

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号  
特許第5947727号  
(P5947727)

(45) 発行日 平成28年7月6日(2016.7.6)

(24) 登録日 平成28年6月10日(2016.6.10)

(51) Int.Cl. F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01) A 6 1 K 39/395 Z N A N

A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 I O 7

A 6 1 P 37/04 (2006.01) A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 37/04

請求項の数 13 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-550126 (P2012-550126)	(73) 特許権者	596129215
(86) (22) 出願日	平成23年1月20日 (2011.1.20)		メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション
(65) 公表番号	特表2013-517331 (P2013-517331A)		Merck Sharp & Dohme Corp.
(43) 公表日	平成25年5月16日 (2013.5.16)		アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907 ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/021943		126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 U. S. A.
(87) 国際公開番号	W02011/091181		
(87) 国際公開日	平成23年7月28日 (2011.7.28)	(74) 代理人	100114188
審査請求日	平成26年1月17日 (2014.1.17)		弁理士 小野 誠
(31) 優先権主張番号	61/296,788		
(32) 優先日	平成22年1月20日 (2010.1.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 I L T 5 抗体および I L T 5 結合抗体断片による免疫調節

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一価の抗ヒトILT5抗体または該抗体のILT5結合断片を含む、癌の治療用の薬学的組成物であって、前記一価の抗体は、クロスリンクしていない抗ヒトILT5抗体または該抗体のILT5結合断片である、薬学的組成物。

【請求項 2】

抗原と組み合わせて用いられる、請求項 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

前記抗原が、腫瘍抗原である、請求項 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

抗体が、免疫応答を誘導または増強する、請求項 1 または 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

抗体が、T細胞応答を誘導または増強する、請求項 1 または 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

前記T細胞応答がCD4+ T細胞を伴う、請求項 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

前記T細胞応答がCD8+ T細胞を伴う、請求項 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

抗体が、増殖応答を誘導または増強する、請求項 2 に記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

癌の治療用の薬学的組成物の製造における、一価の抗ヒトILT5抗体または該抗体のILT5結合断片の使用であって、前記一価の抗体は、クロスリンクしていない抗ヒトILT5抗体または該抗体のILT5結合断片である、使用。

【請求項10】

抗原と組み合わせて用いられるための癌の治療用の薬学的組成物の製造における、一価の抗ヒトILT5抗体または該抗体のILT5結合断片の使用であって、前記一価の抗体は、クロスリンクしていない抗ヒトILT5抗体または該抗体のILT5結合断片である、使用。

【請求項11】

前記抗原が、腫瘍抗原である、請求項10に記載の使用。

【請求項12】

化学療法剤と組み合わせて用いられる、請求項1または2に記載の薬学的組成物。

【請求項13】

放射線療法と組み合わせて用いられる、請求項1または2に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

免疫系は、自己免疫による破壊から「自己」を容赦する一方で、免疫の恒常性および保護免疫を保存するために多数の機構を進化させてきた。免疫の開始は、阻害性受容体と活性化受容体のあいだの相互作用に部分的に依存する厳密に制御されたプロセスである。両方のタイプの受容体を包含するImmunoglobulin-like transcript (ILT) は、ヒトおよび非ヒト霊長類において見いだされる急速に進化しつつある遺伝子によってコードされる。Immunoglobulin-like transcript 5 (「ILT5」) は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、未成熟樹状細胞および単球などの抗原提示細胞 (APC) 上に高度に発現される細胞表面分子である。

【発明の概要】

【0002】

概要

本明細書において、抗ILT5抗体またはILT5結合断片に以前に接触したことがある抗原提示細胞 (APC) にT細胞が接触する際に、そのようなT細胞において免疫刺激効果を誘導するために、抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片を用いる方法が開示される。同様に、本明細書において、抗ILT5抗体またはILT5結合断片に同時に接触しているAPCに、T細胞が同時に接触しているかまたは以前に接触したことがある場合に、そのようなT細胞内の応答 (たとえば、増殖応答) を阻害するために、抗ILT5抗体およびその断片を用いる方法が開示される。同様に、本明細書において、様々な疾患を処置するために、および免疫刺激アジュバントとして用いるために、抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片を用いる方法が開示される。

【0003】

ある態様において、一価の抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるまたは接触しているAPCをT細胞に接触させる段階を含む、T細胞内の応答を誘導する方法が、本明細書において提供される。ある態様において、そのような応答は増殖応答である。ある態様において、そのような応答は、APCが接触する抗体または断片の量に比例する。ある態様において、応答は、T細胞受容体によるMHC分子の認識を必要としない。

【0004】

ある態様において、抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるAPCをT細胞に接触させる段階を含む、その表面上にNKG2Dを発現するようにナイーブT細胞を誘導する方法が本明細書において提供される。ある態様において、抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるAPCをT細胞に接触させる段階を含む、T細胞受容体：CD3複合体の発現をアップレギュレートするようにT細胞を誘導する方法が本明細書において提供される。ある態様において、抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触し

10

20

30

40

50

たことがあるAPCをT細胞に接触させる段階を含む、Fasリガンドを分泌するようにT細胞を誘導する方法が本明細書において提供される。

【0005】

ある態様において、抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるAPCをT細胞に接触させる段階を含む、T細胞に細胞傷害能を与える方法が本明細書において提供される。そのような方法はさらに、腫瘍細胞由来の、または細菌、ウイルス、真菌、原虫、もしくは寄生虫に感染している細胞由来の抗原をT細胞に接触させる段階を含むことができ、T細胞が、細胞表面の抗原に結合するかまたは該抗原を認識すると、T細胞は細胞傷害性となる。

【0006】

ある態様において、上記の方法はいずれも、インピトロで接触させる段階によって行うことができる。ある態様において、上記の方法はいずれも、インピボで接触させる段階によって行うことができる。ある態様において、上記の任意の方法におけるT細胞は、CD4<sup>+</sup> T細胞である。ある態様において、上記の任意の方法におけるT細胞はCD8<sup>+</sup> T細胞である。

【0007】

ある態様において、抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片を対象に投与する段階を含む、該対象における免疫応答を誘導または増強する方法が本明細書において提供される。ある態様において、そのような免疫応答は、T細胞受容体によるMHC分子の認識を必要としない。ある態様において、方法は、対象においてT細胞内の応答を誘導する。

【0008】

ある態様において、対象におけるT細胞は、投与された抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるまたは接触しているAPCに接触すると、細胞傷害能を与えられる。ある態様において、細胞傷害能を獲得したT細胞またはその子孫は、抗原に結合するかまたは抗原を認識すると細胞傷害性となる。ある態様において、抗原は、外因性の抗原および内因性の抗原の一方または両方から選択される。ある態様において、外因性の抗原は、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原虫抗原、および寄生虫抗原からなる群より選択される。ある態様において、外因性の抗原は、対象に投与される。ある態様において、抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片は、外因性の抗原の投与前、投与と共に、または投与に非常に近い時間で少なくとも1回投与される。ある態様において、抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片は、外因性の抗原の投与後、投与と共に、投与に非常に近い時間で少なくとも1回投与される。ある態様において、抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片は、外因性の抗原の投与とは別々に投与される。

【0009】

ある態様において、抗原は細胞抗原である。ある態様において、対象は腫瘍を有する。ある態様において、細胞抗原は内因性の抗原を含む。ある態様において、対象において免疫応答を誘導または増強する方法はさらに、細胞の機能を阻害もしくは予防する、細胞の破壊を引き起こす、またはその両方である治療を対象に投与する段階を含む。ある態様において、治療は、細胞抗原の放出を誘導または増強する。ある態様において、治療は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与の後、投与と共に、または投与に非常に近い時間で少なくとも1回投与される。ある態様において、治療は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与の前、投与と共に、または投与に非常に近い時間で少なくとも1回投与される。ある態様において、抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片は、治療の投与とは別々に投与される。ある態様において、方法は以下のうち1つまたは複数をもたらす：腫瘍増殖の阻害、腫瘍の大きさの低減、腫瘍の数の低減、腫瘍負荷の減少、対象の生存期間延長。

【0010】

ある態様において、対象はウイルス感染症を有する。

【0011】

ある態様において、上記の方法におけるT細胞は、細胞表面の抗原に結合するかまたは該抗原を認識すると細胞傷害性となる。ある態様において、T細胞はCD4<sup>+</sup> T細胞である。ある態様において、T細胞はCD8<sup>+</sup> T細胞である。ある態様において、方法はT細胞内の応答

10

20

30

40

50

を誘導する。

【0012】

ある態様において、本明細書において、クロスリンクした抗ILT5抗体または該抗体のクロスリンクしたILT5結合断片に接触したことがあるAPCをT細胞に接触させるのと同時にまたは非常に近い時間で、T細胞に抗原を接触させる段階を含む、T細胞内の応答を阻害する方法が提供される。ある態様において、増殖応答は阻害される。ある態様において、応答の阻害レベルは、APCが接触する抗体または断片の量に比例する。ある態様において、阻害は、抗体または断片がILT5にクロスリンクするかまたはハイパークロスリンクする場合に起こる。ある態様において、接触させる段階はインビトロで行われる。ある態様において、接触させる段階はインビボで行われる。ある態様において、T細胞はCD4<sup>+</sup> T細胞である。ある態様において、T細胞はCD8<sup>+</sup> T細胞である。

10

【0013】

ある態様において、クロスリンクした抗ILT5抗体または該抗体のクロスリンクしたILT5結合断片を、該抗体または該断片がAPCに結合するように対象に投与する段階を含み、抗原に以前に結合したことがあるまたは抗原を認識したことがある該対象におけるT細胞がAPCとの接触により寛容化される、該対象において寛容を誘導する方法が本明細書において提供される。ある態様において、対象は疾患、たとえば免疫関連疾患を有する。

【0014】

ある態様において、ヒトILT5に結合する抗ILT5抗体またはILT5結合断片を使用する方法が本明細書において提供される。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5抗体断片はキメラである。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合断片はヒト化されている。ある態様において、ILT5結合断片は、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、またはscFv断片を含む。

20

【0015】

特記されない限り、本明細書において用いられる全ての科学技術用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。方法および材料は、本発明において用いるために本明細書において記述され；当技術分野において公知の他の適した用法および材料も同様に用いることができる。材料、方法、および実施例は、説明するために限られ、制限すると意図されない。本明細書において言及した全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベース登録、および他の参考文献は、その全内容が参照により本明細書に組み入れられる。矛盾する場合は、定義を含めて本明細書が優先する。

30

【0016】

[本発明1001]

一価の抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるまたは接触しているAPCをT細胞に接触させる段階を含む、該T細胞内の応答を誘導する方法。

[本発明1002]

前記応答が増殖応答である、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記応答のレベルが、APCが接触する抗体または断片の量に比例する、本発明1001の方法。

[本発明1004]

40

前記応答が、T細胞受容体によるMHC分子の認識を必要としない、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるAPCをナイーブT細胞に接触させる段階を含む、その表面上にNKG2Dを発現するように該T細胞を誘導する方法。

[本発明1006]

抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるAPCをT細胞に接触させる段階を含む、T細胞受容体：CD3複合体の発現をアップレギュレートするように該T細胞を誘導する方法。

[本発明1007]

50

抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるAPCをT細胞に接触させる段階を含む、Fasリガンドを分泌するように該T細胞を誘導する方法。

[本発明1008]

抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるAPCをT細胞に接触させる段階を含む、該T細胞に細胞傷害能を与える方法。

[本発明1009]

腫瘍細胞由来の、または細菌、ウイルス、真菌、原虫、もしくは寄生虫に感染した細胞由来の抗原を前記T細胞に接触させる段階をさらに含み、該T細胞が、細胞表面の抗原に結合するかまたは該抗原を認識すると細胞傷害性となる、本発明1008の方法。

[本発明1010]

前記接触させる段階がインビトロで行われる、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記接触させる段階がインビボで行われる、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1012]

前記T細胞がCD4<sup>+</sup> T細胞である、本発明1001～1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

前記T細胞がCD8<sup>+</sup> T細胞である、本発明1001～1011のいずれかの方法。

[本発明1014]

抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片を対象に投与する段階を含む、該対象における免疫応答を誘導または増強する方法。

[本発明1015]

前記応答がT細胞受容体によるMHC分子の認識を必要としない、本発明1014の方法。

[本発明1016]

前記対象におけるT細胞内の応答を誘導する、本発明1014または1015の方法。

[本発明1017]

前記対象におけるT細胞が、投与された抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に接触したことがあるまたは接触しているAPCに接触すると、細胞傷害能を与えられる、本発明1014または1015の方法。

[本発明1018]

細胞傷害能を獲得した前記T細胞またはその子孫が、抗原に結合するかまたは抗原を認識すると細胞傷害性となる、本発明1017の方法。

[本発明1019]

前記抗原が、外因性の抗原および内因性の抗原の一方または両方から選択される、本発明1018の方法。

[本発明1020]

前記外因性の抗原が、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原虫抗原、および寄生虫抗原からなる群より選択される、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記外因性の抗原が前記対象に投与される、本発明1020の方法。

[本発明1022]

抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片が、前記外因性の抗原の投与前、投与と共に、または投与に非常に近い時間で少なくとも1回投与される、本発明1021の方法。

[本発明1023]

抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片が、前記外因性の抗原の投与後、投与と共に、または投与に非常に近い時間で少なくとも1回投与される、本発明1021の方法。

[本発明1024]

抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片が、前記外因性の抗原の投与とは別々に投与される、本発明1021～1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

前記抗原が細胞抗原である、本発明1018の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1026]

前記対象が腫瘍を有する、本発明1025の方法。

[本発明1027]

前記細胞抗原が内因性の抗原を含む、本発明1026の方法。

[本発明1028]

細胞の機能を阻害もしくは妨害する、細胞の破壊を引き起こす、またはその両方である治療を、前記対象に投与する段階をさらに含む、本発明1027の方法。

[本発明1029]

前記治療が、前記内因性の抗原の放出を誘導または増強する、本発明1028の方法。

[本発明1030]

前記治療が、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与後、投与と共に、または投与に非常に近い時間で少なくとも1回投与される、本発明1028または1029の方法。

[本発明1031]

前記治療が、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与前、投与と共に、または投与に非常に近い時間で少なくとも1回投与される、本発明1029または1030の方法。

[本発明1032]

抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片が、前記治療の投与とは別々に投与される、本発明1028～1031のいずれかの方法。

[本発明1033]

腫瘍増殖の阻害、腫瘍の大きさの低減、腫瘍の数の低減、腫瘍負荷の減少、前記対象の生存期間延長のうち1つまたは複数をもたらす、本発明1027～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

前記対象がウイルス感染症を有する、本発明1025の方法。

[本発明1035]

前記T細胞が、細胞表面の前記抗原に結合するかまたは該抗原を認識すると細胞傷害性となる、本発明1018～1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

前記T細胞がCD4<sup>+</sup> T細胞である、本発明1017～1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

前記T細胞がCD8<sup>+</sup> T細胞である、本発明1017～1035のいずれかの方法。

[本発明1038]

前記T細胞内の応答を誘導する、本発明1017～1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

クロスリンクした抗ILT5抗体または該抗体のクロスリンクしたILT5結合断片に接触したことがあるAPCをT細胞に接触させるのと同時にまたは非常に近い時間で、該T細胞に抗原を接触させる段階を含む、該T細胞内の応答を阻害する方法。

[本発明1040]

増殖応答が阻害される、本発明1039の方法。

[本発明1041]

前記応答の阻害レベルが、APCが接触する抗体または断片の量に比例する、本発明1039の方法。

[本発明1042]

前記抗体または前記断片がILT5にクロスリンクするかまたはハイパークロスリンクすると前記阻害が起こる、本発明1039～1041のいずれかの方法。

[本発明1043]

前記接触させる段階がインビトロで行われる、本発明1039～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

前記接触させる段階がインビボで行われる、本発明1039～1042のいずれかの方法。

[本発明1045]

前記T細胞がCD4<sup>+</sup> T細胞である、本発明1039～1044のいずれかの方法。

10

20

30

40

50

[本発明1046]

前記T細胞がCD8<sup>+</sup> T細胞である、本発明1039～1044のいずれかの方法。

[本発明1047]

クロスリンクした抗ILT5抗体または該抗体のクロスリンクしたILT5結合断片を、該抗体または該断片がAPCに結合するように対象に投与する段階を含み、抗原に以前に結合したことがあるまたは該抗原を認識したことがある該対象におけるT細胞が、APCに接触すると寛容化される、該対象における寛容を誘導する方法。

[本発明1048]

前記対象が疾患を有する、本発明1047の方法。

[本発明1049]

前記疾患が免疫関連疾患である、本発明1048の方法。

[本発明1050]

抗ILT5抗体またはILT5結合断片がヒトILT5に結合する、本発明1001～1049のいずれかの方法。

[本発明1051]

抗ILT5抗体またはILT5結合断片がキメラである、本発明1001～1050のいずれかの方法。

[本発明1052]

抗ILT5抗体またはILT5結合断片がヒト化されている、本発明1001～1050のいずれかの方法。

[本発明1053]

ILT5結合断片が、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、またはscFv断片を含む、本発明1001～1052のいずれかの方法。

本発明の他の特徴および長所は、以下の詳細な説明および添付の図面、ならびに添付の特許請求の範囲から明らかとなる。

**【図面の簡単な説明】****【0017】**

【図1】分位点等高線プロット（または確率プロット）と呼ばれる二次元フローサイトメトリー（FCM）表現形式での、様々な造血細胞サブセットによるILT5の発現を示す。後者のプロットは、様々な細胞亜集団での2つの蛍光パラメータ（すなわち、蛍光抗体）のレベルを示し、これらのパラメータを示す細胞の割合を定量し、およびプロットの各点に存在する細胞の頻度を示す。本研究において、健康なヒトドナーからの末梢血単核球（PBMC）を、TRX585抗体ならびに表記の細胞サブセットに対して特異的な抗体によって染色した。図1Aにおいて、プロットは、ゲートを設定した（gated）CD56<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>またはCD56<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T細胞によるILT5（TRX585）発現を示す。図1Bにおいて、PBMCを（A）と同様に染色した後、細胞内Foxp3によって染色した。プロットは、ゲートを設定したCD56<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>またはCD56<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup> T細胞によるILT5発現を示す。図1Cは、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、またはCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>NKT（CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>）細胞によるILT5発現を示す。図1Dは、骨髄系（CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>）およびプラスマ細胞系（CD123<sup>+</sup>BDCA-2<sup>+</sup>）DC細胞によるILT5発現を示す。図1Eは、CD33<sup>hi</sup>CD34<sup>-</sup>、CD33<sup>hi</sup>CD34<sup>lo</sup>およびCD33<sup>int</sup>CD34<sup>-</sup>単球サブセットならびにCD33<sup>lo</sup>CD34<sup>+</sup>骨髄前駆細胞によるILT5およびCD11bの発現を示す。図1Fは、CD33<sup>hi</sup>CD34<sup>lo</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）によるILT5発現を示す。ILT5<sup>+</sup>細胞のゲート内細胞の百分率およびILT5染色の平均蛍光強度を、プロットの内側および上部にそれぞれ示す。ILT5染色の特異性を、mIgG1アイソタイプ対照抗体による上記の全ての細胞サブセットの染色によって確認した。データは、4回の独立した実験の代表である。

【図2】一次MLR（混合リンパ球反応）における同種異系応答性リンパ球のTRX585抗体仲介過剰応答性を示す一連の棒グラフである。PBMC（応答細胞集団）2×10<sup>5</sup>個/ウェルを、無関係な血液ドナーから得たマイトマイシン処置PBMC（刺激細胞集団）2×10<sup>5</sup>個と共に、mIgG1またはTRX585抗体の表記の量の存在下または非存在下で培養した。MLRにおける増殖活性を、培養の最後の12～18時間のあいだの複製細胞のDNAへの1μCi [<sup>3</sup>H]TdR（トリチウム化チミジン）/ウェルの取込みによって3.5日目に測定した。X軸は、抗体の濃度を示す

10

20

30

40

50

。Y軸は、 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 取込みを示す。示されたデータは、異なる応答細胞 / 刺激細胞対を利用するいくつかの実験の代表であり、1試料あたりウェル3個ずつの平均cpm  $\pm$  標準誤差として報告する。

【図3】MLRアッセイにおいて用いる前に可溶性TRX585抗体による末梢血単球またはDCの前処置によって、抗体仲介性の細胞増殖増強が起こったことを示す一対の棒グラフである。PBMCから精製したDCまたは単球を、 $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  mIgG1アイソタイプ対照またはTRX585抗体の存在下または非存在下でインキュベートした。24時間後、前培養したDCおよび単球を洗浄して非結合抗体を除去して、それぞれ、細胞1000個および120,000個/ウェルで播種し、PBMCから新たに単離したT細胞 $1 \times 10^5$ 個と共培養した。 $[^3\text{H}]\text{チミジン}$ 取込みを上記のように測定した。示したデータは、異なる応答細胞 / 刺激細胞対を利用するいくつかの実験の代表であり、1試料あたりウェル3個ずつの平均cpmとして報告する。X軸はどの抗体を用いたかを示す。Y軸は $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 取込みを示す。

10

【図4】一価のTRX585抗体は刺激能を与えられるが二価の抗体は与えられないことを示す、一対の棒グラフである。PBMC  $2 \times 10^5$ 個/ウェルを、図に示するように、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  ヤギ抗マウスF(ab')<sub>2</sub>断片および様々な濃度の可溶性TRX585またはmIgG1の存在下または非存在下で、マイトマイシン処置同種異系PBMC  $2 \times 10^5$ 個と共に培養した。培養の最後の12~18時間での $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 取込み ( $1\text{ }\mu\text{Ci}$ /ウェル) を3.5日目に測定した。1試料あたりウェル3個ずつの平均cpmを示す。

【図5】プラスチック上にTRX585抗体を固定するとその免疫刺激能が消失することを示す、一対の棒グラフである。PBMC  $2 \times 10^5$ 個/ウェルを、表記の濃度の可溶性TRX585または表記の濃度で組織培養プレートウェルの底にコーティングした組織培養プレート結合TRX585のいずれかの存在下で、マイトマイシン処置同種異系PBMC  $2 \times 10^5$ 個と共に培養した。培養の最後の12~18時間での $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 取込み ( $1\text{ }\mu\text{Ci}$ /ウェル) を3.5日目に測定した。X軸は、抗体濃度を示す。Y軸は、 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 取込みを示す。1試料あたりウェル3個の平均cpmを示す。

20

【図6】TRX585がT細胞の大部分の増殖を誘導すること、およびこの増殖が非T細胞の存在を必要とすることを示す、カラー密度プロット (または擬似カラープロット) と呼ばれる一連の二次元表現および棒グラフである。カラー密度プロットは、分位点等高線プロットと同じ情報を提供する。図6Aにおいて、PBMC  $1 \times 10^7$ 個/mlを、0.1% BSA PBS中の $1\text{ }\mu\text{M}$  CFSE E (カルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル) によって37℃で20分間染色した後、冷PBSによって2回洗浄した。CFSE標識PBMC (応答細胞集団)  $2 \times 10^5$ 個/ウェルを、mIgG1またはTRX585抗体 ( $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) の存在下または非存在下でマイトマイシン処置した同種異系PBMCまたは自己由来PBMC (刺激細胞集団)  $2 \times 10^5$ 個と共に培養した。3.5日後、細胞をCD4およびCD8抗体ならびに生体染色色素である7-アミノアクチノマイシンD (7AAD) によって染色した。細胞増殖を示す、生存CD4およびCD8T細胞におけるCFSE色素の希釈率をフローサイトメトリーによって調べた。図6Bに示す実験において、PBMCから精製したT細胞 $1 \times 10^5$ 個を単独で (上のグラフ)、または表記の量のmIgG1アイソタイプ対照もしくはTRX585抗体の存在下または非存在下でマイトマイシン処置PBMC (下のグラフ)  $2 \times 10^5$ 個と混合して培養した。T細胞増殖を、先に報告した $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 取込みによって3.5日目に測定した。図6Bに示される実験において、X軸は抗体の濃度を示し、Y軸は $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 取込みを示す。1試料あたりウェル3個ずつの平均値  $\pm$  標準誤差を示す。

30

40

【図7】TRX585抗体誘導型T細胞増殖がTCR非依存的であることを示す一連のFCM擬似カラープロットである。応答細胞 (CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞) ならびに刺激細胞 (CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>細胞) を、蛍光活性化セルソーター (FACS Aria) を用いて、CD4およびCD8抗体ならびに7AAD (7-アミノアクチノマイシンD) によって染色したPBMCから単離した。刺激細胞をマイトマイシン処置によって不活化した後、飽和量のW6/32 (抗汎HLAクラスI) もしくはTu39 (抗汎HLAクラスII) と共に、またはブロッキング抗体なしで37℃で30分間インキュベートした後洗浄した。応答細胞を、既に記述したようにCFSE標識した。CFSE標識した応答細胞 $2 \times 10^5$ 個を、TRX585抗体 ( $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) の存在下または非存在下で、マイトマイシン処置した刺激細胞 $2 \times 10^5$ 個と混合した。3.5日後、CD4およびCD8T細胞の増殖をフローサイトメ

50



トリーによって調べた。プロットは、ブロッキング抗体の非存在下（プロットの上の列）、または汎抗MHCクラスI抗体（プロットの中央の列）および汎抗MHCクラスII抗体（プロットの下の方の列）の存在下での、CD4<sup>+</sup> T細胞（プロットの左の2つの縦列）およびCD8<sup>+</sup> T細胞（プロットの右の2つの縦列）の増殖を示す。増殖中の細胞の百分率をプロットの内部に示す。

【図8】TRX585抗体活性化T細胞の表現型を示す一連のFCM擬似カラープロットである。図8Aは、TRX585抗体（50 μg/ml）の存在下または非存在下で3.5日培養した後、CD4、CD8、およびCD25抗体によって染色したCFSE標識PBMCの2パラメータフローサイトメトリー分析図である。図8Bは、既に記述したように培養して、CD4、CD8、およびNKG2D抗体によって染色したPBMCによるNKG2D発現を示す。右側のプロットは、新たに単離したPBMCによるNKG2D発現を示す。プロットにおける数字は、所定の四分分割区画内の細胞の割合を示す。7AAD染色によって、死細胞をフローサイトメトリー分析から系統的に除外した。

【図9】永続的なNKG2Dの会合にもかかわらず抗ILT5曝露T細胞によるNKG2Dの持続的な発現を示す一連のFCM擬似カラープロットである。CFSE標識PBMC（応答細胞集団） $2 \times 10^5$ 個/ウェルを、mIgG1またはTRX585抗体（50 μg/ml）の存在下または非存在下で、マイトマイシン処置した同種異系PBMC（刺激細胞集団） $2 \times 10^5$ 個と共に培養した。示されている場合、ブロッキング抗NKG2D抗体（クローン1D11または5C6）を培養物に加えた。後者のブロッキング実験において、応答細胞を、20 μg/ml抗NKG2D抗体と共に37 °Cで30分間インキュベートしてから、刺激細胞と混合した。抗NKG2D抗体は、最終培養物において10 μg/mlで存在した。3.5日後、細胞をNKG2D、CD4、およびCD8抗体ならびに7AADによって染色して、フローサイトメトリーによって分析した。

【図10】TRX585抗体に以前に接触したことがあるAPCに接触したT細胞によるFasリガンド（FasL）分泌を示す棒グラフである。PBMC（応答細胞集団） $2 \times 10^5$ 個/ウェルを、TRX585抗体（50 μg/ml）の存在下または非存在下で、マイトマイシン処置した同種異系PBMC（刺激細胞集団） $2 \times 10^5$ 個と共に培養した。24時間培養物の上清中のFasリガンドを、市販のヒトFasリガンド特異的ELISAを用いて定量した。

【図11】TRX585抗体含有PBMC培養物からのT細胞が多様なヒト腫瘍細胞株に対して細胞傷害性であることを示す、一連の折れ線および棒グラフである。図11Aに示す実験において、CFSE標識PBMC  $4 \times 10^5$ 個をmIgG1またはTRX585抗体（50 μg/ml）と共に培養した。3.5日後、前培養したT細胞（エフェクター細胞）を、CD4およびCD8発現に基づいてFACS Aria（商標）を用いて精製した。同じ日に、CFSE標識したU937およびKG1腫瘍細胞（標的細胞）50,000個/ウェルを、エフェクター：標的（E:T）比4:1、1:1、0.25:1、および0:1でエフェクター細胞と混合して、終夜培養した。次に、細胞をCD3、7AAD、およびアネキシンVによって染色して、標的細胞（CD3<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>細胞）におけるアポトーシスの発生をフローサイトメトリーによって調べた。後期アポトーシス（7AAD<sup>+</sup>アネキシンV<sup>+</sup>）および初期アポトーシス（7AAD<sup>+</sup>アネキシンV<sup>-</sup>）細胞の百分率を合計することによって、細胞傷害性の百分率を決定した。左右のグラフはそれぞれ、mIgG1アイソタイプ対照（黒い菱形）またはTRX585（青い四角）抗体によって前処置したエフェクターT細胞のいずれかの表記の比率と混合した場合の、U937およびKG1死細胞の百分率を示す。X軸は、エフェクター：標的比を示す。Y軸は%細胞傷害性を示す。図11Bに示す実験において、エフェクターT細胞を得て、図11Aに関して記述されるように、ARPE19、U937、およびHCT116腫瘍細胞株（E:T=4:1）に対する細胞傷害機能に関して評価した。X軸はどの腫瘍細胞株を用いたかを示す。Y軸は%細胞傷害性を示す。図11Cに示される実験において、CD4およびCD8 T細胞を、上記のように設定したPBMCの3.5日培養物から細胞ソーティングして、ARPE19、U937、HCT116、およびK562腫瘍細胞株に対する細胞傷害機能（E:T=4:1）に関して独立して評価した。X軸およびグラフの右の説明表は、どの腫瘍細胞株を用いたかを示している。Y軸は%細胞傷害性を示す。

【図12】図12Aは、TRX585前活性化T細胞の細胞傷害性がMHCクラスI依存的であることを示す折れ線グラフである。図12Bは、TRX585前活性化T細胞の細胞傷害性がFasリガンド依存的であることを示す棒グラフである。エフェクターT細胞を、mIgG1またはTRX585含有PB

10

20

30

40

50

MC培養物ならびに抗体を含有しない培養物から精製して、図11Aに関して記述した実験技法に従ってU937腫瘍細胞に対する細胞傷害性に関して評価した。MHCクラスIブロッティング実験に関して、標的細胞を、抗汎ヒトMHCクラスI抗体（20  $\mu$ g/ml；クローンW6/32）の飽和量と共に30分間インキュベートして、洗浄し、非結合W6/32抗体を除去した後にT細胞に曝露した。Fasリガンドを中和するために、10  $\mu$ g/mlブロッティング抗ヒトFasリガンド抗体（クローンNOK-2）をエフェクターおよび標的細胞の共培養物に加えた。データは、多様な腫瘍細胞株を用いるいくつかの実験の代表であり、CD4またはCD8エフェクターT細胞のいずれを用いた場合でも再現することができる。

【図13】TRX585抗体のみを含有するPBMC培養物からのCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞は活発に分裂したが、抗CD3およびTRX585抗体によってPBMCを同時処置すると、T細胞増殖の阻害が起こったことを示す、一連のFCM擬似カラープロットである。本研究において、CFSE標識PBMC  $4 \times 10^5$ 個を、可溶性抗CD3抗体（10  $\mu$ g/ml）の存在下または非存在下で、表記の濃度のmIgG1アイソタイプ対照またはTRX585抗体と共に培養した。3.5日後、CD4およびCD8 T細胞におけるCFSE色素の希釈率をフローサイトメトリーによって調べた。プロットにおける数字は分裂中の細胞の割合を示している。7AAD染色によって、死細胞をフローサイトメトリー分析から系統的に除外した。

【図14】CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞をTRX585抗体に予め曝露すると、その後のTCR刺激ならびに表面CD3複合体に対するその応答性が増加することを示す、一連のFCM擬似カラープロット（図14A）および折れ線グラフ（図14B）である。図14Aに示す実験において、CFSE標識PBMC  $4 \times 10^5$ 個を、mIgG1アイソタイプ対照またはTRX585抗体（50  $\mu$ g/ml）の存在下または非存在下で培養した。3.5日後、前培養したT細胞ならびに新たに単離した自己由来PBMCからのT細胞を、FACS Ariaを用いて細胞ソーティングし、CFSE標識して、抗CD3抗体仲介刺激にさらに2日間曝露した。後者のTCR刺激は、濃度0.03～10  $\mu$ g/mlの固相抗CD3抗体を用いた。CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞増殖を、既に記述されたようにフローサイトメトリーによって調べた。プロットにおける数字は、分裂中の細胞の割合を示す。死細胞を7AAD染色によってフローサイトメトリー分析から系統的に除外した。図14Bは、同じT細胞の表面でのCD3複合体の量を示し、蛍光抗CD3抗体によって染色した細胞の平均蛍光強度として表記する。

【発明を実施するための形態】

【0018】

ある態様の説明

開示の様々な局面を以下に記述する。

【0019】

定義

本明細書において用いられる「抗体」という用語は、一般的に重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドとを含むタンパク質を指す。抗原の認識および結合は、重鎖および軽鎖の可変領域内で起こる。1つの重鎖と1つの軽鎖とを有する単ドメイン抗体、および軽鎖を欠く重鎖抗体も同様に知られている。所定の抗体は、その分類が重鎖定常領域のアミノ酸配列に基づく、 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、および $\alpha$ と呼ばれる5つのタイプの重鎖の1つを含む。これらの異なるタイプの重鎖はそれぞれ、5つのクラスの抗体、すなわちIgA（IgA1およびIgA2を含む）、IgD、IgE、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4）、およびIgMを生じる。所定の抗体はまた、その分類が軽鎖定常ドメインのアミノ酸配列に基づく、 $\kappa$ または $\lambda$ と呼ばれる2つのタイプの軽鎖の1つを含む。IgG、IgD、およびIgE抗体は一般的に、2つの同一の重鎖と2つの同一の軽鎖、ならびに各々が重鎖可変領域（ $V_H$ ）および軽鎖可変領域（ $V_L$ ）で構成される2つの抗原結合ドメインを含有する。一般的に、IgA抗体は、各々の単量体が2つの重鎖と2つの軽鎖（IgG、IgD、およびIgE抗体に関して）で構成される2つの単量体で構成され；したがってIgA分子は、各々が再度 $V_H$ および $V_L$ で構成される4つの抗原結合ドメインを有する。あるIgA抗体は、それらが2つの重鎖と2つの軽鎖で構成されるという点において単量体である。分泌型のIgM抗体は一般的に、各々の単量体が2つの重鎖と2つの軽鎖で構成される（IgGおよびIgE抗体に関して）5つの単量体で構成され；したがってIgM分

子は、各々が再度 $V_H$ および $V_L$ で構成される10個の抗原結合ドメインを有する。IgMの細胞表面型も同様に存在して、これはIgG、IgD、およびIgE抗体と類似の2つの重鎖/2つの軽鎖構造を有する。

#### 【0020】

本明細書において用いられる「キメラ抗体」という用語は、少なくとも1つのヒト定常領域を含むように操作された抗体を指す。たとえば、マウス抗体（たとえば、マウスモノクローナル抗体）の軽鎖の1つまたは全ての可変領域および/または重鎖の1つまたは全ての可変領域を、IgG1ヒト定常領域などの、しかしこれに限定されないヒト定常領域に各々連結させてもよい。キメラ抗体は典型的に、非キメラ抗体と比較してヒトに対する免疫原性が低く、したがってある状況下では治療の恩典を提供する。当業者は、キメラ抗体を理解しており、同様にそれらを生成するための適した技術を理解しているであろう。たとえばその各々の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号; Shoemaker et al., 米国特許第4,978,775号; Beavers et al., 米国特許第4,975,369号; およびBoss et al., 米国特許第4,816,397号を参照されたい。

#### 【0021】

本明細書において用いられる「相補性決定領域」または「CDR」という用語は、特異的抗原認識の仲介を主に司る重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内の短いポリペプチド配列を指す。CDRは、その各々の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Kabat, et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 1977; Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; およびMacCallum, et al., J. Mol. Biol. 262:732-745, 1996によって記述されている。各 $V_L$ および各 $V_H$ 内には3つのCDR (CDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれる) が存在する。

#### 【0022】

本明細書において抗体に関連して用いられる「断片」または「抗体断片」という用語は、完全長の抗体ポリペプチドを含まないが、完全長の抗体ポリペプチドの少なくとも一部をなお含む抗体ポリペプチド分子（たとえば、抗体の重鎖または軽鎖ポリペプチド）に由来するポリペプチドを指す。抗体断片はしばしば、完全長の抗体ポリペプチドの切断された一部を含むポリペプチドを含むが、この用語はそうのように切断された断片に限定されない。本明細書において抗体に関連して用いられる断片という用語は、抗体ポリペプチド（たとえば、重鎖または軽鎖抗体ポリペプチド）に由来する1つのポリペプチド鎖を含む断片を包含することから、抗体断片は、それ自身、抗原に結合しなくてもよいと理解される。たとえば、抗体断片は、Fab断片に含有される重鎖抗体ポリペプチドのその部分を含んでもよく; そのような抗体断片は典型的に、抗原結合部位が再構成されるように、軽鎖抗体ポリペプチド（たとえば、Fab断片に含有される軽鎖抗体ポリペプチドのその部分）に由来するもう1つの抗体断片と会合しなければ、抗原に結合しないであろう。抗体断片は、たとえばFab断片、 $F(ab')_2$ 断片、scFv（一本鎖Fv）断片、ダイアボディ、直鎖状抗体、二重特異性、三重特異性、および多重特異性抗体（たとえば、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ）などの多重特異性抗体断片、ミニボディ、キレート化組み換え型抗体、トリボディまたはバイボディ、イントラボディ、ナノボディ、低分子モジュール性免疫薬剤（SMIP）、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体、および $V_H$ 含有抗体に含有されるポリペプチドを含むことができる。「抗体断片」または「抗体ポリペプチド断片」とは、「抗原結合抗体断片」および「抗原結合抗体ポリペプチド断片」を含むと認識される。「抗原結合抗体断片」および「抗原結合抗体ポリペプチド断片」とは、たとえば「ILT5結合抗体断片」および「ILT5結合抗体ポリペプチド断片」、および「ILT5結合断片」を含む。

#### 【0023】

本明細書において用いられる「フレームワーク領域」という用語は、CDR配列ではなく、抗原結合を可能にするためにCDR配列の正確な配置の維持を主に司る重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内のアミノ酸配列を指す。フレームワーク領域自身は典型的に、当技術分野において公知であるように、抗原結合に直接関与しないが、ある抗体のフ

10

20

30

40

50

フレームワーク領域内のある残基は、抗原結合に直接関与することができるか、またはCDRにおける1つもしくは複数のアミノ酸の抗原との相互作用能に影響を及ぼすことができる。フレームワーク領域は時に「FR」と呼ばれる。

#### 【0024】

本明細書において用いられる「ヒト化抗体」という用語は、重鎖および/または軽鎖の非ヒト（たとえば、マウス、ラット、またはハムスター）相補性決定領域（CDR）と共に、可変領域において1つまたは複数のヒトフレームワーク領域を含むように操作された抗体を指す。ある態様において、ヒト化抗体は、CDR領域を除いて完全にヒトである配列を含む。ヒト化抗体は典型的に、非ヒト化抗体と比較してヒトに対する免疫原性が低く、したがってある状況において治療的恩典を提供する。当業者は、ヒト化抗体を理解しており、同様にそれらを生成するための適した技術を理解しているであろう。たとえば、その各々の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Hwang, W. Y. K., et al., Methods 36:35, 2005; Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033, 1989; Jones et al., Nature, 321 :522-25, 1986; Riechmann et al., Nature, 332:323-27, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-36, 1988; Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:3833-37, 1989; 米国特許第5,225,539号;第5,530,101号;第5,585,089号;第5,693,761号;第5,693,762号;第6,180,370号、およびSelig et al., WO 90/07861を参照されたい。

10

#### 【0025】

本明細書において用いられる「Treg」または「調節性T細胞」という用語は、免疫系の活性化を抑制するように機能し、それによって免疫系の恒常性および自己抗原に対する寛容を維持するT細胞集団を指す。調節性T細胞の大多数は胸腺において発達するが、末梢の非Treg細胞を、調節性T細胞系列へと分化方向を決定するように教育することもできる。調節性T細胞は、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>またはCD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>表現型を示す細胞の中で濃縮され、多くがフォークヘッドファミリー転写因子（FOXP3）を発現する。調節性T細胞は、自身の免疫系が外来抗原に対する応答に成功した後の哺乳動物対象における免疫応答の調整に関係しており、かつまた、対象自身の組織を攻撃することによって自己免疫疾患をもたらし得る免疫応答の調節にも関係する。

20

#### 【0026】

#### ILT5

Immunoglobulin-like transcripts (ILT) は、ヒトおよび非ヒト霊長類において見いだされる急速に進化しつつある遺伝子によってコードされる。Immunoglobulin-like transcripts 5 (「ILT5」) は、ILT1、ILT2、ILT3、ILT4、ILT5、ILT6、ILT7、およびILT8を含む免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーである細胞表面分子である（その全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Colonna et al., J. of Exp. Med., Volume 186, Number 11, 1809-1818, 1997）。阻害機能をもつ、ILT受容体であるILT3の細胞外ドメインは、T細胞過剰応答性の誘導能を有することが確立されている（たとえば、その全内容が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第2008/0038260号を参照されたい）。この知見は、T細胞によって発現されるILT3リガンドが、ILT3と相互作用すると、阻害シグナルを変換することを示唆している。

30

40

#### 【0027】

ILT5もまた、阻害性ILT受容体であり、ヒトにおける未成熟DCおよび単球などの抗原提示細胞（APC）上で高度に発現される。ヒトILT5遺伝子はクローニングされて特徴付けされている（たとえば、その各々の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Colonna et al., J. of Exp. Med., Volume 186, Number 11, 1809-1818, 1997; Pfistershammer et al., Blood, Sep 10; 114(11):2323-32. Epub 2009 Jul 17; 米国特許第6,448,035号を参照されたい）。

#### 【0028】

#### 免疫細胞に及ぼす抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片の効果

本明細書において開示される方法において用いるための抗ILT5抗体およびそのILT5結合

50

断片は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片が一価型である場合にT細胞増殖を誘導するが、抗ILT5抗体またはILT5結合断片が多価（クロスリンク）型である場合には、T細胞増殖を誘導しない。本明細書において記述される抗ILT5抗体およびILT5結合断片に関連して用いられる場合、「一価」とは、クロスリンクしていない抗ILT5抗体またはILT5結合断片の単一の分子を指す。たとえば、2つの抗原結合部位を含む抗ILT5抗体の可溶性のものは、本明細書において用いられる「一価」という用語である。理論に拘束されることを望むわけではないが、本発明者らは、ILT5リガンドを発現するT細胞とILT5を発現する定常状態APCとの相互作用時に、ILT5によるILT5リガンドの会合が阻害シグナルを誘導し、これがT細胞の活性化閾値を増加させると仮定している。または、ILT5：ILT5リガンドの会合が、ILT5リガンドと、免疫刺激性であると思われるより親和性の低い不確定受容体との相互作用を排除する可能性がある。表面ILT5分子を占有するのみならず、表面ILT5分子の何らかの内在化を誘導することによって、本明細書において開示される方法において用いるための一価の抗ILT5抗体およびILT5結合断片は、ILT5リガンド-ILT5相互作用を妨害して、それによって阻害シグナルを除去するかまたは活性化シグナルを発生させ、そのいずれもがT細胞の活性化閾値を低下させるであろう。（組織培養ウェルのプラスチック底面に固定された抗体ではなく）一価の抗ILT5抗体が刺激性でありうるという事実から（実施例3を参照されたい）、その細胞質ドメインに機能的阻害モチーフを含むILT5分子はハイパークロスリンクされなければ阻害性受容体として機能しないことが、強く示されている。ILT5受容体が、（たとえば、APC上のFc受容体にまたはプラスチック組織培養ウェルの底面に結合した）クロスリンクした抗ILT5抗体またはILT5抗体断片に同時会合すると、それらは完全に内在化されるようになり、これによりILT5：ILT5リガンド相互作用は排除される。さらに、クロスリンクした抗ILT5抗体は、T細胞活性化を増強しない。このことにより、クロスリンクした抗ILT5抗体が、ILT5発現細胞（たとえば、APC）において阻害性カスケードを誘導することができ、これは、ILT5：ILT5リガンド相互作用の非存在下で起こるT細胞特異的活性化シグナルを相殺する機能（すなわち寛容化機能）を示すようにAPCを再プログラムするのに十分な強さであることが示唆されている。したがって、本発明者らは、活性化シグナルと阻害シグナル（それぞれILT5：ILT5リガンド相互作用の遮断およびAPCへのILT5シグナル伝達による）を統合させた結果として、不変の（類似の強度のシグナルに対抗する）または減損した免疫を達成することができると仮定している。

#### 【0029】

後述の実施例の章により詳細にさらに記述されるように、自己由来の状況のみならず同種異系の状況でのAPC上のILT5と一価の抗ILT5抗体との会合によって、そのようなAPCに曝露されたナイーブT細胞においてNKG2Dのアップレギュレーションが起こる。NKG2Dは、腫瘍およびウイルス免疫において重要な役割を有する免疫受容体である。その上、抗ILT5抗体に以前に接触したことがあるAPCに曝露されたT細胞は、通常、その内在化を誘発する条件下でNKG2Dの上昇したレベルを維持する。そのような条件は典型的に、NKG2DとそのリガンドまたはNKG2Dに結合するアゴニスト抗体もしくは断片との接触を含む。NKG2Dの内在化は、腫瘍および細胞内病原体（たとえばウイルス）が免疫系による認識を回避するのを助ける。それゆえ、免疫系の適切な細胞（たとえば、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞）によるNKG2D発現期間の延長は、癌および/または細胞内病原体による感染症の処置において有利でありうる。加えて、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片に接触したことがあるAPCと相互作用した結果として増殖するT細胞は、表面TCR：CD3複合体を有意にアップレギュレートして、その後のTCR刺激に対する応答性の顕著な増加を示す。抗ILT5抗体に接触したことがあるまたは接触しているAPCとの相互作用により、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞はいずれも高レベルのFasリガンドを分泌して、その後、MHCクラスI依存のかつFas-L依存の強い抗腫瘍細胞傷害効果を発揮する。

#### 【0030】

ある態様において、本開示の方法において用いるための抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片に接触したことがあるまたは接触しているAPCに接触すると、インビボまたはインビトロのいずれにおいてもT細胞、たとえばCD4<sup>+</sup>またはC

D8<sup>+</sup> T細胞内の応答を誘導する。ある態様において、そのような応答は、増殖応答および/またはサイトカイン/ケモカイン産生応答である。ある態様において、T細胞応答（たとえば、増殖応答）は、APCに接触した抗ILT5抗体またはILT5結合断片の量に比例する。ある態様において、T細胞応答（たとえば、増殖応答）は、抗原に曝露されることがないT細胞（たとえばナイーブT細胞）において誘導される。ある態様において、T細胞応答（たとえば、増殖応答）は、抗原に既に曝露されたメモリーT細胞において誘導される。本開示の方法において用いられる抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片によって誘導されるT細胞応答は、MHC分子のTCR認識の非存在下で起こる。したがって、そのような抗ILT5抗体またはILT5結合断片によって仲介されるT細胞応答は、TCR非依存的な（たとえば、該応答がTCRによるMHC分子の認識を必要としない）様式で起こる。

10

**【0031】**

ある態様において、T細胞、たとえばCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup> T細胞が、インビボまたはインビトロのいずれかで、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片に以前に接触したことがあるAPCに接触すると、該T細胞はその表面上でNKG2Dの発現をアップレギュレートする。本発明の文脈において用いられる「アップレギュレートする」という用語は、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片に接触したことがないAPCに対照T細胞が接触した場合より高レベルのタンパク質（たとえば、細胞表面上のNKG2D）をT細胞が発現することを意味する。「アップレギュレートする」とは、対照T細胞が所定のタンパク質（たとえば、細胞表面上のNKG2D）をあるレベルで発現する場合に、より多くの該タンパク質を発現する状態を指す。「アップレギュレートする」とはまた、対照T細胞が所定のタンパク質（たとえば、細胞表面上のNKG2D）を全く発現しない場合に、該タンパク質の任意の量、たとえば任意の検出可能な量を発現する状態を指す。ある態様において、T細胞は、NKG2Dが典型的には細胞表面から内在化される1つまたは複数の条件下で、その表面上でのNKG2Dの発現を維持する。そのような条件の非制限的な例としては、NKG2Dと細胞の表面上に発現されたNKG2Dリガンドとの会合、NKG2Dと分泌されたNKG2Dリガンドとの会合、およびNKG2DとNKG2Dに結合する抗体または断片との会合が挙げられる。

20

**【0032】**

ある態様において、T細胞、たとえばCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup> T細胞が、インビボまたはインビトロのいずれかで、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片に以前に接触したことがあるAPCに接触すると、該T細胞はその表面上のTCRおよびCD3分子（たとえば、TCR：CD3複合体）の発現をアップレギュレートする。ある態様において、T細胞は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片に接触したことがないAPCにT細胞が接触する場合より高いレベルでFasリガンド（FasL）を分泌する。

30

**【0033】**

ある態様において、インビボまたはインビトロのいずれかで、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片に以前に接触したことがあるAPCに接触したT細胞またはその子孫、たとえばCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup> T細胞は、細胞傷害能を示す。本明細書において用いられる「細胞傷害能」という用語は、抗原に曝露されると細胞傷害活性を獲得することができる状態を指す。したがって、ある態様において、（たとえば、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片に以前に接触したことがあるAPCに接触した結果として）細胞傷害能を示すT細胞またはその子孫は、抗原に曝露されると細胞傷害性となるように誘導される。細胞傷害能を示すT細胞（たとえば、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片に以前に接触したことがあるAPCに接触したT細胞またはその子孫）は、任意の多様な抗原に曝露されると細胞傷害性が誘導されうる。たとえば、そのようなT細胞は、「細胞抗原」に曝露されうる。本明細書において用いられる「細胞抗原」という用語は、対象の細胞表面または細胞内で発現されることができるとする。本明細書において用いられる「外因性の抗原」という用語は、対象に投与される抗原を指す。「外因性の抗原」という用語は、外来の非内因性の抗原（以下の「内因性の抗原」の定義を参照されたい）、ならびに対象の体内においてインビボで存在する抗原と同一である抗原を含む。本明細書において用いられる「内因性の抗原」とは、対象に投与され

40

50

ない、たとえば対象の体内に存在する、抗原を指す。ある態様において、「細胞抗原」は、治療（たとえば、以下により詳しく記述されるように放射線照射または化学療法剤）の投与時に放出される。ある態様において、「細胞抗原」とは、腫瘍細胞または抗原を有するAPC上、またはその中に存在する抗原を含む。または、「細胞抗原」は、対象の細胞表面または細胞内で発現されることができ、無細胞でありうる。ある態様において、抗原との接触は一般的に、抗ILT5抗体またはILT5結合断片に接触したAPCとの接触後、少なくとも1時間（たとえば、少なくとも2時間、3時間、5時間、10時間、15時間、24時間、2日、4日、1週間、2週間、またはそれより長く）で起こるのである。多様な任意の抗原との接触により、細胞傷害能を有する状態から細胞傷害性への移行が起こるのである。ある態様において、細胞傷害能を示すT細胞は、癌様である細胞、または細菌、ウイルス、真菌（たとえば、酵母を含む）、原虫、もしくは寄生虫に感染した細胞に結合するまたはそれらを認識すると、細胞傷害性となりうる。たとえば、細胞傷害能を示すT細胞は、細菌、ウイルス、真菌、原虫、または寄生虫に感染した細胞に結合すると、細胞傷害性となりうる。関心対象の例示的な抗原としては、抗原に対する免疫応答が該物質によって引き起こされる疾患を予防または処置するために役立つ、該感染物質に由来する抗原および腫瘍抗原が挙げられる。そのような抗原としては、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、糖脂質等が挙げられるがこれらに限定されない。関心対象の抗原はまた、腫瘍を獲得するリスクがあるかまたは腫瘍を有すると診断された対象に治療的恩典を提供する抗原を含む。ある態様において、そのような抗原は、腫瘍を獲得するリスクがあるかまたは腫瘍を有すると診断された対象に投与される。適切な抗原としては、腫瘍ワクチン、タンパク質、疾患に関連するマーカー等が挙げられる。ある態様において、腫瘍ワクチンは、免疫寛容原性の腫瘍環境を壊す目的で共刺激タンパク質を導入する。

#### 【0034】

腫瘍抗原の非制限的な例としては、たとえば、腫瘍関連糖タンパク質TAG-72、HER-2、抗体9.2.27に結合する高分子量黒色腫抗原、ルイス-Y-関連炭水化物（上皮癌において認められる）、IL-2受容体p55サブユニット（白血病およびリンパ腫細胞表面で発現される）、erbB2/p185癌腫関連癌原遺伝子（乳癌において過剰発現される）、ガングリオシド（たとえば、GM2、GD2、およびGD3）、上皮腫瘍ムチン（すなわち、MUC-1）、癌胎児抗原、卵巣癌抗原MOV-18、扁平上皮癌抗原17-1A、および悪性黒色腫MAGE抗原（たとえば、MAGE-1およびMAGE-3）等が挙げられる。当業者は、細胞傷害性T細胞またはその子孫を、本明細書において記述される細胞傷害能を有するようにする他の適した腫瘍抗原を理解しているであろう。

#### 【0035】

ウイルス抗原の非制限的な例としては、インフルエンザウイルスの核タンパク質（NP）およびHIVのGagタンパク質が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。他の抗原としては、HIV Envタンパク質またはその成分部分、gp120およびgp41、HIV Nefタンパク質、およびHIV Polタンパク質、逆転写酵素ならびにプロテアーゼが挙げられるがこれらに限定されるわけではない。加えて、たとえばEBOV NP、または完全長の糖タンパク質（GP）もしくは分子のムチン領域が欠失したGPなどのエボラウイルス（EBOV）抗原（Yang Z-Y, et al. (2000) Nat Med 6:886-9, 2000）、痘瘡抗原、A型、B型、またはC型肝炎ウイルス、2型または14型などのヒトライノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ポリオウイルス2型または3型、口蹄疫ウイルス（FMDV）、狂犬病ウイルス、ロタウイルス、インフルエンザウイルス、コクサッキーウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス（HPV）、たとえば乳頭腫ウイルス16型、そのE7タンパク質、およびE7タンパク質またはそのエピトープを含有する断片；ならびにサル免疫不全ウイルス（SIV）などの他のウイルス抗原が用いられうる。関心対象の抗原は、ウイルス起源の抗原に限定される必要はない。真菌抗原、細菌抗原、および腫瘍抗原と同様に、たとえばマラリア抗原などの寄生虫抗原が含まれる。細菌抗原の非制限的な例としては、百日咳菌（*Bordetella pertussis*）（たとえば、P69タンパク質および糸状血液凝集素（FHA）抗原）、コレラ菌（*Vibrio cholerae*）、炭疽菌（*Bacillus anthracis*）、大腸菌熱不安定毒素Bサブユニット（LT-B）、大腸菌K88抗原、および腸毒素

10

20

30

40

50

産生性大腸菌抗原などの大腸菌 (*E. coli*) 抗原、*Y. エンテロコリチカ* (*Y. enterocolitica*) 熱ショックタンパク質60 (Mertz et al., *J. Immunol.* 164(3): 1529-1537, 2000)、ヒト型結核菌 (*M. tuberculosis*) 熱ショックタンパク質hsp60およびhsp70、トラコーマクラミジア (*Chlamydia trachomatis*) 外膜タンパク質 (Ortiz et al., *Infect. Immun.* 68(3):1719-1723, 2000)、*B. ブルグドルフェリ* (*B. burgdorferi*) 外表面タンパク質 (Chen et al., *Arthritis Rheum.* 42(9): 1813-1823, 1999)、*L. メジャー* (*L. major*) GP63 (White et al., *Vaccine* 17(17):2150-2161, 1999 (*Vaccine* 17(20-21):2755似て正誤表を開示))、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 髄膜炎菌血清型15 PorBタンパク質 (Delvig et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 85(2):134-142, 1997)、*P. ジンギバリス* (*P. gingivalis*) 381線毛タンパク質 (Ogawa, *J. Med. Microbiol.* 41(5):349-358, 1994)、大腸菌外膜タンパク質F (Williams et al., *Infect. Immun.* 68(5):2535-2545, 2000) が挙げられる。微生物抗原の他の例としては、マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) P28グルタチオン-S-トランスフェラーゼ抗原 (P28抗原)、ならびに住血吸虫、マイコプラズマ、回虫、条虫、トラコーマクラミジア、およびマラリア寄生虫、プラスモジウム (*Plasmodium*) またはバベシア (*babesia*) 属の寄生虫、たとえば熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の抗原、および上記の抗原からの免疫原性エピトープをコードするペプチドが挙げられる。上記で開示した参考文献の各々は、その全内容が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0036】

抗ILT5抗体またはILT5結合断片 (たとえば、一価型抗ILT5抗体またはILT5結合断片) に以前に接触したことがあるAPCにナイーブCD4<sup>+</sup>またはナイーブCD8<sup>+</sup> T細胞が接触するとそのようなT細胞表面で間接的な免疫刺激効果および/または増殖応答を仲介する多様な任意の抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を、本開示の方法において用いることができる。その上、そのようなAPCに曝露されたT細胞 (たとえば、ナイーブT細胞) においてNK2DまたはTCR: CD3複合体のアップレギュレーションを生じる多様な任意の抗ILT5抗体またはILT5-結合抗体断片を、本開示の方法において用いることができる。その上、抗ILT5抗体またはILT5結合断片 (たとえば、一価型の抗ILT5抗体またはILT5結合断片) に以前に接触したことがあるAPCにT細胞が接触すると、T細胞またはその子孫に細胞傷害能を与える多様な任意の抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を、本開示の方法において用いることができる。当業者は、本開示の方法において用いるための適した抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片を選択することができる。たとえば、本開示の方法において用いることができる抗ILT5抗体およびILT5結合断片としては、以下に記述される抗ILT5抗体およびILT5結合断片、たとえばSEQ ID NO:1~32の1つまたは複数を含む抗体が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。

#### 【0037】

##### T細胞応答の阻害

上記の免疫増強効果とは対照的に、クロスリンクした抗ILT5抗体に以前に接触したことがあるAPCと相互作用するT細胞が、一価の抗体を用いる場合には観察されるT細胞応答を開始しないことから、そのようなAPCは免疫寛容原性であり得る。したがって、ある態様において、本開示の方法において用いるための抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、T細胞、たとえばCD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup> T細胞が抗ILT5抗体またはILT5結合断片のクロスリンク型に接触したことがあるAPCに接触する場合に該T細胞内の応答をインビボまたはインビトロで阻害し得、ここで該T細胞は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片に以前に接触した該APCと該T細胞との接触と同時にまたは非常に近い時間で抗原に接触する。T細胞応答の阻害に関連して用いられる場合、「非常に近い時間で」とは、APCに及ぼす抗ILT5抗体の薬力学的効果がなおも発揮されている時間枠内を意味する。何らかの特定の理論に拘束されることを望むわけではないが、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片の半減期などの非限定的要因が、そのような時間枠を決定するために重要であろうと仮定される。ある態様において、そのような応答は増殖応答である。ある態様において、T細胞応答 (たとえば、増殖応答) の阻害は、クロスリンクした抗ILT5抗体またはILT5結合断片がAPCに接触した量に比例す



る。ある態様において、T細胞応答（たとえば、増殖応答）は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片がILT5にクロスリンクまたはハイパークロスリンクすると阻害される。本明細書において記述されるように、そのようなハイパークロスリンクは、抗ILT5抗体またはILT5結合断片が多価型である（たとえば、固相支持体またはFc受容体（インビボ）に結合している）場合に起こるが、抗ILT5抗体またはILT5結合断片が一価型である場合には起こらない。

#### 【0038】

ある態様において、本開示の方法において用いるための抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、対象（たとえば、ヒト）において寛容を誘導するために用いられる。たとえば、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を、関心対象の抗原と同時にまたは非常に近い時間で対象に投与することができる。

10

#### 【0039】

##### 疾患および感染症の処置

##### T細胞応答の誘導または増強を介した処置

「免疫細胞に及ぼす抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片の効果」と題する章に記述される抗体などの、一価の抗ILT5抗体およびILT5結合抗体断片は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片に接触したことがあるまたは接触しつづけているAPCにCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞が接触すると、そのような両方のT細胞をTCR非依存的な（たとえば、該活性化はTCRによるMHC分子の認識を必要としない）様式で、間接的に活性化する。そのようなT細胞またはその子孫は、T細胞またはその子孫を抗原に曝露し、したがって細胞を細胞傷害性にするこ

20

#### 【0040】

ある態様において、本開示の方法において用いるための抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片は、対象における多様な任意の癌を処置するために用いられうる。癌は、細胞の制御不能かつ異常な増殖を特徴とし、組織病理学的タイプまたは浸潤の進行期によらず、全てのタイプの過増殖成長、過形成増殖、腫瘍形成プロセス、転移組織、または悪性形質転換した細胞、組織、もしくは臓器を含む。処置することができる癌には、膵臓癌、黒色腫、乳癌、肺癌、気管支癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、末梢神経系の癌、食道癌、子宮頸癌、子宮または子宮内膜癌、口腔または咽頭の癌、腎臓癌、精巣癌、胆管癌、小腸または虫垂癌、唾液腺癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫、および血液組織の癌が含まれ得るがこれらに限定されるわけではない。

30

#### 【0041】

ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、癌を処置するためのもう1つの治療と併用される。たとえば、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、放射線療法と併用されうる。追加的または代替的に、抗ILT5抗体またはILT5結合断片は、化学療法剤と併用されうる。ある態様において、治療は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与と同時にまたは非常に近い時間で少なくとも1回投与される。抗ILT5抗体またはILT5結合断片と併用して投与される治療に関連して用いられる場合の、「非常に近い時間」とは、T細胞が抗ILT5抗体またはILT5結合断片により薬力学的効果を示す時間枠内を意味する。

40

#### 【0042】

抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与に関連する治療の投与のタイミングは、いくつかのパラメータを考慮に入れる：一方で、T細胞と抗原を有するDCとの接触を通して二次リンパ系組織（たとえば、リンパ節）において開始される、抗原特異的T細胞活性化および応答のインビボ反応速度論に影響を及ぼすことが知られている要因が考慮される。たとえば、抗原の量、免疫原性、および利用能は、明らかに重要であり、T細胞応答が開始されるか否かならびにその全体的な強度および期間を規定する。ペプチド：MHC複合体に対する単一のTCRの親和性はもう1つのパラメータである。この点において、および任意の特定の理論に拘束されることを望むわけではないが、本発明者らは、T細胞の表面上でのTCR：

50

CD3複合体を増加させることによって、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、抗原を有するDCに対するT細胞のアビディティを増加させ、かつそれによって、そうでなければ応答に関与していなかった、低親和性TCRを有するT細胞の該応答を可能にするのみならず、T細胞活性化の全体的な反応速度論を加速させると仮定している。T細胞活性化の反応速度論はまた、DCが関心対象の抗原を獲得するのがリンパ節の内部であるのか外部（たとえば、血流内または末梢の非リンパ系組織内）であるのかにも依存する。後者の場合、抗原を有するDCがリンパ節に移動するために要する時間は、抗原曝露時間に比例したT細胞活性化が起こるタイミングを増加させる。他方、インビトロのデータは、TCR刺激とCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞の抗ILT5抗体への曝露とを同時に行うことにより、抗ILT5抗体誘導型T細胞応答性が消失することを示している（図13を参照されたい）。したがって、および任意の特定の理論に拘束されることを望むわけではないが、治療の投与による抗原曝露を通して誘導される抗原特異的T細胞活性化を開始する前に、抗ILT5抗体またはILT5結合断片に、T細胞に対するその薬力学的効果を発揮させることが望ましいと仮定される。加えて、抗ILT5抗体またはILT5結合断片が比較的短い半減期を有する場合、関心対象の抗原とより近い時間で抗ILT5抗体またはILT5結合断片を投与することが望ましい。投与した抗体または抗原結合断片の半減期の決定は、当技術分野においてルーチンであり、投与後の様々な時間で血清レベルでの抗体または断片の量を測定する（たとえば、ELISAによって）段階、およびそのような測定を半減期曲線に適合させる段階を含むがこれらに限定されるわけではない多様な方法によって達成することができる。投与と投与の間隔に影響を及ぼすことができる他の要因としては、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片に対する患者の生理的反応またはその欠如、治療の性質、および診察回数の最少化などの実際的な考慮が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。当業者は、上記の要因を理解しており、治療投与のタイミングが適切であるか否かを決定することができる。ある態様において、治療（たとえば、放射線または化学療法剤）は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与後に投与される。たとえば、治療を、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与の数時間から数日後に行うことができる。他の態様において、治療（たとえば、放射線または化学療法剤）は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与の前または同時に投与される。たとえば、治療を、抗ILT5抗体またはILT5結合断片と同時、または数時間もしくは数日前に投与することができる。

#### 【0043】

ある態様において、造血腫瘍を有する対象では、治療は骨髓移植 / 造血細胞移植（BMT/HCT）からなる。そのような態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、治療（BMT/HCT）後に腫瘍再発の徴候を示す対象に投与されうる。後者の場合、および理論に拘束されることを望むわけではないが、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、腫瘍細胞を標的とする応答を含むT細胞応答を誘導および / または増強するであろうと仮定される。そのような態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、腫瘍の再発が診断された後任意の時期に投与される。

#### 【0044】

ある態様において、治療（たとえば、放射線または化学療法剤）の投与は、細胞の機能を阻害または妨害し、かつ / または、細胞の破壊を引き起こす、たとえば、関心対象の抗原を含む細胞を溶解もしくはそれ以外の方法で（たとえば、アポトーシス誘導によって）破壊するように作用することによって、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片に接触したAPCと相互作用したことがあるT細胞またはその子孫の細胞傷害能を活性化する抗原の供給源を提供する。ある態様において、治療は、細胞（たとえば、腫瘍細胞またはウイルスに感染した細胞）から細胞抗原を放出させて、それによって抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片に接触したAPCと相互作用したことがあるT細胞の細胞傷害能を活性化する抗原の供給源を提供する。ある態様において、治療（たとえば、腫瘍ワクチン）は、腫瘍環境において内因性に発現された場合には腫瘍細胞を根絶するのに十分な免疫を誘導しない腫瘍抗原の、相当量を導入する。ある態様において、腫瘍ワクチンはまた、共刺激分子を導入することができる。抗体またはILT5結合断片の前に治療を投与する場合、以下に記述されるよう

に、抗原仲介T細胞応答の反応速度論は、抗ILT5抗体仲介T細胞応答の反応速度論より遅い可能性があること、およびしたがって、そのような抗原に対するT細胞の細胞傷害性が誘導または増強されることを理解されたい。ある態様において、抗ILT5抗体およびそのILT5結合抗体断片は、腫瘍を患う対象を処置するために用いられうる。ある態様において、腫瘍は低免疫原性であるか、または免疫寛容原性でさえある。そのような態様において、本明細書において記述されるT細胞の細胞傷害性をおそらく誘発しうる関心対象の抗原もまた、たとえば腫瘍環境に存在する結果として、低免疫原性であるかまたは免疫寛容原性でさえありうる。ある態様において、先に記述した治療（たとえば、化学療法剤または放射線治療）の投与は、抗原がもはや低免疫原性でも免疫寛容原性でもなくなるような様式で、腫瘍から1つまたは複数の抗原を放出させる。その結果、抗ILT5抗体またはそのILT5結合抗体断片に以前に結合したことがあるAPCは、治療によって放出された抗原に結合するとまたは抗原を認識すると細胞傷害性となるように誘導され得るT細胞に、結合しうる。ある態様において、腫瘍細胞は腫瘍細胞表面の抗原を認識するT細胞表面のILT5リガンドに結合するILT5受容体を発現する。そのような態様において、ILT5：ILT5リガンド相互作用は、腫瘍細胞に結合したT細胞の活性化を禁止する。したがって、ある態様において、治療と併用した、または治療と併用しない抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片の投与は、T細胞と腫瘍細胞とのあいだのILT5：ILT5リガンド相互作用を妨害して、それによって腫瘍細胞に結合したT細胞を活性化させる。

#### 【0045】

ある態様において、治療は、所望のエンドポイントに達するまで投与される。たとえば、治療は、腫瘍増殖の阻害、腫瘍の大きさの低減、腫瘍の数の低減、腫瘍負荷の減少、および/または生存期間延長の、所望のレベルに達するまで投与されうる。当業者は、これらおよび他の所望のエンドポイントを理解しており、標準的な方法を用いてそのようなエンドポイントに達する時期を決定することができる。

#### 【0046】

たとえば体外から適用される、体外照射療法（EBRTまたはXBRT）または遠隔放射線療法、密封放射性線源が処置領域に配置される近接照射療法または密封線源療法、および注入または経口摂取によって投与される全身放射線療法または非密封線源療法を含む、多様な放射線療法が当技術分野において公知である。従来の2D体外照射療法（2DXRT）、定位放射線療法、3次元原体照射療法（3DCRT）、および強度変調放射線療法（IMRT）が含まれるがこれらに限定されるわけではない多様な体外照射療法が公知である。近接照射療法は、放射性線源の一時的または永続的な留置を用いることができる。当業者は、これらおよび他の放射線治療を理解しており、それらを適切に投与することができる。

#### 【0047】

多様な化学療法剤が当技術分野において公知である。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片と併用される化学療法剤は、抗代謝剤である。抗代謝剤の非制限的な例としては、アミノプテリン、メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、クラドリピン、クロファラビン、フルダラビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニン、カペシタビン、シタラビン、フルオロウラシル、フロクスウリジン、およびゲムシタピンが挙げられる。ある態様において、抗代謝剤は、ゲムシタピンまたはフルオロウラシルなどの、しかしこれらに限定されるわけではないヌクレオシドアナログである。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片と併用される化学療法剤は、微小管形成に影響を及ぼす物質である。微小管形成に影響を及ぼす物質の非制限的な例としては、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビノレルピン、タキソテール、エトポシド、およびテニポシドが挙げられる。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片と併用される化学療法剤は、たとえばシクロホスファミドなどのアルキル化剤である。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片と併用される化学療法剤は、細胞傷害性抗生物質、たとえばドキソルビシンなどのトポイソメラーゼII阻害剤である。ある態様において、化学療法剤は、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の低分子毒素または酵素的に活性な毒素などの毒素、またはその

断片を含む。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合断片と併用される化学療法剤は、たとえばアバスタチンなどの抗血管新生剤である。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片と併用される化学療法剤は、たとえばハーセプチンなどの生物学的物質である。

#### 【0048】

ある態様において、本開示の方法において用いるための抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片は、対象における多様な任意の感染症を処置または予防（たとえば、ワクチン接種と併用して）するために用いられうる。例示的な感染症としては、多様な任意の細菌（たとえば、細胞内細菌）、ウイルス、真菌、原虫、または寄生虫（たとえば、細胞内寄生虫）感染症が挙げられる。処置することができるウイルス感染症としては、HIV（たとえば、HIV-1およびHIV-2）、ヒトヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス（特にヒト）、ロタウイルス、エプスタイン-バーウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、B型肝炎ウイルス、A型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、およびE型肝炎ウイルスなどの肝炎ウイルス、パラミクソウイルス、RSウイルス、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス（たとえば、HPV6、11、16、18等）、フラビウイルス（たとえば、黄熱病ウイルス、デングウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス）、およびインフルエンザウイルスによって引き起こされる感染症が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。

#### 【0049】

細菌感染症としては、淋菌（*N. gonorrhea*）および髄膜炎菌（*N. meningitidis*）を含むナイセリア（*Neisseria*）種、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）、化膿性連鎖球菌（*S. pyogenes*）、*S. アガラクチアエ*（*S. agalactiae*）、ミュータンス連鎖球菌（*S. mutans*）を含む連鎖球菌（*Streptococcus*）種；タイプBインフルエンザ菌（*H. influenzae* type B）、分類不能型インフルエンザ菌（non typeable *H. influenzae*）、軟性下疳菌（*H. ducreyi*）を含むヘモフィルス（*Haemophilus*）種；カタル球菌（*Branhamella catarrhalis*）としても知られる*M. カタラーリス*（*M. catarrhalis*）を含むモラクセラ（*Moraxella*）種；百日咳菌（*B. pertussis*）、パラ百日咳菌（*B. parapertussis*）および気管支敗血症菌（*B. bronchiseptica*）を含むボルデテラ（*Bordetella*）種；ヒト型結核菌（*M. tuberculosis*）、ウシ型結核菌（*M. bovis*）、らい菌（*M. leprae*）、トリ型結核菌（*M. avium*）、パラ結核菌（*M. paratuberculosis*）、スメグマ菌（*M. smegmatis*）を含むマイコバクテリウム（*Mycobacterium*）種；*L. ニューモフィラ*（*L. pneumophila*）を含むレジオネラ（*Legionella*）種；腸毒素産生性大腸菌（*E. coli*）、腸管出血性大腸菌、および腸病原性大腸菌を含むエシェリキア（*Escherichia*）種；コレラ菌（*V. cholera*）を含むビブリオ（*Vibrio*）種；ゾンネ赤痢菌（*S. sonnei*）、志賀赤痢菌（*S. dysenteriae*）、フレクスナー赤痢菌（*S. flexnerii*）を含む赤痢菌（*Shigella*）種；*Y. エンテロコリチカ*（*Y. enterocolitica*）、ペスト菌（*Y. pestis*）、偽結核エルジニア菌（*Y. pseudotuberculosis*）を含むエルジニア（*Yersinia*）種；*C. ジェジュニ*（*C. jejuni*）、および*C. コリ*（*C. coli*）を含むカンピロバクター（*Campylobacter*）種；腸チフス菌（*S. typhi*）、パラチフス菌（*S. paratyphi*）、ブタコレラ菌（*S. choleraesuis*）、腸炎菌（*S. enteritidis*）を含むサルモネラ（*Salmonella*）種；リステリア菌（*L. monocytogenes*）を含むリステリア（*Listeria*）種；ピロリ菌（*H. pylori*）を含むヘリコバクター（*Helicobacter*）種；緑膿菌（*P. aeruginosa*）を含むシュードモナス（*Pseudomonas*）種；黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）、表皮ブドウ球菌（*S. epidermidis*）を含むブドウ球菌（*Staphylococcus*）種；*E. フェカーリス*（*E. faecalis*）、*E. フェシウム*（*E. faecium*）を含むエンテロコッカス（*Enterococcus*）種；破傷風菌（*C. tetani*）、ボツリヌス菌（*C. botulinum*）、*C. ディフィシル*（*C. difficile*）を含むクロストリジウム（*Clostridium*）種；炭疽菌（*B. anthracis*）を含むバチルス（*Bacillus*）種；ジフテリア菌（*C. diphtheriae*）を含むコリネバクテリウム（*Corynebacterium*）種；*B. ブルグドルフェリ*（*B. burgdorferi*）、*B. ガリニイ*（*B. garinii*）、*B. アフゼリイ*（*B. afzelii*）、ガチョウスピロヘータ（*B. andersonii*）、*B. ヘルムシイ*（*B. hermsii*）を含むボレリア（*Borrelia*）種；*E. エクイ*（*E. equi*）

およびヒト顆粒球エールリヒア症の原因菌を含むエールリヒア (*Ehrlichia*) 種 ; 斑点熱リケッチア (*R. rickettsii*) を含むリケッチア (*Rickettsia*) 種 ; トラコーマクラミジア (*C. trachomatis*)、クラミジア肺炎病原体 (*C. pneumoniae*)、オウム病クラミジア (*C. psittaci*) を含むクラミジア (*Chlamydia*) 種 ; *L. インテロガン* (*L. interrogans*) を含むレプトスピラ (*Leptospira*) 種 ; 梅毒トレポネーマ (*T. pallidum*)、*T. デンチコラ* (*T. denticola*)、および *T. ヒオジセンテリ*ア (*T. hyodysenteriae*) を含むトレポネーマ (*Treponema*) 種によって引き起こされる感染症が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。

#### 【 0 0 5 0 】

ある態様において、本開示の方法において用いるための抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、対象における免疫応答を誘導および/または増強するために用いることができる。そのような態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合断片は、関心対象の抗原に対する免疫応答（たとえば、細胞傷害性細胞免疫応答）を誘導または増強することによって、アジュバントとして作用する。たとえば、対象に、関心対象の抗原を同時投与せずに抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片を最初に投与してもよい。理論に拘束されることを望むわけではないが、そのような投与は、対象におけるあるナイーブT細胞に細胞傷害能を与えることと仮定される。次に、対象に関心対象の抗原を投与してもよい。この場合も理論に拘束されることを望むわけではないが、細胞傷害能を示すあるT細胞は、関心対象の抗原に曝露されると該抗原を発現する細胞に対して細胞傷害性となると仮定される。したがって、ある態様において、対象における少なくとも1つのT細胞の、抗原を含む細胞に対する細胞傷害性が誘導または増強される。ある態様において、対象に抗原を直接投与することにより、1つまたは複数の追加の抗原が提供される。ある態様において、直接投与によって提供される抗原は、治療の投与時に溶解または破壊された細胞から放出される抗原と同じ抗原である。

#### 【 0 0 5 1 】

先に述べたように、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与と関心対象の抗原の投与との適切な間隔は、その各々を当業者が決定することができる様々な要因に依存する。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合断片を、関心対象の抗原を投与する前に1~14日間（たとえば、3日間）投与することができる。ある態様において、抗原は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の投与の前または投与と同時に投与される。たとえば、治療を、抗ILT5抗体またはILT5結合断片と同時に、または数時間もしくは数日前に投与することができる。

#### 【 0 0 5 2 】

ある態様において、対象は、対象における免疫応答を誘導または増強するために関心対象の抗原と同時にまたはほぼ同時に抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を投与されう。本明細書においてより詳細に記述されるように、増殖性T細胞応答は、抗ILT5抗体と外来リンパ球上に存在する外来抗原との両方を同時に含有する同種異系混合リンパ球培養において、インビトロで誘導される。対照的に、抗CD3抗体仲介刺激と抗ILT5抗体によって影響を受けたAPCとに同時に曝露されたT細胞の抗ILT5抗体誘導型増殖は、阻害される。理論に拘束されることを望むわけではないが、抗原仲介性T細胞応答および抗ILT5抗体仲介性T細胞応答の異なる反応速度論により、これらの結果を両立させることは可能である。同種異系混合リンパ球反応におけるT細胞増殖は典型的に、T細胞がT細胞活性化プロセスの本質的な成分であるAPCとの安定な接触を確立するためには一定の時間を必要とするという事実により、5~9日目で起こる。対照的に、抗ILT5仲介T細胞増殖は、抗CD3抗体に関して観察されたT細胞増殖の刺激と同様に、24時間と早期に検出され、3~3.5日でピークに達する。したがって、抗原仲介T細胞応答の反応速度論は、抗ILT5抗体仲介T細胞応答の反応速度論より遅い。もう1つの可能性は、この場合も理論に拘束されることを望むわけではないが、混合リンパ球培養における1つまたは複数のILT5リガンドおよびTCR複合体が、観察されたT細胞増殖に関係する分子に関して競合することである。

#### 【 0 0 5 3 】

ある態様において、対象はまた、抗原に対する対象の免疫応答を強化するために、アジュバント（たとえば、関心対象の抗原と共に投与される）を投与される。適したアジュバントとしては、CpG、ミョウバン、水中油型乳剤（たとえば、MF59（商標）（スクアレン、モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン、およびトリオレイン酸ソルビタンのミクロン水中油型乳剤）、Montanide（Seppic）、アジュバント65、Lipovant）、免疫刺激複合体またはISCOM（典型的にキラヤサポニン、コレステロール、およびリン脂質で構成されるハニカム様構造）、QS-21（セッケンボク（*Quillaja saponaria*）種の樹皮の天然物）、およびイヌリンに基づくアジュバントが挙げられるがこれらに限定されるわけではない。

【0054】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、インビトロでT細胞において免疫刺激応答を誘導または増強するために用いられ、該T細胞が次に対象に単独または1つもしくは複数の治療物質と併用して投与される。たとえば、所定の対象からのPBMCを、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片と共に培養することができる。これらの培養において、T細胞（たとえば、CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup> T細胞）は抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片に接触したことがあるAPCと相互作用し、それらまたはその子孫が細胞傷害能を獲得すると考えられる。次に、T細胞を関心対象の抗原に接触させて、それによってT細胞を、その表面上に関心対象の抗原を有する細胞に対して細胞傷害性にすることができる。抗原とのこの接触は、対象に細胞を投与する前にインビトロで行うことができるか、または対象に細胞を投与した後にインビボで行うことができる。そのような方法によって生成されたT細胞の細胞傷害性は、ルーチンの方法に従って当業者が評価することができる。関心対象の抗原に関連する疾患または状態を処置するために、適した細胞傷害性を示すT細胞を、それらが由来する対象に注入することができる。または、自己由来の状況において本明細書に記述される抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片に以前に接触したAPCに接触したことがある結果として細胞傷害能を有するT細胞またはそのような細胞傷害能を有するその子孫を、それが由来する対象に注入してもよく、ここでT細胞は、インビボで抗原に曝露されると細胞傷害性となる。ある態様において、CD4<sup>+</sup> T細胞のみを細胞傷害性にして対象に注入する。ある態様において、CD8<sup>+</sup> T細胞のみを細胞傷害性にして対象に注入する。ある態様において、CD4<sup>+</sup>とCD8<sup>+</sup> T細胞の両方を含むT細胞集団を細胞傷害性にして、対象に注入する。

【0055】

ある態様において、細胞を対象から得て、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片をコードする核酸分子を該細胞に導入する。たとえば、核酸分子は、プロモーター、またはその細胞において抗ILT5抗体またはILT5結合断片の発現を仲介する他の配列に機能的に連結される。ある態様において、核酸分子はまた、分泌を仲介するポリペプチド部分をコードする1つまたは複数の配列を含み得、該配列は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片が細胞から分泌されるように、抗ILT5抗体またはILT5結合断片をコードする配列に機能的に（たとえば、インフレームで）連結されている。次に、対象から得られ、核酸分子が導入されたそのような細胞、またはそのような細胞の子孫を、該細胞がインビボで抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を分泌するように、該対象に導入して戻すことができる。本来、対象から得られた細胞の子孫を用いる場合、それらもまた、核酸分子を含有および発現すべきである。対象に投与して戻される細胞を、任意で投与後のその増殖を妨害または阻害するように処置することができる。それらを、電離放射線（たとえば、x線またはγ線照射）の適切な線量、またはマイトマイシンCなどの薬物の適切な用量によって処置することができる。

【0056】

本開示を読むことによって当業者によって認識されるように、上記の細胞によって産生された（たとえば、エクスピボ方法によって産生された）抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、T細胞増殖の誘導において、ならびに細胞傷害能および/または細胞傷害性を示すようT細胞を誘導することにおいて有用であろう。

## 【 0 0 5 7 】

T細胞応答の阻害を介した処置

ある態様において、本開示の方法において用いるための抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、免疫関連疾患を処置するために上記のように寛容を誘導するために用いられる。本明細書において用いられる「免疫関連疾患」という用語は、少なくとも1つの異常な免疫現象に関連する疾患を指す。たとえば、免疫関連疾患の1つのクラスは自己免疫疾患を含む。自己免疫疾患は典型的に、対象の免疫系が対象の1つまたは複数の成分（細胞、組織、または細胞／組織を含まない分子）に対して活性化されて、たとえば外来細菌、ウイルス、および他の感染物質または癌細胞を攻撃する代わりに、対象自身の臓器、組織、または細胞を攻撃する場合に起こる。あらゆる哺乳動物対象は、ある程度自己免疫を示すが、そのような自己免疫は通常、免疫系が正常な自己免疫を調節して抑制することから、疾患状態にはならない。自己免疫疾患は、免疫系の調節が破壊されると発症する。自己免疫疾患はまた、変化した細胞を免疫系が「異物」とであると認識するように、免疫系によって認識される分子の変化が対象の細胞に存在する場合にも起こりうる。

10

## 【 0 0 5 8 】

免疫関連疾患のもう1つの例は、臓器、組織、または細胞移植の効果に関連する疾患である。移植された細胞が、レシピエント対象の内因性の細胞と同じ抗原をその表面上に示すことはまれである。したがって、移植対象の免疫系はしばしば、移植された固形組織を攻撃して拒絶し、それによって臓器不全または他の重篤な全身合併症が起こりうる。ある免疫抑制剤は典型的に、これらの免疫攻撃を仲介または予防するために用いられるが、そのような薬物はしばしば、たとえば免疫応答が減少した結果として日和見感染を発症するリスクを含む、望ましくない副作用を引き起こす。例示的な免疫関連疾患としては、アドレナリン作動薬抵抗性、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫アジソン病、副腎の自己免疫疾患、アレルギー性脳脊髄炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性炎症性眼疾患、自己免疫性新生児血小板減少症、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性甲状腺炎、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、心臓切開症候群、セリアックスブルー-皮膚炎、慢性活動性肝炎、慢性疲労性免疫不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、チャージ-スト劳斯症候群、癬痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素病、クローン病、デンスデポジット病、臓器移植による効果に関連する疾患、円板状狼瘡、本態性混合クリオグロブリン血症、線維筋痛症-線維筋炎、糸球体腎炎（たとえば、IgA腎症）、グルテン感受性腸症、グッドパスチャー症候群、GVHD、グレーヴス病（たとえば、グレーヴス甲状腺炎およびグレーヴス眼症）、ギラン-バレー、甲状腺機能亢進症（すなわち、橋本甲状腺炎）、特発性肺線維症、特発性アジソン病、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン抵抗症候群、若年性関節炎、扁平苔癬、紅斑性狼瘡、メニエール病、代謝症候群、混合結合組織病、多発性硬化症、重症筋無力症、心筋炎、糖尿病（たとえば、I型糖尿病またはII型糖尿病）、神経炎、他の内分泌腺不全、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多発性内分泌症、多腺症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発筋炎および皮膚筋炎、MI後症候群、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、再発性多発性軟骨炎、ライター症候群、リウマチ性心疾患、リウマチ性関節炎、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフマン症候群、全身性紅斑性狼瘡、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、蕁麻疹、ブドウ膜炎、眼ブドウ膜炎、疱疹状皮膚炎血管炎などの血管炎、白斑、およびヴェーゲナー肉芽腫症が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。

20

30

40

## 【 0 0 5 9 】

ある態様において、クロスリンクした抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、寛容を誘導したもう1つの治療物質と併用して投与される。そのような寛容誘導性治療物質の非制限的な例は、CD3に結合する抗体またはその抗原結合断片、たとえばオテリキシズマブ（その全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Keymeulen B, et al. N Engl J Med

50

.;352:2598-2608, 2005)である。他の抗CD3抗体としては、hOKT3(ヒト化(IgG1またはIgG4)抗ヒトCD3)、HUM291(ヒト化(IgG2)抗ヒトCD3;ピシリズマブ;NUVIONTM)、UCH T1(マウス(IgG1)抗ヒトCD3)、Leu4(マウス(IgG1)抗ヒトCD3)、500A2(ハムスター(IgG)抗マウスCD3)、CLB-T3/3(マウス(IgG2a)抗ヒトCD3)、BMA030(マウス(IgG2a)抗ヒトCD3)、YTH 12.5(ラット(IgG2b)抗ヒトCD3)、およびNI-0401(完全なヒト抗ヒトCD3)が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。当業者は、本明細書において開示される抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片と併用できる他の抗CD3抗体および断片を理解しているであろう。

#### 【0060】

ある態様において、対象に投与される抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、クロスリンクされるか、またはそうでなければ凝集している。先に示したように、いかなる特定の理論にも拘束されたくはないが、本明細書において記述されるクロスリンクした抗ILT5抗体およびILT5結合断片によるILT5受容体の同時会合によってILT5発現APCにおける阻害性カスケードが開始され、それによりこれらが寛容原性になると仮定される。

#### 【0061】

##### 処置全般

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、対象に直接投与される。投与経路は「薬学的組成物」と題する章においてより詳細に記述される。抗ILT5抗体またはILT5結合断片の治療的活性量を、所望の結果を達成するために有効な量、必要な用量および期間で投与することができる。たとえば、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片の治療的活性量は、対象の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに抗ILT5抗体またはILT5結合断片が対象において所望の応答を誘発する能力などの要因に応じて変化しうる。最適な治療応答を提供するよう用量レジメンを調節することができる。たとえば、いくつかの分割用量を毎日投与することができ、または治療状況の緊急性によって指示されるように用量を比例的に低減させることができる。当業者は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の対象への投与に適した用量および投与レジメンを理解するであろう。たとえば、その全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Physicians' Desk Reference, 63rd edition, Thomson Reuters, November 30, 2008を参照されたい。

#### 【0062】

当業者は、多様な任意の抗ILT5抗体およびILT5結合断片を用いて処置することができる他の疾患および状態を理解しているであろう。

#### 【0063】

##### 薬学的製剤

本明細書において記述される抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、非経口(たとえば、静脈内)、皮内、皮下、経口、鼻、気管支、眼、経皮(表面)、経粘膜、直腸、および腔経路を含むがこれらに限定されない任意の利用可能な経路によって送達するために処方されうる。抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、薬学的に許容される担体と共に送達物質(たとえば、本明細書において記述される陽イオン性ポリマー、ペプチド分子輸送体、界面活性剤等)を含みうる。本明細書において用いられる「薬学的に許容される担体」という用語には、薬学的投与に適合する溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等が含まれる。補助活性化合物も同様に、本明細書において記述される抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片を含む薬学的製剤に組み入れることができる。

#### 【0064】

薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合性であるように処方される。非経口、皮内、または皮下適用のために用いられる液剤または懸濁剤は、以下の成分を含むことができる:注射用水、食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒などの滅菌希釈剤;ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤;アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤;エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤;酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などの



緩衝剤、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張性を調節する物質。塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基によって、pHを調節することができる。非経口調製物を、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または多用量バイアルに封入することができる。

#### 【0065】

注射可能な用途に適した薬学的組成物としては、典型的に滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散剤、および滅菌注射剤または分散剤の即時調製のための滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与の場合、適した担体としては、生理食塩液、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, N.J.）またはリン酸緩衝生理食塩液（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は無菌でありかつ、容易なシリンジ操作性が存在する程度に流動的であるべきである。薬学的製剤は理想的には、製造および保存条件下で安定であり、細菌および真菌などの微生物の混入作用に対して保存されるべきである。一般的に、妥当な担体は、たとえば水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、およびその適した混合物を含有する溶媒または分散媒体でありうる。適切な流動性は、たとえばレシチンなどのコーティングを用いることにより、分散剤の場合には必要な粒子径を維持することにより、および界面活性剤を用いることにより、維持することができる。微生物の作用の保護は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、たとえばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成することができる。多くの場合において、等張剤、たとえば糖、マンニトールなどの多価アルコール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物に含めることが有利であろう。注射可能組成物の持続的吸収は、吸収を遅らせる物質、たとえばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含めることによってもた

10

20

#### 【0066】

滅菌注射剤は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片を、必要に応じて、先に列挙した成分の1つまたは組み合わせと共に、適切な溶媒中に必要量を組み入れた後、濾過滅菌することによって調製することができる。一般的に、分散剤は、基本的な分散培地と先に列挙したもののうち必要な他の成分とを含有する滅菌媒体に、精製した抗ILT5抗体またはILT5抗体断片を組み入れることによって調製される。滅菌注射剤を調製するための滅菌粉末の場合、例示的な調製法は真空乾燥および凍結乾燥であり、予め滅菌濾過した溶液から、有効成分

30

#### 【0067】

経口組成物は一般的に、不活性希釈剤または食用担体を含む。経口治療的投与の目的に関して、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を、賦形剤と共に組み入れて、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤、たとえばゼラチンカプセル剤の剤形で用いることができる。経口組成物はまた、マウスウォッシュとして用いるために液体担体を用いて調製することができる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤等は、以下の成分または類似の性質を有する化合物をいずれも含有することができる：結晶セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンなどの結合剤；デンプンまたはラクトースなどの賦形剤；アルギン酸、Primogel、またはコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはSterotesなどの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などのグライダント；蔗糖またはサッカリンなどの甘味料；またはペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ香料などの着香料。経口送達のための製剤は、消化管内での安定性を改善するおよび/または吸収を増強する物質を組み入れると有利でありうる。

40

#### 【0068】

吸入投与の場合、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片および送達物質は、好ましくは適した噴射剤、たとえば二酸化炭素などの気体を含有する加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからのエアロゾル化スプレーの剤形で送達される。本開示は特に、点鼻スプレー、インヘラー、または上気道および/または下気道への他の直接送達を用い

50

る組成物の送達を企図する。インフルエンザウイルスに対するDNAワクチンの鼻腔内投与は、CD8 T細胞応答を誘導することが示されており、この経路によって送達した場合に、気管（inspiratory tract）における少なくともいくつかの細胞がDNAを取り込むことができることを示しており、本発明の送達物質は細胞の取込みを増強するであろう。ある態様に従って、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片および送達物質は、エアロゾル投与のために大きい多孔性粒子として処方される。

#### 【0069】

全身投与はまた、経粘膜または経皮手段によっても行うことができる。経粘膜または経皮投与の場合、浸透させる障壁に対して適切な浸透剤を処方用いる。そのような浸透剤は一般的に、当技術分野において公知であり、たとえば経粘膜投与の場合、洗浄剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、点鼻スプレーまたは坐剤を用いることを通して達成することができる。経皮投与の場合、精製ポリペプチドまたはタンパク質および送達物質は、一般的に当技術分野において公知である軟膏、軟膏（salve）、ゲル、またはクリームに処方される。

#### 【0070】

ある態様において、組成物は、インプラントおよび微小封入送達系を含む徐放性製剤などの、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片が体内から急速に消失しないよう保護する担体と共に調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの、生物学的分解性および生物学的適合性のポリマーを用いることができる。そのような製剤を調製する方法は当業者に明らかであろう。材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から購入することによっても得ることができる。リポソーム浮遊液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体によって感染細胞を標的とするリポソームを含む）も同様に、薬学的に許容される担体として用いることができる。これらは、たとえばその全内容が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,522,811号に記述されるように、当業者に公知の方法に従って調製することができる。

#### 【0071】

投与の容易さおよび用量の均一性のために、単位投与剤形で経口または非経口組成物を処方することが有利である。本明細書において用いられるように「単位投与剤形」とは、処置される対象に関して単位用量として適した物理的に個別の単位を指し；各単位は、必要な薬学的担体に関連して所望の治療効果を生じるように計算された活性な抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片の規定量を含む。

#### 【0072】

抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を、様々な間隔で必要な異なる期間のあいだ、たとえば約1～10週間、2～8週間、約3～7週間、約4、5、または6週間等のあいだ週1回投与することができる。当業者は、疾患または障害の重症度、これまでの処置、対象の全身健康および/または年齢、ならびに存在する他の疾患を含むがこれらに限定されないある要因が、対象を有効に処置するために必要な用量およびタイミングに影響を及ぼすことができることを認識するであろう。一般的に、本明細書において記述される抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片による対象の処置は、1回の処置を含むことができ、または多くの場合、一連の処置を含むことができる。さらに、適切な用量は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の効力に依存しうること、および、任意で、たとえば予め選択した所望の応答が達成されるまでの漸増量の投与を通して、特定のレシピエントに適合されうることが理解される。任意の特定の動物対象に関する特異的用量レベルは、使用される特異的ポリペプチドまたはタンパク質の活性、対象の年齢、体重、全身健康、性別、および食事、投与時間、投与経路、排泄速度、任意の薬物併用、および調整される発現または活性の程度を含む多様な要因に依存しうると理解される。

#### 【0073】

本明細書において記述される薬学的組成物は、投与のための説明書と共に容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

## 【0074】

検出および診断アッセイ

ILT5との結合能を考慮すると、抗ILT5抗体およびILT5結合抗体断片は、酵素免疫測定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、細胞ソーティングアッセイ（たとえば、蛍光活性化細胞ソーティング、またはFACS）、FCM、または組織免疫組織化学アッセイが含まれるがこれらに限定されるわけではない任意の多様なイムノアッセイを用いて、（たとえば、血清または血漿などの生物学的試料中で）ILT5を検出するために用いることができる。ある態様において、生物学的試料中でILT5（たとえば、ヒトILT5）を検出する方法が提供され、そのような方法のいくつかは、生物学的試料（たとえば、血液などの細胞または組織）に抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片を接触させる段階、およびILT5に結合した抗ILT5抗体もしくはILT5結合断片、または非結合抗体もしくは断片のいずれかを検出して、それによって生物学的試料中のILT5を検出する段階を含む。抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、結合したまたは結合していない抗ILT5抗体またはILT5結合断片の検出を容易にするために検出可能な標識によって直接または間接的に標識されうる。適した検出可能な標識としては、様々な酵素、補欠分子標識、蛍光標識、発光標識、および放射性標識が挙げられる。適した酵素の非制限的な例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。適した補欠分子標識の非制限的な例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる。適した蛍光標識の非制限的な例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリスリンが挙げられる。発光標識の非制限的な例としては、ルミナルが挙げられる。適した放射性標識の非制限的な例としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、および $^3\text{H}$ が挙げられる。

10

20

## 【0075】

ある態様において、ILT5は、検出可能な基質によって標識したILT5標準物質と、非標識抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片とを利用する競合的イムノアッセイによって、生物学的試料中でアッセイすることができる。そのようなアッセイにおいて、生物学的試料、標識ILT5標準物質、および抗ILT5抗体またはILT5結合断片を混合して、抗ILT5非標識抗体またはILT5結合断片に結合した標識ILT5標準物質の量を決定する。生物学的試料中のILT5の量は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片に結合した標識ILT5標準物質の量に反比例する。

30

## 【0076】

抗体または断片を利用する他の検出アッセイが、当業者に公知であろう。本明細書において記述される抗体または断片はいずれも、そのようなアッセイに従って用いられうる。

## 【0077】

細胞

後述の実施例において記述されるように、ヒトPBMCと抗ILT5抗体との培養によって、培養物における明確なCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞集団の産生がもたらされた。これらの知見に基づいて、本開示は、この章において以下に記述される単離されたまたは培養された細胞を提供する。

## 【0078】

ある態様において、本開示の細胞は、CD25およびNKG2Dを発現するヒトCD4<sup>+</sup> T細胞（CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> T細胞）である。ある態様において、本開示の細胞は、CD25を発現し、かつまた定常状態ナチュラルキラー細胞において観察されるNKG2Dのレベルより高いレベルでNKG2Dも発現するヒトCD8<sup>+</sup> T細胞（CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>NKG2D<sup>hi</sup> T細胞）である。ある態様において、そのようなヒトT細胞は、T細胞によるMHC分子の認識を必要としない様式で、たとえばTCR非依存的な（たとえば該増殖はTCRによるMHC分子の認識を必要としない）様式で増殖する。ある態様において、そのようなヒトT細胞は、Fasリガンド（FasL）を、ナイーブT細胞より高いレベルで分泌する。ある態様において、そのようなT細胞は、ナイーブT細胞において観察されるレベルより高いレベルでTCR：CD3複合体を発現する。ある態様において、そのようなヒトT細胞は、ナイーブT細胞において観察されるより高いレベルでMHCクラスI

40

50

I (DR) を発現する。

【 0 0 7 9 】

ある態様において、 $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、NKG2Dが典型的に細胞表面から内在化される条件下で、その細胞表面上でNKG2Dを維持する。そのような条件の非制限的な例としては、NKG2Dと細胞表面上に発現されたNKG2Dリガンドとの会合、NKG2Dと分泌されたNKG2Dリガンドとの会合、およびNKG2DとNKG2Dに結合する抗体または断片との会合が挙げられる。

【 0 0 8 0 】

ある態様において、 $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片に以前に接触したことがある抗原提示細胞 (APC) をナイーブT細胞に接触させる段階を含む方法によって産生される。ある態様において、 $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、抗ILT5抗体または該抗体のILT5結合断片に以前に接触したことがある抗原提示細胞 (APC) をTCR刺激の非存在下でメモリーT細胞に接触させる段階を含む方法によって、産生される。

【 0 0 8 1 】

ある態様において、そのような $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞またはその子孫は、本明細書において記述される細胞傷害能を与えられる。ある態様において、 $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、抗原に結合するかまたは抗原を認識すると、細胞傷害性となるように誘導される。任意の多様な抗原に結合するまたは認識することによって、細胞傷害能を有する状態から細胞傷害性への移行が起こるであろう。たとえば、 $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、精製または単離された抗原に結合するまたは認識すると細胞傷害性となりうる。同様に、細胞傷害能を示す $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、たとえば細胞溶解物に由来する抗原、または血液もしくは血清試料中に存在する抗原などの非精製または非単離抗原に結合するまたは認識すると、細胞傷害性となりうる。ある態様において、細胞傷害能を有する $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、癌様細胞、または細菌、ウイルス、真菌、原虫、もしくは寄生虫に感染した細胞に結合するまたは認識すると、細胞傷害性となるように誘導される。ある態様において、細胞傷害能を有する $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、癌様細胞、または細菌、ウイルス、真菌、原虫、もしくは寄生虫に感染した細胞表面に存在する抗原に結合するまたは認識すると細胞傷害性となるように誘導される。

【 0 0 8 2 】

ある態様において、 $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞を含む細胞培養物において、サイトカインであるTNF- (腫瘍壊死因子) およびIL5ならびに / またはケモカインであるRantes、IP-10 (インターフェロン誘導タンパク質10)、またはMIP-1 (マクロファージ炎症性タンパク質1) が産生される。ある態様において、そのような細胞培養物に存在する $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、Rantes、IP-10、TNF-、IL5、またはMIP-1そのものの1つまたは複数を産生する。ある態様において、細胞培養物における $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、該培養物中のもう1つのタイプの細胞がRantes、IP-10、TNF-、IL5、またはMIP-1の1つまたは複数を産生するように誘導する。たとえば、 $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、単球、マクロファージ、 $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞以外のT細胞、B細胞、肥満細胞、内皮細胞、および / または線維芽細胞の1つまたは複数、Rantes、IP-10、TNF-、IL5、またはMIP-1の1つまたは複数を産生するように誘導することができる。したがって、これらの細胞タイプ (単球、マクロファージ、 $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  もしくは  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞以外のT細胞、またはB細胞) によるこれらの可溶性メディエータ (サイトカインおよびケモカイン) の産生を誘導するために $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  細胞を用いる方法が提供される。

【 0 0 8 3 】

この章において記述される $CD4^+CD25^+NKG2D^+$  または  $CD8^+CD25^+NKG2D^{hi}$  T細胞は、上記の

「疾患および感染症の処置」と題する章に記述される任意の応用を含む、多様な任意の応用において用いられうる。

【0084】

抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片

本明細書において、多様な抗ILT5抗体およびそのILT5結合抗体断片が開示される。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合抗体断片は、本明細書において記述される1つまたは複数の応用（たとえば、T細胞において免疫刺激応答を誘導して、それによってT細胞を増殖させるか、または細胞傷害機能を示させる）のために用いることができる。ある態様において、そのようなT細胞は、サイトカインを産生して、および/またはサイトカインおよび/またはケモカインを産生するよう他の細胞を誘導する。ある態様において、そのようなT細胞は、様々な疾患または感染症の処置において用いられうる。ある態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、それがヒト重鎖および/または軽鎖定常領域を含有するという点においてキメラである。たとえば、その各々の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号; Shoemaker et al., 米国特許第4,978,775号; Beavers et al., 米国特許第4,975,369号; およびBoss et al., 米国特許第4,816,397号を参照されたい。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、それが重鎖および/または軽鎖の非ヒト（たとえば、マウス、ラット、またはハムスター）相補性決定領域（CDR）と共に可変領域において1つまたは複数のヒトフレームワーク領域を含有するという点においてヒト化されている。ヒト化抗体は、当業者に周知である組み換え型DNA技術を用いて産生することができる。たとえば、その各々の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Hwang, W. Y. K., et al., Methods 36:35, 2005; Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033, 1989; Jones et al., Nature, 321: 522-25, 1986; Riechmann et al., Nature, 332:323-27, 1988; Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-36, 1988; Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:3833-37, 1989; 米国特許第5,225,539号; 第5,530,101号; 第5,585,089号; 第5,693,761号; 第5,693,762号; 第6,180,370号; およびSelig et al., WO 90/07861を参照されたい。

【0085】

ある態様において、断片（たとえば、抗原結合断片）は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの全抗体分子に由来する。抗体を、たとえばそのヒンジ領域のカルボキシ末端側で（たとえば、ペプシンによって）切断して、F(ab')<sub>2</sub>断片を生成することができ、またはそのヒンジ領域のアミノ末端側で（たとえば、パパインによって）切断してFab断片を生成することができる。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、ヒトILT5に結合する。

【0086】

ある態様において、抗ILT5抗体断片は、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、scFv断片、ダイアボディ、直鎖状抗体、二重特異性、三重特異性、または多重特異性抗体（たとえばダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ）などの多重特異性抗体断片、ミニボディ、キレート化組み換え型抗体、トリボディまたはバイボディ、イントラボディ、ナノボディ、低分子モジュール性免疫薬剤（SMIP）、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質、ラクダ化抗体またはV<sub>HH</sub>含有抗体である。当業者は、不適当な実験を行うことなく、そのような抗体または断片を操作または構築する方法を理解しているであろう。

【0087】

ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合抗体断片は、  
SEQ ID NO: 1

[DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQKGKSPQVLVYAATNLADGV  
PSRFSGSGSGTQFSLKINSLSQSEDFGNFYFCQHFWRIPWTFGGGTKLEIK]

のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、

SEQ ID NO: 2

[DVQLQESGPGLVKPSQSLFLTCSVTGYSSSSYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISFDGSNN  
YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAREKENYYGSSFYFFDYWGLGT  
SLTVSS]

のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、

SEQ ID NO: 3

[EVQLQESGPGLVKPSQSLFLTCSVTGYSSSSYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISFDGSNN  
YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAREKENYYGSSFYFFDYWGLGT  
SLTVSS]

のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0088】

ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを含む。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域とを含む。

【0089】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片、たとえばヒト化またはキメラ抗体または断片は、以下のCDRの1つまたは複数を含む。

SEQ ID NO: 4 [SSYYWN] (VH CDR1), SEQ ID NO: 5

[YISFDGSNNYNPSLKN] (VH CDR2), SEQ ID NO: 6 [EKENYYGSSFYFFDY] (VH CDR3),  
SEQ ID NO: 7 [RASENIYSNLA] (VL CDR1), SEQ ID NO: 8 [AATNLAD] (VL CDR2), および  
SEQ ID NO: 9 [QHFWRIPT] (VL CDR3)

【0090】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片、たとえばヒト化またはキメラ抗体または断片は、以下を含む重鎖可変領域 (VH) を含む: SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を含むVH CDR1、SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を含むVH CDR2、およびSEQ ID NO:6のアミノ酸配列を含むVH CDR3。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合抗体断片、たとえばヒト化またはキメラ抗体または断片は、以下を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む: SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を含むVL CDR1、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むVL CDR2、およびSEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含むVL CDR3。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片、たとえばヒト化またはキメラ抗体または断片は、以下を含む重鎖可変領域を含む: SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を含むVH CDR1、SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を含むVH CDR2、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列を含むVH CDR3、SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を含むVL CDR1、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むVL CDR2、およびSEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含むVL CDR3。

【0091】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、以下を含む重鎖可変領域を含む: SEQ ID NO:4のアミノ酸配列からなるVH CDR1、SEQ ID NO:5のアミノ酸配列からなるVH CDR2、およびSEQ ID NO:6のアミノ酸配列からなるVH CDR3。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、以下を含む軽鎖可変領域を含む: SEQ ID NO:7のアミノ酸配列からなるVL CDR1、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列からなるVL CDR2、およびSEQ ID NO:9のアミノ酸配列からなるVL CDR3。

【0092】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、以下を含む重鎖可変領域を含む: SEQ ID NO:4のアミノ酸配列を含むVH CDR1、SEQ ID NO:5のアミノ酸配列を含むVH

10

20

30

40

50

CDR2、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列を含むVH CDR3、SEQ ID NO:7のアミノ酸配列からなるVL CDR1、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列からなるVL CDR2、およびSEQ ID NO:9のアミノ酸配列からなるVL CDR3。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、以下を含む重鎖可変領域を含む：SEQ ID NO:4のアミノ酸配列からなるVH CDR1、SEQ ID NO:5のアミノ酸配列からなるVH CDR2、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列からなるVH CDR3、SEQ ID NO:7のアミノ酸配列を含むVL CDR1、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列を含むVL CDR2、およびSEQ ID NO:9のアミノ酸配列を含むVL CDR3。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合抗体断片は、以下を含む重鎖可変領域を含む：SEQ ID NO:4のアミノ酸配列からなるVH CDR1、SEQ ID NO:5のアミノ酸配列からなるVH CDR2、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列からなるVH CDR3、SEQ ID NO:7のアミノ酸配列からなるVL CDR1、SEQ ID NO:8のアミノ酸配列からなるVL CDR2、およびSEQ ID NO:9のアミノ酸配列からなるVL CDR3。

10

【 0 0 9 3 】

ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合抗体断片は、それが1つまたは複数のヒトフレームワーク領域、たとえばヒト重鎖フレームワーク領域および/またはヒト軽鎖フレームワーク領域を含むという点においてヒト化されている。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、

SEQ ID NO: 10

[QVQLQESGPGGLVKPPGTLSTCAVSGGSISSSYYWNWVRQPPGKGLEWIGYISFDGSNN  
YNPSLKNRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYCCAREKENYYGSSFYYFDYWGQG  
TLVTVSS], SEQ ID NO: 11

20

[QVQLQESGPGGLVKPSGTLSTCAVSGGSISSSYYWNWVRQPPGKGLEWIGYISFDGSNN  
YNPSLKNRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYCCAREKENYYGSSFYYFDYWGQG  
TLVTVSS], SEQ ID NO: 12

[QVQLQESGPGGLVKPPGTLSTCAVSGGSISSSYYWNWVRQPPGKGLEWIGYISFDGSNN  
YNPSLKNRVTISVDKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKENYYGSSFYYFDYWGQG  
TLVTVSS], SEQ ID NO: 13

[QVQLQESGPGGLVKPSDTLSLTCAVSGYSISSSYYWNWIRQPPGKGLEWIGYISFDGSNN  
YNPSLKNRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKENYYGSSFYYFDYWGQ  
GTLVTVSS], SEQ ID NO: 14

30

[QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYYWNWIRQPPGKGLEWIGYISFDGSNNY  
NPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKENYYGSSFYYFDYWGQGT  
LVTVSS], SEQ ID NO: 15

[QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYYWNWIRQPPGKGLEWIGYISFDGSNNY  
NPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKENYYGSSFYYFDYWGQGT  
LVTVSS], SEQ ID NO: 16

40

[QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSYYWNWIRQPPGKGLEWIGYISFDGSNN  
YNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKENYYGSSFYYFDYWGQG  
TLVTVSS], および SEQ ID NO: 17

[QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAVSGYSISSSYYWNWIRQPPGKGLEWIGYISFDGSNN  
YNPSLKNRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREKENYYGSSFYYFDYWGQG  
TLVTVSS]

50

のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域由来の1つまたは複数のヒトフレームワーク領域を含む（CDR配列をSEQ ID NO:10～17において下線で示し、フレームワーク領域には下線がない。各配列における4つのフレームワーク領域に、配列のN末端から始まる1～4（FW1、FW2、FW3、およびFW4）の番号をつける）。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、SEQ ID NO:10のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域由来の1つまたは複数のヒトフレームワーク領域を含む。

【0094】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、  
SEQ ID NO: 18

10

[AIRMTQSPSSFSASTGDRVITITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYFATYYCQHFWRIPTFGQGTKVEIK], SEQ ID NO: 19

[DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHFWRIPTFGQGTKVEIK], SEQ ID NO: 20

[DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHFWRIPTFGQGTKVEIK], SEQ ID NO: 21

20

[DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHFWRIPTFGQGTKVEIK], SEQ ID NO: 22

[AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHFWRIPTFGQGTKVEIK], SEQ ID NO: 23

[AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHFWRIPTFGQGTKVEIK], および SEQ ID NO: 24

[DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASENIYSNLAWYQQKPEKAPKSLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHFWRIPTFGQGTKVEIK]

30

のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域由来の1つまたは複数のヒトフレームワーク領域を含む（CDR配列をSEQ ID NO:18～24において下線で示し、フレームワーク領域には下線がない。各配列における4つのフレームワーク領域に、配列のN末端から始まる1～4（FW1、FW2、FW3、およびFW4）の番号をつける）。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合抗体断片は、SEQ ID NO:18のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域由来の1つまたは複数のヒトフレームワーク領域を含む。

【0095】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、SEQ ID NO:10～17のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:18～24のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域由来の1つまたは複数のヒトフレームワーク領域を含む。

40

【0096】

ある態様において、CDR相同性に基づく方法（たとえば、Hwang, W. Y. K., et al., Methods 36:35, 2005を参照されたい）がヒト化のために用いられる。この方法は一般的に、構造が類似する非ヒトフレームワークおよびヒトフレームワークよりむしろ構造が類似する非ヒトCDRおよびヒトCDRに基づく、非ヒトCDRのヒトフレームワークへの置換を伴う。非ヒトCDRおよびヒトCDRの類似性は一般に、同じ鎖タイプ（軽鎖または重鎖）のヒト遺伝子がマウス結合分子と同じ組み合わせの限界CDR構造を有しかつしたがってCDRペプチド骨格の三次元コンフォメーションを保持していると同定することによって、決定される。

50



次に、マッチする限界構造を有する候補可変領域遺伝子セグメントの各々に関して、非ヒトCDRと候補ヒトCDRとのあいだの残基ごとの相同性を評価する。最後に、ヒト化結合分子を生成するために、非ヒトCDRと同一ではない選択されたヒト候補CDRのCDR残基を、非ヒト配列に変換する。ある態様において、ヒトフレームワークの変異は、ヒト化結合分子に導入されない。

【0097】

ある態様において、非ヒトCDRのヒトフレームワークへの置換は、CDRが由来する非ヒトフレームワークと同じコンフォメーションを保持するヒトフレームワークを同定することによる、非ヒトフレームワークの正しい空間的方向の保持に基づく。ある態様において、これは、そのフレームワーク配列が、CDRが由来する非ヒトフレームワーク領域と高い程度  
10  
の配列同一性を示すヒト抗体からのヒト可変領域を得ることによって達成される。その各々の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773, 1991; Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971, 1993; and Carter et al., WO 92/22653を参照されたい。

【0098】

ある態様において、抗原に対するヒト化抗体の結合親和性を保存するように、1つまたは複数のヒトフレームワーク残基を当初の非ヒト（たとえば、マウス）抗体において対応する位置の残基に変更または置換することができる。そのような変化は時に、「戻し変異」と呼ばれる。ヒトフレームワーク残基由来のあるアミノ酸を、CDRコンフォメーション  
20  
および/または抗原に対する結合に影響を及ぼすことができるか否かに基づいて、戻し変異のために選択する。たとえば、CDRの適切な空間的配置を確保するために、1つまたは複数のCDRに隣接する残基を戻し変異させることができる。非ヒト（たとえば、マウス）CDR領域をヒトフレームワーク領域内に配置することは、特定のアミノ酸残基の置換によって修正しない限り結合親和性の喪失に至る、コンフォメーションの制限をもたらす。したがって、ある態様において、ILT5に対する適切な親和性を確保するために、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の妥当なコンフォメーションに影響を及ぼす残基において戻し変異を生じることができる。

【0099】

ある態様において、戻し変異のためのアミノ酸残基の選択は、部分的に、当技術分野において認識された技術を用いるコンピューターモデリングによって、決定することができる。  
30  
一般的に、免疫グロブリン鎖またはそのドメインに関して解明された構造から始まる分子モデルが産生される。モデルとする鎖を、解決された三次元構造の鎖またはドメインとのアミノ酸配列類似性に関して比較して、最大の配列類似性を示す鎖またはドメインを、分子モデルを構築するための開始点として選択する。少なくとも50%の配列同一性を共有する鎖またはドメインをモデリングのために選択して、好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%またはそれより多くの配列同一性を共有する鎖またはドメインをモデリングのために選択する。解決された開始構造を、モデルとされる免疫グロブリン鎖またはドメインにおける実際のアミノ酸と開始構造におけるアミノ酸とのあいだの差を許容するように修飾する。次に、修飾構造を、複合免疫グロブリンへと組み立てる。最後に、エネルギー最小化によって、ならびに全ての原子が互いに適切な距離内にあり、結合の長さおよ  
40  
び角度が化学的に許容される限界内であることを確認することによって、モデルを精密にする。

【0100】

置換のためのアミノ酸残基の選択はまた、部分的に、特定の位置でのアミノ酸の特徴を調べることによって、または特定のアミノ酸の置換もしくは変異誘発の効果を経験的に観察することによって、決定することができる。たとえば、非ヒト（たとえば、マウス）フレームワーク残基と選択されたヒトフレームワーク残基のあいだでアミノ酸が異なる場合、非ヒト結合分子由来の同等のフレームワークアミノ酸が（1）抗原に非共有的に直接結合するか、（2）CDR領域に隣接するか、（3）そうでなければCDR領域と相互作用する（たとえば、コンピューターモデリングによって決定されるようにCDR領域の約3~6オングス  
50

トローム以内に存在する)か、または(4)VL-VH境界領域に関与すると妥当に予想される場合に、該アミノ酸によって、ヒトフレームワークアミノ酸を置換してもよい。

【0101】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、ヒト重鎖定常領域を含む。たとえば、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、IgG1( 1)重鎖定常領域、IgG2( 2)重鎖定常領域、IgG3( 3)重鎖定常領域、またはIgG4( 4)重鎖定常領域などのIgG( )重鎖定常領域を含みうる。その上、それらは、IgA( )重鎖定常領域、IgE( )重鎖定常領域、IgM(  $\mu$ )重鎖定常領域、またはIgD( )重鎖定常領域を含むことができる。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、

SEQ ID NO: 25

10

[ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK]

のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含む。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、

SEQ ID NO: 26

20

[ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK]

30

のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含む。SEQ ID NO:26は、アスパラギンがアラニンに変化しているという点においてSEQ ID NO:25とは異なり(関連するアミノ酸を各配列において下線で示す)、その変化によってSEQ ID NO:26を含む抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片のN-結合型インビボグリコシル化の消失が起こる。関連する残基でのN-結合型グリコシル化が存在しないことにより、関連する抗ILT5抗体またはILT5結合断片のFc領域のFc受容体に対する結合が劇的に減少する。

【0102】

抗ILT5抗体またはILT5結合断片のFc受容体に対する結合の低減が起こる多様な任意の他の修飾を行ってもよい。たとえば、Fcドメインの234および235番目の位置の2つのアミノ酸残基がアラニン残基へと修飾されているヒト化OKT3由来抗体(hOKT3- 1(ala-ala)と呼ぶ)は、その開示の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願公開第2007/0077246号および第2008/0095766号に開示されている。hOKT3- 1(ala-ala)抗体は、そのFcドメインがN-結合型グリコシル化されている残基を含むにもかかわらず、Fc( )受容体に対して低減された結合を示すと記述されている。ある態様において、少なくとも1つのFc( )受容体に対する結合の低減を示す抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、Fcドメインのいくつかまたは全てを欠損するという点において修飾されている。たとえば、Fab断片およびF(ab')<sub>2</sub>断片は、Fcドメインのいくつかまたは全てを欠損する。ある態様において、抗体またはその抗原結合断片は、少なくとも1つのFc( )受容体に対する結合の低減を示すように、いくつかの他の方法で修飾される。たとえば、抗ILT5抗体ま

40

50

たはILT5結合断片は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片が少なくとも1つのFc( )受容体に結合するのを妨害するまたはその結合能を減少させる化学成分の共有的連結によって修飾されうる。もう1つの例として、抗ILT5抗体またはILT5結合断片は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片が少なくとも1つのFc( )受容体に結合するのを妨害するまたはその結合能を減少させる化学成分の非共有的連結によって修飾されうる。少なくとも1つのFc( )受容体に対する結合を妨害または減少させるために、任意の多様な成分を、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片に共有的または非共有的に連結してもよい。当業者は、抗体または断片に連結させることができる適した成分を理解しており、本明細書における教示に従ってそのような成分を用いることができる。

#### 【0103】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の物理的特性またはインビボ特性の変化をもたらす任意の多様な修飾を、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片に対して行ってもよい。たとえば、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の安定性(たとえば、インビボにおける)に影響を及ぼす多様な任意の修飾を行ってもよい。追加的および/または代替的に、インビボで抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片の半減期に影響を及ぼす任意の多様な修飾を行ってもよい。当技術分野において公知であるように、FcRnは、IgGタイプの抗体を分解から防御して、それによって血清中でのこのクラスの抗体のより長い半減期をもたらす(その全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Roopenian and Akilesh, Nature Reviews Immunology 7, 715-725, 2007を参照されたい)。したがって、ある態様において、IgGタイプの抗ILT5抗体またはその断片は、そのFc領域におけるアミノ酸残基を、異なる様式でFcRnに結合するように変化させることによって修飾される。FcRnに対する結合の改善をもたらす変化によって、インビボでより長い半減期を有する抗ILT5抗体またはILT5結合断片が得られるであろう。FcRnに対する結合の減少をもたらす変化によって、インビボでより短い半減期を有する抗ILT5抗体またはILT5結合断片が得られるであろう。当業者は、PEG化および/またはアミノ酸置換などの実施可能な適切な変更を理解しており、不適当な実験を行うことなく、本明細書において開示される抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片においてそのような対応する変化を作製することができる。

#### 【0104】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、ヒト軽鎖定常領域を含む。たとえば、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、ヒト またはヒト 軽鎖定常領域を含みうる。ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、

SEQ ID NO: 27

[RTVAAPSVFIFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC]

のアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

#### 【0105】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、

SEQ ID NO: 28

[DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWEYQQKQGGKSPQVLVYAATNLADGVPSRFGSGSGTQFSLKINSLSQSEDFGNVFCQHFWRIPWTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC]

のアミノ酸配列を含むまたはそれらからなる軽鎖を含む。

#### 【0106】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、

SEQ ID NO: 29

[DVQLQESGPGLVKPSQSLFLTC SVTGYSISSSYW N WIRQFPGNKLEWMGYISFDGSNN  
YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAREKENYYGSSFYFDYWGAGT  
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK] または SEQ ID NO: 30:

10

[EVQLQESGPGLVKPSQSLFLTC SVTGYSISSSYW N WIRQFPGNKLEWMGYISFDGSNN  
YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAREKENYYGSSFYFDYWGAGT  
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK]

20

の アミノ酸配列を含むまたはそれらからなる重鎖を含む。ある態様において、抗 ILT5 抗体  
または ILT5 結合抗体断片は、  
SEQ ID NO: 31

[DVQLQESGPGLVKPSQSLFLTC SVTGYSISSSYW N WIRQFPGNKLEWMGYISFDGSNN  
YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAREKENYYGSSFYFDYWGAGT  
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK] または SEQ ID NO: 32

30

[EVQLQESGPGLVKPSQSLFLTC SVTGYSISSSYW N WIRQFPGNKLEWMGYISFDGSNN  
YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCAREKENYYGSSFYFDYWGAGT  
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK]

40

の アミノ酸配列を含むまたはそれらからなる重鎖を含む。SEQ ID NO: 29 および 30 は、アス  
パラギンがアラニンに変化している（関連するアミノ酸を各配列において下線で示す）と

50

いう点においてSEQ ID NO:31および32とは異なり、その変化によって、SEQ ID NO:31および32を含む抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片のインビボグリコシル化が減少する。

【0107】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、SEQ ID NO:28のアミノ酸配列を含むまたはそれからなる軽鎖、およびSEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、またはSEQ ID NO:32のアミノ酸配列を含むまたはそれらからなる重鎖を含む。

【0108】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、SEQ ID NO:1~32の1つまたは複数と少なくとも75%同一、たとえばSEQ ID NO:1~32の1つまたは複数と少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、少なくとも95%同一、少なくとも96%同一、少なくとも97%同一、少なくとも98%同一、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む。ある態様において、抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片は、SEQ ID NO:1~32の1つまたは複数の少なくとも5連続アミノ酸残基、たとえば少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、またはそれより多くの連続アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を含む。

10

【0109】

ある態様において、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、SEQ ID NO:1~32の1つまたは複数のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較して、1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、または挿入を有するポリペプチドを含む。たとえば、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれより多くのアミノ酸置換、欠失、または挿入を有する。置換、欠失、または挿入は、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片のポリペプチドをコードする核酸分子の部位特異的変異誘発またはPCRによる変異誘発などの標準的な技術によって導入される。ある態様において、保存的アミノ酸置換が1つまたは複数の位置で行われる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に交換される置換である。塩基性側鎖（たとえば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（たとえば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（たとえば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（たとえば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分岐側鎖（たとえば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（たとえば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む、類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当技術分野において定義されている。したがって、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片のポリペプチドにおける1つのアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからのもう1つのアミノ酸残基に交換してもよい。ある態様において、一連のアミノ酸を、側鎖ファミリーメンバーの順序および/または組成が異なる構造的に類似の一連のアミノ酸に交換することができる。当業者は、SEQ ID NO:1~32の1つまたは複数のアミノ酸配列を有するポリペプチドと比較して1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、または挿入を有するポリペプチドを含む抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片がILT5に結合するか否かを、ELISA、ウェスタンブロット、ファージディスプレイ等を含むがこれらに限定されるわけではない当技術分野において認められたルーチンの方法を利用することによって、評価することができる。

20

30

40

【0110】

抗ILT5抗体およびそのILT5結合断片は、当業者に公知の任意の多様な方法によって產生することができる。ある態様において、抗ILT5抗体およびILT5結合抗体断片は、組み換えによって產生することができる。たとえば、SEQ ID NO:1~32の1つまたは複数にコードする核酸配列またはその一部を、細菌細胞（たとえば、大腸菌、枯草菌（*B. subtilis*））、または真核細胞（たとえば、出芽酵母（*S. cerevisiae*）などの酵母、またはCHO細胞株、様々なCos細胞株、HeLa細胞、様々な骨髓腫細胞株、または形質転換B細胞もしくはハイ

50

ブリドーマなどの哺乳動物細胞)、またはインビトロ翻訳系に導入してもよく、翻訳されたポリペプチドを単離してもよい。当業者は、抗体軽鎖タンパク質および重鎖タンパク質が、成熟抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片の産生時には除去されるリーダー配列を用いて、細胞内で産生されることを認識するであろう。

#### 【0111】

抗ILT5抗体およびILT5結合抗体断片を、宿主細胞における免疫グロブリン軽鎖および重鎖遺伝子の組み換え型発現によって調製することができる。たとえば、軽鎖および重鎖が宿主細胞において発現されるように、かつ好ましくは、宿主細胞が培養されている培地中に分泌され、その培地から抗ILT5抗体またはILT5結合断片を回収することができるように、抗ILT5抗体またはILT5結合断片の軽鎖および重鎖をコードするDNA断片を有する1つまたは複数の組み換え型発現ベクターを宿主細胞にトランスフェクトする。標準的な組み換えDNA方法論(たとえば、その各々の全内容が参照により本明細書に組み入れられる、Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel, F. M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1989; および米国特許第4,816,397号において記述される方法論などの方法論)を用いて、抗体重鎖および軽鎖遺伝子を得て、これらの遺伝子を組み換え型発現ベクターに組み入れて、ベクターを宿主細胞に導入する。

#### 【0112】

当技術分野において理解されるように、発現ベクターは、複製を仲介する配列を含み、しばしば1つまたは複数の選択マーカーを含む。発現ベクターは、標準的な技術によって宿主細胞にトランスフェクトされる。非制限的な例としては、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクション等が挙げられる。

#### 【0113】

抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を発現させるために、部分的または完全長の軽鎖および重鎖(たとえば、ヒトまたはヒト化重鎖および軽鎖)をコードするDNA(たとえば、cDNA)分子を、遺伝子が転写および翻訳制御配列に機能的に連結されるように、発現ベクターに挿入してもよい。この文脈において、「機能的に連結された」という用語は、抗ILT5抗体またはILT5結合断片をコードする核酸配列が、ベクター内の転写および翻訳制御配列が核酸配列の転写および翻訳を調節するというその意図される機能を果たすようにベクターに挿入されることを意味する。ある態様において、発現ベクターおよび発現制御配列は、用いられる発現宿主細胞と適合性であるように選択される。軽鎖および重鎖をコードする核酸配列を、異なるベクターに挿入してもよく、または両方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入してもよい。核酸配列を、標準的な方法(たとえば、結合分子遺伝子断片およびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合には平滑末端ライゲーション)によって発現ベクターに挿入してもよい。軽鎖および/または重鎖コード配列を挿入する前に、発現ベクターは定常領域をコードする核酸配列を既に含んでもよい。たとえば、VHおよびVL配列を完全長の抗体コード配列に変換するための1つのアプローチは、VHセグメントがベクター内のCHセグメントに機能的に連結して、VLセグメントがベクター内のCLセグメントに機能的に連結するように、重鎖定常領域および軽鎖定常領域をそれぞれ既にコードしている発現ベクターにVHおよびVL配列を挿入することである。追加的または代替的に、組み換え型発現ベクターは、宿主細胞からの結合分子鎖の分泌を促進する、重鎖および/または軽鎖にインフレームで融合したシグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド)でありうる。

#### 【0114】

当業者は、不適当な実験を行うことなく、ウェスタンブロット、ELISAアッセイなどの非限定かつ標準的な方法論を用いて、所定のポリペプチド配列を含む抗体または断片がILT5に結合するか否かを判定することができる。

## 【 0 1 1 5 】

本明細書において提供された方法および組成物のある態様を、以下の実施例によってさらに説明する。実施例は、説明目的のために限って提供される。それらは本発明の範囲または程度をいかなるようにも制限すると解釈されない。

## 【実施例】

## 【 0 1 1 6 】

実施例1：抗ILT5抗体の調製

ヒトILT5マウスIg融合構築物を、標準的な分子生物学技術を用いて生成した。可溶性のILT5-Ig融合タンパク質を、一過性にトランスフェクトした293細胞の細胞培養上清からプロテインA/Gセファロースクロマトグラフィーによって精製した。ILT5-Ig融合タンパク質をコードする発現プラスミドDNA (100 µg) を、製造元 (Bio-Rad, Hercules, CA) の説明書に従って、金ビーズ (1 µM) にコーティングした。マウスを、Helios (登録商標) Gene Gunを用いてhILT5-Ig発現プラスミドコーティング金ビーズによって1日おきに10日間免疫した。免疫したマウスからの血清を、精製hILT5-Igタンパク質に対するELISAによって反応性に関して試験した。証明された血清免疫反応性を有するマウスを、融合の3日前に組み換え型hILT5-Ig融合タンパク質 (20 µg/200 µl) によって追加免疫した。ハイブリドーマ上清を、精製hILT5-Igおよび無関係なIg融合タンパク質に対する免疫反応性に関してELISAによってスクリーニングした。hILT5-Igと反応性であるが無関係な融合タンパク質とは反応しない抗体を産生するハイブリドーマを、限界希釈および軟寒天によってクローニングした。8G6 mAb (IgG1、  
、以降「TRX585」と呼ぶ) を、プロテインGセファロースカラムクロマトグラフィーによりハイブリドーマ培養上清から精製して、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液に対して2~8 で終夜透析した。精製TRX585 mAbを使用するまで-80 で保存した。

## 【 0 1 1 7 】

実施例2：ILT5受容体の発現

ILT5の表面発現：健康なヒト血液ドナーからの末梢血単核球 (PBMC) を、SEQ ID NO:2 またはSEQ ID NO:3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含むマウスモノクローナル抗体 (TRX585) によって染色した。重鎖可変領域のシーケンシング分析は、第一のアミノ酸残基がDまたはEであるかに関して決定的ではなかった。2つのアミノ酸は非常に類似しており、かつこの第一の残基はCDRに存在しないことから、第一の位置でDまたはEを有するVHは、同じではないものの非常に類似したILT5結合特性を有する可能性が高い。PBMCをまた、定義された造血細胞系列に対して特異的な抗体によって染色して、フローサイトメトリーによってILT5発現に関して分析した。

## 【 0 1 1 8 】

CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞によるILT5発現：ILT5の表面発現は、CD56<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T細胞の約1%において観察されたが、CD56<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> T細胞では観察されなかった (図1A)。実験の詳細は図1Aおよびその説明に見ることができる。

## 【 0 1 1 9 】

TregによるILT5発現：調節性T細胞 (Treg) によるILT5発現を、TRX585抗体による染色によって調べた。ナイーブFoxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>細胞は、そのFoxp3<sup>+</sup>相対物より約10倍多いILT5を示すことが見いだされた (図1Bを参照されたい)。さらに、非古典的MHCクラスI分子であるCD1dによって制限されるもう1つの免疫調整性T細胞サブセットであるCD4<sup>+</sup>ナチュラルキラーT (NKT) 細胞の5%もまた、ILT5の表面発現を示した (図1C)。実験技法は、図1 (パネルBおよびC) およびその説明に見ることができる。

## 【 0 1 2 0 】

APCによるILT5発現：APC上でのILT5発現を、TRX585抗体による染色によって測定した。定常状態の骨髄樹状細胞 (DC) (CD11c<sup>+</sup>HLA<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>細胞) はILT5発現を示したが、プラスマ細胞様DCは表面ILT5を発現しなかった (図1Dを参照されたい)。対照的に、単球サブセットの大部分は、多様なレベルではあるがILT5を発現することが見いだされた (図1E)。さ

らなる実験の詳細は、図1（パネルD、E）およびその説明に見ることができる。

#### 【0121】

MDSCによるILT5発現：癌患者はしばしば、骨髓由来サプレッサー細胞（MDSC）の増加を示し、この細胞は、末梢血のみならず腫瘍内でのT細胞応答を抑制することができる。MDS Cが、癌およびいくつかの他の病態において寛容の誘導に関与することを示唆する証拠が増えつつある。CD33<sup>hi</sup>CD34<sup>lo</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>細胞として定義される定常状態末梢血MDSC上のILT5発現を、TRX585抗体による染色によって検出した。これらの細胞は、高レベルの表面ILT5を発現することが見いだされた（図1F）。実験技法を図1Fおよびその説明に詳述する。

#### 【0122】

##### 実施例3：TRX585抗ILT5抗体の特徴付けおよび生物活性

TRX585抗体の免疫調節特性：末梢血単核球（PBMC）をマイトマイシンC処置同種異系PBMCによって刺激することは、T細胞応答性に関する確立されたインビトロモデルである。ILT分子は免疫調整性であるように思われることから、マウス抗ヒトILT5 TRX585抗体によるILT5のクロスリンクが混合リンパ球反応（MLR）を調整するか否かを試験した。この目的に関して、可溶性TRX585抗体またはマウスIgG1アイソタイプ対照抗体（mIgG1）の増加用量の存在下または非存在下で行われた一次MLRにおける同種異系PBMCの増殖を比較した。対照mIgG1の多様な濃度に関するMLR応答の強度に変化はなかった（図2を参照されたい）。対照的に、TRX585は、細胞増殖の用量依存的増強を仲介した（図2）。さらなる詳細は図2およびその説明に見ることができる。

#### 【0123】

これらの知見は、TRX585抗体がアッセイの全期間のあいだ培養物中に残っている条件下で確立された。TRX585抗体によって仲介されるT細胞増殖の増加が、培養物中に存在する抗体レベルに依存したか否かを調べるために、ILT発現抗原提示細胞（APC）を可溶性（50 μg/ml）TRX585抗体によって24～48時間前処置して、洗浄し、同種異系MLRにおいて刺激細胞として利用した。単球または末梢血DCを、MLRアッセイにおいて用いる前に可溶性TRX585抗体によって前処置すると、最初の実験で観察された細胞増殖の抗体による増強が再現された（図3）。さらなる詳細は図3およびその説明に見いだすことができる。

#### 【0124】

骨髓/単球系の細胞は活性化および阻害性Fc受容体の両方を発現し、抗体によるその場合は免疫を増強またはダウンレギュレートし、したがって、免疫調節特性を有する抗体の効力を増加または減少させることができる。TRX585抗体の生物学的効果が、Fcクロスリンクによって増強されるか否かを調べるために、一次MLRアッセイを、10 μg/ml F(ab')<sub>2</sub> ヤギ抗マウスIgG抗体の存在下または非存在下で先に記述したように行った。飽和濃度（<10 μg/ml）の、一価（すなわちF(ab')<sub>2</sub> ヤギ抗マウスIgG抗体の非存在下）のTRX585抗体は細胞増殖を誘導したが、二価のTRX585抗体（すなわち、F(ab')<sub>2</sub> ヤギ抗マウスIgG抗体の存在下）は細胞増殖を誘導しなかった（図4を参照されたい）。しかし、F(ab')<sub>2</sub> 断片の濃度より高い濃度でTRX585抗体を加えると、同一の濃度の一価TRX585抗体（すなわち、F(ab')<sub>2</sub> ヤギ抗マウスIgG抗体の非存在下）について観察されたよりかなり低いレベルではあるが、過剰応答を回復した（図4を参照されたい）。実験技法を図4およびその説明に詳述する。

#### 【0125】

上記の知見がより高い価数の抗体にも拡張できるか否かを決定するために、同種異系PBMCを可溶性または固相TRX585抗体のいずれかと共に播種した。可溶性抗体について抗体誘導型増殖が観察されたが、プラスチックに固定したTRX585抗体については観察されなかった（図5およびその説明を参照されたい）。これらの知見に従って、固相抗体によるAPCの前処置は、T細胞応答の増強を示さなかった（データは示していない）。可溶性TRX585をAPCに加えると、表面ILT5の占有および部分的内在化が起こったが、固相TRX585をAPCに加えると、ILT5の完全な内在化を誘導した（データは示していない）。

#### 【0126】



全体的に、これらの知見は、一価および多価TRX585抗体がAPCおよびAPC仲介T細胞応答の調節に対して異なる効果を有することを示している。さらに、上記の知見は、TRX585抗体によるAPC上のILT5抗原のインビボハイパークロスリンクが、後者の試薬の有効性を減少させることを示唆している。Fc受容体を介する結合を低減または消失させるように抗体を修飾することによって、クロスリンクを低減させることができる。

#### 【 0 1 2 7 】

MLRアッセイにおいて増殖する細胞のより厳密な検査により、TRX585抗体が、同種異系のみならず自己由来の状況において大多数のCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞の増殖を誘導することが判明した。これは、細胞が分裂するとCFSE色素が希釈されることから、この蛍光色素の細胞含有量をフローサイトメトリーによって調べることによって決定された（図6Aおよびその説明を参照されたい）。もう1つの実験において、精製T細胞を、同種異系刺激細胞の存在下または非存在下でTRX585またはmIgG1と共に培養した。精製T細胞が増殖しないことが観察され、これは、TRX585抗体が直接T細胞に対して分裂促進性である可能性を否定し、TRX585抗体誘導型T細胞増殖が、非T細胞の存在を必要とすることを証明した（図6Bおよびその説明を参照されたい）。

#### 【 0 1 2 8 】

自己および/または非自己認識の結果として、全てのT細胞が同時増殖できるわけではないことから、これまでの知見は、TRX585抗体誘導型T細胞増殖が、TCR非依存的な（たとえば、該増殖はTCRによるMHC分子の認識を必要としない）様式で達成されたことを示唆した。実際に、汎抗MHC抗体によってTCR:MHC/ペプチド複合体相互作用を遮断しても、TRX585抗体誘導型T細胞増殖を廃止しなかった（図7を参照されたい）。さらなる詳細は図7およびその説明に見ることができる。

#### 【 0 1 2 9 】

変化した表現型を有するT細胞の生成：PBMCを上記のTRX585抗体と共に培養すると、増殖中のCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞は独自の表現型を獲得した。CD25のアップレギュレーションに加えて、T細胞はまた、抗腫瘍および抗ウイルス免疫において重要な役割を果たす主要な固有の活性化免疫受容体であるNKG2Dの発現もアップレギュレートした（図8Aおよび8Bならびにその説明を参照されたい）。

#### 【 0 1 3 0 】

NKG2Dに関するリガンドは、健康な組織および細胞においてほとんど検出されないが、腫瘍細胞ならびにウイルス感染細胞ではしばしば発現される。ヒトおよびマウスにおいて、NKG2Dリガンドの永続的発現の結果としてのNKG2Dの局所のみならず全身（NKG2Dリガンドの散布を通して）のダウンレギュレーションは、腫瘍およびウイルスが免疫の監視を逃れる1つの機構である。本発明者らは、したがって、TRX585抗体およびNKG2DリガンドによるNKG2Dの永続的会合を模倣するシグナルの両方に供したT細胞表面のNKG2D発現を調べた。意外なことに、TRX585抗体に曝露されたT細胞は、定常状態ナチュラルキラー（NK）細胞について観察されたレベルより高いレベルでNKG2Dをアップレギュレートしたのみならず（さらなる詳細に関しては図8Bおよびその説明を参照されたい）、通常はその内在化および引き続く分解を誘発する条件下で、NKG2Dの持続的発現を呈した（たとえば、可溶性MICA抗原（NKG2Dリガンド）または抗NKG2D mAb、クローン1D11および5C6のいずれかによるNKG2D会合を介して）（さらなる詳細に関しては、図9およびその説明を参照されたい）。

#### 【 0 1 3 1 】

NKG2Dリガンドおよびサイトカインなどの微小環境要因によるNKG2D仲介エフェクター機能の厳密な制御は、望ましくない免疫応答の発生を妨害するための追加の安全機構を提供するはずである。

#### 【 0 1 3 2 】

サイトカインおよびケモカインの産生：可溶性TRX585抗体の存在下で行われるMLRアッセイ培養物からの上清は、対照培養と比較してTNF- $\alpha$  およびIL5の増加量を含む（データは示していない）。TRX585抗体を加えても、IL2、IFN- $\gamma$ 、IL17、IL6、およびIL12などの他の主要なサイトカインの過剰産生は起こらなかった。対照的に、TRX585抗体含有培

養物は、増加量のRantes、IP-10、およびMIP-1ケモカインを含有し、これらは炎症部位への白血球の動員において積極的役割を果たし、インビボで強力な抗腫瘍効果を誘発することができる（データは示していない）。TRX585抗体を含有する培養物において、T細胞はまた、免疫系の本質的なエフェクター機能に関与しかつ、たとえば細胞傷害性の強力なメディエータである因子である、可溶性Fasリガンドも過剰産生した。さらなる詳細は図10およびその説明に見ることができる。上記の知見から、TRX585抗体活性化T細胞が細胞傷害活性を与えられたか否かに関する試験を行った。この目的に関して、PBMCをTRX585またはmIgG1抗体の存在下で3.5日間培養した。増殖中のT細胞（エフェクター細胞）を次に細胞ソーティングして、多様な腫瘍細胞（標的細胞）と共に異なるエフェクター：標的（E：T）比で12～18時間培養した。インキュベーション後の腫瘍細胞の生存率を調べると、TRX585抗体含有前培養物からのT細胞は強力な抗腫瘍細胞傷害効果を発揮したが、mIgG1含有前培養物からのT細胞は抗腫瘍細胞傷害効果を発揮しなかったことが示された（図11AおよびBを参照されたい）。ヒト細胞傷害性T細胞の存在は、多数のウイルス感染症およびリウマチ性関節炎において報告されているが、CD4<sup>+</sup> T細胞による溶解活性の獲得はまれな事象である。しかし、TRX585抗体によるPBMCの前活性化は、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞サブセットの両方に対して細胞傷害活性を与えることが見いだされた（実験技法に関して図11Cおよびその説明を参照されたい）。注目すべきは、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞の細胞傷害活性は、腫瘍細胞に対して特異的であるように思われるが、同じ殺細胞アッセイを用いて同じT細胞が自己由来PBMCまたは同種異系PBMCを殺さなかったことから、健康な細胞に対しては特異的ではないように思われた（示していない）。

#### 【 0 1 3 3 】

TRX585抗体誘導型細胞傷害性CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞は、パーフォリンまたはグランザイムAを発現せず（データは示していない）、観察された細胞傷害性について可能性があるメディエータとしてのこれらの分子を除外する。対照的に、汎抗MHCクラスI抗体または中和抗Fasリガンド抗体によってMHCクラスI分子またはFasリガンドをそれぞれ遮断すると、TRX585抗体含有培養物からのT細胞の抗腫瘍細胞傷害効果が顕著に減少した。さらなる詳細は、図12およびその説明に見ることができる。加えて、TRX585抗体含有培養物からのCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞はいずれも、高レベルのグランザイムBを発現することが見いだされた。

#### 【 0 1 3 4 】

全体として、これらのデータは、APCおよびTRX585抗体と共に培養したT細胞が、強力な細胞傷害効果を発揮できること、そのような細胞が、適切な誘発物質の非存在下では細胞傷害機能を発揮しないことを証明している。

#### 【 0 1 3 5 】

TRX585抗体の投与の順序が免疫応答の調整に影響を及ぼすか否かを決定するために、本発明者らは、TRX585抗体およびTCR刺激を同時に与えるか、またはTCR刺激を送達する前にTRX585抗体を加える一連のインビトロ実験を行った。図13は、TRX585抗体を含有するPBMC培養物からのCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup> T細胞が活発に分裂したが、抗CD3およびTRX585抗体によってPBMCを同時処置すると、TRX585誘導型T細胞増殖の阻害が起こったことを示している。対照的に、TRX585抗体含有PBMC培養物において増殖するよう誘導されたT細胞をその後精製して、抗CD3刺激に供すると、そのようなT細胞は、TCR刺激に対して顕著に増加した応答性および細胞表面上のアップレギュレートされたTCR：CD3複合体を示した（さらなる詳細に関しては、図14Aおよび14Bならびにその説明を参照されたい）。

#### 【 0 1 3 6 】

全体としてこれらの結果は、腫瘍特異的寛容を克服するため、免疫応答を増強するため、および/または腫瘍の殺細胞を誘導するためにTRX585抗体を使用できることを示している。そのような効果は、TRX585抗体の後もう1つの治療的物質または抗原を投与することによりもたらされるT細胞による抗腫瘍細胞傷害機能の獲得に起因する可能性がある。

#### 【 0 1 3 7 】

実施例4：免疫刺激アジュバントとしての抗ILT5抗体および断片の使用

抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、関心対象の抗原に対する免疫応答を増強するための免疫刺激物質として用いられる。(たとえば、ワクチン接種目的に関して)関心対象の抗原に対するインビボでの抗体または細胞性免疫応答を刺激するために、抗原および抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を、増強された免疫応答が対象で起こるようにヒト対象に投与する。関心対象の抗原および抗ILT5抗体またはILT5結合断片は、たとえば異なる薬学的組成物において適切に処方される。ある状況において、抗原と同時またはほぼ同時に抗体を投与することが望ましい可能性がある。ある状況において、まず抗体を投与した後に抗原を投与することが望ましい可能性があり、ここで、T細胞に薬力学的効果を与えるため関心対象の抗原を投与する前にプライミング用量の抗体が投与される。たとえば、抗ILT5抗体またはILT5結合断片を関心対象の抗原の投与前1~14日間(たとえば、3日間)投与することができる。関心対象の抗原を投与すると、抗原に対する強い免疫応答が誘導されると予想される。

10

#### 【0138】

#### 実施例5：腫瘍細胞に対する特異的免疫応答を増加させるための抗ILT5抗体および断片の使用

対象における腫瘍特異的寛容を克服するために、および免疫応答をアップモジュレートして腫瘍増殖、転移を阻害するためまたは腫瘍の根絶を誘発するために、抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を、腫瘍細胞を有する対象に投与する。腫瘍は、たとえば白血病、リンパ腫、もしくは血液細胞の他の悪性疾患などの造血系の腫瘍、または黒色腫、胃癌、肺癌、乳癌、および前立腺癌などの固形腫瘍でありうる。ある態様において、そのような抗ILT5抗体またはILT5結合断片は、化学療法剤との併用などの、免疫応答を増強するために用いられるアジュバントとして、対象におけるもう1つの治療的処置との併用治療の一部として用いられる。抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片を投与すると、腫瘍特異的寛容が低減されて、それによって腫瘍増殖または転移の減損が起こり、腫瘍が根絶されるか、または腫瘍の大きさもしくは数が低減するであろうと予想される。抗ILT5抗体の投与後、1つまたは複数の適切な腫瘍抗原(上記を参照されたい)またはワクチンを同様に投与してもよい。

20

#### 【0139】

#### 実施例6：ウイルスに感染した細胞に対する特異的免疫応答を増加させるための抗ILT5抗体および断片の使用

抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片は、ウイルスに感染した細胞に対する免疫応答をアップモジュレートするために、ウイルス感染症を患う対象に投与される。ある態様において、そのような抗ILT5抗体またはILT5結合断片は、免疫応答を増強するために用いられるアジュバントとして、対象におけるもう1つの治療的処置との併用治療の一部として用いられる。抗ILT5抗体またはそのILT5結合断片を投与すると、ウイルスに感染した細胞は消失するか、またはその数が低減すると予想される。抗ILT5抗体の投与後、1つまたは複数の適切なウイルス抗原(上記を参照されたい)またはワクチンを同様に投与してもよい。

30

#### 【0140】

#### 実施例7：寛容を誘導するためにクロスリンクまたは凝集した抗ILT5抗体および断片の使用

クロスリンクした、またはそうでなければ凝集した抗ILT5抗体またはILT5結合抗体断片を、インビボでの関心対象の抗原に対する細胞性免疫応答を阻害するために、対象に投与する。理論に拘束されることを望むわけではないが、そのようにクロスリンクした、しかし一価ではない抗ILT5抗体およびILT5結合断片によるILT5受容体の同時会合は、ILT5発現APCにおいて阻害性カスケードを開始し、阻害性カスケードはAPCの刺激能を減少させるか、またはそれらを免疫寛容原性にする仮定される。ある態様において、クロスリンクしたまたはそうでなければ凝集した抗ILT5抗体またはILT5結合断片は、抗原に対する免疫応答を阻害するために、もう1つの治療物質または抗原の投与と同時に投与されうる。T細胞におけるILTリガンド変換阻害シグナルの除去とDC免疫刺激能の減少とが同時に起こる効果は、互いを相殺して、免疫の減損に至ると認識されるであろう。抗ILT5抗体またはその

40

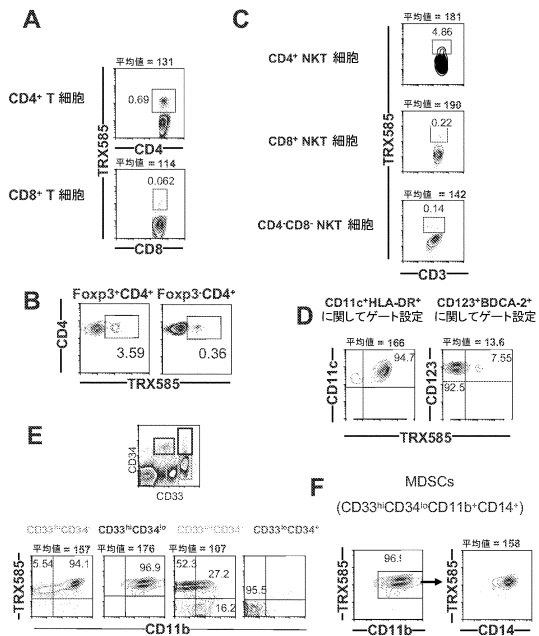
50

ILT5結合断片を投与すると、寛容が誘導されると予想される。

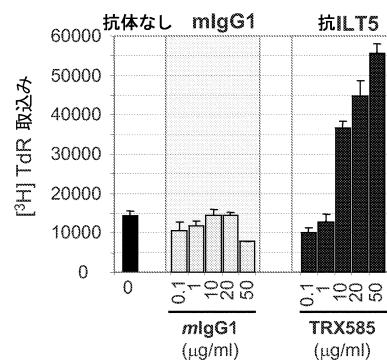
【 0 1 4 1 】

実施例6に記述される技法などの技法は、たとえば自己免疫疾患ならびに同種異系および異種臓器、組織、または細胞移植物の免疫学的拒絶の処置として有用であろう。

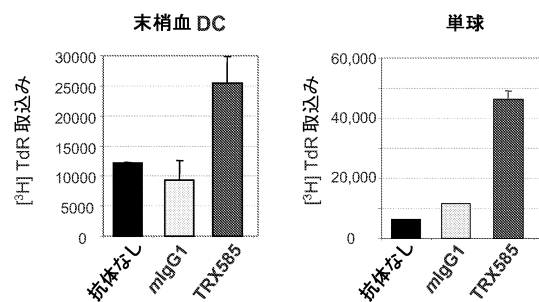
【 図 1 】



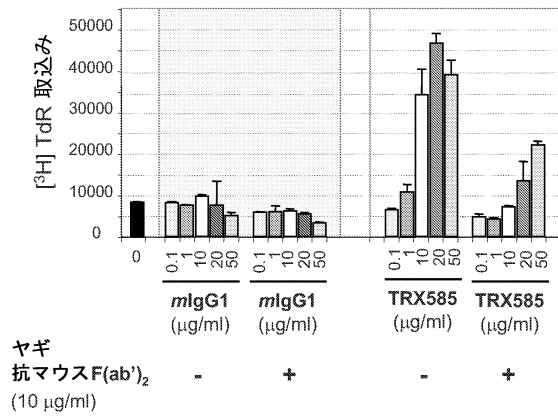
【 図 2 】



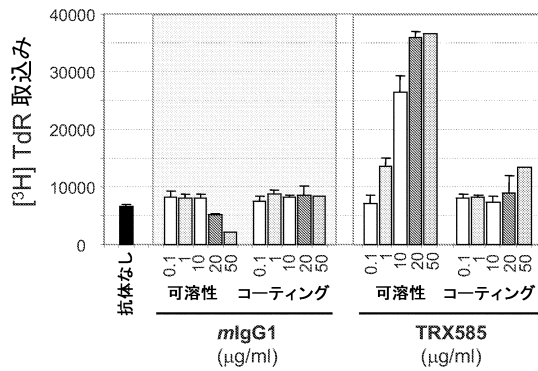
【 図 3 】



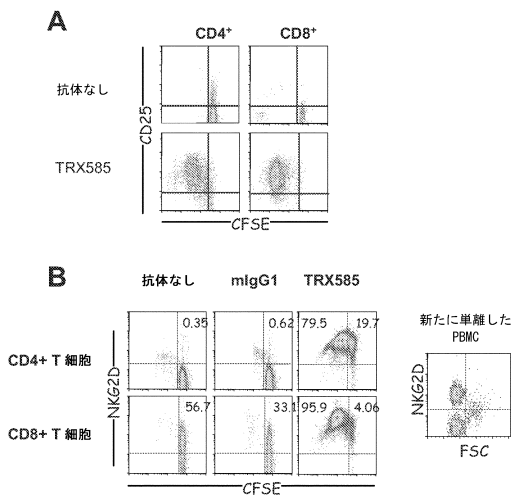
【図 4】



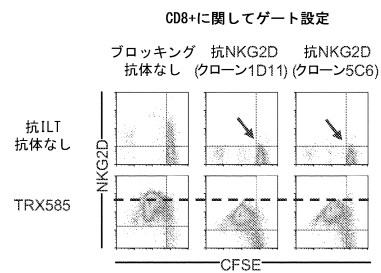
【図 5】



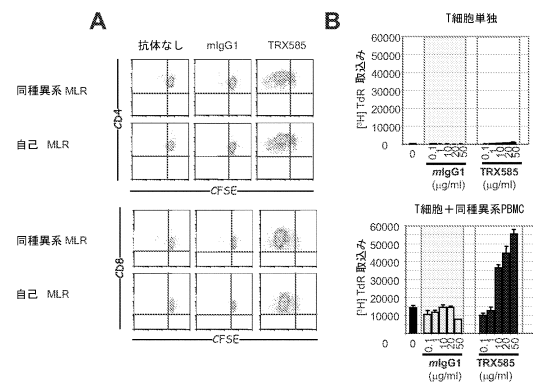
【図 8】



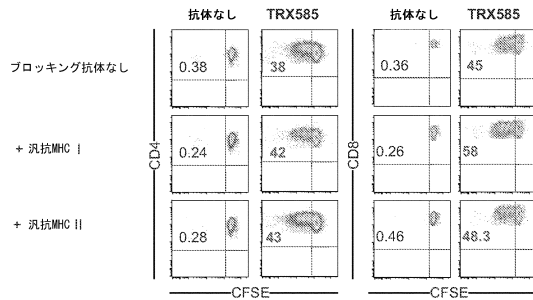
【図 9】



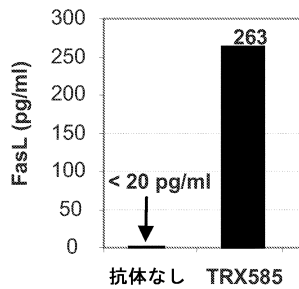
【図 6】



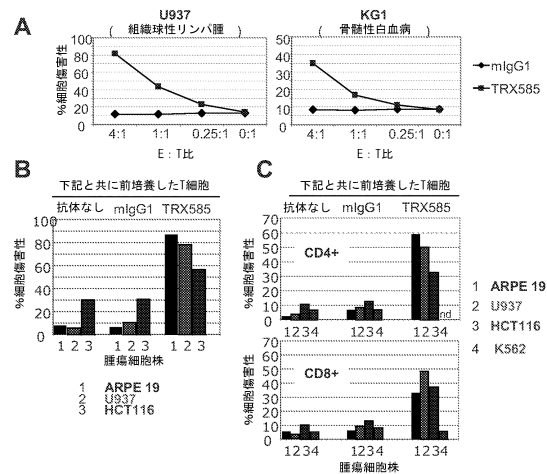
【図 7】



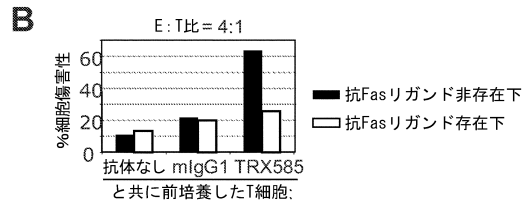
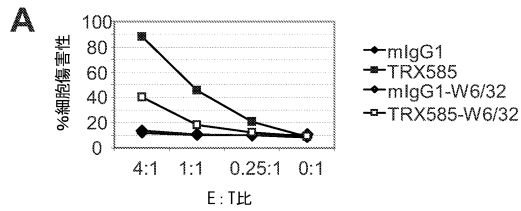
【図 10】



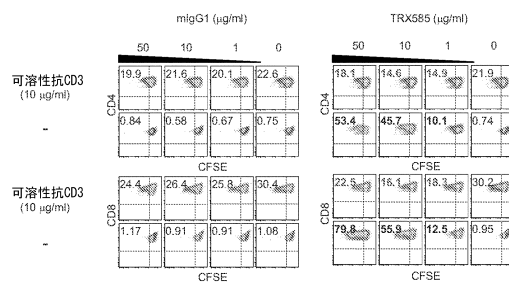
【図 11】



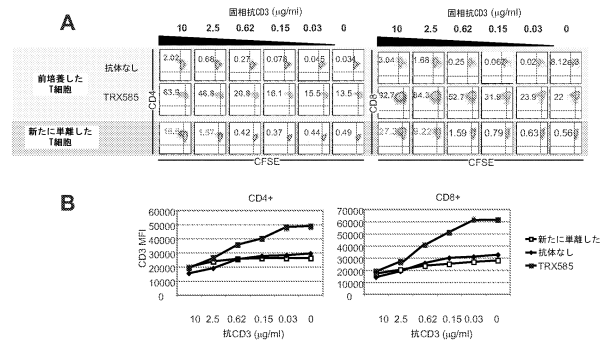
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

0005947727000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P 31/12

(74)代理人 100119253

弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713

弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 230105223

弁護士 城山 康文

(72)発明者 アポーストルー イリーナ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ロスリンデール ファークワー ストリート 85

(72)発明者 ボナス ポール

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ クリッパー ストリート 698

(72)発明者 ボンテ ジョセ エフ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウェーマス コテージ レーン 83

(72)発明者 ローゼンツワイク マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フェーエット ストリート 20 アパートメント 2

(72)発明者 バイックス ルー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ヒングハム フランクリン ロジャース ロード 22

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 特表2005-532256(JP,A)

特表2013-517330(JP,A)

Blood, 2009年, Vol.114, p.2323-2332

Immunology, 2009年, Vol.127, p.8-17

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5