、4E5.5(受託番号CNCM I-4242)、9G9.2(受託番号CNCM I-4243)、10E2.9(受託番号CNCM I-4244)または17B1.3(受託番号CNCM I-4245)から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合できる。これら4種のハイブリドーマは、Institut National De La Sante et De La Recherche Medicale(INSERM)の名前で、2009年11月18日にthe Collection Nationale de Cultures de Microorganismes(CNCM、Institut Pasteur; Paris, France)に寄託された。

30

40

【0074】

5種のマウス抗ヒトB7H6モノクローナル抗体が同定および特性決定された。これらは、本明細書に記載されている。抗体の特性決定によって、これらのモノクローナル抗体のうち特定のものは、競合結合アッセイによって示され、本明細書に開示されるB7H6タンパク質上の異なるエピトープを認識することが実証された。抗体の特性決定によって、抗体のうち2種は、B7H6-NK p 30相互作用を少なくとも部分的に遮断することがさらに実証された。

【0075】

50

特許請求される発明の範囲内に入る抗体を同定するために、エピトープビニング (epitope binning) を使用してもよい。エピトープビニングとは、競合結合アッセイを使用して、B7H6タンパク質と同時に結合できるか、結合できない抗体の対を同定し、それによって、タンパク質上の同一または重複するエピトープと結合する抗体の対を同定することを指す。エピトープビニング実験は、抗原的に別個のエピトープが存在するという証拠を提供する。エピトープを同定するか、またはB7H6タンパク質分子の特定のアミノ酸配列もしくは位置に「マッピング」するには、さらなるデータが必要である。

【0076】

結合の競合は、任意の対の抗体または断片について評価できる。例えば、適当な検出試薬を使用して、任意の供給源に由来する抗体または結合断片の結合特異性を、本明細書に開示されるモノクローナル抗体の結合特異性と比較できる。エピトープビニングは、「単離された抗体」を用いて実施しても、細胞培養上清を用いて実施してもよい。ビニングは、さらに開発されるべきクローンの選択を導くために、第1ラウンドのクローン上清を用いて実施することが多い。比較される抗体は、実質的に同種の抗原結合ドメインであるべきである。「二重特異性」または「二官能性」抗体の場合には、2種の異なる結合部位の結合特異性を、独立に評価するか、ビニングする必要がある。

【0077】

本発明の抗体は、当技術分野で公知の任意の方法によって特異的結合についてアッセイしてもよい。エピトープビニングのために、多数の異なる競合結合アッセイ形式 (単数または複数) を使用してよい。使用できるイムノアッセイとして、それだけには限らないが、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素アッセイ、ゲル拡散沈降素アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイおよび補体固定アッセイのような技術を使用する競合アッセイ系が挙げられる。このようなアッセイは、日常的なものであり、当技術分野で周知である (例えば、Ausubel et al., eds, 1994 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., New York参照のこと)。さらに、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane, 1988に記載されるものなどの日常的な交差遮断アッセイを実施してもよい。

【0078】

BIA CORE (登録商標) (GE Healthcare, Piscataway, NJ) は、モノクローナル抗体のエピトープビニングパネルに日常的に使用される種々の表面プラズモン共鳴アッセイ形式の1つにすぎない。その他の参考文献、例えば、The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn Morris ed. Humana Press, 1996には、抗体と結合するために使用でき、抗体のB7H6リガンドとの結合特異性に関して匹敵する情報を提供すると期待される代替法が記載されている。BIA CORE (登録商標) システムを使用する場合には、エピトープビニング実験は、可溶性の、天然または組換え抗原を用いて実施する。エピトープビニング研究は、BIA CORE 1000 (登録商標) システム (GE Healthcare, Piscataway, NJ) で実施してもよい。runメソッドをプログラムするためにBIAlogue (登録商標) v. 1.2ソフトウェアを使用してもよい。例えば、B7H6に対して作製したマウスモノクローナル抗体をビニングするために、ポリクローナルヤギ抗マウスIgG Fc抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) を、BIA CORE (登録商標) CM5センサーチップに共有結合によって固定し、試験シリーズの一次モノクローナル抗体をチップに結合 (捕獲) するために使用してもよい。次いで、チップ上の非占有のFc結合部位をポリクローナルIgG Fc断片 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を使用してブロックする。続いて、B7H6タンパク質を注入し、捕獲された一次モノクローナル抗体と特異的に結合することを可能にする。BIA CORE (登録商標) 機器は、センサーチップと結合しているタンパク質の質量を測定し、一

次抗体および B 7 H 6 抗原両方の結合は各サイクルについて確認してもよい。チップに一次抗体および抗原を結合した後、可溶性二次抗体を注入し、予め結合している抗原との結合を可能にする。二次モノクローナル抗体は、一次モノクローナル抗体と同時に B 7 H 6 抗原と結合でき、その結合は、B I A C O R E (登録商標)によって検出される。しかし、二次モノクローナル抗体が一次モノクローナル抗体と同時に B 7 H 6 抗原と結合できない場合には、追加の結合は検出されない。各モノクローナル抗体を、自身に対して陰性対照として試験して、バックグラウンド(結合なし)シグナルのレベルを確立する。

【0079】

抗体をピニングするために非標識競合 E L I S A 形式 (L F C - E L I S A) を使用してもよい。この方法は、Nagata et al., J. Immunol. Methods 292:141-155, 2004によって記載されており、ビオチン化 B 7 H 6 を利用する。B 7 H 6 に対して作製したマウスモノクローナル抗体のピニングの実施例のために、E L I S A B (P B S 、 0 . 1 % T w e e n 2 0 、 1 % B S A) に希釈した $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ のヤギ抗マウス I g G F c - 特異的抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h) を用いて $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ でマイクロタイタープレートをコーティングする。このコーティング抗体を周囲温度で3時間結合させた後、各 m A b 含有コンディショニング培地を、E L I S A B に希釈し、 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ のおよその m A b 濃度とし、4 で一晩ヤギ抗マウス I g G でコーティングされたプレートと結合させる (m A b 番号 1) 。並行して、第 2 のセットのコンディショニング培地 (m A b 番号 2) を、ポリスチレン試験管中で E L I S A B におよそ $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ m A b に希釈し、 $50 \text{ng} / \text{mL}$ のビオチン化 B 7 H 6 抗原と混合し、4 で一晩インキュベートする。m A b 番号 1 をコーティング抗体とともにインキュベートした後、プレートを無関係の抗体を用いてブロッキングして、プレート上の非占有結合部位を飽和させる。m A b 番号 2 - ビオチン - B 7 H 6 混合物をプレートに加え、結合させる。アッセイにおける (非競合) のための対照として、固定化された m A b 番号 1 を含有するウェルに $50 \text{ng} / \text{mL}$ のビオチン化 B 7 H 6 を直接 (m A b 番号 2 とともにプレインキュベートすることなく) 加える。ビオチン化 B 7 H 6 - m A b 番号 2 複合体とともにインキュベートした後、プレートにストレプトアビジン - H R P (P i e r c e 、 R o c k f o r d 、 I l l .) を $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ で加える。プレートを T M B 基質 (B i o F X L a b o r a t o r i e s 、 O w i n g s M i l l s 、 M d .) を用いて発色させ、 450nm での個々のウェルの吸光度をプレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s S P E C T R A M A X 340 、 S u n n y v a l e 、 C a l i f .) を用いて測定する。m A b 番号 1 が、m A b 番号 2 とは異なるエピトープと結合する場合には、ビオチン - B 7 H 6 - m A b 番号 2 複合体は、プレートと結合し、高い吸光度読み取り値をもたらす。m A b 番号 1 が、m A b 番号 2 と同一のエピトープと結合する場合には、ビオチン - B 7 H 6 - M A b 番号 2 複合体は、プレートと結合せず、低い吸光度読み取り値をもたらす。

【0080】

いくつかの実施形態では、本発明の抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体は、B 7 H 6 のヒト N K p 3 0 との相互作用を阻害でき、このような抗体は、例えば、B 7 H 6 - および / または N K p 3 0 - 媒介性細胞内シグナル伝達ならびに関連エフェクター機能 (例えば、N K p 3 0 媒介性細胞溶解性活性) を包含する、例えば、B 7 H 6 の N K p 3 0 との相互作用と関連している細胞事象またはその他の生理学的事象を阻害するために有用である。

【0081】

B 7 H 6 に対する抗体は、例えば、B 7 H 6 発現ベクターの生成物または天然供給源から単離された B 7 H 6 を抗原として使用して得ることができる。特に有用な抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体は、B 7 H 6 と「特異的に結合する」。抗体は、以下の 2 つの特性 : (1) 抗体が、閾値レベルの結合活性で B 7 H 6 と結合する、および (2) 抗体が、B 7 H 6 と関連しているポリペプチドと大きく交差反応しない、のうち少なくとも 1 つを示す場合に、特異的に結合していると考えられる。

10

20

30

40

50

【0082】

第1の特徴に関しては、抗体は、 10^6 M^{-1} 以上の、好ましくは、 10^7 M^{-1} 以上の、より好ましくは、 10^8 M^{-1} 以上の、最も好ましくは、 10^9 M^{-1} 以上の結合親和性 (K_d) で B7H6 ポリペプチド、ペプチドまたはエピトープと結合する場合に特異的に結合する。抗体の結合親和性は、例えば、スキャッチャード解析法 (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660, 1949) によって当業者によって容易に決定できる。第2の特徴に関しては、抗体は、例えば、標準ウエスタンブロット解析を使用して B7H6 を検出するが、現在知られているポリペプチドを検出しない場合には、関連ポリペプチド分子と大きく交差反応しない。既知関連ポリペプチドの例として、既知 B7ファミリーメンバーが挙げられる。

10

【0083】

抗ヒト B7H6 モノクローナル抗体は、抗原性 B7H6 エピトープ保有ペプチドおよびポリペプチドを使用して製造できる。抗原性エピトープ保有ペプチドおよびポリペプチドは、通常、配列番号2のアミノ酸配列内に含有される少なくとも9個または15個～約30個のアミノ酸の配列を含有する。しかし、30個～50個のアミノ酸または最大 B7H6 ポリペプチドの全アミノ酸配列を含めた任意の長さを含含有する、本発明のアミノ酸配列の大きな部分を含むペプチドまたはポリペプチドも、B7H6 と結合する抗体を誘導するのに有用である。エピトープ保有ペプチドのアミノ酸配列が、水性溶媒における実質的な溶解度を提供するように (すなわち、配列が比較的親水性の残基を含み、一方で、疎水性残基は通常避けられる) 選択されることが望ましい。さらに、プロリン残基を含有するアミノ酸配列も、抗体製造にとって望ましいものであり得る。

20

【0084】

B7H6 中の潜在的抗原性部位は、LASERGENE (DNASTAR; Madison, WI) の PROTEAN プログラム (バージョン 3.14) によって実施される、Jameson-Wolf 法、Jameson and Wolf (CABIOS 4:181, 1988) を使用して同定できる。この分析においてデフォルトパラメータを使用してもよい。

【0085】

Jameson-Wolf 法は、タンパク質構造予測のための6つの主要なサブルーチンを組み合わせるによって潜在的抗原決定基を予測する。例えば、Hopp-Woods 法 (Hopp et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 78:3824, 1981 参照のこと) をまず使用して、最大の局所親水性の区域に相当するアミノ酸配列を同定してもよい (パラメータ: 平均7残基)。第2の工程では、Emini 法 (Emini et al., J. Virology 55:836, 1985 参照のこと) を使用して、表面の可能性 [パラメータ: 表面決定閾値 (0.6) = 1] を算出してもよい。第3に、Karplus-Schultz 法、Karplus and Schultz (Naturwissenschaften 72:212, 1985) を使用して、骨格鎖の柔軟性 [パラメータ: 柔軟性閾値 (0.2) = 1] を予測してもよい。分析の第4および第5の工程では、Chou-Fasman の方法 [Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation 549-586 (Fasman, ed., Plenum Press 1990) 中の Chou, 「Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition」参照のことおよび Garnier-Robson の方法 (Garnier et al., J. Mol. Biol. 120:97, 1978 参照のこと) を使用して、データに二次構造予測を適用してもよい (Chou-Fasman パラメータ: コンホメーション表 = 64 タンパク質; 領域閾値 = 103 ; 領域閾値 = 105 ; Garnier-Robson パラメータ: および 決定定数 = 0)。第6のサブルーチンでは、柔軟性パラメータおよびハイドロパシー/溶媒露出係数を組み合わせて、「抗原性指数」と呼ばれる表面輪郭形状値を決定してもよい。最後に、抗原性指数に、例えば、内部領域に対する表面領域の移動度に由来するさらなる自由エネルギーを説明するためにそれぞれのピーク値の 20 、 40 、 60 または 80% を加えることによって主要な表面ピークを広げるピーク広がり関数を適用してもよい。しかし、この算出は、通常、ヘリックス領域中に存在する任意の主要なピークには適用されないが、これは、ヘリックス領域があまり柔軟性でない傾向があるためである。

30

40

50

【 0 0 8 6 】

モノクローナル抗体を作製する方法は、一般に知られている。例えば、特定の抗原に対するげっ歯類モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって得ることができる [例えば、Kohler et al., Nature 256:495, 1975; Coligan et al. (eds.), Current Protocols in Immunology, Vol. 1 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) [「Coligan」]; DN A Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition 93 (Glover et al., eds., Oxford University Press 1995中のPicksley et al., 「Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli」参照のこと]。特定のバリエーションでは、モノクローナル抗体は、B 7 H 6 遺伝子産物 (例えば、配列番号 2 残基 2 5 ~ 2 6 6 を含むか、またはからなるポリペプチド) を含む組成物を用いてマウスに注射することと、血清サンプルを採取することによって抗体産生の存在を確認することと、B リンパ球を得るために脾臓を採取することと、B リンパ球を骨髓腫細胞と融合して、ハイブリドーマを製造することと、ハイブリドーマをクローニングすることと、抗原に対する抗体を産生する陽性クローンを選択することと、抗原に対する抗体を産生するクローンを培養することと、ハイブリドーマ培養物から抗体を単離することによって得られる。

10

【 0 0 8 7 】

抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体はまた、ヒトモノクローナル抗体またはそれに由来する抗体である場合もある。ヒトモノクローナル抗体は、例えば、抗原投与に応じて特異的なヒト抗体を産生するよう操作されたトランスジェニックマウスから得ることができる。この技術では、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子座の要素が、内因性重鎖および軽鎖遺伝子座の標的とされる破壊を含有する胚幹細胞株に由来するマウスの系統に導入される。トランスジェニックマウスは、ヒト抗原に特異的なヒト抗体を合成でき、これらのマウスを使用してヒト抗体を分泌するハイブリドーマを製造できる。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得る方法は、例えば、Green et al., Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg et al., Nature 368:856, 1994; および Taylor et al., Int. Immun. 6:579, 1994 によって記載されている。

20

【 0 0 8 8 】

モノクローナル抗体を作製または選択するための代替技術として、例えば、B 7 H 6 タンパク質またはペプチドに対するリンパ球のインビトロ曝露およびファージまたは同様のベクターにおける抗体ディスプレイライブラリーからの抗体の選択 (例えば、固定化または標識した B 7 H 6 タンパク質またはペプチドの使用による) が挙げられる。このような抗体ディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするための技術は、当技術分野で公知である (例えば、米国特許第 5, 5 8 0, 7 1 7 号; 同第 5, 8 8 5, 7 9 3 号; 同第 5, 9 6 9, 1 0 8 号; および同第 6, 0 4 0, 1 3 6 号を参照のこと)。

30

【 0 0 8 9 】

モノクローナル抗体は、種々の十分に確立された技術によって細胞培養物から単離および精製してもよい。このような単離技術として、例えば、プロテイン A セファロースを用いるアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーが挙げられる [例えば、2.7.1-2.7.12 頁および 2.9.1-2.9.3 頁の Coligan; Methods in Molecular Biology (Vol. 10) 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992) 中の Baines et al., 「Purification of Immunoglobulin G (IgG)」参照のこと]。

40

【 0 0 9 0 】

モノクローナル抗体のアミノ酸配列は、組換え DNA 技術の適用によって変えてもよい。したがって、抗体を、所望の特徴を得よう再設計してもよい。改変された抗体は、例えば、その非改変形態に対して改善された安定性および / または治療効力を提供し得る。可能性あるバリエーションは多数あり、例えば、可変領域または定常領域のたった 1 個または数個のアミノ酸の変更から完全な再設計までに及ぶ。定常領域の変更は、一般に、補体結合、膜との相互作用およびその他のエフェクター機能などの特徴を改善または変更するために行われる。通常、可変領域の変更は、抗原結合特徴を改善するため、可変領域安定性を改善するため、または免疫原性の危険を低減するために行われる。ファージディス

50

プレイ技術も使用してもよい。例えば、Huse et al., Science 246:1275-1281, 1989; Ladner et al., 米国特許第 5, 571, 698 号参照のこと。

【0091】

いくつかの実施形態では、抗ヒト B7H6 モノクローナル抗体は、無傷の（全）抗体の抗原 - 結合ドメインを含む抗体断片である。このような抗体断片は、例えば、抗体のタンパク質分解性加水分解によって得ることができる。抗体断片は、従来法による全抗体のペプシンまたはパイン消化によって得てもよい。例示として、抗体断片を、ペプシンを用いる抗体の酵素的切断によって製造し、 $F(ab')_2$ と示される 5S 断片を提供してもよい。この断片を、チオール還元剤を使用してさらに切断し、3.5S Fab' 一価断片を製造してもよい。所望により、ジスルフィド結合の切断に起因するスルフヒドリル基のブロッキング基を使用して切断反応を実施してもよい。代替として、ペプシンを使用する酵素的切断によって、2つの一価 F_a F_b 断片および F_c 断片を直接的に生成する。これらの方法は、例えば、Goldenberg の米国特許第 4, 331, 647 号; Nisonoff et al., Arch Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman et al., in Methods in Enzymology (Vol. 1) 422 (Academic Press 1967); ならびに 2.8.1-2.8.10 頁および 2.10.-2.10.4 頁の Coligan に記載されている。

10

【0092】

断片が、無傷の抗体によって認識される抗原と結合する限り、重鎖を分離して一価軽鎖 - 重鎖断片を形成すること、断片のさらなる切断またはその他の酵素的、化学的もしくは遺伝的技術などの抗体を切断するその他の方法も使用してよい。

20

【0093】

例えば、 F_v 断片は、 V_H および V_L 鎖の結合を含む。この結合は、Inbar et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659, 1972 によって記載されるように非共有結合であり得る。あるいは、可変鎖は、分子間ジスルフィド結合によって連結している場合も、グルタルアルデヒドなどの化学物質によって架橋している場合もある（例えば、Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992 参照のこと）。

【0094】

F_v 断片は、ペプチドリinker によって連結している V_H および V_L 鎖を含み得る。これらの一本鎖抗原結合タンパク質 ($s c F_v$) は、オリゴヌクレオチドによって連結している V_H および V_L ドメインをコードする DNA 配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製する。構造遺伝子を、発現ベクターに挿入し、これを用いて、イー・コリ (*E. coli*) などの宿主細胞に導入する。組換え宿主細胞は、2つの V ドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一のポリペプチド鎖を合成する。 $s c F_v$ を製造する方法は、例えば、Whitlow et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97, 1991 によって記載されている。（Bird et al., Science 242:423, 1988; Ladner et al. の米国特許第 4, 946, 778 号; Pack et al., Bio/Technology 11:1271, 1993 および Sandhu, 前掲も参照のこと。）例示として、 $s c F_v$ は、B7H6（例えば、固定化または標識された B7H6 タンパク質またはペプチド）との特異的結合について、 $s c F_v$ のライブラリー（例えば、 $s c F_v$ をディスプレイしたファージ）をスクリーニングすることによって得ることができる。

30

40

【0095】

抗体断片の別の形態として、単一の相補性決定領域 (CDR) のペプチドコーディングがある。CDR ペプチド（「最小認識単位」）は、対象とする抗体の CDR をコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。このような遺伝子は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して、抗体産生細胞の RNA から可変領域を合成することによって調製する [例えば、Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application 166 (Ritter et al., eds., Cambridge University Press 1995) 中の Courtenay-Luck, 「Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies」; および Monoclonal Antibodies: Principles and Applications 137 (Birch et al., eds., Wiley-Liss, Inc. 1995) 中

50

のWard et al., 「Genetic Manipulation and Expression of Antibodies参照のこと」。

【0096】

あるいは、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体は、非ヒト抗B7H6抗体に由来する「ヒト化」モノクローナル抗体であってもよい。ヒト化モノクローナル抗体は、非ヒト（例えば、マウス）相補性決定領域を非ヒト免疫グロブリンの重鎖および軽鎖可変鎖からヒト可変ドメインへ移植することによって製造する。次いで、非ヒト対応物のフレームワーク領域において、ヒト抗体の通常の残基が置換される。ヒト化モノクローナル抗体の使用によってマウス定常領域の免疫原性と関連する潜在的問題が取り除かれる。マウス免疫グロブリン可変ドメインをクローニングするための一般技術は、例えば、Orlandi et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:3833, 1989によって記載されている。ヒト化モノクローナル抗体を製造する技術は、例えば、Jones et al., Nature 321:522, 1986; Carter et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992; Singer et al., J. Immunol. 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols (Humana Press, Inc. 1995); Protein Engineering: Principles and Practice 399-434 (Cleland et al., eds., John Wiley & Sons, Inc. 1996) 中のKelley, 「Engineering Therapeutic Antibodies」; およびQueen et alの米国特許第5,693,762号によって記載されている。

10

【0097】

特定のバリエーションでは、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体は、免疫グロブリン(Ig)重鎖のC_H2およびC_H3ドメインを含むFc領域と、通常は、Igヒンジ領域の一部とを含む。Fcは、IgGの高度に望ましい特性のうち2つ：エフェクター機能の動員および長い血清半減期に参与している。抗体が結合する標的細胞を死滅させる能力は、FcのそれぞれFc受容体および補体タンパク質、C1qとの結合による免疫エフェクター経路(ADCC)および補体経路(CDC)の活性化から生じる。結合は、下部のヒンジ領域および上部のC_H2ドメイン中に主に局在する残基によって媒介される。(例えば、Wines et al., J. Immunol. 164:5313, 2000; Woof and Burton, Nature Reviews 4:1, 2004参照のこと。) IgGによって実証される血清における長い半減期は、C_H2およびC_H3ドメイン中のアミノ酸と、新生児型Fc受容体、FcRn間のpH依存性相互作用によって媒介される。(例えば、Getie and Ward, Immunology Today 18:592, 1997; Petkova et al., Int. Immunol. 18:1759, 2006参照のこと。)

20

30

【0098】

したがって、Fc領域を含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体の特定の実施形態では、Fc領域は、ADCCおよび/またはCDC活性を有する。このような抗体は、例えば、癌細胞またはウイルス感染した細胞などのB7H6を発現する標的細胞の死滅を媒介するために特に有用である。その他の実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体は、1つまたは複数のエフェクター機能を欠く(例えば、ADCCおよび/またはCDC活性を欠く)Fc領域を含む。エフェクター機能を欠くか、または実質的に減少したエフェクター機能を有するFc領域は、例えば、Fc領域が、細胞溶解性Fc受容体および/またはC1q補体タンパク質と結合しない、または実質的に減少した結合を有するように、天然のFc領域配列に1個または複数のアミノ酸置換を導入することによって得ることができる。エフェクター機能を欠くか、または実質的に減少したエフェクター機能を有する種々の改変されたFc領域は、当技術分野で公知である。エフェクター機能を欠くか、または実質的に減少したエフェクター機能を有する特に適したFc領域として、例えば、米国特許出願公開第2009/0220502号に記載される変異体Fc領域が挙げられる。

40

【0099】

Fc領域を含む特定の実施形態では、Fc領域は、柔軟性(flexible)リンカーによって連結された2つのFcドメインモノマーを含む一本鎖Fc(scFc)であり、その結果、2つのFcモノマーが二量体を形成して、機能的、二量体Fcドメインを形成できる。例えば、scFcを含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体のいくつかのバリエーショ

50

ンでは、抗体は、s c F v 部分が B 7 H 6 と特異的に結合し、s c F c 部分と融合している一本鎖 F v (s c F v) を含む。s c F c と、もう 1 つの抗原 - 結合ドメイン (例えば、s c F v) とを含む融合ポリペプチドを包含する一本鎖 F c ポリペプチドは、「Single Chain Fc, Methods of Making, and Methods of Treatment」と題された国際 P C T 特許出願公開第 W O 0 8 / 0 1 3 1 2 4 2 号にさらに記載されており、その開示内容は参照によりその全文が本明細書に組み込まれる。

【 0 1 0 0 】

さらに、本発明の抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体断片は、当技術分野における、本明細書に記載される方法を使用して P E G 化することができる。

【 0 1 0 1 】

抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体は、検出可能な標識とコンジュゲートして、抗 B 7 H 6 イムノコンジュゲートを形成してもよい。適した検出可能な標識として、例えば、放射性同位元素、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識、生物発光標識またはコロイド金が挙げられる。このような検出可能に標識されたイムノコンジュゲートを作製および検出する方法は、当業者に周知であり、以下により詳細に記載する。

【 0 1 0 2 】

検出可能な標識は、オートラジオグラフィーによって検出される放射性同位元素であり得る。本発明の目的上、特に有用である同位元素として、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S および ^{14}C がある。

【 0 1 0 3 】

抗 B 7 H 6 イムノコンジュゲートはまた、蛍光化合物を用いて標識することができる。蛍光標識された抗体の存在は、イムノコンジュゲートを適切な波長の光に対して曝露することおよび得られた蛍光を検出することによって調べられる。蛍光標識性化合物として、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン (phycoerytherin) 、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルデヒドおよびフルオレサミンが挙げられる。

【 0 1 0 4 】

あるいは、抗 B 7 H 6 イムノコンジュゲートは、抗体を化学発光化合物とカップリングすることによって検出可能に標識することができる。化学発光タグのついたイムノコンジュゲートの存在は、化学反応の過程の間に生じる発光の存在を検出することによって調べられる。化学発光標識性化合物の例として、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルが挙げられる。

【 0 1 0 5 】

同様に、生物発光化合物を使用して、本発明の抗 B 7 H 6 イムノコンジュゲートを標識することができる。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を高める生物学的系に見られる化学発光の 1 種である。生物発光タンパク質の存在は、発光の存在を検出することによって調べられる。標識にとって有用である生物発光化合物として、ルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンが挙げられる。

【 0 1 0 6 】

あるいは、抗 B 7 H 6 イムノコンジュゲートは、抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体を酵素と連結することによって検出可能に標識することができる。抗 B 7 H 6 - 酵素コンジュゲートを適当な基質の存在下でインキュベートする場合には、酵素部分が基質と反応して、例えば、分光光度的、蛍光分析的または視覚的手段によって検出され得る化学部分を生成する。多重特異性イムノコンジュゲートを検出可能に標識するために使用できる酵素の例として、 α - ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼが挙げられる。

【 0 1 0 7 】

当業者ならば、本発明に従って使用できるその他の適した標識を承知しているであろう。マーカー部分の抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体との結合は、当技術分野で公知の標

10

20

30

40

50

準技術を使用して達成してもよい。これに関する通常の方法論は、Kennedy et al., Clin. Chim. Acta 70:1, 1976; Schurs et al., Clin. Chim. Acta 81:1, 1977; Shih et al., Int'l J. Cancer 46:1101, 1990; Stein et al., Cancer Res. 50:1330, 1990;およびC oligan、前掲によって記載されている。

【 0 1 0 8 】

さらに、アビジン、ストレプトアビジンおよびビオチンとコンジュゲートされている抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を使用することによって免疫化学的検出の便利さおよび万能性を増強できる。[例えば、Wilchek et al, (eds.), 「Avidin-Biotin Technology」, Methods In Enzymology (Vol. 184) (Academic Press 1990); Methods In Molecular Biology (Vol. 10) 149-162 (Manson, ed., The Humana Press, Inc. 1992)中のBayer et al., 「Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology」参照のこと。]

【 0 1 0 9 】

イムノアッセイを実施する方法は、十分に確立されている。[例えば、Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application 180-208 (Ritter and L adyman, eds., Cambridge University Press 1995)中のCook and Self, 「Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays」; Monoclonal Antibodies: Principles and Applications 107-120 (Birch and Lennox, eds., Wiley-Liss, Inc. 1995)中のPerry, 「The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology」; Diamandis, Immunoassay (Academic Press, Inc. 1996)参照のこと。]

【 0 1 1 0 】

IV. 抗B7H6モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲート

別の態様では、本発明は、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲートを提供する。本明細書において、「抗ヒトB7H6モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲート」とは、治療薬とコンジュゲートしている抗ヒトB7H6モノクローナル抗体(III節、前掲に記載される)を指す。このような抗ヒトB7H6モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲートは、対象、例えば、B7H6を発現する癌を有する対象などに投与した場合に、通常、単独だけでなくその他の治療薬と組み合わせて投与した場合にも、B7H6発現細胞に対して臨床上有益な効果をもたらす。

【 0 1 1 1 】

通常の実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を、細胞毒性薬剤とコンジュゲートし、その結果、得られた抗体 - 薬物コンジュゲートが、細胞によって取り込まれるか、インターナライズされた場合に、B7H6発現細胞(例えば、B7H6を発現する癌細胞)に対して細胞毒性または細胞分裂阻害効果を発揮する。抗体とのコンジュゲーションにとって特に適した部分として、化学療法薬、プロドラッグ変換酵素、放射性同位元素もしくは化合物または毒素がある。例えば、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を化学療法薬(以下参照)または毒素(例えば、細胞分裂阻害または細胞破壊剤、例えば、アブリン、リシンA、シュドモナス外毒素またはジフテリア毒素など)などの細胞毒性薬剤とコンジュゲートしてもよい。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体とコンジュゲートするのに有用なさらなる薬剤の例を以下に提供する。

【 0 1 1 2 】

その他の実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体をプロドラッグ変換酵素とコンジュゲートする。プロドラッグ変換酵素は組換えによって抗体と融合することができ、または公知の方法を使用して、それと化学的にコンジュゲートすることができる。例示的プロドラッグ変換酵素として、カルボキシペプチダーゼG2、 - グルクロニダーゼ、ペニシリン - V - アミダーゼ、ペニシリン - G - アミダーゼ、 - ラクタマーゼ、 - グルコシダーゼ、ニトロレダクターゼおよびカルボキシペプチダーゼAがある。

【 0 1 1 3 】

治療薬をタンパク質と、特に、抗体とコンジュゲートする技術は、周知である。[例えば、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985)中のArnon et al., 「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Dr

ugs In Cancer Therapy」; Controlled Drug Delivery (Robinson et al. eds., Marcel Deiker, Inc., 2nd ed. 1987)中のHellstrom et al., 「Antibodies For Drug Delivery」; Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera et al. eds., 1985)中のThorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」; Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985)中の「Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」;およびThorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58参照のこと。例えば、P C T 公開W O 8 9 / 1 2 6 2 4 も参照のこと。]

【 0 1 1 4 】

10

本明細書に記載される方法に従う特定のバリエーションでは、抗ヒトB 7 H 6 モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲートは、インターナライズされ、B 7 H 6 発現細胞内に蓄積し、ここで、抗体 - 薬物コンジュゲートが、治療的効果（例えば、細胞毒性または細胞分裂阻害効果）を発揮する。蓄積および蓄積速度を調べる方法は、例えば、「Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, an Autoimmune Disease or an Infectious Disease」と題されたW O 2 0 0 4 / 0 1 0 9 5 7に見られる。

【 0 1 1 5 】

通常の実施形態では、治療薬（例えば、薬物またはプロドラッグ変換酵素）とコンジュゲートしている抗ヒトB 7 H 6 モノクローナル抗体を使用する場合には、薬剤は、治療されるB 7 H 6 発現細胞（例えば、B 7 H 6 を発現する癌の細胞）によってインターナライズされる場合に、優先的に活性である。その他の実施形態では、抗ヒトB 7 H 6 モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲートは、インターナライズされず、薬物は、細胞膜と結合することによって、治療的効果（例えば、B 7 H 6 発現細胞の枯渇またはその成長の阻害）を発揮するのに有効である。

20

【 0 1 1 6 】

B 7 H 6 発現細胞（例えば、B 7 H 6 を発現する癌細胞）の外部での治療薬の活性を最小にするために、治療薬は通常、抗体から切断されない限りは（例えば、加水分解によって、または切断物質によって）治療薬の活性を低下させる方法で、コンジュゲートされる。このような実施形態では、治療薬を、B 7 H 6 発現細胞の細胞内環境において切断に対して感受性であるが、細胞外環境に対して実質的に感受性ではない切断可能なリンカーを用いて抗体と結合し、その結果、コンジュゲートは、B 7 H 6 発現細胞によって[例えば、エンドソームにおいて、または例えば、p H 感受性もしくはプロテアーゼ感受性によって、リソソーム環境において、またはカベオラ (caveolea) において]インターナライズされる場合に抗体から切断される。[IV(A) 節、下記参照のこと。]

30

【 0 1 1 7 】

さらに、特定の実施形態では、抗体 - 薬物コンジュゲートは、細胞膜に対して帯電している治療薬を含み、それによって、細胞によってひと度インターナライズされると薬剤の細胞膜を通過する能力がさらに最小化される。本明細書において、「帯電している薬剤」とは、(a) 薬剤の一方の領域が、細胞膜に対して電荷を有するよう極性化しているか、(b) 細胞膜に対して正味の電荷を有する薬剤を意味する。

40

【 0 1 1 8 】

A . リンカー

通常、B 7 H 6 抗体 - 薬物コンジュゲートは、治療薬および抗ヒトB 7 H 6 モノクローナル抗体の間にリンカー領域を含む。上記のように、特定の実施形態では、リンカーは、細胞内条件下で切断可能であり、その結果、リンカーの切断によって細胞内環境において抗体から治療薬が遊離される。

【 0 1 1 9 】

例えば、いくつかの実施形態では、リンカーは、細胞内環境中（例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラ内）に存在する切断物質によって切断可能である。リンカーは、例えば、それだけには限らないが、リソソームプロテアーゼまたはエンドソーム

50

プロテアーゼを包含する細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチジルリンカーであり得る。通常、ペプチジルリンカーは、少なくとも2個のアミノ酸の長さまたは少なくとも3個のアミノ酸の長さである。切断物質として、カテプシンBおよびDならびにプラスミンを挙げることができ、そのすべてはジペプチド薬物誘導体を加水分解し、標的細胞内に活性薬物を放出すると知られている（例えば、Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999参照のこと）。最も典型的なものは、B7H6発現細胞中に存在する酵素によって切断可能であるペプチジルリンカーである。例えば、癌性組織において高度に発現されているチオール依存性プロテアーゼカテプシン-Bによって切断可能であるペプチジルリンカーを使用してもよい（例えば、Phe-LeuまたはGly-Phe-Leu-Glyリンカー）。その他のこのようなリンカーは、例えば、米国特許第6,214,345号に記載されている。特定の実施形態では、細胞内プロテアーゼによって切断可能であるペプチジルリンカーは、Val-Cit（バリン-シトルリン）リンカーまたはPhe-Lys（フェニルアラニン-リシン）リンカーである（例えば、Val-Citリンカーを用いるドキシソルピシンの合成を記載する米国特許第6,214,345号を参照のこと）。治療薬の細胞内タンパク質分解放出を使用することの1つの利点は、コンジュゲートしている場合には、薬剤が、通常、減弱されていることおよびコンジュゲートの血清安定性が通常高いことである。

10

【0120】

その他の実施形態では、切断可能なリンカーは、pH感受性、すなわち、特定のpH値で加水分解に対して感受性である。通常、pH感受性リンカーは、酸性条件下で加水分解可能である。例えば、リソソームにおいて加水分解可能である酸不安定性リンカー（例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シス-アコニチックアミド、オルトエステル、アセタール、ケタール、など）を使用してもよい。（例えば、米国特許第5,122,368号；同第5,824,805号；同第5,622,929号；Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999；Neville et al., Biol. Chem. 264:14653-14661, 1989参照のこと。）このようなリンカーは、血液中などの中性pH条件下で比較的安定であるが、pH5.5または5.0未満、すなわち、リソソームのおよそのpHでは不安定である。特定の実施形態では、加水分解可能リンカーは、チオエーテルリンカー〔例えば、アシルヒドラゾン結合によって治療薬と結合しているチオエーテル（例えば、米国特許第5,622,929号参照のこと）など〕である。

20

30

【0121】

さらにその他の実施形態では、リンカーは、還元条件下で切断可能である（例えば、ジスルフィドリンカー）。例えば、SATA（N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート）、SPDP〔N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート〕、SPDB〔N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）ブチレート〕およびSMPOT〔N-スクシンイミジル-オキシカルボニル- -メチル- -（2-ピリジル-ジチオ）トルエン〕、SPDBおよびSMPOTを使用して形成できるものを包含する、種々のジスルフィドリンカーが当技術分野で公知である。〔例えば、Thorpe et al., Cancer Res. 47:5924-5931, 1987；Wawrzynczak et al., In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987参照のこと。米国特許第4,880,935も参照のこと。〕

40

【0122】

さらにその他のバリエーションでは、リンカーは、マロネートリンカー（Johnson et al., Anticancer Res. 15:1387-93, 1995）、マレイミドベンゾイルリンカー（Lau et al., Bioorg-Med-Chem. 3:1299-1304, 1995）または3'-N-アミド類似体（Lau et al., Bioorg-Med-Chem. 3:1305-12, 1995）である。

【0123】

通常、リンカーは、細胞外環境に対して実質的に感受性ではない。本明細書において、「細胞外環境に対して実質的に感受性ではない」とは、リンカーとの関連で、抗体-薬物コンジュゲートが、細胞外環境中（例えば、血漿中）に存在している場合には、抗体-薬

50

物コンジュゲートのサンプル中のわずか約 20 %、通常、わずか約 15 %、より通常は、わずか約 10 %、さらにより通常は、わずか約 5 %、わずか約 3 %またはわずか約 1 %のリンカーしか切断されないことを意味する。リンカーが、細胞外環境に対して実質的に感受性ではないかどうかは、例えば、(a) 抗体 - 薬物コンジュゲート (「抗体 - 薬物コンジュゲートサンプル」) および (b) 当モル量の非コンジュゲート抗体または治療薬 (「対照サンプル」) の両方を、所定の期間 (例えば、2、4、8、16 または 24 時間) 血漿とともに独立にインキュベートすることと、次いで、例えば、高性能液体クロマトグラフィーによって測定される、抗体 - 薬物コンジュゲートサンプル中に存在する非コンジュゲート抗体または治療薬の量を、対照サンプル中に存在するものと比較することによって調べることができる。

10

【0124】

いくつかのバリエーションでは、リンカーは、細胞のインターナリゼーションを促進する。特定の実施形態では、リンカーは、治療薬とコンジュゲートしている場合に (すなわち、抗体 - 薬物コンジュゲートのリンカー - 治療薬部分の環境において)、細胞のインターナリゼーションを促進する。さらにその他の実施形態では、リンカーは、治療薬および抗 B7H6 抗体の両方とコンジュゲートしている場合に (すなわち、抗体 - 薬物コンジュゲートの環境において)、細胞のインターナリゼーションを促進する。

【0125】

本組成物および方法とともに使用できる種々のリンカーは、例えば、「Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, an Autoimmune Disease or an Infectious Disease」と題された WO 2004 / 010957 に記載されている。

20

【0126】

B. 治療薬

本発明に従って、B7H6 発現細胞に対して治療的効果を発揮する任意の薬剤を、抗ヒト B7H6 モノクローナル抗体とのコンジュゲーションのための治療薬として使用してよい。特定の実施形態では、B7H6 を発現する癌の治療などのための治療薬は、細胞毒性薬剤である。

【0127】

有用なクラスの細胞毒性薬剤として、例えば、抗チューブリン剤、アウリスタチン、DNA 副溝結合剤、DNA 複製阻害剤、アルキル化剤 [例えば、シスプラチン、一 (白金) 錯体、ビス (白金) 錯体および三核白金錯体などの白金錯体ならびにカルボプラチン]、アントラサイクリン、抗生物質、葉酸代謝拮抗剤、代謝拮抗剤、化学療法増感剤、デュオカルマイシン、エトボシド、フッ素化ピリミジン、イオノフォア、レキシトロブシン、ニトロソウレア、プラチノール、予備形成化合物、プリン代謝拮抗剤、ピューロマイシン、放射線照射増感剤、ステロイド、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、ピンカアルカロイドなどが挙げられる。

30

【0128】

個々の細胞毒性薬剤として、例えば、アンドロゲン、アントラマイシン (AMC)、アスパラギナーゼ、5 - アザシチジン、アザチオプリン、プレオマイシン、ブスルファン、ブチオニンスルホキシミン、カンプトセシン、カルボプラチン、カルムスチン (BSNU)、CC - 1065 (Li et al., Cancer Res. 42:999-1004, 1982)、クロラムブシル、シスプラチン、コルヒチン、シクロホスファミド、シタラビン、シチジンアラビノシド、サイトカラシン B、ダカルバジン、ダクチノマイシン (以前は、アクチノマイシン)、ダウノルビシン、デカルバジン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エストロゲン、5 - フルオロデオキシウリジン (fluorodeoxyuridine)、リン酸エトボシド (VP - 16)、5 - フルオロウラシル、グラミシジン D、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イフォスファミド、イリノテカン、ロムスチン (CCNU)、メクロレタミン、メルファラン、6 - メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトラマイシン、マイトマイシン C、ミトキサントロン、ニトロイミダゾール、パクリタキセル、プリカマイシン、プロカルビジン、ストレプトゾトシン、テノボシド (VM - 26)、6 - チオグアニン、チオテバ、トボテカン、ピン

40

50

ブラスチン、ピンクリスチンおよびビノレルビンが挙げられる。

【0129】

特に適した細胞毒性薬剤として、例えば、ドラスタチン（例えば、アウリスタチンE、AFP、MMAF、MMAE）、DNA副溝結合剤（例えば、エネジインおよびレキシトロブシン）、デュオカルマイシン、タキサン（例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル）、ピューロマイシン、ピンカルカロイド、CC-1065、SN-38（7-エチル-10-ヒドロキシ-カンプトテシン（camptothecin））、トポテカン、モルホリノ-ドキソルビシン、リゾキシシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、エキノマイシン、コンプレタスタチン、ネトロブシン、エポチロンAおよびB、エストラムスチン、クリプトフィシン（cryptophysins）、セマドチン、マイタンシノイド、ディスコデルモリド、エリテロピンならびにミトキサントロンが挙げられる。

10

【0130】

特定の実施形態では、細胞毒性薬剤は、従来の化学療法薬、例えば、ドキソルビシン、パクリタキセル、メルファラン、ピンカルカロイド、メトトレキサート、マイトマイシンCまたはエトポシドなどである。さらに、CC-1065類似体、カリケアマイシン、マイタンシン、ドラスタチン10の類似体、リゾキシシンおよびパリトキシシンなどの強力な薬剤を、抗B7H6発現抗体と連結してもよい。

【0131】

特定のバリエーションでは、細胞毒性または細胞分裂阻害剤は、アウリスタチンE（ドラスタチン-10としても当技術分野で知られている）またはその誘導体である。通常、アウリスタチンE誘導体は、例えば、アウリスタチンEとケト酸の間に形成されるエステルである。例えば、アウリスタチンEは、パラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応して、それぞれ、AEBおよびAEVBを生成し得る。その他の通常のアウリスタチン誘導体として、AFP（ジメチルバリリン-バリリン-ドライソロイン-ドラプロイン-フェニルアラニン-p-フェニレンジアミン）、MMAF（ドバリリン（dovaline）-バリリン-ドライソロニン（dolaisoleunine）-ドラプロイン-フェニルアラニン）およびMAE（モノメチルアウリスタチンE）が挙げられる。アウリスタチンEおよびその誘導体の合成および構造は、米国特許出願公開第20030083263号；国際特許公報WO2002/088172およびWO2004/010957；ならびに米国特許第6,884,869号；同第6,323,315号；同第6,239,104号；同第6,034,065号；同第5,780,588号；同第5,665,860号；同第5,663,149号；同第5,635,483号；同第5,599,902号；同第5,554,725号；同第5,530,097号；同第5,521,284号；同第5,504,191号；同第5,410,024号；同第5,138,036号；同第5,076,973号；同第4,986,988号；同第4,978,744号；同第4,879,278号；同第4,816,444号；および同第4,486,414号に記載されている。

20

30

【0132】

その他のバリエーションでは、細胞毒性薬剤は、DNA副溝結合剤である。（例えば、米国特許第6,130,237号参照のこと。）例えば、特定の実施形態では、副溝結合剤は、CBI化合物である。その他の実施形態では、副溝結合剤は、エネジイン（例えば、カリケアマイシン）である。

40

【0133】

特定の実施形態では、抗体-薬物コンジュゲートは、抗チューブリン剤を含む。抗チューブリン剤の例として、例えば、タキサン〔例えば、タキソール（登録商標）（パクリタキセル）、タキソテル（登録商標）（ドセタキセル）〕、T67（Tularik）、ピンカルカロイド（vinca alkyls）（例えば、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピンデシンおよびビノレルビン）およびドラスタチン（例えば、アウリスタチンE、AFP、MMAF、MMAE、AEB、AEVB）が挙げられる。その他の抗チューブリン剤として、例えば、パッカチン誘導体、タキサン類似体（例えば、エポチロンAおよびB）、ノコダゾール、コルヒチンおよびコルセミド（colcimid）、エストラムスチン、クリブ

50

トフィシン、セマドチン、マイタンシノイド、コンプレタスタチン、ディスコデルモリドならびにエリユテロピンが挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞毒性薬剤は、マイタンシノイド、別の群の抗チューブリン剤である。例えば、特定の実施形態では、マイタンシノイドは、マイタンシンまたはDM-1である(ImmunoGen, Inc.; Chari et al., Cancer Res. 52:127-131, 1992も参照のこと)。

【0134】

その他の実施形態では、細胞毒性薬剤は、代謝拮抗物質である。代謝拮抗物質は、例えば、プリンアンタゴニスト(例えば、アゾチオプリンまたはミコフェノール酸モフェチル)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ阻害剤(例えば、メトトレキサート)、アシクロビル、ガンシクロビル(gancyclovir)、ジドブジン、ピダラビン、リバビリン(ribavarin)、アジドチミジン、シチジンアラビノシド、アマンタジン、ジデオキシウリジン、ヨードデオキシウリジン、ホスカルネット(poscarnet)またはトリフルリジンであり得る。

【0135】

C. 抗B7H6抗体-薬物コンジュゲートの形成

抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートの作成は、当業者に公知の任意の技術によって達成できる。手短には、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートは、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体と、薬物と、所望により、薬物と抗体を連結するリンカーを含む。薬物を抗体と共有結合するために、いくつかの異なる反応が利用可能である。これは、リジンのアミン基、グルタミン酸およびアスパラギン酸の遊離カルボン酸基、システインのスルフヒドリル基および芳香族アミノ酸の種々の部分を包含する、抗体分子のアミノ酸残基の反応によって達成されることが多い。最もよく使用される非特異的共有結合方法の1つは、化合物のカルボキシ(またはアミノ)基を抗体のアミノ(またはカルボキシ)基と連結するためのカルボジイミド反応である。さらに、化合物のアミノ基を抗体分子のアミノ基と連結するために、ジアルデヒドまたはイミドエステルなどの二官能性物質が使用されてきた。また、シッフ塩基反応も薬物の抗体との結合に利用可能である。この方法は、グリコールまたはヒドロキシ基を含有する薬物の過ヨウ素酸酸化、したがって、アルデヒドの形成を伴い、次いで、これを抗体分子と反応させることを伴う。結合は、抗体分子のアミノ基とシッフ塩基を形成することを介して起こる。イソチオシアネートも、薬物を抗体と共有結合するためのカップリング剤として使用してよい。その他の技術も当業者に公知であり、本発明の範囲内にある。このような技術の限定されない例は、例えば、米国特許第5,665,358号;同第5,643,573号;および同第5,556,623号に記載されている。

【0136】

いくつかの実施形態では、リンカーの前駆体である中間体を、適当な条件下で薬物と反応させる。特定の実施形態では、薬物および/または中間体上の反応性基が使用される。続いて、薬物および中間体間の反応の生成物または誘導体化薬物を、適当な条件下で抗ヒトB7H6モノクローナル抗体と反応させる。

【0137】

D. 細胞毒性または細胞分裂阻害活性のアッセイ

特定の実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートは、細胞毒性薬剤とコンジュゲートしている抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を含み、その結果、抗体-薬物コンジュゲートがB7H6発現細胞(例えば、B7H6を発現する癌細胞)に対して細胞毒性または細胞分裂阻害効果を発揮する。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートの細胞毒性または細胞分裂阻害効果についてアッセイできるB7H6発現細胞は、例えば、下記、表5に列挙されるものなどの培養細胞株であり得る。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートが、B7H6発現細胞に対して細胞毒性または細胞分裂阻害を発揮すると確認されれば、その治療的価値を適当な動物モデルにおいて確認してもよい。好ましい実施形態では、細胞毒性薬剤を含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートを使用して、B7H6を発現する癌を治療する。本発明の抗体-薬物コンジュゲートの治療効力を評価するために使用してもよい種々

の癌の例示的動物モデルを、下記、V (B) 節に、および実施例 X に記載する。

【0138】

薬剤が、細胞に対して細胞分裂阻害または細胞毒性効果を発揮するかどうかを調べる方法は、一般に、当技術分野で公知である。このような方法の例示的例を以下に記載する。B7H6 発現細胞に対するこれらの効果のいずれかを決定することは、抗ヒト B7H6 モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲートが、少なくとも幾分かは、例えば、B7H6 を発現する癌などの B7H6 発現細胞の異常な成長または活性化によって媒介される病理を有する疾患または障害の治療または予防において有用であることを示す。

【0139】

抗ヒト B7H6 モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲートが、B7H6 発現細胞に対して細胞分裂阻害効果を発揮するかどうかを調べるために、チミジン取り込みアッセイを使用してもよい。例えば、5,000 個細胞 / 96 ウェルプレートのウェルの密度の B7H6 発現細胞を、72 時間培養し、72 時間の期間の最後の 8 時間の間、0.5 μ Ci の 3 H - チミジンに対して曝露してもよく、培養細胞への 3 H - チミジンの取り込みを、抗体 - 薬物コンジュゲートの存在下および不在下で測定する。

【0140】

細胞毒性を調べるために、壊死またはアポトーシス (プログラム細胞死) を測定してもよい。壊死は、通常、細胞膜の透過性の増大、細胞の膨潤および細胞膜の破壊によって達成される。アポトーシスは、通常、膜の小胞形成、細胞質の縮合および内因性エンドヌクレアーゼの活性化を特徴とする。

【0141】

細胞生存力は、細胞において、ニュートラルレッド、トリパンブルーまたはアラマーブルー (登録商標) (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH) などの色素の取り込みを調べることによって測定してもよい。例えば、Page et al., Intl. J. of Oncology 3:473-476, 1993 も参照のこと。このようなアッセイでは、細胞を、色素を含有する培地中でインキュベートし、細胞を洗浄し、色素の細胞取り込みを反映する残存する色素を分光光度的に測定する。細胞毒性 (cytotoxicity) を測定するために、タンパク質結合性色素スルホローダミン B (SRB) を使用してもよい (Skehan et al., J. Nat'l Cancer Inst. 82:1107-12, 1990)。

【0142】

あるいは、生存細胞を検出するが、死滅細胞を検出しないことによる哺乳類細胞生存および増殖の定量的熱量測定アッセイにおいて、MTT などのテトラゾリウム塩を使用する (例えば、Mosmann, J. Immunol. Methods 65:55-63, 1983 参照のこと)。

【0143】

アポトーシスは、例えば、DNA 断片化を測定することによって定量化できる。DNA 断片化の定量的インビトロ決定のための市販の測光法が利用可能である。TUNEL (断片化された DNA における標識されたヌクレオチドの組み込みを検出する) および ELISA ベースのアッセイを包含する、このようなアッセイの例が Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals) に記載されている。

【0144】

アポトーシスはまた、細胞における形態変化を測定することによって決定してもよい。例えば、壊死と同様に、特定の色素 (例えば、蛍光色素、例えば、アクリシンオレンジまたは臭化エチジウムなど) の取り込みを測定することによって細胞膜の完全性の喪失を決定できる。アポトーシス細胞数を測定する方法は、これまでに、Duke and Cohen, Current Protocols In Immunology (Coligan et al. eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16) によって記載されている。また、細胞を DNA 色素 (例えば、アクリシンオレンジ、臭化エチジウムまたはヨウ化プロピジウム) を用いて標識し、細胞をクロマチン縮合および内側核膜に沿った辺縁趨向について観察してもよい。アポトーシスを調べるために測定できるその他の形態変化として、例えば、細胞質縮合、膜の小胞形成の増加および細胞の縮みが挙げられる。

【 0 1 4 5 】

アポトーシス細胞の存在は、培養物の付着しているコンパートメントおよび「浮遊している」コンパートメントの両方において測定できる。例えば、両コンパートメントは、上清を採取することと、付着している細胞をトリプシン処理することと、遠心分離洗浄工程（例えば、10分、2000rpm）後に調製物を組み合わせることと、アポトーシスを検出することと（例えば、DNA断片化を測定することによって）によって収集できる。（例えば、Piazza et al., Cancer Research 55:3110-16, 1995参照のこと。）

【 0 1 4 6 】

V. 使用方法

A. 全般

別の態様では、本発明は、例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞およびT細胞（例えば、CD8⁺T細胞）を包含する、NKp30を発現する細胞の活性（例えば、細胞溶解性活性）を調節する方法を提供する。このような方法は、例えば、NKp30を発現する細胞の活性の増大と関連している疾患または障害を治療するための方法を包含する。適した抗体として、B7H6との結合について、（i）クローン4E5.5（受託番号CNCM I - 4242）のハイブリドーマ；（ii）クローン9G9.2（受託番号CNCM I - 4243）のハイブリドーマ；（iii）クローン10E2.9（受託番号CNCM I - 4244）のハイブリドーマ；および（iv）クローン17B1.3（受託番号CNCM I - 4245）のハイブリドーマからなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合できる抗体が挙げられる。特定のバリエーションでは、抗体は、上記の（i）～（iv）から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体に由来するキメラまたはヒト化抗体である。

【 0 1 4 7 】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、B7H6のNKp30との相互作用の干渉において使用するためのものである。このような実施形態において使用するために、方法は、機能的B7H6を発現する細胞を、NKp30を発現する細胞の存在下で、有効量の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体またはB7H6のNKp30との相互作用を干渉できるその他の薬剤と接触させることを含む。適した抗体として、B7H6との結合について、（i）クローン4E5.5（受託番号CNCM I - 4242）のハイブリドーマまたは（ii）クローン17B1.3（受託番号CNCM I - 4245）のハイブリドーマから選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合できる抗体が挙げられる。特定のバリエーションでは、抗体は、上記の（i）および（ii）から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体に由来するキメラまたはヒト化抗体である。このような方法は、インビトロで実施しても、エキソビボ（ex vivo）で実施しても、インビボ（in vivo）で実施してもよい。特定の好ましいバリエーションでは、NKp30を発現する細胞は、NK細胞であり、NK細胞活性を調節する使用または方法は、例えば、NK細胞活性の増大と関連している疾患または障害の治療においてとなる。その他のバリエーションでは、NKp30を発現する細胞は、NKp30を発現するT細胞（例えば、CD8⁺T細胞）であり、NKp30を発現するT細胞活性を調節する使用または方法は、例えば、NKp30を発現するT細胞の活性の増大と関連している疾患または障害の治療のためであろう。CD8⁺T細胞を包含する特定のT細胞が、NKp30を発現するとわかっている。（例えば、Srivastava and Srivastava, Leuk. Res. 30:37-46, 2006参照のこと。）

【 0 1 4 8 】

上記で示したように、特定のバリエーションでは、本発明の抗体は、NK細胞活性と関連している疾患または障害の治療において使用するためのものである。例えば、いくつかの実施形態では、抗体を使用する方法は、NK細胞媒介性疾患または障害〔例えば、NK細胞媒介性同種移植片拒絶、例えば、NK細胞媒介性骨髄細胞（BMC）同種移植片拒絶など〕を患っている対象またはそれを発症するリスクが高い対象に、B7H6のNKp30との相互作用を干渉できる、有効量の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を投与するこ

とを包含する。NK細胞媒介性骨髄同種移植片拒絶を抑制するために使用される抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を含む方法が、本発明において具体化される。骨髄移植(BMT)は、種々の血液系腫瘍の治療のための認容される治療方法になった。しかし、同種間BMTの有効性は、例えば、移植の拒絶などの特定の障害によって制限される。NK細胞が、骨髄同種移植片の生着にとって障壁であることおよびそれらが単独で、マウスにおいてBMC拒絶の特異性を媒介し得るといふことの十分な証拠がある。(例えば、Murphy et al., J. Exp. Med. 165:1212-1217, 1987; Murphy et al., J. Exp. Med. 166:1499-1509, 1987; Murphy et al., J. Immunol. 144:3305-3311, 1990; Murphy et al., Eur. J. Immunol. 20:1729-1734, 1990; Murphy et al., Immunol. Rev. 181:279-289, 2001参照のこと。)临床上、細胞減少性前処置を行っていない、T細胞の枯渇した、HLA不適合BMTを受けたSCIDを有する患者において観察される同種移植抵抗性は、ドナーに由来するNK細胞の高い活性に起因する。(O'Reilly et al., Vox. Sang. 51:81-86, 1986参照のこと。)したがって、同種移植片に対するNK細胞の細胞溶解性活性を阻害し、それによって、BMC同種移植片拒絶を治療または予防するために、BMTの際に、本明細書に記載される、B7H6の細胞外ドメインに対する、B7H6のNKp30との相互作用を阻害できる抗体を使用してもよい。

10

【0149】

さらにその他の実施形態では、例えば、B7H6発現細胞の存在を特徴とする疾患または障害の治療などのために、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を使用して、B7H6発現細胞に対する抗体依存性細胞毒性(ADCC)または補体依存性細胞毒性(CDC)を誘導する。例えば、いくつかの実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を使用して、B7H6を発現する癌細胞に対する抗体依存性細胞毒性(ADCC)または補体依存性細胞毒性(CDC)を誘導する。抗体治療は、癌治療において特に成功してきたが、これは、特定の腫瘍が、独特な抗原、系列特異的抗原または正常な細胞に対して過剰な量で存在する抗原のいずれかを示すからである。実験的証拠によって、B7H6は、正常組織と比較して、結腸、肝臓、子宮頸部、肺、膵臓および前立腺の癌に由来する細胞株ならびに原血球性白血病、B細胞リンパ腫、単球性リンパ腫、赤白血病、パーキットリンパ腫または慢性骨髄性白血病などの種々の血液の癌に由来するものを包含する多数の腫瘍由来細胞株によって高度に発現されることが実証されている。この証拠は、B7H6が、新規腫瘍特異的または腫瘍関連抗原であるということおよび抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を、抗腫瘍治療薬として使用してもよいということを示す。モノクローナル抗体治療の抗腫瘍活性と関連する機序の1つとして、抗体依存性細胞毒性(ADCC)がある。ADCCでは、モノクローナル抗体が、標的細胞(例えば、癌細胞)と結合し、モノクローナル抗体の受容体を発現する特異的エフェクター細胞(例えば、NK細胞、CD8⁺T細胞、単球、顆粒球)が、モノクローナル抗体/標的細胞複合体と結合し、その結果、標的細胞が死滅する。

20

30

【0150】

したがって、いくつかの実施形態では、エフェクター機能を有するFc領域を含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を使用して、B7H6発現細胞に対する抗体依存性細胞毒性(ADCC)または補体依存性細胞毒性(CDC)を誘導する。ADCCを誘導する方法は、一般に、B7H6発現細胞を、ADCC活性を有するFc領域を含む有効量の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体と接触させることを含み、ここで、接触させる工程は、細胞溶解性活性を有するFc受容体を発現する細胞溶解性免疫エフェクター細胞の存在下で行う。細胞溶解性Fc受容体(例えば、FcγRIII またはCD16)を発現する免疫エフェクター細胞として、例えば、NK細胞ならびに特定のCD8⁺T細胞が挙げられる。CDCを誘導する方法は、一般に、B7H6発現細胞を、CDC活性を有するFc領域を含む有効量の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体と接触させることを含み、ここで、接触させる工程は、補体の存在下で行う。このような方法を使用して死滅させるために標的とされ得るB7H6発現細胞として、いくつか例を挙げると、例えば、癌細胞、例えば、結腸癌細胞、肝臓癌細胞、子宮頸癌細胞、肺癌細胞、膵臓癌細胞、前立腺癌細胞、原血

40

50

球性白血病細胞、B細胞リンパ腫細胞、単球性リンパ腫細胞、赤白血病細胞、バーキットリンパ腫細胞および慢性骨髄性白血病細胞などが挙げられる。適した抗体として、B7H6との結合について、(i)クローン4E5.5(受託番号CNCMI-4242)のハイブリドーマ；(ii)クローン9G9.2(受託番号CNCMI-4243)のハイブリドーマ；(iii)クローン10E2.9(受託番号CNCMI-4244)のハイブリドーマ；および(iv)クローン17B1.3(受託番号CNCMI-4245)のハイブリドーマからなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合できる抗体が挙げられる。いくつかの実施形態では、抗体は、B7H6との結合について、上記の(ii)～(iii)から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合できる。特定のバリエーションでは、抗体は、上記の(i)～(iv)から選択されるか、または上記の(ii)～(iii)から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体に由来するキメラまたはヒト化抗体である。

10

20

30

40

50

【0151】

関連実施形態では、本明細書に記載されるエフェクター機能を有するFc領域を含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を使用して、対象においてB7H6を発現する癌を治療する。このような方法は、一般に、対象に、ADCC活性および/またはCDC活性を有するFc領域を含む、有効量の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を投与することを含む。このような方法を使用する治療に特に適しているB7H6を発現する癌として、例えば、結腸、肝臓、子宮頸部、肺、膵臓または前立腺の癌ならびに例えば、原血球性白血病、B細胞リンパ腫、単球性リンパ腫、赤白血病、バーキットリンパ腫または慢性骨髄性白血病などの血液の癌が挙げられる。

【0152】

さらにその他の実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲート(IV節、前掲参照のこと)を使用して、B7H6発現細胞に治療薬を送達し、ここで、薬剤が治療的効果を発揮する。このような方法は、B7H6発現細胞の存在を特徴とする疾患または障害の治療にとって特に有用である。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートを利用する特定の好ましいバリエーションでは、治療薬は、B7H6を発現する癌細胞などのB7H6発現細胞に対して細胞毒性または細胞分裂阻害効果を発揮する細胞毒性薬剤である。上記に示されるように、実験的証拠によって、B7H6は、正常組織と比較して、結腸、肝臓、子宮頸部、肺、膵臓および前立腺の癌に由来する細胞株ならびに原血球性白血病、B細胞リンパ腫、単球性リンパ腫、赤白血病、バーキットリンパ腫または慢性骨髄性白血病などの種々の血液の癌に由来するものを包含する多数の腫瘍由来細胞株によって高度に発現されることが実証されている。この証拠は、B7H6が、癌治療において治療効力を有するターゲティング物質、特に、腫瘍細胞を枯渇させるか、その成長を阻害することができる細胞毒性薬剤にとって有用な、新規腫瘍特異的または腫瘍関連抗原であるということを示す。したがって、いくつかの実施形態では、細胞毒性薬剤とコンジュゲートしている抗ヒトB7H6モノクローナル抗体を含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートを使用して、B7H6を発現する癌を治療する。適した抗体-薬物コンジュゲートとして、B7H6との結合について、(i)クローン4E5.5(受託番号CNCMI-4242)のハイブリドーマ；(ii)クローン9G9.2(受託番号CNCMI-4243)のハイブリドーマ；(iii)クローン10E2.9(受託番号CNCMI-4244)のハイブリドーマ；および(iv)クローン17B1.3(受託番号CNCMI-4245)のハイブリドーマからなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合できる抗体を含むものが挙げられる。いくつかの実施形態では、抗体を含む抗体-薬物コンジュゲートは、B7H6との結合について、上記の(ii)～(iii)から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合できる。特定のバリエーションでは、抗体-薬物コンジュゲートは、上記の(i)～(iv)から選択されるか、または上記の(ii)～(iii)から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体に由来するキメラまたはヒト化抗体を含む。

【 0 1 5 3 】

本明細書に記載される治療方法の各実施形態では、抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲートは、治療が試みられる疾患または障害の管理と関連する従来の方法論と一致する方法で送達される。本明細書における開示内容に従って、このような治療を必要とする対象に、有効量の抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを、疾患または障害を予防または治療するのに十分な時間および条件下で投与する。

【 0 1 5 4 】

本明細書に記載される抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを投与するための対象として、NKp30を発現する細胞によって媒介されるか、または B 7 H 6 発現細胞の存在を特徴とする疾患または障害を発症する通常のリスクよりも高い患者ならびに既存の疾患または障害を提示する患者が挙げられる。対象が疾患または障害をまだ患っていない特定の実施形態では、使用は、スクリーニングまたは診断のためである。その他の特定の実施形態では、対象は、治療が試みられる疾患または障害を有すると診断されている。さらに、対象を、治療の経過の間、疾患または障害における任意の変化について（例えば、疾患または障害の臨床症状の増大または減少について）モニタリングできる。

【 0 1 5 5 】

予防的適用において、医薬組成物（医薬）を、特定の疾患に対して感受性であるか、またはそうでなければ特定の疾患のリスクがある患者に、疾患の発生のリスクを排除もしくは低減するか、または疾患の発生を遅延するのに十分な量で投与する。治療的適用では、組成物を、このような疾患の疑いのある、またはこのような疾患をすでに患っている患者に、疾患またはその合併症の症状を治癒するか、または少なくとも部分的に停止するのに十分な量で投与する。これを達成するのに適切な量が、治療上または医薬上有効な用量または量と呼ばれる。予防的および治療的両方の投与計画において、抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートは、普通、十分な反応（例えば、適当な NK 細胞活性の誘発または不適当な NK 細胞活性の阻害）が達成されるまで数回の投与量で投与される。通常、反応をモニタリングし、所望の反応が消え始める場合には、反復投与量を与える。

【 0 1 5 6 】

用途が、NKp30を発現する細胞によって媒介されるか、または B 7 H 6 発現細胞の存在を特徴とする疾患または障害をまだ患っていない対象におけるリスクの上昇についての診断またはスクリーニングである本発明のバリエーションのために、対象から生物学的試料を採取し、正常もしくは健康な対象から得た生物学的試料または所定のベースレベルと比較する。癌を発症するリスクは、対象サンプルにおいて、正常もしくは健康対象から得た比較できる生物学的試料において見られるものまたはベースレベルよりも高レベルを検出することによって決定する。本発明の抗体組成物を検出する方法は、V. C 節に記載されている。

【 0 1 5 7 】

本発明の組成物および方法を使用して、骨髓移植後の種々の時間で、または抗癌薬物もしくは治療を与えられた後の種々の時間で対象から得た生物学的試料において治療の進行をモニタリングできる。対象から得た生物学的試料において検出される B 7 H 6 レベルを、治療に先立って（T1）検出し、第2の時間（T2）；治療後に採取した同一対象から得た生物学的試料と比較する。高レベルの B 7 H 6 は、一般に、疾患の進行を示し、低い B 7 H 6 は、退縮を示す。

【 0 1 5 8 】

本発明の方法に従ってスクリーニングまたは治療のための対象患者を同定するために、認容されたスクリーニング法を使用して、NKp30を発現する細胞によって媒介されるか、もしくは B 7 H 6 発現細胞の存在を特徴とする特定の疾患もしくは障害と関連しているリスク因子を調べてもよく、または対象において同定された既存の障害の状態を調べてもよい。このような方法は、例えば、個体が、特定の疾患と診断されている親類を有する

10

20

30

40

50

かどうかを調べることを含み得る。スクリーニング法はまた、例えば、遺伝性成分を有すると知られている特定の疾患についての家族の状態を調べるための従来の精密検査も含み得る〔例えば、BMTの場合には、臨床研究によって、特定のHLA-C対立遺伝子の存在が、BM同種移植片拒絶のリスクの増大と相関することがわかっており（Scott et al., Blood 92:4864-4871, 1998参照のこと）、種々の癌もまた、特定の遺伝性成分を有すると知られている〕。癌の遺伝性成分として、例えば、形質転換している複数の遺伝子（例えば、Ras、Raf、EGFR、cMet他）における突然変異、特定のHLAの存在もしくは不在およびキラー細胞抑制受容体（KIR）分子または癌細胞がNK細胞およびT細胞のような細胞の免疫抑制を直接的にもしくは間接的に調節できる機序（例えば、Ljunggren and Malmberg, Nature Rev. Immunol. 7:329-339, 2007; Boyton and Altmann, Clin. Exp. Immunol. 149:1-8, 2007参照のこと）が挙げられる。このような目的で、ヌクレオチドプローブを日常的に使用して、対象とする特定の疾患と関連している遺伝子マーカー保持する個体を同定してもよい。さらに、特定の疾患のマーカーを同定するのに有用であるさまざまな免疫学的方法が、当技術分野で公知である。例えば、モノクローナル抗体プローブを使用して、特定の腫瘍と関連している抗原を検出する種々のELISAイムノアッセイ法が利用可能であり、当技術分野で周知である。スクリーニングは、既知の患者の症候学、年齢因子、関連リスク因子などによって示されるように実施してよい。これらの方法によって、臨床医が、治療のために本明細書に記載される方法を必要とする患者を日常的に選択することが可能となる。これらの方法に従って、NK細胞活性の調節は、独立した治療プログラムとして実施しても、または治療計画に付随するか、もしくは治療計画とその他の治療を調整するフォローアップとして実施してもよい。

【0159】

B. 癌治療

1. 癌の種類

本明細書における研究によって記載され、示されるように、B7H6抗体を使用して、FcのFc受容体および補体タンパク質、C1qとの結合を介してADCCまたはCDC経路を活性化することによってB7H6発現細胞の死滅を指示してもよい。さらにその他のバリエーションでは、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体とコンジュゲートしている細胞毒性薬剤を含む抗ヒトB7H6モノクローナル抗体-薬物コンジュゲートを使用して、B7H6を発現する癌細胞に細胞毒性薬剤を送達してもよく、ここで、細胞毒性薬剤が癌細胞を枯渇させるか、またはその成長を阻害することによって治療的效果を発揮する。

【0160】

以下の表4は、主に標的によってまとめられた、本発明に従った治療に適している一部の癌を列挙する。

表4：例示的癌の種類のリスト

1. 頭頸部癌
 - a. 脳
 - b. 口腔
 - c. 中咽頭(Oropharynx)
 - d. 上咽頭
 - e. 下咽頭
 - f. 鼻腔および副鼻腔
 - g. 喉頭
 - h. 口唇
2. 肺癌
 - a. 非小細胞癌
 - b. 小細胞癌
3. 消化管癌

10

20

30

40

50

- a. 結腸直腸癌
 - b. 胃癌
 - c. 食道癌
 - d. 肛門癌
 - e. 肝外胆管癌
 - f. ファーター膨大部の癌
 - g. 消化管間葉性腫瘍 (G I S T)
4. 肝臓癌
- a. 肝臓細胞腺腫 10
 - b. 肝細胞癌
5. 乳癌
6. 婦人科癌
- a. 子宮頸癌
 - b. 卵巣癌
 - c. 膣癌
 - d. 外陰部癌
 - e. 妊娠性絨毛性腫瘍 20
 - f. 子宮癌
7. 尿路癌
- a. 腎癌癌腫
 - b. 前立腺癌
 - c. 膀胱癌
 - d. 陰茎癌
 - e. 尿道癌
8. 膀胱癌 30
9. 神経性腫瘍
- a. 星状細胞腫および膠芽腫
 - b. 原発性 CNS リンパ腫
 - c. 髄芽細胞腫
 - d. 生殖細胞腫瘍
 - e. 網膜芽細胞腫
10. 内分泌腫瘍
- a. 甲状腺癌 40
 - b. 膵臓癌
- 1) 膵島細胞腫瘍
- a) インスリノーマ
 - b) グルカゴノーマ
 - c. クロム親和性細胞腫
 - d. 副腎癌
 - e. カルチノイド腫瘍
 - f. 副甲状腺癌腫
 - g. 松果体腫瘍

11. 皮膚癌
- a. 悪性黒色腫
 - b. 扁平上皮癌
 - c. 基底細胞癌
 - d. カボジ肉腫
12. 骨癌
- a. 骨芽細胞腫
 - b. 骨軟骨腫
 - c. 骨肉腫
13. 結合組織腫瘍
- a. 軟骨芽細胞腫
 - b. 軟骨腫
14. 造血器悪性腫瘍
- a. 非ホジキンリンパ腫
 - 1) B細胞リンパ腫
 - 2) T細胞リンパ腫
 - 3) 未分化リンパ腫
 - b. 白血病
 - 1) 慢性骨髄性白血病
 - 2) ヘアリー細胞白血病
 - 3) 慢性リンパ性白血病
 - 4) 慢性骨髄単球性白血病
 - 5) 急性骨髄性白血病
 - 6) 急性リンパ芽球性白血病
 - c. 骨髄増殖性疾患
 - 1) 多発性骨髄腫
 - 2) 本態性血小板血症
 - 3) 骨髄化生を伴う骨髄線維症
 - 4) 好酸球増加症候群
 - 5) 慢性好酸球性白血病
 - 6) 真性赤血球増加症
 - d. ホジキンリンパ腫
15. 小児癌
- a. 白血病およびリンパ腫
 - b. 脳癌
 - c. 神経芽腫
 - d. ウィルムス腫瘍（腎芽細胞腫）
 - e. 横紋筋肉腫(Phabdomyosarcoma)
 - f. 網膜芽細胞腫
16. 免疫療法的に感受性の癌
- a. 黒色腫
 - b. 腎臓癌
 - c. 白血病、リンパ腫および骨髄腫
 - d. 乳癌
 - e. 前立腺癌

10

20

30

40

50

- f. 結腸直腸癌
- g. 子宮頸癌
- h. 卵巣癌
- i. 肺癌

【0161】

腫瘍応答に対する本発明に従った抗 B 7 H 6 抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの効果を評価するために、関連動物モデルの一部を含む上記で列挙される癌の一部を、以下にさらに詳細に論じる。

【0162】

a. 慢性骨髄性白血病

10

慢性骨髄性白血病 (CML) は、大部分は成人に影響を及ぼす稀な種類の癌である。顆粒球 (白血球の主な種類) の癌である。CML では、多数の顆粒球が産生され、それらが未熟で、適切に機能できない時点で血液中に放出される。未熟な白血球は、芽細胞として知られている。その他の種類の血液細胞の産生も混乱する。普通、白血球は自身を、秩序正しい、制御された方法で修復し、再生するが、慢性骨髄性白血病では、このプロセスが制御されず、細胞が分裂し続け、異常に成熟する。この疾患は、通常、極めてゆっくりと発達し、慢性骨髄性白血病と考えられる。

【0163】

CML がゆっくりと進行するので、その初期段階で検出することは困難である。別の理由のために血液検査が行われた場合にのみ発見されることもある。CML の症状は漠然としており、非特異的であり、骨髄中の異常な白血球数の増大および正常血液細胞数の減少によって引き起こされ、膨満感または腹部の左側の柔らかいしこりをもたらすことが多い。CML では、脾臓が肥大し得る。脾臓の膨潤は、胃に対して圧迫を引き起こし、消化不良および食欲不振につながり、貧血をもたらす。血液中の血小板数の減少のために、容易に出血したり、あざができたりすることに気づく人もいる。CML と関連している「点状出血」とは、小さい血液のような点が、脚または口中に通常見られる挫傷の特定の種類である。女性では、生理が極めて重くなったことに気づく場合もある。しかし、これらの症状および徴候は稀である。慢性骨髄性白血病は、任意の年齢で起こり得るが、中年および高齢の人に影響を及ぼすことがより多く、小児では稀である。(National Cancer Institute, 「NIH Publication No. 08-3775」 Rockville, MD, Sept. 2008)。腫瘍応答に対する抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの効果は、例えば、免疫不全マウスに移植されたヒト CML 細胞を使用するヒト腫瘍異種移植片モデルにおいて評価できる (例えば、Ren, Leukemia and Lymphoma 8:1549-1561, 2002; Van Etten, Blood Cells Mol. Dis. 27:201-205, 2001; Wong and Witte, Oncogene 20:5644-5659, 2001 参照のこと)。

20

30

【0164】

b. 多発性骨髄腫

多発性骨髄腫は、形質細胞と呼ばれる特定の白血球に影響を及ぼす癌の種類である。形質細胞に関する癌では、細胞はすべて異常であり、同一であり、骨髄腫細胞と呼ばれる。骨髄腫細胞は、骨髄中および骨の硬い外側中に集まる傾向がある。1つの骨だけに集まり、単一の塊すなわち形質細胞腫と呼ばれる腫瘍を形成することもある。しかし、ほとんどの場合には、骨髄腫細胞は、多数の骨に集まり、多数の腫瘍を形成し、その他の問題を引き起こすことが多い。これが起こる場合には、この疾患は、多発性骨髄腫と呼ばれる。

40

【0165】

多発性骨髄腫を有する人は、異常に多数の同一の形質細胞を有するので、過剰な量の1種の抗体も有する。これらの骨髄腫細胞および抗体は、いくつかの深刻な医学的問題を引き起こし得、これとして以下が挙げられる: (1) 骨髄腫細胞数が増大するにつれ、骨に損傷を与え、骨を弱め、疼痛および時には骨折を引き起こす。(2) 骨が損傷を受けると、血液中にカルシウムが放出される。これは高カルシウム血症につながり得る。高カルシウム血症は、食欲の喪失、悪心、口渇、疲労、筋力低下、不穏状態および錯乱を引き起こ

50

し得る。(3) 骨髄腫細胞は、骨髄が正常な形質細胞および免疫系にとって重要なその他の白血球を形成するのを妨げる。患者は、感染および疾患に対してより感受性であり得る。(4) 癌細胞はまた、新規赤血球の成長を妨げ、貧血を引き起こす場合もある。(5) 多発性骨髄腫患者は、その腎臓に深刻な問題を有し得る。過剰な抗体タンパク質およびカルシウムは、腎臓が血液を適切に濾過し清澄化するのを妨げ得る。症状は、疾患の進行度に応じて変わる。疾患の初期段階では、症状は全くないこともある。症状が生じる場合には、患者は、多くは背骨または肋骨に骨の疼痛を有することが多い。患者はまた、骨折、脱力感、疲労、体重減少または反復性感染症を有し得る。疾患が進行している場合には、症状として、悪心、嘔吐、便秘、排尿の問題および脱力感または脚の痺れ感を挙げることができる(National Cancer Institute, 「NIH Publication No. 08-1575」 Rockville, MD, Sept. 2008)。腫瘍応答に対する抗 B 7 H 6 抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの効果は、Miyakawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 313:258-62, 2004に記載されるものなどの免疫不全マウスにおけるヒト腫瘍異種移植片モデルにおいて評価できる。

10

【0166】

c. 非ホジキンリンパ腫

2つの主要な種類のリンパ腫がある。ホジキン病および非ホジキンリンパ腫。約20種の異なる種類の非ホジキンリンパ腫がある。ホジキン病のほとんどの症例において、生検でリードシュテルンベルク細胞として知られる特定の細胞が見られる。この細胞は、その他のリンパ腫においては普通見られず、その結果、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫のための異なる治療となる。

20

【0167】

非ホジキンリンパ腫の最初の徴候は、頸部、腋窩または鼠径部におけるリンパ節の無痛性の膨潤であることが多い。その他の症状として以下のいずれかを含み得る：寝汗または原因不明の発熱；食欲不振、原因不明の体重減少および極度の疲労；小児では、咳または息切れを発生する場合もある。患者が、腹痛もしくは小児の腹部におけるしこりまたは全身の皮膚の持続性のそう痒を訴える場合もある(National Cancer Institute, 「NIH Publication No. 07-1567」 Rockville, MD, Sept. 2007)。腫瘍応答に対する抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの効果は、Ansell et al., Leukemia 18:616-23, 2004に記載されるものと同様の非ホジキンリンパ腫異種移植片モデルにおいて評価できる。

30

【0168】

最も使用されている非ホジキンリンパ腫の分類は、REAL分類体系である(Ottensmeyer, Chemico-Biological Interactions 135-136:653-664, 2001。)リンパ腫の分類のために、特異的免疫学的マーカーが同定されている。例えば、濾胞性リンパ腫マーカーとして、CD20+、CD3-、CD10+、CD5-が挙げられ；小リンパ球性リンパ腫マーカーとして、CD20+、CD3-、CD10-、CD5+、CD23+が挙げられ；辺縁帯B細胞リンパ腫マーカーとして、CD20+、CD3-、CD10-、CD23-が挙げられ；びまん性大B細胞リンパ腫マーカーとして、CD20+、CD3-が挙げられ；マントル細胞リンパ腫マーカーとして、CD20+、CD3-、CD10-、CD5+、CD23+が挙げられ；末梢T細胞リンパ腫マーカーとして、CD20-、CD3+が挙げられ；縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫マーカーとして、CD20+、CD3-が挙げられ、リンパ芽球性リンパ腫マーカーとして、CD20-、CD3+、Tdt+が挙げられ、パーキットリンパ腫マーカーとして、CD20+、CD3-、CD10+、CD5-が挙げられる(Decision Resources, Non-Hodgkins Lymphoma, Waltham, MA., Feb. 2002)。

40

【0169】

国際ワーキングフォーミュレーション(International Working Formulation)による非ホジキンリンパ腫(NHL)の臨床的分類は、疾患をサブタイプに分ける：(1) 小リンパ性を包含し、慢性リンパ性白血病(SC)；濾胞性の、主に小分割細胞(FSC)型；濾胞性の、混合小分割および大細胞型(FM)と一致する低悪性度(low grade)(低

50

悪性度 (indolent)) 疾患 ; (2) 濾胞性の、主に大細胞型 (F L) ; びまん性の、小分割細胞型 (D S C) ; びまん性の混合小細胞および大細胞型 (D M) ; びまん性の、大分割または非分割細胞型 (D L) を包含する中悪性度疾患ならびに (3) 免疫芽球性の、大細胞型 (I B L) ; リンパ芽球性の、脳回状または非脳回状細胞型 (L L) ; および非分割小細胞型、パーキットまたは非パーキット (S N C ; The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project, Cancer 49:2112-35, 1982) を包含する高悪性度疾患。N H L の患者を病期分類するために A n n A r b o r ステージ分類システムがよく使用される。ステージ I は、単一のリンパ節領域の関与または単一のリンパ節外臓器もしくは部位の局在化した関与を意味する。ステージ I I は、横隔膜の同じ側の 2 以上のリンパ節領域の関与または横隔膜の同じ側の節外 (extranodal) 部位もしくは臓器と、1 つもしくは複数のリンパ節領域の局在化した関与を意味する。ステージ I I I は、節外臓器または部位の局在化した関与をおそらく伴う、横隔膜の両側のリンパ節領域の関与を意味する。ステージ I V は、リンパ節の関与を伴うか伴わない、1 つまたは複数の別個の節外臓器のびまん性または播種性の関与を意味する (「Lymphoid neoplasms」, In American Joint Committee on Cancer.: AJCC Cancer Staging Manual 6th ed. New York, NY: Springer, 2002, pp. 393-406) 。リツキシマブは、低悪性度および濾胞性リンパ腫の治療において有効であるとわかっている (Boye et al., Annals of Oncol. 14:520-535, 2003) 。

10

【 0 1 7 0 】

d . 子宮頸癌

子宮頸部は、膣に通じる子宮の頸部である。子宮頸癌はまた、子宮頸癌腫とも呼ばれ、子宮頸部の表面上の異常な細胞から発生し、女性を襲う最もよくある癌の 1 種である。子宮頸癌は、普通、子宮頸部の表面の細胞における異形成、前癌病変より始まる。これらの異常な細胞が、浸潤性癌に進行し得る。癌が現れると、4 つのステージを通して進行し得る。ステージは、癌の広がり度によって定義される。癌が広がるほど、治療がより広範囲である可能性が高い。2 つの主な種類の子宮頸癌がある : (1) 扁平上皮種 (類表皮癌) : これは、最もよくある種類であり、子宮頸癌の約 8 0 % ~ 8 5 % を占める。この癌は、性行為感染症によって引き起こされ得る。1 種のこのような性病として、性器疣贅を引き起こすヒトパピローマウイルスがある。癌性腫瘍は、子宮頸部上および子宮頸部中に増殖する。癌は、一般に、子宮頸部の表面で始まり、パバニコロースメアによって初期段階で診断され得る。 (2) 腺癌 : この種の子宮頸癌は、子宮頸部の管中の子宮頸管腺中の組織から発生する。初期疾患は、普通、症状を全く引き起こさない。癌は、普通、パバニコロースメアおよび婦人科内診によって検出され得る。疾患の後期ステージは、月経期間の間、性交後または閉経後などの予想外の時点での異常な膣出血または血痕のある分泌物を引き起こす。異常な膣分泌物は、濁ったまたは血性のものである場合も、悪臭を有する粘液を含有する場合もある。進行したステージの癌は、疼痛を引き起こし得る (National Cancer Institute, 「NIH Publication No. 08-2407」 Rockville, MD, Sept. 2008) 。腫瘍応答に対する抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの効果は、Downs et al., Gynecol. Oncol. 98:203-10, 2005 および Li et al., Int. J. Gynecol. Cancer 15:301-7, 2005 に記載されるものと同様のヒト腫瘍異種移植片モデルにおいて評価できる。

20

30

40

【 0 1 7 1 】

e . 頭頸部腫瘍

頭頸部のほとんどの癌は、癌腫 (特に、扁平上皮癌) と呼ばれる種類のものである。頭頸部の癌腫は、口、鼻、喉もしくは耳の内層または舌を覆う表面層を形成する細胞で始まる。しかし、頭頸部の癌は、その他の種類の細胞から発生する場合もある。リンパ腫は、リンパ系の細胞から発生する。肉腫は、筋肉、軟骨または血管を構成する支持細胞から発生する。黒色腫は、眼および皮膚に色を与えるメラニン細胞と呼ばれる細胞から始まる。頭頸部癌の症状は、どこにあるかに応じて変わる。例えば、舌の癌は、発語を幾分か不明瞭にし得る。最もよくある症状は、数週間内には治癒しない頭頸部における潰瘍または痛む区域 ; 嚥下困難または咀嚼もしくは嚥下時の疼痛 ; 持続性の雑音のある呼吸、不明瞭な

50

発語またはしわがれた声などの呼吸または発語の問題；口中の麻痺感；持続性の鼻づまりまたは鼻血；持続性の耳痛、耳鳴りまたは難聴；口または首中の膨潤またはしこり；顔面または上顎における疼痛であり；煙草を吸うか、噛む人では、口の内層または舌の上に前癌病変が生じ得る。これらは、持続性の舌の白斑（白板症）または赤斑（紅板症）として現れる場合もある。それらは、普通、無痛性であるが、時には、痛むものである場合もあり、出血することもある（National Cancer Institute, 「NIH Publication No. 09-1574」 Rockville, MD, Sept. 2009）。腫瘍応答に対する抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの効果は、Kuriakose et al., Head Neck 22:57-63, 2000; Cao et al., Clin. Cancer Res. 5:1925-34, 1999; Braakhuis et al., Cancer Res. 51:211-4, 1991; および Baker, Laryngoscope 95:43-56, 1985 に記載されるものと同様のヒト頭頸部腫瘍異種移植片モデルにおいて評価できる。

10

【 0 1 7 2 】

f . 脳 癌

脳組織において始まる腫瘍は、脳の原発腫瘍として知られており、それらが始まる細胞の種類または脳の部分に従って名づけられる。最もよくある原発性脳腫瘍は、グリア細胞で始まり、神経膠腫と呼ばれる。多数の種類神経膠腫がある：（１）星状細胞腫 - この腫瘍は、星状細胞と呼ばれる星型グリア細胞から生じる。成人では、星状細胞腫は、ほとんどの場合、大脳中に生じる。小児では、脳幹、大脳および小脳中に生じる。グレードⅠⅠ星状細胞腫は、未分化星状細胞腫と呼ばれることもある。グレードⅤ星状細胞腫は、普通、多形性膠芽腫と呼ばれる。（２）脳幹膠腫 - この腫瘍は、脳の最下部中に生じる。脳幹膠腫は、ほとんどの場合、低年齢小児および中年成人において診断される。（３）上衣腫 - この腫瘍は、脳室または脊髄の中心管の内側を覆う細胞から生じ、小児および若年成人において最もよく見られる。（４）乏突起膠腫 - この稀な腫瘍は、神経を覆い、保護する脂肪性物質を構成する細胞から生じる。これらの腫瘍は、普通、大脳中に生じる。それらはゆっくりと増殖し、普通、周りの脳組織中には広がらない。それらは中年成人において最もよく見られる。脳腫瘍の症状は、腫瘍の大きさ、種類および位置に応じて変わる。症状は、腫瘍が、神経を圧迫するか、または脳の特定の区域に損傷を与える場合に引き起こされ得る。それらはまた、脳が膨潤するか、液体が頭蓋内で増大する場合にも引き起こされ得る。脳腫瘍の最もよくある症状として、頭痛（普通、朝により激しい）；悪心または嘔吐；発語、視力または聴力の変化；平衡または歩行の問題；気分、人格または集中力の変化；記憶の問題；筋肉の痙攣（jerking）または攣縮〔発作または痙攣（convulsions）〕；および腕または脚の痺れ感または刺痛が挙げられる（National Cancer Institute, 「NIH Publication No. 09-1558」 Rockville, MD, May 2009）。腫瘍応答に対する抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの効果は、Bello et al., Clin.Cancer Res. 8:3539-48, 2002 に記載されるものと同様のヒト神経膠腫異種移植片モデルにおいて評価できる。

20

30

【 0 1 7 3 】

g . 甲 状 腺 癌

乳頭状および濾胞性甲状腺癌は、すべての甲状腺癌の 80 ～ 90 パーセントを占める。両種類とも、甲状腺の濾胞中で始まる。ほとんどの乳頭状および濾胞性甲状腺癌がゆっくりと増殖する傾向がある。それらが早期に検出される場合には、ほとんどは成功裏に治療され得る。髄様甲状腺癌は、甲状腺癌の症例の 5 ～ 10 パーセントを占め、濾胞ではなく、C 細胞中で生じる。未分化甲状腺癌は、極めて稀な種類の甲状腺癌であり（症例の 1 ～ 2 パーセントにすぎない）、濾胞中で生じる。癌細胞は高度に異常であり、認識することが困難である。この種の癌は、普通、癌細胞が迅速に増殖し、広がる傾向があるので、制御することは極めて困難である。初期甲状腺癌は、症状を引き起こさないことが多い。しかし、癌が増殖するにつれ、症状として、以下を挙げることができる：喉仏の付近の頸部前面のしこりもしくは小結節；しわがれ声もしくは正常な声での発語困難；特に、頸部の腫れたリンパ節；嚥下もしくは呼吸の困難；または咽頭もしくは頸部における疼痛（National Cancer Institute, 「NIH Publication No. 07-4994」 Rockville, MD, Sept. 2007

40

50

)。腫瘍応答に対する抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの効果は、Quidville et al., *Endocrinology* 145:2561-71, 2004に記載されるものと同様のヒト腫瘍異種移植片モデルにおいて評価できる。

【 0 1 7 4 】

h . 肝臓癌

2つの異なる種類の原発性肝臓癌がある。最もよくある種類は、肝細胞腫または肝細胞癌 (HCC) と呼ばれ、肝臓の主な細胞 (肝細胞) から生じる。この種類は、普通、肝臓に限定されるが、時折、その他の臓器に広がる。また、線維層板型肝細胞腫と呼ばれる、より稀な、肝細胞腫の無関係のサブタイプがあり、これはより若い人において生じ得る。もう1つの種類の原発性肝臓癌は、胆管の細胞で始まり、胆管癌腫または胆管癌と呼ばれる。肝細胞腫を発症するほとんどの人が、普通、肝臓の硬変と呼ばれる状態を有している。これは、肝臓全体の微細な瘢痕であり、これは、感染および長期間にわたる大量のアルコール摂取を包含する種々の原因による。しかし、肝臓の硬変を有する人の少数のみが、原発性肝臓癌を発症する。B型肝炎またはC型肝炎ウイルスのいずれかの感染は、肝臓癌につながる場合があり、硬変を引き起こし得、肝細胞腫を発症するリスクが増大する。身体中に過剰の鉄の沈着を引き起こすヘモクロマトーシスと呼ばれる稀な状態を有する人は、肝細胞腫を発症するより高い機会を有する。抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを使用して、肝細胞癌を治療、予防してもよく、その進行を阻害し、その発症を遅延してもよく、および / あるいはその重篤度を低減するか、または肝細胞癌と関連している状態もしくは症状の少なくとも1種を阻害してもよい。肝細胞癌は、肝炎 (例えば、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎およびD型肝炎) 感染と関連している場合も、そうではない場合もある。腫瘍応答に対する抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの効果は、Zhou et al., *Clin. Cancer Res.* 9:6030-7, 2003およびHuynh et al., *J. Cell Mol. Med.* 2008 (E-Publication 10.1111/j.1582-4934.2008.00364., 2008, Blackwell Synergy)に記載されるものと同様のヒト腫瘍異種移植片モデルにおいて評価できる。

10

20

【 0 1 7 5 】

i . 肺癌

腫瘍応答に対する抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの効果は、ヒト小 / 非小細胞肺癌腫異種移植片モデルにおいて評価できる。手短には、ヒト腫瘍を、免疫不全 (immunodeficient) マウスに移植し、これらのマウスを、抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを、単独でまたはその他の薬剤と組み合わせて用いて治療する。治療の有効性は、腫瘍成長を評価することによって実証できる (Nemati et al., *Clin Cancer Res.* 6:2075-86, 2000およびHu et al., *Clin. Cancer Res.* 10:7662-70, 2004)。

30

【 0 1 7 6 】

2 . 固形腫瘍に対するエンドポイントおよび抗腫瘍活性

各プロトコルが、腫瘍応答評価を異なって定義し得るが、RECIST [固形癌の効果判定基準 (Response evaluation Criteria in solid tumors)] 判定基準が、National Cancer Instituteによって腫瘍応答の評価のために推奨されるガイドラインであると現在考えられている (Therasse et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 92:205-216, 2000参照のこと)。RECIST判定基準によれば、腫瘍応答とは、すべての測定可能な病変または転移の低減または排除を意味する。疾患は、一般に、従来の技術を用いて 20 mmまたはスパイラルCTスキャンを用いて 10 mmとして少なくとも一次元で正確に測定できる病変を含む場合に測定可能であると考えられ、医学的写真もしくはX線、コンピューター断層撮影 (CT)、磁気共鳴画像法 (MRI) または臨床検査 (病変が表在性である場合には) によって周縁部が明確に定められる。測定可能でない疾患とは、疾患が従来の技術を用いて < 20 mmまたはスパイラルCTスキャンを用いて < 10 mmの病変、真に測定可能でない病変 (正確に測定するには小さすぎる) を含むことを意味する。測定可能でない疾患として、胸腔浸出液、腹水および間接的な証拠によっ

40

50

て実証される疾患が挙げられる。

【0177】

固形腫瘍応答を評価するために、他覚状態の判定基準がプロトコールにとって必要である。代表的な判定基準として、以下が挙げられる：(1)すべての測定可能な疾患の完全な消失；新規病変なし；疾患関連症状なし；測定可能でない疾患の証拠なしとして定義される、完全奏功(CR)；(2)標的病変の最長直径の合計の30%減少として定義される部分奏功(PR)；(3)標的病変の最長直径の合計の20%増加または任意の新規病変の出現として定義される、進行性疾患(PD)；(4)CR、PRまたはPDに適格でないと定義される、安定または応答なし。(Therasse et al., 前掲参照のこと。)

【0178】

腫瘍学の技術分野内で認められているさらなるエンドポイントとして、全生存(OS)、無病生存率(DFS)、客観的奏効率(ORR)、腫瘍増殖停止時間(TTP)および無進行生存(PFS)が挙げられる(Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics, April 2005, Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Rockville, MD参照のこと)。

【0179】

3. 組合せ癌療法

これまでに論じたように、特定の実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを、疾患または障害の治療のための第2の薬剤と組み合わせて使用する。癌を治療するために使用する場合には、本発明の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを、従来の癌療法、例えば、手術、放射線療法、化学療法またはそれらの組合せなどと組み合わせて使用してもよい。特定の態様では、本発明に従う抗B7H6抗体または抗体-薬物コンジュゲートとの組合せ癌療法にとって有用なその他の治療薬として、血管新生抑制薬が挙げられる。いくつかのその他の態様では、併用療法にとって有用なその他の治療薬として、腫瘍成長に関与している特定の因子、例えば、EGFR、ErbB2(Her2)、ErbB3、ErbB4またはTNFなどのアンタゴニストが挙げられる。いくつかの態様では、本発明に従う抗体または抗体-薬物コンジュゲートをサイトカイン(例えば、腫瘍に対する免疫応答を刺激するサイトカイン)と同時投与する。癌の治療に特に適している例示的併用療法を、以下にさらに詳細に記載する。

【0180】

a. 腫瘍関連抗原を標的とする抗体

先に記載したように、抗体治療は、癌治療において特に成功してきたが、これは、特定の腫瘍が、独特な抗原、系列特異的抗原または正常な細胞に対して過剰な量で存在する抗原のいずれかを示すからである。モノクローナル抗体治療の抗腫瘍活性と関連している機序の1つが、抗体依存性細胞毒性(ADCC)である。ADCCでは、モノクローナル抗体が、標的細胞(例えば、癌細胞)と結合し、モノクローナル抗体の受容体を発現する特異的エフェクター細胞(例えば、NK細胞、単球、顆粒球)が、モノクローナル抗体/標的細胞複合体と結合し、その結果、標的細胞が死滅する。したがって、本発明の特定のバリエーションでは、癌に対して有効性を有する抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを、第2の腫瘍関連抗原(すなわち、B7H6以外の腫瘍関連抗原)に対するモノクローナル抗体と同時投与する。MAbの用量およびスケジュールは、同時投与される特定の抗体に帰する薬物動態および毒物動態特性に基づき、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートの投与と関連し得る任意の毒性を最小にしながら、これらの効果を最適化しなくてはならない。

【0181】

本明細書に記載される抗B7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートおよび腫瘍関連抗原に対する第2のモノクローナル抗体を用いる併用療法は、一次治療が失敗した場合に示されることがあり、二次治療として考慮され得る。本発明はまた、新規に診断され、これまでに抗癌剤を用いて治療されていない患者集団(「新規患者」)およ

びこれまでに任意のモノクローナル抗体治療を受けていない患者（「未処置患者」）において、一次治療として組合せを使用して提供する。

【0182】

本明細書に記載される抗B7H6抗体または抗体-薬物コンジュゲートはまた、腫瘍細胞の任意の直接抗体媒介性ADCCまたはCDCの不在下で、腫瘍関連抗原に対するモノクローナル抗体との併用療法において有用である。例えば、免疫系において阻害シグナルを遮断する抗体は、免疫応答の増強につながり得る。例として、（1）細胞毒性Tリンパ球関連抗原4（CTLA-4）、プログラム死-1（PD-1）、BおよびTリンパ球アテニユエータ（BTLA）などの阻害機能を有するB7Rファミリーの分子に対する抗体；（2）IL-10、TGFのような阻害性サイトカインに対する抗体ならびに（3）抗CD25またはCTLA-4のような抑制細胞を枯渇させるか、またはその機能を阻害する抗体が挙げられる。例えば、抗CTLA4 MA bは、マウスおよびヒトの両方において、免疫抑制的調節性T細胞（Treg）の機能を抑制するか、またはT細胞上のCTLA-4の、APCもしくは腫瘍細胞上のB7-1もしくはB7-2分子との結合によって伝達される阻害シグナルを阻害する。

10

【0183】

表6は、承認されたか、または本発明に従う併用療法が可能であるかについて試験されているモノクローナル抗体の包括的リストである。

【表 1】

表 6：抗 B 7 H 6 抗体または抗体－薬物コンジュゲートと組み合わせて使用するためのモノクローナル抗体治療

標的	薬物名	臨床的適応	企業
TRAIL-R1	HGS-ETR1	癌	HGS
TRAIL-R2	HGS-ETR2	固形腫瘍	HGS
CD40	SGN40	MM	Seattle Genetics
HER2	ハーセプチン	乳癌	Genentech
EGF-R	ABX-EGF	CRC、NSCLC、RCC	Abgenix
EGF-R	EMD72000	固形腫瘍	Merck
EGF-R	MDX-214	E G F - R 陽性腫瘍	Medarex
EGF-R	アービタックス	CRC	Imclone
$\alpha 5 \beta 3$ インテグリン	ビタキシン	乾癬、前立腺癌	AME/Lilly
CD152	CTLA-4	癌	Medarex
CD49e	インテグリン $\alpha 5$	癌	Protein Design Labs
MUC18 (TIM 様)	ABX-MA1	黒色腫	
TAG-72 ムチン	アナツモマブ(Anatumomab)	癌	
CD3	エクロメキシマブ(Ecromeximab)	黒色腫	協和発酵
CD64 (Fc GR1)	抗 C D 6 4	癌	Medarex
CEA	CEA-Cide	癌	Immunomedics
EpCAM	パノレックス (Panorex)	結腸直腸癌	Centocor
Lewis-Y-Ag	SGN15	癌	Seattle Genetics

【 0 1 8 4 】

b . チロシンキナーゼ阻害剤

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを、チロシンキナーゼ阻害剤と組み合わせて使用する。チロシンキナーゼは、アデノシン三リン酸から標的タンパク質へのリン酸基の転移を触媒する酵素である。チロシンキナーゼは、受容体および非受容体タンパク質チロシンキナーゼとして分類できる。それらは、増殖受容体を介した活性化を包含する、さまざまな正常な細胞プロセスにおいて重要な役割を果たし、種々の細胞種の増殖、生存および成長に影響を及ぼす。さらに、それらは、腫瘍細胞増殖を促進し、抗アポトーシス効果を誘導し、血管新生および転移を促進すると考えられている。増殖因子を介した活性化に加えて、体細胞突然変異を介したプロテインキナーゼ活性化が、腫瘍発生の一般的な機序である。同定された突然変異の一部は、B - R a f キナーゼ、F L t 3 キナーゼ、B C R - A B L キナーゼ、c - K I T キナーゼ、上皮成長因子 (E G F R) および P D G F R 経路中のものである。H e r 2、V E G F R および c - M e t は、癌の進行および腫瘍発生に関与しているその他の重要な受容体チロシンキナーゼ (R T K) 経路である。多数の細胞プロセスがチロシンキナーゼによって開始されるので、それらは阻害剤の重要な標的と同定されている。

【 0 1 8 5 】

チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) は、受容体および非受容体チロシンキナーゼ両方の触媒チロシンキナーゼドメインとの結合について、アデノシン三リン酸 (ATP) と競合する、細胞内で作用する小分子である。この競合結合が、下流のシグナル伝達の開始を遮断し、成長、生存および血管新生のようなこれらのシグナル伝達事象と関連しているエフェクター機能につながる。構造および計算論的アプローチを使用して、多数の医薬化学コンビナトリアルライブラリーから、チロシンキナーゼを阻害するいくつかの化合物を同定した。

【 0 1 8 6 】

ほとんどの TKI は、腫瘍細胞の直接阻害によってか、または血管新生の阻害によって腫瘍の成長を阻害すると考えられる。さらに、特定の TKI は、ソラフェニブおよびスニチニブを包含する VEGF ファミリー受容体によるシグナル伝達に影響を及ぼす。いくつかの場合には、TKI は、樹状細胞および NK 細胞のようなその他の自然免疫細胞の機能を活性化するとわかっている。これは、イマチニブについて、動物モデルにおいて最近報告された。イマチニブは、樹状細胞および NK 細胞によるキラー活性を増強するとわかっている TKI である (総説については、Smyth et al., NEJM 354:2282, 2006 を参照のこと)。

【 0 1 8 7 】

BAY 43 - 9006 [ソラフェニブ、ネクサバル (登録商標)] および SU 11248 [スニチニブ、スーテント (登録商標)] は、転移性腎細胞癌 (RCC) において使用するために最近承認された 2 種のこのような TKI である。いくつかのその他の TKI が、種々の種類の癌の治療のための開発の後期および初期段階にある。その他の TKI として、それだけには限らないが、イマチニブメシル酸塩 [グリベック (登録商標)、Novartis]; ゲフィチニブ [イレッサ (登録商標)、AstraZeneca]; エルロチニブ塩酸塩 [タルセバ (登録商標)、Genentech]; バンデタニブ [ザクティマ (登録商標)、AstraZeneca]; ティピファニブ [ザルネストラ (登録商標)、Janssen-Cilag]; ダサチニブ [スプリセル (登録商標)、Bristol Myers Squibb]; ロナファーニブ [サラサル (Sarasar) (登録商標)、Schering Plough]; バタラニブコハク酸塩 (Novartis, Schering AG); ラパチニブ [タイケルブ (登録商標)、GlaxoSmithKline]; ニロチニブ (Novartis); レスタウルチニブ (Cephalon); パゾパニブ塩酸塩 (GlaxoSmithKline); アキシチニブ (Pfizer); カネルチニブ二塩酸塩 (Pfizer); ペリチニブ (Pelitinib) (National Cancer Institute, Wyeth); タンデュチニブ (Millennium); ポスチニブ (Wyeth); セマキサニブ (Sugen, Taiho); AZD - 2171 (AstraZeneca); VX - 680 (Merck, Vertex); EXEL - 0999 (Exelixis); ARRY - 142886 (Array BioPharma, AstraZeneca); PD - 0325901 (Pfizer); AMG - 706 (Amgen); BIBF - 1120 (Boehringer Ingelheim); SU - 6668 (Taiho); CP - 547632 (OSI); (AEE - 788 (Novartis); BMS - 582664 (Bristol-Myers Squibb); JNK - 401 (Celgene); R - 788 (Rigel); AZD - 1152HQP A (AstraZeneca); NM - 3 (Genzyme Oncology); CP - 868596 (Pfizer); BMS - 599626 (Bristol-Myers Squibb); PTC - 299 (PTC Therapeutics); ABT - 869 (Abbott); EXEL - 2880 (Exelixis); AG - 024322 (Pfizer); XL - 820 (Exelixis); OSI - 930 (OSI); XL - 184 (Exelixis); KRN - 951 (キリンビール); CP - 724714 (OSI); E - 7080 (エーザイ); HKI - 272 (Wyeth); CHIR - 258 (Chiron); ZK - 304709 (Sc

10

20

30

40

50

hering AG); EXEL - 7647 (Exelixis); BAY - 57 - 9352 (Bayer); BIBW - 2992 (Boehringer Ingelheim); AV - 412 (AVEO); YN - 968D1 (Advenchen Laboratories); Midostaurin (Novartis); Perifosine (Aeterna Zentaris, Keryx, National Cancer Institute); AG - 024322 (Pfizer); AZD - 1152 (AstraZeneca); ON - 01910Na (Onconova); および AZD - 0530 (AstraZeneca) が挙げられる。

【0188】

c. 化学療法の組合せ

特定の実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを、1種または複数の化学療法薬と組み合わせて投与する。化学療法薬は、例えば、DNAまたはRNAのいずれかに影響を及ぼすことおよび細胞周期複製を干渉することによって、異なる作用様式を有する。DNAレベルか、またはRNAレベルに作用する化学療法薬の例として、代謝拮抗剤（アザチオプリン、シタラビン、リン酸フルダリン、フルダリン、ゲムシタビン、シタラビン、クラドリビン、カペシタビン6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、メトトレキサート、5 - フルオロウラシルおよびヒドロキシ尿素 (hydroxyurea) ; アルキル化剤（メルファラン、ブスルファン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、イフォスファミド、ダカルバジン (Dacarabazine) 、プロカルバジン、クロラムブシル、チオテパ、ロムスチン、テモゾロミド (Temozolamide) など) ; 有糸分裂阻害薬（ビノレルビン、ピンクリスチン、ビンブラスチン、ドセタキセル、パクリタキセルなど) ; トポイソメラーゼ阻害剤（ドキソルビシン (Doxorubicin) 、アムサクリン、イリノテカン、ダウノルビシン、エピルビシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、イダルビシン、テニボシド、エトボシド、トボテカンなど) ; 抗生物質（アクチノマイシンおよびブレオマイシンなど) ; アスパラギナーゼ; アントラサイクリンまたはタキサンがある。

【0189】

d. 放射線療法の組合せ

いくつかのバリエーションでは、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを、放射線療法と組み合わせて投与する。特定の腫瘍は、放射線照射または放射性医薬品を用いて治療できる。放射線療法は、一般に、切除不能な腫瘍もしくは手術不可能な腫瘍および/または腫瘍転移を治療するために使用される。放射線療法は、通常、3つの方法で送達される。外部照射は、身体から少し離れて施し、線 (^{60}Co) およびX線を包含する。近接照射療法は、供給源、例えば、 ^{60}Co 、 ^{137}Cs 、 ^{192}Ir または ^{125}I を標的組織とともに、または接触させて使用する。

【0190】

e. ホルモン剤の組合せ

いくつかの実施形態では、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを、ホルモンまたは抗ホルモンと組み合わせて投与する。特定の癌は、ホルモン依存性と関連しており、これとして、例えば、卵巣癌、乳癌および前立腺癌が挙げられる。ホルモン依存性癌治療は、抗アンドロゲンまたは抗エストロゲン化合物の使用を含み得る。癌療法に使用されるホルモンおよび抗ホルモンとして、リン酸エストラムスチン、リン酸ポリエストラジオール、エストラジオール、アナストロゾール、エキセメスタン、レトロゾール、タモキシフェン、酢酸メゲストロール、酢酸メドロキシプロゲステロン、オクトレオチド、酢酸シプロテロン、ピカルタミド (Bicalutamide) 、フルタミド、トリプトレリン (Tritorelin) 、ロイプロレリン、プセレリンおよびゴセレリンが挙げられる。

【0191】

投与のために、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを医薬組成物として製剤する。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを含む医薬組成物は、医薬上有用な組成物を調製するための公知の方法に従って

製剤でき、それによって、治療的分子を混合物中で医薬上許容される担体と組み合わせる。組成物は、その投与がレシipient患者によって許容され得る場合に、「医薬上許容される担体」といわれる。滅菌リン酸緩衝生理食塩水が、医薬上許容される担体の1つの例である。その他の適した担体は、当業者に周知である。(例えば、Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995) 参照のこと。) 製剤は、1種または複数の賦形剤、保存料、可溶化剤、緩衝剤、バイアル表面でのタンパク質の損失を防ぐためのアルブミンなどをさらに含み得る。

【0192】

抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを含む医薬組成物を、対象に有効量で投与する。本発明の方法によれば、抗体または抗体-薬物コンジュゲートを、例えば、筋肉内、皮下、静脈内、心房内、関節内、非経口、鼻腔内、肺内、経皮、胸膜内、くも膜下腔内および経口経路の投与を包含する種々の投与様式によって対象に投与してもよい。予防および治療目的上、抗体または抗体-薬物コンジュゲートを、単回ボラスデリバリーで、長期間にわたる持続性デリバリー(例えば、持続性経皮デリバリー)によって、または反復投与プロトコルで(例えば、1時間ごとに、毎日または週単位で)で対象に投与してもよい。

10

【0193】

これに関連して、有効な投与量の決定は、通常、動物モデル研究とそれに続くヒト臨床試験に基づき、モデル対象において対象疾患または障害の発生または重篤度を大幅に低減する有効な投与量および投与プロトコルを決定することによって導かれる。本発明の組成物の有効な用量は、投与の手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるか、動物であるか、投与されるその他の医薬、治療が予防的であるか、治療的であるか、ならびに組成物自体の特定の活性および個体において所望の応答を誘発するその能力を包含する多数の異なる因子に応じて変わる。普通、患者はヒトであるが、一部の疾患では、患者は、非ヒト哺乳類であり得る。通常、投与計画は、最適な治療応答を提供するよう、すなわち、安全性および有効性を最適化するよう調整される。したがって、治療上または予防上有効な量はまた、任意の望ましくない副作用を、NKp30媒介性NK細胞活性を調節するという有益な効果が上回るものである。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートの投与には、投与量は、通常、約0.1 μ g ~ 100 mg / 対象の体重1 kgまたは1 μ g / 対象の体重1 kg ~ 約50 mg / 対象の体重1 kg、より普通は、10 μ g ~ 5 mg / 対象の体重1 kgの範囲である。より特定の実施形態では、有効量の薬剤は、約1 μ g / kgから約20 mg / kgの間、約10 μ g / kgから約10 mg / kgの間または約0.1 mg / kgから約5 mg / kgの間である。この範囲内の投与量は、単回または例えば、1日あたり複数回の投与、毎日、毎週、隔週もしくは毎月の投与を包含する複数回投与によって達成され得る。例えば、特定のバリエーションでは、投与計画は、最初の投与と、それに続く、毎週または隔週間隔の複数回のその後の投与とからなる。別の投与計画は、最初の投与と、それに続く、毎月または隔月間隔の複数回の、その後の投与とからなる。あるいは、投与は、NK細胞活性のモニタリングおよび/または疾患もしくは障害臨床症状によって示されるように不規則にであってもよい。

20

30

【0194】

医薬組成物の投与量は、標的部位で所望の濃度を維持するよう主治医によって変えられる場合もある。例えば、静脈内デリバリー様式が選択される場合には、標的組織での血流中の薬剤の局所濃度は、対象の状態、予測される測定される応答に応じて、1リットルあたり約1 ~ 50 ナノモルの組成物の間、時には、1リットルあたり約1.0 ナノモルから1リットルあたり10、15または25 ナノモルの間であり得る。デリバリー様式、例えば、経皮デリバリー対粘膜表面へのデリバリーに基づいて、より高濃度またはより低濃度を選択してもよい。投与量はまた、投与される製剤、例えば、点鼻薬対散剤、徐放性経口または注射される粒子、経皮製剤などの放出速度に基づいて調整されなければならない。同じ血清濃度レベルを達成するために、例えば、5 ナノモルの放出速度を有する(標準条件下で)持続放出粒子は、10 ナノモルの放出速度を有する粒子の投与量の約2倍投与す

40

50

る。

【0195】

抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲート組成物を含む医薬組成物は、液体形態で提供しても、エアゾールで提供しても、固体形態で提供してもよい。液体形態は、注射用溶液、エアゾール、液滴、トポロジカル溶液 (topological solutions) および経口懸濁液によって例示される。例示的固体形態として、カプセル剤、錠剤および放出制御形態が挙げられる。後者の形態は、ミニ浸透圧ポンプおよび埋め込み錠によって例示される。[例えば、Bremer et al., Pharm. Biotechnol. 10:239, 1997; Drug Delivery Systems 95-123 (Ranade and Hollinger, eds., CRC Press 1995)中のRanade, 「Implants in Drug Delivery」; Protein Delivery: Physical Systems 239-254 (Sanders and Hendren, eds., Plenum Press 1997)中のBremer et al., 「Protein Delivery with Infusion Pumps」; Protein Delivery: Physical Systems 93-117 (Sanders and Hendren, eds., Plenum Press 1997)中のYewey et al., 「Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant」参照のこと。]その他の固体形態として、クリーム剤、ペースト剤、その他のトポロジカル適用などが挙げられる。

10

【0196】

リポソームは、対象に治療的組成物を、例えば、静脈内に、腹膜内に、くも膜下腔内に、筋肉内に、皮下に、または経口投与、吸入もしくは鼻腔内投与によって送達する1つの手段を提供する。リポソームは、水性コンパートメントを囲む1または複数の脂質二重層からなる微細な小胞である。[全般的に、Bakker-Woudenberg et al., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Suppl. 1):S61, 1993; Kim, Drugs 46:618, 1993; Drug Delivery Systems 3-24 (Ranade and Hollinger, eds., CRC Press 1995)中のRanade, 「Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers」参照のこと。]リポソームは、組成が細胞膜と同様であり、結果として、リポソームは安全に投与でき、生分解性である。調製方法に応じて、リポソームは、単層である場合も、多層である場合もあり、リポソームは大きさが変わり得、 $0.02\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ 超の範囲の直径を有する。種々の薬剤をリポソーム：二層中の疎水性薬剤区分および内部の水性空間 (単数および複数) 内の親水性薬剤区分中にカプセル封入してもよい。[例えば、Machy et al., Liposomes In Cell Biology And Pharmacology (John Libbey 1987); Ostro et al., American J. Hosp. Pharm. 46:1576, 1989参照のこと。]さらに、リポソームの大きさ、二層の数、脂質組成ならびにリポソームの電荷および表面の特徴を変更することによって、カプセル封入された薬剤の治療的有効性を制御することが可能である。

20

30

【0197】

リポソームは実質的にいかなる種類の細胞にも吸着し、次いで、カプセル封入された薬剤をゆっくりと放出することができる。あるいは、吸収されたりリポソームは、食作用性である細胞によって貪食され得る。エンドサイトーシスに、リポソーム脂質のリソソーム内分解およびカプセル封入された薬剤の放出が続く (Scherphof et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 446:368, 1985参照のこと)。静脈内投与後、小さいリポソーム ($0.1 \sim 1.0\mu\text{m}$) は、通常、主に肝臓および脾臓中に局在する細網内皮系の細胞によって取り込まれ、他方、 $3.0\mu\text{m}$ より大きいリポソームは肺中に沈着する。細網内皮系の細胞による小さいリポソームのこの選択的取り込みは、化学療法薬をマクロファージに、および肝臓の腫瘍に送達するために使用されてきた。

40

【0198】

細網内皮系は、リポソーム粒子の大量投与での飽和または薬理学的手段による選択的マクロファージ不活性化を包含するいくつかの方法によって回避され得る (Claassen et al., Biochim. Biophys. Acta 802:428, 1984参照のこと)。さらに、糖脂質またはポリエチレングリコールで誘導体化したリン脂質をリポソーム膜中に組み込むことが、細網内皮系による取り込みの大幅な減少をもたらすことがわかった (Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1068:133, 1991; Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1150:9, 1993)。

【0199】

50

リボソームはまた、リン脂質組成を変更することによって、またはリボソーム中に受容体もしくは対抗受容体を挿入することによって、特定の細胞または臓器を標的とするよう調製できる。例えば、高含量の非イオン性界面活性剤を用いて調製されたりリボソームが、肝臓を標的とするために使用されている。(例えば、Hayakawa et alの日本特許第04 - 244, 018号; Kato et al., Biol. Pharm. Bull. 16:960, 1993参照のこと。)これらの製剤は、メタノール中で、ダイズホスファチジルコリン(phosphatidylcholine)と、
- トコフェロールと、エトキシ化硬化ヒマシ油(HCO - 60)とを混合することと、
真空下で混合物を濃縮することと、次いで、混合物を水を用いて再構成することとによって調製された。ダイズ由来ステアリルグルコシド混合物(SG)およびコレステロール(Ch)を用いるジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)のリボソーム製剤も、
肝臓を標的とするわかっている。(Shimizu et al., Biol. Pharm. Bull. 20:881, 1997参照のこと。)

10

【0200】

あるいは、抗体、抗体断片、炭水化物、ビタミンおよび輸送タンパク質などの種々のターゲティング対抗受容体を、リボソームの表面に結合してもよい。例えば、肝臓にターゲティングするために、もっぱら肝臓細胞の表面で発現されるアシアロ糖タンパク質(ガラクトース)受容体を標的とするよう、リボソームを分岐型ガラクトシル脂質誘導体を用いて改変してもよい。(Kato and Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14:287, 1997; Murahashi et al., Biol. Pharm. Bull. 20:259, 1997参照のこと。)組織ターゲティングへのより一般的なアプローチでは、標的細胞を、標的細胞によって発現される対抗受容体に特異的なビオチン化抗体を用いて予備標識する。(Harasym et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 32:99, 1998参照のこと。)遊離抗体の血漿消失後、ストレプトアビジンがコンジュゲートしているリボソームを投与する。別のアプローチでは、ターゲティング抗体を、リボソームと直接結合する。(Harasym et al., 前掲参照のこと。)

20

【0201】

タンパク質マイクロカプセル化の標準技術を使用して、抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートをリボソーム内にカプセル封入してもよい。[例えば、Anderson et al., Infect. Immun. 31:1099, 1981; Anderson et al., Cancer Res. 50:1853, 1990; Cohen et al., Biochim. Biophys. Acta 1063:95, 1991; Liposome Technology (Vol. III) 317 (Gregoriadis, ed., CRC Press, 2nd ed. 1993)中のAlving et al. 「Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies」; Wassef et al., Meth. Enzymol. 149:124, 1987参照のこと。]上記のように、治療上有用なリボソームは、種々の構成要素を含有し得る。例えば、リボソームは、ポリ(エチレングリコール)の脂質誘導体を含み得る。(Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1150:9, 1993参照のこと。)

30

【0202】

高い全身レベルの治療的タンパク質を維持するよう、分解性ポリマーマイクロスフェアが設計されている。マイクロスフェアは、ポリ(ラクチド - コ - グリコリド)(PLG)、ポリ酸無水物、ポリ(オルトエステル)などの分解性ポリマー、タンパク質がポリマー中に封入されている非生物分解性の酢酸エチルビニルポリマーから調製される。[例えば、Gombotz and Pettit, Bioconjugate Chem. 6:332, 1995; Drug Delivery Systems 51-93 (Ranade and Hollinger, eds., CRC Press 1995)中のRanade, 「Role of Polymers in Drug Delivery」; Protein Delivery: Physical Systems 45-92 (Sanders and Hendren, eds., Plenum Press 1997)中のRoskos and Maskiewicz, 「Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery」; Bartus et al., Science 281:1161, 1998; Putney and Burke, Nature Biotechnology 16:153, 1998; Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2:548, 1998参照のこと。]ポリエチレングリコール(PEG)でコーティングされたナノスフェアも、治療的タンパク質の静脈内投与のための担体を提供し得る。(例えば、Gref et al., Pharm. Biotechnol. 10:167, 1997参照のこと。)

40

【0203】

その他の投与形は、例えば、Ansel and Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and

50

Drug Delivery Systems (Lea & Febiger, 5th ed. 1990); Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995)およびRanade and Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996)によって示されるように、当業者によって考案され得る。

【0204】

本明細書に記載される医薬組成物はまた、併用療法との関連で使用してもよい。本明細書において、用語「併用療法」とは、対象が、少なくとも1種の治療上有効な用量の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを、疾患または障害を治療するための第2の薬剤と組み合わせて投与されることを示す。抗B7H6抗体または抗体-薬物コンジュゲートおよび第2の薬剤は、一緒に同時投与してもよく（例えば、両薬剤を含む単一組成物として、または同じもしくは実質的に同じ部位に別個の組成物として同時に）、あるいは、別個に投与してもよい（例えば、異なる時間で、および/または異なる投与部位で）。

10

【0205】

医薬組成物は、本明細書に記載される治療的ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む容器を含むキットとして供給されてもよい。治療的分子は、例えば、単回もしくは複数回用量のための注射用溶液の形態で、または注射の前に再構成される滅菌散剤として提供され得る。あるいは、このようなキットは、治療的ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを投与するためのドライパウダー分散器、液体エアゾール発生器または噴霧器を含み得る。このようなキットは、医薬組成物の適応症および使用法に関する書面情報をさらに含み得る。例えば、このような情報は、B7H6に対する既知過敏症の患者では抗B7H6組成物は禁忌となるという記載を含み得る。

20

【0206】

C. B7H6発現を検出する方法

本明細書に記載される抗体はまた、診断的用途を含む、B7H6の発現を検出する方法において用途がある。B7H6発現の検出は、複数の理由で重要であり得る。例えば、癌検出において、細胞または組織中のB7H6発現を使用してもよい。検出は、癌のスクリーニング、診断または予後の一部として使用され得る。この検出方法を使用して、対象から得た生物学的試料中のB7H6発現のレベルを、癌の重篤度もしくはステージを調べることはまた治療をモニタリングすることの一部として標準または参照と比較してもよい。この検出方法は、1回行ってもよく、または治療の間、対象の進行をモニタリングするためのモニタリングなどの用途のために複数回使用して、癌が再発しているかどうかを示してもよい。

30

【0207】

特定の実施形態では、B7H6の細胞性発現を検出する方法は、試験される生物学的試料を、抗B7H6モノクローナル抗体と接触させることと、次いで、抗体の結合を検出することを含む。抗体の結合は、細胞上のB7H6の存在を示す。抗体およびB7H6は、抗体-抗原複合体を形成し、複合体が形成する条件は、使用される生物学的試料および方法に応じて変わり、決定は当業者によって容易に行われる。適した抗体として、ヒトB7H6の細胞外ドメインとの結合について、(i)クローン4E5.5（受託番号CNCMI-4242）のハイブリドーマ；(ii)クローン9G9.2（受託番号CNCMI-4243）のハイブリドーマ；(iii)クローン10E2.9（受託番号CNCMI-4244）のハイブリドーマ；および(iv)クローン17B1.3（受託番号CNCMI-4245）のハイブリドーマからなる群から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合する抗体が挙げられる。

40

【0208】

生物学的試料は、試験される無傷のヒト細胞または細胞の膜画分を含み得る。例えば、特許請求される方法を用いて試験される細胞は、B7H6を発現する疑いのある細胞および対象において癌と関連している細胞、例えば、いくつか例を挙げると、結腸癌細胞、肝臓癌細胞、子宮頸癌細胞、肺癌細胞、膵臓癌細胞、前立腺癌細胞、原血球性白血病細胞、

50

B細胞リンパ腫細胞、単球性リンパ腫細胞、赤白血病細胞、パーキットリンパ腫細胞および慢性骨髄性白血病細胞などを包含する。

【0209】

B7H6発現細胞の存在を示すための抗体による結合の検出は、当技術分野で公知の任意の方法による特異的結合についてのアッセイを含む。周知である多数の異なる結合アッセイ形式がある。例えば、結合アッセイ系は、ほんのいくつか例を挙げると、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素アッセイ、ゲル拡散法沈降素アッセイ、免疫放射線測定法、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイ、補体固定アッセイのような技術を使用する直接的なものであっても、間接的なものであってもよい。このようなアッセイは、日常的なものであり、当技術分野で周知である。検出を増強するために、抗体を、放射性同位元素、蛍光標識、化学発光標識、酵素標識または生物発光標識などの検出可能な標識を用いて標識する。標識を抗体にコンジュゲートする方法は、当技術分野で公知であり、任意の適当な方法を使用してよい。

10

【0210】

本発明は、B7H6を発現する癌の種類を有する疑いのある対象を診断する方法をさらに提供する。この方法は、対象、一般に、ヒト（しかし、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ブタなどといった別の哺乳類であってもよい）に、上記のものなどの検出可能な標識（label）とコンジュゲートしている抗B7H6モノクローナル抗体を投与することを含む。適した抗体として、ヒトB7H6の細胞外ドメイン（配列番号2のアミノ酸残基25～266）との結合について、（i）クローン名称番号4E5.5のハイブリドーマ；（ii）クローン名称番号9G9.2のハイブリドーマ；（iii）クローン名称番号10E2.9のハイブリドーマ；および（iv）クローン名称番号17B1.3のハイブリドーマから選択されるハイブリドーマによって産生される抗体と競合する抗体が挙げられる。いくつかの実施形態では、抗体は、B7H6の細胞外ドメインとの結合について、上記の（i）～（iii）から選択されたハイブリドーマによって産生される抗体と競合する。特定のバリエーションでは、抗体は、上記の（i）～（iv）から選択されるか、または上記の（ii）～（iii）から選択されるハイブリドーマによって産生される抗体に由来するキメラまたはヒト化抗体である。抗体の投与後、対象内の抗体の分布を検出する。任意の特定の標識の分布を検出する方法は、当業者に公知であり、任意の適当な方法を使用してよい。いくつかの限定されない例として、コンピューター断層撮影法（CT）、ポジトロン断層撮影法（PET）、磁気共鳴画像法（MRI）、蛍光、化学発光および超音波検査が挙げられる。

20

30

【0211】

以下の限定されない例によって、本発明をさらに例示する。

【実施例】

【0212】

[実施例1]

マウス抗ヒトB7H6モノクローナル抗体の製造および選択

A. 免疫化

Balb/cマウスを、以下のプロトコールに従って免疫誘導した：

【0213】

D0：100 μgの可溶性B7H6 [C末端マウスFc融合物を有するヒトB7H6の細胞外ドメイン（hB7H6/mFc2；配列番号3の残基25～500で示される成熟形態）]のi.v.注射

【0214】

D15：100 μgの可溶性B7H6のi.v.注射

【0215】

D25：100 μgの可溶性B7H6を用いるブーストi.p.

【0216】

40

50

3 回目の免疫誘導の 3 日後に、脾臓を採取した。脾細胞を単離し、骨髓腫細胞と融合し、40 枚の 96 ウェルプレート中に播種した。3 週間培養した後、3840 種のハイブリドーマの上清を、抗ヒト B7H6 モノクローナル抗体の存在についてスクリーニングした。

【0217】

B. ハイブリドーマの第 1 のスクリーニング

抗ヒト B7H6 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択するために、B7H1 を発現する P815 細胞および B7H6 を発現する P815 細胞を、3840 種のハイブリドーマの上清を用いて染色した。ハイブリドーマ上の染色は、Cy5 がコンジュゲートしている抗マウス Ig を使用する FACS 分析によって明らかにした。2 種の P815 トランスフェクタントを区別するために、P815 B7-H1 細胞をまず CFSE を用いて染色した。結果は、3840 種のハイブリドーマ上清のうち 114 種が、B7H1 を発現する P815 細胞に対する B7H6 を発現する P815 細胞の染色について陽性であると示し、それによって、対応するハイブリドーマによる抗 B7H6 mAb の産生が示された。

10

【0218】

C. ハイブリドーマの第 2 のスクリーニング

第 2 のスクリーニングを実施して、遮断抗体を選択した。これらのハイブリドーマを同定するために、114 種の上清の各々の、P815・B7H6 細胞との NKp30Fc 結合を遮断する能力を評価した。選択されたハイブリドーマを並行して調べ、P815・B7H6 を染色することによってそれらが依然として抗 B7H6 mAb を産生していることを確認した。さらに、B7H6 を発現する P815 細胞との NKp30Fc 結合の結合を阻害するとこれまでにわかっている抗 B7H6 ポリクローナル抗体 (pAb) を、正の対照として使用した。

20

【0219】

結果は、P815・B7-H6 細胞は NKp30Fc によって染色され、抗 B7H6 pAb は、10 µg/ml でインキュベートした場合には染色を阻害することを示した。114 種の上清を、結果に従って 4 群に分けた：(1) NKp30Fc 結合を遮断した抗 B7H6 mAb を産生するハイブリドーマ (1/114)；(2) NKp30Fc 結合を遮断しなかった抗 B7H6 mAb を産生するハイブリドーマ (27/114)；(3) NKp30Fc 結合を部分的に遮断した抗 B7H6 mAb を産生するハイブリドーマ (1/114)；(4) もはや抗 B7H6 mAb を産生しなかったハイブリドーマ (85/114)。結論として、29 種のハイブリドーマが、抗 B7H6 mAb を効率的に産生し、そのうち 2 種のみが、mAb を遮断できた。抗 B7H6 mAb を産生する 29 種のハイブリドーマをクローニングした。

30

【0220】

D. ハイブリドーマのクローニング

29 種の選択されたハイブリドーマをクローニングした後、11 種のハイブリドーマは増殖せず、5 種のハイブリドーマは、陰性クローンをのみをもたらし、13 種が陽性クローンを生成した。フラスコ中で増幅した結果、依然として抗 B7H6 mAb を産生する、5 種の異なるハイブリドーマに由来する 9 種のクローンのみが得られた。以下のクローンを特性決定し、すべてがマウス IgG1 と同定された：4E5.5、5E1.4、9G9.2、10E2.9 および 17B1.3。

40

【0221】

B7H6 に対するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを、ブタペスト条約の下での最初の寄託物として、Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM、Institut Pasteur；Paris、France) 特許寄託機関に寄託し、以下の CNCM 寄託機関受託番号が与えられた：クローン 4E5.5 (受託番号 CNCM I-4242、2009 年 11 月 18 日に寄託された)；クローン 9G9.2 (受託番号 CNCM I-4

50

243、2009年11月18日に寄託された)；クローン10E2.9(受託番号CNCMI-4244、2009年11月18日に寄託された)；およびクローン17B1.3(受託番号CNCMI-4245、2009年11月18日に寄託された)。

【0222】

[実施例2]

マウス抗ヒトB7H6モノクローナル抗体の特性決定

A. 腫瘍細胞株に対するマウス抗ヒトB7H6モノクローナル抗体の反応性

抗ヒト-B6H7 mAb(4E5.5、5E1.4、9G9.2、10E2.9および17B1.3)の各々を、以下の腫瘍細胞株：HEK-293、HeLa EV2、K562およびRajiの染色について抗B7-H6ポリクローナル抗体に対して比較した。P815-B7H6細胞およびP815-B7-H1細胞を、それぞれ、陽性対照および陰性対照として使用した。5種のmAbの各々は、腫瘍細胞株の各々での染色について陽性であり、各mAbの染色強度プロフィールにおいて幾分かの変動があった。例えば、17B1.3は、pAbと同一強度でP815-B7-H6を染色したが、同一の有効性でRaji細胞は染色しなかった。また、17B1.3を用いたHEK-293およびHeLa EV2細胞の染色は、pAbを用いた場合よりもわずかに低い強度であり、4E5.5を用いたK562の染色は、pAbを用いた場合よりもわずかに少なかった。

10

【0223】

C. 競合アッセイによるエピトープ分化

4E5.5、5E1.4、9G9.2、10E2.9および17B1.3 mAbが、異なるエピトープ標的とすることが規定するために、mAb間の競合アッセイを行った。蛍光色素(Alexa647、Molecular Probes)と直接コンジュゲートしている唯一のクローンは、9G9.2であった。したがって、その他の精製された抗B7H6 mAbとともにインキュベートした後、9G9.2-Alexa647のHEK293細胞との結合の評価においてこの抗体を使用した。HEK-293細胞をまず、30μg/mlの精製したmAbとともにインキュベートし、次いで、10μg/mlの9G9.2-Alexa647とともにインキュベートした。次いで、HEK-293の9G9.2-Alexa647での染色を、FACS(登録商標)(BD Sciences, Inc.、Franklin Lakes、NJ)によって評価した。この分析の結果は、HEK-293細胞をmAb10E2.9、4E5.5または9G9.2とともにブレインキュベーションすることで、9G9.2-Alexa647での染色の強度が実質的に減少したことを示した。10E2.9、4E5.5または9G9.2とともにブレインキュベーションすることで、9G9.2-Alexa647での染色強度が実質的に減少したが、5E1.4とともにブレインキュベーションすることは、染色強度がわずかしき減少しなかった。17B1.3とともにブレインキュベーションすることでは、9G9.2-Alexa647染色に対して有意な効果はなかった。これらの結果は、10E2.9、4E5.5および9G9.2が、重複する(実質的に同一または同様ではない場合には)エピトープを標的とすることを示す。対照的に、17B1.3および9G9.2(および恐らくは、5E1.4および9G9.2)は重複していないエピトープを認識した。

20

30

40

【0224】

D. マウス抗ヒトB7H6モノクローナル抗体は、NKp30Fc結合を部分的に遮断する

NKp30Fc結合を幾分か遮断するmAbを同定するために、競合アッセイを実施した。NKp30Fcは、C末端Fc融合物を有するヒトNKp30の細胞外ドメインからなるヒトNKp30の可溶性形態である。B7H6ポリクローナル抗体、mIgG1、対照ならびに精製した4E5.5、5E1.4、9G9.2、10E2.9および17B1.3抗B7-H6 mAbとともにインキュベートした後の、NKp30FcのHEK293細胞との結合を評価した。HEK-293細胞をまず、洗浄した30μg/mlの精製したmAbとともにインキュベートし、次いで、予備形成された複合体NKp30Fc(

50

5 μ g/ml) / PE がコンジュゲートしている抗 hu Ig (5 μ g/ml、Jackson ImmunoResearch Laboratories、West Grove、PA) とともにインキュベートした。蛍光染色を、FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Inc. Ashland、OR) を使用して BD FACSCalibur (商標) (BD Sciences Inc.) で分析した。結果は、4E5.5 および 17B1.3 が、NKp30Fc 結合を部分的に遮断することを示した。

【0225】

E. マウス抗ヒト B7H6 モノクローナル抗体は、DOMSP30 活性化を部分的に遮断する

17B1.3 および 4E5.5 が、mAb を遮断していたことを確認するために、リポーター細胞 DOMSP30 を用いる機能的アッセイを実施した。DOMSP30 細胞をリポーター細胞系として使用して、B7H6 が、NKp30 によって直接的にシグナル伝達を誘導できたかどうかを評価した。(DOMSP30 細胞については、Schleinitz et al. Arthritis Rheum. 58:32156-3223, 2008 参照のこと)。DOMSP30 の活性化は、刺激の 24 時間後の IL-2 産生によってか、刺激の 4 時間後の CD69 アップレギュレーションのいずれかによって検出され得る。DOMSP30 細胞を、抗 NKp30、抗 NKp46、抗 B7H6 ポリクローナル抗体、マウス IgG1 または抗ヒト B7H6 モノクローナル抗体 4E5.5、5E1.4、9G9.2、10E2.9 および 17B1.3 (10 μ g/ml の) のうちの 1 種の存在下または不在下で、HeLa EV2 または HeLa PF 細胞株のいずれかとともに共培養した。4 時間共培養した後、CD69 + DOMSP30 細胞の数 (パーセント) を測定した。

【0226】

結果は、抗 NKp30 が DOMSP30 活性化を完全に遮断することならびに 4E5.5 および 17B1.3 が、DOMSP30 活性化を部分的に阻害することを示した。手短には、抗体共培養を行った、以下の CD69 + パーセンテージ：抗 NKp30 を用いて 10% 未満；抗 B7H6 pAb を用いて約 20%；ならびに mAb 4E5.5 および 17B1.3 の各々を用いて約 45% と比較して、抗体の不在下で、DOMSP30 細胞の約 75% は CD69 + であった。対照的に、抗 NKp46 ならびに mAb 9G9.2、10E2.9 および 5E1.4 の各々は、DOMSP30 活性化に対して効果を示さなかった。

【0227】

F. マウス抗ヒト B7H6 モノクローナル抗体 17B1.3 は、プロットティング抗体である

抗 B7H6 mAb のプロットティング抗体として作用する能力を、3 種の異なる細胞株：B7H6 を発現しない KHYG-1 ならびに各々 B7H6 を発現する P815、B7-H6 および HEK293 から得たタンパク質抽出物を用いる免疫プロット法実験を実施することによって試験した。抗 B7H6 pAb を、陽性対照として使用した。細胞を回収し、冷 PBS 1x で洗浄し、 2.0×10^6 個細胞/mL の濃度で溶解バッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.6；150 mM NaCl；1% Triton X；1x プロテアーゼ阻害剤 (Roche Applied Science、Indianapolis、IN) に懸濁し、氷上で 30 分間静置した。次いで、溶解物を 13200 rpm、4 で、10 分間遠心分離した。上清を回収し、タンパク質濃度を Pierce 製の BCA キットを用いて測定し、1.5 mg/ml に調整した。30 μ L の各細胞溶解物を、10 μ L の 4x ローディングバッファーと混合し、95 で 10 分間加熱した。次いで、それらをプレキャストゲル (Thermo scientific 製の、2~20% の正確なタンパク質ゲル) にロードし、110 V で流す。電気泳動した後、iBlot Gel Transfer Stack Nitrocellulose, Regular kit (Invitrogen、San Diego、CA) を使用してメンブレン上にサンプルをトランスファーした。メンブレンを 1x TBST (100 mM Tris HCl pH = 7.5 + 0.9% HCl + 0.05% Tween) で洗浄した。

+ 5 % ミルク中、室温で 1 時間飽和させ、次いで、 $1 \times$ T B S T + 5 % ミルク中、 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ の各抗 B 7 H 6 m A b とともに 4 で一晚インキュベートした。メンブレンを、 $1 \times$ T B S T 中で 10 分間、2 回洗浄し、 $1 \times$ T B S T + 5 % ミルクで希釈された、西洋ワサビペルオキシダーゼにカップリングされたヒツジ抗マウス I g G 抗体とともに室温で 1 時間インキュベートした。次いで、メンブレンを T B S T 中で 20 分間、4 回洗浄し、これによって E C L キットを用いて明らかにした (G E H e a l t h c a r e 、 P i s c a t a w a y 、 N J) 。

【 0 2 2 8 】

5 種の m A b の中でも、m A b 1 0 E 2 . 9 ($10 \mu\text{g} / \text{mL}$) のみが、試験された条件下で免疫ブロット法 m A b として実施できた。これらの結果は、m A b 4 E 5 . 5、5 E 1 . 4、9 G 9 . 2 および 1 7 B 1 . 3 の B 7 H 6 エピトープは、直線ではない可能性があり、代わりに B 7 H 6 ポリペプチドの不連続領域を含む可能性が高いことを示唆する。

10

【 0 2 2 9 】

G . 5 種の抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体のうち 3 種が、免疫沈降にとって効率的である

4 E 5 . 5、5 E 1 . 4、9 G 9 . 2、1 0 E 2 . 9 および 1 7 B 1 . 3 が、免疫沈降にとって効率的であるかどうかを評価するために、P 8 1 5 . B 7 - H 6 タンパク質抽出物を調製し、種々の m A b を用いて免疫沈降を実施した。免疫沈降物を S D S ゲルで流し、抗 B 7 H 6 ポリクローナル抗体および H R P がコンジュゲートしている抗マウス I g を使用して B 7 H 6 の存在を観察した。結果は、4 E 5 . 5、9 G 9 . 2 および 1 0 E 2 . 9 は、P 8 1 5 . B 7 - H 6 タンパク質抽出物から B 7 H 6 を免疫沈降させるのに対し、5 E 1 . 4 および 1 7 B 1 . 3 は免疫沈降させないことを示した。

20

【 0 2 3 0 】

[実施例 3]

腫瘍成長に対する抗 B 7 H 6 抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの有効性を評価するための B x P C 3 膵臓癌腫モデル

抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲートが、マウスにおいて腫瘍成長に対して活性を有するかどうかを試験するために、0 日目に、マウスの群に B x P C 3 膵臓腫瘍を s . c 注射する。 $150 \sim 200 \text{ mm}^3$ に腫瘍が増殖すると、次いで、マウスの群 ($n = 10 / \text{gp}$) マウスに、 $1 \text{ mg} / \text{Kg} \sim 30 \text{ mg} / \text{Kg}$ の対照試薬、抗 B 7 H 6 抗体または抗 B 7 H 6 抗体 - 薬物コンジュゲート $1 \times \sim 3 \times / 1$ 週間を 3 週間注射する。腫瘍容量は、 $3 \times / 1$ 週間で 5 週間モニタリングする。対照試薬を注射されたマウスと比較して、抗 B 7 H 6 抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを注射されたマウスにおける有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害にわたるアンタゴニストの有効性を示す。

30

【 0 2 3 1 】

研究設計：0 日目に、8 ~ 10 週齢の雌の C . B - 1 7 S C I D マウス (C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s) に、 2×10^6 個 B x P C - 3 細胞を用いて右脇腹に s . c . 注射する。 $150 \sim 200 \text{ mm}^3$ の腫瘍の大きさで出発し、 $1 \text{ mg} / \text{Kg} \sim 30 \text{ mg} / \text{Kg}$ の対照試薬、抗 B 7 H 6 抗体または抗 B 7 H 6 抗体 - 薬物コンジュゲート $1 \times \sim 3 \times / 週$ を用いて、マウスの群 ($n = 10 / \text{群}$) に 3 週間 i . p . 注射する。腫瘍成長を、ノギス測定を使用して、 $3 \times / 週$ で 5 週間モニタリングする。腫瘍容量を、式 $1 / 2 * (B)^2 * L (\text{mm}^3)$ を使用して算出する。

40

【 0 2 3 2 】

[実施例 4]

抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートを使用する、インビボでのヒト肝細胞癌細胞成長の阻害

インビボでのヒト肝細胞癌細胞に対する抗ヒト B 7 H 6 モノクローナル抗体または抗体 - 薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を評価するために、0 日目に、B A L B / c ノードマ

50

ウスの群に、HuH7またはC3A肝細胞癌細胞のいずれかを注射する。5～33日目に、腫瘍を保有するマウスの群（ $n = 10 / \text{群}$ ）に、 $5 \sim 75 \mu\text{g}$ の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを、1日おきの（EOD）i.pまたは腫瘍周囲の注射によって与える。腫瘍容量を、 $3 \times / \text{週}$ で6週間モニタリングする。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートによる腫瘍成長の阻害は、それぞれのタンパク質が、インビボでヒト肝細胞（heptocellular）癌腫に対して阻害効果を有することを示す。

【0233】

研究設計：0日目に、8週齢の雌のBALB/cヌードマウス（Charles River Laboratories）に、 6×10^6 個HuH7またはC3A細胞を用いて右脇腹にs.c.注射する。5～33日目に、 $5 \mu\text{g} \sim 75 \mu\text{g}$ の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを用いて、マウスの群（ $n = 10 / \text{群}$ ）にi.p.または腫瘍周囲に注射する。注射は $200 \mu\text{l}$ の総容量で与える。腫瘍成長を、ノギス測定を使用して、 $3 \times / \text{週}$ で6週間モニタリングする。腫瘍容量を、式 $1/2 * (B)^2 * L (\text{mm}^3)$ を使用して算出した。

【0234】

[実施例5]

抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを使用する、インビボでのヒト前立腺癌腫細胞成長の阻害

インビボでのヒト前立腺癌腫細胞に対する抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を評価するために、0日目に、BALB/cヌードマウスの群に、PC-3またはDU-145前立腺癌腫細胞のいずれかを注射する。5～33日目に、腫瘍を保有するマウスの群（ $n = 10 / \text{群}$ ）に、 $5 \sim 75 \mu\text{g}$ の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを、1日おきの（EOD）i.p.または腫瘍周囲の注射によって与える。腫瘍容量を、 $3 \times / \text{週}$ で6週間モニタリングする。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートによる腫瘍成長（容量または重量）の阻害は、それぞれのタンパク質が、インビボでヒト前立腺癌腫に対して阻害効果を有することを示す。

【0235】

研究設計：0日目に、8週齢の雌のBALB/cヌードマウス（Charles River Laboratories）に、 10×10^6 個のPC-3または 6×10^6 個のDU-145細胞を用いて右脇腹に、または前立腺葉において同所性にs.c.注射する。5～33日目に、 $5 \sim 75 \mu\text{g}$ の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを用いて、マウスの群（ $n = 10 / \text{群}$ ）にi.p.または腫瘍周囲に注射する（s.cモデルのみ）。注射は $200 \mu\text{l}$ の総容量で与える。s.c.腫瘍については、腫瘍成長をノギス測定を使用して、 $3 \times / \text{週}$ で6週間モニタリングする。腫瘍容量を、式 $1/2 * (B)^2 * L (\text{mm}^3)$ を使用して算出する。同所性腫瘍については、マウスを研究の最後に屠殺し、腫瘍を秤量して、腫瘍量評価を可能にする。

【0236】

[実施例6]

抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを使用する、インビボでのヒト結腸癌腫細胞の阻害

インビボでのヒト結腸癌腫細胞に対する抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を評価するために、0日目に、BALB/cヌードマウスの群に、DLD-1またはHCT-116結腸癌腫細胞のいずれかを注射する。5～33日目に、腫瘍を保有するマウスの群（ $n = 10 / \text{群}$ ）に、 $5 \sim 75 \mu\text{g}$ の抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを、1日おきの（EOD）i.pまたは腫瘍周囲の注射によって与える。腫瘍容量を、 $3 \times / \text{週}$ で6週間モニタリングする。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートによる腫瘍成長（容量または重量）の阻害は、それぞれのタンパク質が、インビボでヒト結腸癌腫に対し

て阻害効果を有することを示唆する。

【0237】

研究設計：0日目に、8週齢の雌のBALB/cヌードマウス(Charles River Laboratories)に、 6×10^6 個のDL D-1またはHCT-116細胞を用いて、右脇腹に、または結腸壁において同所性にs.c.注射する。5～33日目に、5～75 μ gの抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを用いて、マウスの群(n=10/群)にi.p.または腫瘍周囲に注射する(s.cモデルのみ)。注射は200 μ lの総容量で与える。s.c腫瘍については、腫瘍成長をノギス測定を使用して、3X/週で6週間モニタリングする。腫瘍容量を、式 $1/2 * (B)^2 * L (mm^3)$ を使用して算出する。同所性腫瘍については、マウスを研究の最後に屠殺し、腫瘍を秤量して、腫瘍量評価を可能にする。

10

【0238】

[実施例7]

抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを使用する、インビボでのヒト膵臓癌腫細胞の阻害

インビボでのヒト膵臓癌腫細胞に対する抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍活性を評価するために、0日目に、BALB/cヌードマウスの群に、BxPC-3またはHPAF-II膵臓癌腫細胞のいずれかを注射する。5～33日目に、腫瘍を保有するマウスの群(n=10/群)に、5～75 μ gの抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを、1日おきの(EO D)i.pまたは腫瘍周囲の注射によって与える。腫瘍容量を、3X/週で6週間モニタリングする。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートによる腫瘍成長(容量または重量)の阻害は、それぞれのタンパク質が、インビボでヒト膵臓癌腫に対して阻害効果を有することを示唆する。

20

【0239】

研究設計：0日目に、8週齢の雌のBALB/cヌードマウス(Charles River Laboratories)に、 6×10^6 個のBxPC-3またはHPAF-II細胞を用いて、右脇腹に、または膵臓葉において同所性にs.c.注射する。5～33日目に、5～75 μ gの抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを用いて、マウスの群(n=10/群)にi.p.または腫瘍周囲に注射する(s.cモデルのみ)。注射は200 μ lの総容量で与える。s.c腫瘍については、腫瘍成長をノギス測定を使用して、3X/週で6週間モニタリングする。腫瘍容量を、式 $1/2 * (B)^2 * L (mm^3)$ を使用して算出した。同所性腫瘍については、マウスを研究の最後に屠殺し、腫瘍を秤量して、腫瘍量評価を可能にする。

30

【0240】

[実施例8]

抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを使用する、インビボでのB細胞リンパ腫の阻害

ヒトBリンパ腫細胞株を、増殖培地に継代することによってインビトロで維持する。細胞をPBSで十分に洗浄して、培養構成要素を除去する。

40

【0241】

SCIDマウスに、(通常) 1×10^6 個のヒトリンパ腫細胞を用い、100マイクロリットル容量で尾静脈を介して注射する。注射される最適細胞数は、所望の動態学と一致して腫瘍の受け取りをもたらすようパイロット研究において経験的に決定する。抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲート治療を、ALZET(登録商標)浸透圧ミニポンプ(ALZET、Cupertino、CA)の皮下移植または抗ヒトB7H6モノクローナル抗体もしくは抗体-薬物コンジュゲートもしくは媒体の毎日のi.p.注射のいずれかによって翌日始める。マウスを、生存およびかなりの罹患についてモニタリングする。その初期体重の20%超を失っているマウスならびに後肢麻痺などの相当な罹患を示すマウスを屠殺する。使用されるリンパ腫細胞株に応じて、未処理マウ

50

スは、通常、3～6週で死亡する。IgGまたはIgMを分泌するB細胞リンパ腫については、毎週血液採取することおよびELISAによって血清ヒト免疫グロブリンレベルを測定することによって、疾患進行もモニタリングできる。

【0242】

抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲート用量反応/IM-9モデル

マウスに、 1×10^6 個のIM-9細胞を注射し、翌日、28日浸透圧ミニポンプを移植する。ポンプに、以下の濃度：1日あたり0、0.12、1.2または12マイクログラムの抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを送達するよう充填し、用量群あたり8匹のマウスを用いる。増大した用量の抗体または抗体-薬物コンジュゲートを用いると腫瘍細胞株からのマウスの保護が増大することは、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートの効果が、用量依存的であることを示す。実験の最後で生存するマウスは、疾患の徴候およびその血清中に検出可能なヒトIgGを有さない。

【0243】

これらのデータは、SCIDマウスリンパ腫モデルにおける抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートの有効性が、インビボでリンパ腫細胞株の成長を阻害する能力と相関性があることを実証する。

【0244】

[実施例9]

抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを使用する、インビボでのB細胞由来腫瘍の阻害

ミニ浸透圧ポンプを介した一定注入による抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートの投与は、ポンプ中に含有される抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートの濃度に比例して定常状態血清濃度をもたらす。2mg/mlまたは0.2mg/mlの濃度のリン酸緩衝生理食塩水(pH6.0)中に含有される抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲート0.22mlを、Alzetミニ浸透圧ポンプ(モデル2004; Alza Corporation Palo Alto, CA)に滅菌条件下で充填する。ポンプは、背部皮膚の1cmの切開部を通して、マウスに皮下移植し、無菌創縫合で皮膚を閉じる。これらのポンプは、28日間にわたって、その内容物を1時間あたり0.25μlの速度で送達するよう設計されている。この投与方法は、腫瘍細胞を注射されたマウスにおいて生存の大幅な増大をもたらす(下記)。

【0245】

インビボでのB細胞由来腫瘍に対する抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体薬物コンジュゲートの効果

抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートの効果を、本明細書に記載されるマウス腫瘍異種移植片モデルを使用してインビボで試験する。試験される異種移植片モデルは、ヒトリンパ芽球様細胞株IM-9である。C.B-17SCIDマウス(雌C.B-17/IcrHsd-scld; Harlan, Indianapolis, Indiana)を4群に分ける。0日目に、IM-9細胞を培養物から採取し、すべてのマウスに、尾静脈を介して静脈内に注射する(マウスあたり、約1,000,000個細胞)。1日目に、試験物または対照物を含有するミニ浸透圧ポンプを、マウスに皮下移植する。群1～3のマウス(群あたりn=9)には、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを送達する：群1は、2.0mg/mLの抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートを含有し、1日あたり12μgを送達し；群2は、0.20mg/mLを含有し、1日あたり1.2μgを送達し；群3は、0.02mg/mLを含有し、1日あたり0.12μgを送達する。群4のマウス(n=9)は対照であり、媒体(PBS pH6.0)で処理する。

【0246】

媒体で処理されたマウスと比較して、治療群（例えば、 $12\mu\text{g}/\text{日}$ または $1.2\mu\text{g}/\text{日}$ のいずれか）の生存の増大は、抗ヒトB7H6モノクローナル抗体または抗体-薬物コンジュゲートが、インビボでB細胞腫瘍細胞の効果を低減することを示す。

【0247】

上記から、例示目的で、本明細書に本発明の特定の実施形態が記載されているが、本発明の趣旨および範囲を逸脱することなく、種々の改変を行ってもよいことが理解されよう。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲を除き、制限されない。本明細書に引用されるすべての刊行物、特許および特許出願は、あらゆる目的のために、出展明示によりその全文が本明細書に組み込まれる。

【配列表】

10

2013513380000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年8月13日(2012.8.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2013513380000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2010/003411

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/046407 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]; BRANDT CAMERON S [US]; KENNEDY JACOB J [US]; XU) 9 April 2009 (2009-04-09) the whole document	1-53
X	BRANDT CAMERON S ET AL: "The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor Nkp30 in humans", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 206, no. 7, 6 July 2009 (2009-07-06), pages 1495-1503, XP009145615, ISSN: 0022-1007, DOI: DOI:10.1084/JEM.20090681 [retrieved on 2009-06-15] the whole document	1-53
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 April 2011		26/04/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Morawetz, Renate

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2010/003411

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/51514 A1 (MILLENNIUM PHARM INC [US]) 19 July 2001 (2001-07-19)	1-8,53
A	the whole document	9-52
A	----- VON STRANDMANN ELKE POGGE ET AL: "Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the Nkp30 receptor on natural killer cells", IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 27, no. 6, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 965-974, XP009145630, ISSN: 1074-7613 the whole document	1-53
A	----- MORETTA LORENZO ET AL: "Unravelling natural killer cell function: Triggering and inhibitory human NK receptors", EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 23, no. 2, 28 January 2004 (2004-01-28), pages 255-259, XP009145631, ISSN: 0261-4189 the whole document	1-53
A	----- WO 2006/124668 A1 (ZYMOMETICS INC [US]; GAO ZEREN [US]; LEVIN STEVEN D [US]; CLEGG CHRI) 23 November 2006 (2006-11-23) the whole document	1-53
A	----- SCHLEINITZ NICOLAS ET AL: "Expression of the CD85j (Leukocyte Ig-like Receptor 1, Ig-like Transcript 2) Receptor for Class I Major Histocompatibility Complex Molecules in Idiopathic Inflammatory Myopathies", ARTHRITIS & RHEUMATISM, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 58, no. 10, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 3216-3223, XP009147259, ISSN: 0004-3591 [retrieved on 2008-09-29] the whole document	1-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2010/003411

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009046407 A2	09-04-2009	AU 2008308509 A1 CA 2697992 A1 EP 2197489 A2 KR 20100091950 A US 2009220502 A1 US 2011081346 A1	09-04-2009 09-04-2009 23-06-2010 19-08-2010 03-09-2009 07-04-2011
WO 0151514 A1	19-07-2001	AU 2769101 A	24-07-2001
WO 2006124668 A1	23-11-2006	AU 2006247592 A1 CA 2606867 A1 EP 1891112 A1 JP 2008540569 T	23-11-2006 23-11-2006 27-02-2008 20-11-2008

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D
	G 0 1 N 33/574	Z
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,IL,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,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,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,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

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100170520

弁理士 澤本 真奈美

(72)発明者 ミッシェル・ピエール

フランス 1 3 0 1 6 マルセイユ、シュマン・デュ・モザンピーク、ル・ベルヴェデール 6 3 番

(72)発明者 エリック・ヴィヴィエ

フランス 1 3 2 6 0 カシ、シュマン・デ・キューエット

(72)発明者 ミリアム・バルタン

フランス 1 3 2 6 0 カシ、ルート・ドゥ・カルヌー、アモー・デ・ゴルゲット 8 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA46 DA02 GA05 HA01 HA15

4B064 AG27 CA20 CC24 DA01 DA14

4B065 AA91X AA91Y AA94X AB05 AC12 AC14 BA08 BB19 CA25 CA44
CA46

4C085 AA14 AA16 BB36 CC23 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA28 EA51 FA72