

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 1 1 c + C D 8 + T 細胞の増大を誘発することで癌を治療又は予防するためのヒト化抗 4 - 1 B B 抗体 (H B B K 4) を有効成分として薬学的に許容される担体と共に含む医薬品組成物。

【請求項 2】

癌細胞増殖を相乗的に阻害する効果により癌を治療又は予防するための、H B B K 4 と抗 C T L A - 4 抗体の混合物を有効成分として薬学的に許容される担体と共に含む医薬品組成物。

【請求項 3】

前記組成物がヒト化抗 4 - 1 B B 抗体 (H B B K 4) を組成物の総重量に対して 0. 1 から 5 0 重量%含有する、請求項 1 又は 2 に記載の医薬品組成物。

【請求項 4】

前記ヒト化抗 4 - 1 B B 抗体 (H B B K 4) がSEQ ID NO.59のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の医薬品組成物。

【請求項 5】

前記ヒト化抗 4 - 1 B B 抗体 (H B B K 4) がSEQ ID NO.61のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の医薬品組成物。

【請求項 6】

前記ヒト化抗 4 - 1 B B 抗体 (H B B K 4) がSEQ ID NO.63のヌクレオチド配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の医薬品組成物。

【請求項 7】

前記ヒト化 4 - 1 B B 抗体 (H B B K 4) がSEQ ID NO.60のアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の医薬品組成物。

【請求項 8】

前記ヒト化抗 4 - 1 B B 抗体 (H B B K 4) がSEQ ID NO.62のアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の医薬品組成物。

【請求項 9】

前記ヒト化抗 4 - 1 B B 抗体 (H B B K 4) がSEQ ID NO.64のアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の医薬品組成物。

【請求項 10】

それを必要とするヒトを含む哺乳類における癌の治療及び予防のための治療薬の調製のためのヒト化抗 4 - 1 B B 抗体 (H B B K 4) の使用。

【請求項 11】

それを必要とするヒトを含む哺乳類における癌の治療及び予防のための治療薬の調製のためのヒト化抗 4 - 1 B B 抗体 (H B B K 4) と抗 C T L A - 4 抗体の混合物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌を治療又は予防するためのヒト化抗体 H B B K 4 を含む医薬品組成物及びその使用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

癌細胞は特定のタンパク質についての過剰発現と突然変異の誘発から生じる癌細胞特異性抗原を発現し、これらは患者の自己免疫反応により排除される (Nagorsen D. et al., Clin. Cancer Res. 9, pp4296-4304, 2003; Yee C et al., J. Exp. Med. 192, pp1637-1644, 2000; Castelli C et al., J. Cell Physiol., 182, pp323-331, 2000)。癌細胞に対するこういった免疫反応は樹状細胞等の抗原提示細胞 (A P C) により代表され、通常の免疫反応と同じであり、癌細胞は A P C による適当な T 細胞及び B 細胞の活性化により除去される (Jay A. et al., J. Clin. Invest. 113, pp1515-1525, 2004)。癌細胞は様々

10

20

30

40

50

なメカニズム、例えばMHC分子数の低下、共刺激分子発現の抑制、TGF- β 及びIL-10等の免疫抑制物質の誘発、癌組織へのCD4+CD25+制御性T細胞等の浸透を通して、アネルギー又は耐性を引き起こし、又、抗癌免疫反応から自己を守ろうとする(Smyth MJ et al., Nat. Immunol. 2, pp293-299, 2001; Dunn GP et al., Immunity 21, pp137-148, 2004)。

【0003】

抗癌免疫反応は細胞性免疫に依存している。特にCD8+T細胞(CTL)は癌細胞の除去に重要であり、免疫記憶を保持する(Maeurer MJ et al., Int. Rev. Immunol. 14, pp97-132, 1997)。

【0004】

T細胞の活性化を誘発するには2種類の信号を必要とし(Mondino A et al., J. Leukoc. Biol. 55, pp805-815, 1994)、つまり抗原特異性信号である第一信号がTCRにより運ばれ、第二信号が共刺激分子により運ばれる。Ig(免疫グロブリン)群及びTNFR群は共刺激分子として良く知られている。これらの分子の免疫アゴニスト及びアンタゴニスト的役割は公知であることから、これを利用した多様な治療方法が現在まで試みられている。現在、4-1BB(CD137)、CTLA-4、CD28、LIGHT、PD-1、CD27等がこの中でも強力な抗癌活性を示すことが報告されている(Ye Z et al., Nat. Med. 8, pp343-348, 2002; Phan GQ et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 100, pp8372-8377, 2003; Li Q et al., J. Immunother., 25, pp304-313, 2002; Yu P et al., Nat. Immunol., 5, pp141-149, 2004; Iwai Y et al., Int. Immunol. 17, pp133-144, 2005; Arens R et al., J. Exp. Med., 199, pp1595-1605, 2004)。

【0005】

4-1BBがCTL及びIFN- γ の発現を誘発することが報告されており、アゴニスト性抗4-1BBmAbによる癌の治療が多く研究者によって試みられている(Shuford WW et al., J. Exp. Med., 186, pp47-55, 1997)

【0006】

CTLA-4が免疫反応を制限し、活性化T細胞により発現したCTLA-4信号伝達を阻害することでT細胞の最大活性化により癌細胞の増殖が防止されることが報告されている(Phan GQ et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 100, pp8372-8377, 2003)。

【0007】

本発明の発明者は、抗4-1BB抗体の機能を発見しようと試み、ついにアゴニスト性抗4-1BB抗体とアンタゴニスト性抗CTLA-4抗体を使用しての治療により癌細胞特異性CD8+T細胞が増大することを発見した。これによりCD11c分子を発現するCD8+T細胞の産生が誘発され、その他の共刺激分子とは異なる方法で腫瘍に浸透する。アゴニスト性抗4-1BB抗体の投与による癌細胞増殖の阻害は腫瘍へのCD11c+CD8+T細胞の十分な浸透と高度に発現したIFN- γ により引き起こされる。

【0008】

従って、本発明はヒト化抗4-1BB抗体及び／又はアンタゴニスト性抗CTLA-4抗体の癌に対する治療有効性が、CTL機能とIFN- γ 発現の強化による強力な癌阻害効果へとつながる増大したCD11c+CD8+T細胞によるものであること、更にこの効果がCTLA-4信号伝達の阻害により強化されることを確認することで完成した。

【0009】

本発明のこれら及びその他の目的は以下に記載の本発明の詳細な開示により明らかとなる。

【発明の開示】

【0010】

本発明の一態様において、本発明はCD11c+CD8+T細胞とIFN- γ 発現増大の誘発を通して癌を治療又は予防するためのヒト化抗4-1BB抗体(HBBK4)を有効成分として薬学的に許容される担体と共に含む医薬品組成物を提供する。

【0011】

本発明は哺乳類に有効量の有効成分としてのヒト化抗４－１ＢＢ抗体（ＨＢＢＫ４）を薬学的に許容されるその担体と共に投与することを含む、癌を治療又は予防するための免疫療法を提供する。

【００１２】

本発明は、それを必要とするヒトを含む哺乳類における癌の治療又は予防のための治療薬の調製のためのヒト化抗４－１ＢＢ抗体（ＨＢＢＫ４）の使用も提供する。

【００１３】

従って、本発明の目的はＣＤ１１ｃ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞増大の誘発を通して癌を治療又は予防するためのヒト化抗４－１ＢＢ抗体（以下、ＨＢＢＫ４と称する）を有効成分として薬学的に許容される担体と共に含む医薬品組成物を提供することである。

10

【００１４】

本発明の別の態様により、それを必要とするヒトを含む哺乳類における癌の治療又は予防のための治療薬の調製のためのヒト化抗４－１ＢＢ抗体（ＨＢＢＫ４）の使用も提供する。

【００１５】

本発明のその他の態様により、哺乳類に有効量の有効成分としてのヒト化抗４－１ＢＢ抗体（ＨＢＢＫ４）を薬学的に許容されるその担体と共に投与することを含む、癌を治療又は予防するための免疫療法も提供する。

【００１６】

本発明のその他の態様により、癌細胞増殖を相乗的に阻害することにより癌を治療又は予防するための、ヒト化抗４－１ＢＢ抗体と抗ＣＴＬＡ－４抗体の組合せを有効成分として薬学的に許容される担体と共に含む医薬品組成物も提供する。

20

【００１７】

本発明の別の態様により、それを必要とするヒトを含む哺乳類における癌の治療及び予防のための治療薬の調製のための、ヒト化抗４－１ＢＢ抗体と抗ＣＴＬＡ－４抗体との混合物の使用も提供する。

【００１８】

本発明のその他の態様により、哺乳類に有効量の有効成分としてのヒト化抗４－１ＢＢ抗体と抗ＣＴＬＡ－４抗体の混合物を薬学的に許容されるその担体と共に投与することを含む、癌を治療又は予防するための免疫療法も提供する。

30

【００１９】

本発明の癌を治療又は予防するための医薬品組成物は本発明の上記記載のヒト化抗４－１ＢＢ抗体（ＨＢＢＫ４）を組成物の総重量に対して約０．０１～８０ｗ／ｗ％、好ましくは０．１～５０ｗ／ｗ％含有する。

【００２０】

本願で開示の用語「ヒト化抗４－１ＢＢ抗体（ＨＢＢＫ４）」はヌクレオチド配列SEQ ID NO. 59、SEQ ID NO. 61又はSEQ ID NO. 63を含み、またアミノ酸配列SEQ ID NO. 60、SEQ ID NO. 62又はSEQ ID NO. 64を含む。

【００２１】

本願で開示の用語「癌」には、肺癌、砒素細胞肺癌、結腸癌、骨肉腫、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部癌、皮膚又は眼内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、胃癌、肛門周囲癌、結腸癌、乳癌、子宮内膜症、子宮頸癌、陰癌、外陰癌、ホジキン病、食道癌、腸癌、内分泌腺癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、平滑組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、慢性又は急性白血病、リンパ球腫、嚢胞癌、腎臓又は水尿管癌、腎細胞癌、腎盂癌、ＣＮＳ腫瘍、原発性中枢神経系悪性リンパ腫、脊髄髄質腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫症等を含む。

40

【００２２】

以下に、本発明を詳細に説明する。

【００２３】

本発明に関し、本願で開示のヒト化抗４－１ＢＢ抗体（ＨＢＢＫ４）は以下の手順で調製可能である。

50

【0024】

例えば、本発明のHBBK4はアゴニスト性抗4-1BB抗体(BBK4)を第一工程でハイブリドーマ細胞株を用いて調製し；第二工程でBBK4遺伝子をクローニングし；BBK4のVH及びVLを第三工程でヒト化し；最終工程でヒト化BBK4(HBBK4)クローンをヒト化BBK4(HBBK4)ScFVの機能分析を通して選択し、本発明のHBBK4を得る工程を含む手順によって調製可能である。

【0025】

従って、上記の方法で調製した本発明のHBBK4は癌の予防と治療のための医薬品組成物の調製において有効成分として使用可能である。

【0026】

更に、上記の方法で調製したHBBK4と抗CTLA-4の混合物は癌の予防と治療のための医薬品組成物の調製において有効成分として使用可能である。

【0027】

本発明の組成物は、追加として当該分野で慣用に使用されている適切な担体、アジュバント又は希釈剤を含んでもよい。適切な担体、アジュバント又は希釈剤は特定の材料に限定されず、用法及び適用方法に応じて選択可能である。適当な希釈剤は文献：Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Co., Easton PA)に記載されている。

【0028】

本発明のHBBK4抗体は独立して、又はタクソール、シクロホスファミド、ドキソルビシン等の周知の抗癌剤と組み合わせて使用可能である。

【0029】

以下において、以下の製剤法及び賦形剤は単に例示的なものにすぎず、本発明をいかなる場合も限定するものではない。

【0030】

本発明の組成物は薬学的に許容される担体、アジュバント又は希釈剤、例えば乳糖、ブドウ糖、蔗糖、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、澱粉、アカシアゴム、アルギン酸塩、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム、及び鉱物油を含有する医薬品組成物として調製可能である。処方には更に充填剤、抗凝集剤、滑剤、湿潤剤、着色料、乳化剤、保存料等を含有していてもよい。本発明の組成物は、当該分野で周知のいずれの手順でもって、患者に投与した後、有効成分が迅速、徐放性又は遅延放出されるように処方を設計することができる。

【0031】

例えば、本発明の組成物は注射剤を製造する際に一般的に使用される油類、プロピレングリコール又はその他の溶媒に溶解可能である。適切な担体の例には生理食塩水、ポリエチレングリコール、エタノール、植物性油、ミリスチン酸イソプロピル等が含まれるが、これらに限定されるものではない。局所的投与の場合、本発明の組成物を軟膏やクリーム of 形態で処方可能である。

【0032】

本発明の組成物を含有する医薬品製剤は、経口投薬形状（粉末、錠剤、カプセル、ソフトカプセル、水薬、シロップ、エリキシル剤、丸薬、粉末、サシェ剤、顆粒）、又は局所用調合物（クリーム、軟膏、ローション、ゲル、バーム、パッチ、ペースト、散布剤、エアロゾル等）、又は注射剤（水溶液、懸濁液、エマルジョン）等のいずれの形状で調製してもよい。

【0033】

薬剤投与形態での本発明の組成物は、その薬学的に許容される塩として使用してもよく、又、その他の薬学的に活性な化合物と組み合わせての使用はもちろん、単体で使用しても適当なものと組み合わせての使用であってもよい。

【0034】

本発明の組成物の望ましい投与量は、患者の状態や対象の体重、疾患の重症度、剤形、投与経路、投与期間によって異なり、当業者が選択してもよい。しかしながら、望ましい効果を得るためには、本発明の抽出物又は組成物を体重/日あたり、 10 mg/kg 、好ましくは 0.1 から 1000 mg/kg 投与することが一般的に勧められる。一日一回投与しても、何回かにわけて投与してもよい。

【0035】

組成に関しては、本発明の組成物の含有量は組成物の全重量に対して 0.01 から 80 重量%、好ましくは 0.5 から 50 重量%であるべきである。

【0036】

本発明の医薬品組成物は、哺乳類（ラット、マウス、家畜又は人間）等の被験動物に様々な経路で投与可能である。全ての投与方式が考えられるが、例えば、経口投与、直腸投与、静脈内投与、筋肉投与、皮下投与、皮内投与、鞘内投与、硬膜外投与、又は脳室内投与が挙げられる。

10

【0037】

本発明の精神又は範囲から外れることなく、本発明の組成物、その使用及び調製に様々な改良や変更を加えることは当業者には自明である。

【0038】

本発明を以下の図面及び実施例を用いてより詳細に説明するが、当然ながら、いかなる方法によっても本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

【0039】

本発明の独創的なHBBK4抗体はCD11c + CD8 + T細胞数とIFN- γ 発現の増大による、癌細胞増殖の阻害効果を示した。従って、癌の予防又は治療に有用であり、副作用を伴わない。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0040】

本発明の精神と範囲から外れることなく様々な改変及び変更を本発明の組成物、その使用、及び調製に加えることは当業者に明白である。

【0041】

本発明は以下の実施例によりより具体的に説明されるが、当然のことながら、いかなる場合でも本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

30

【0042】

以下の実施例及び実験例は、範囲を制限することなく本発明を説明することを意図するものである。

【実施例1】

【0043】

アゴニスト性抗ヒト4-1BB（BBK4）の調製

1-1 ヒト4-1BBタンパク質の調製

ヒト4-1BB分子コードcDNAとグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）の結合部位をコードするDNA（Pharmacia LKB Biotechnology社）とを組み合わせることでpGEX3発現ベクターを調製した。

40

【0044】

大腸菌を上記ベクターで形質転換した後、適切な条件下で培養して4-1BB-GST融合タンパク質の発現を誘発させ、次にグルタチオンセファロース-4Bカラム（Pharmacia LKB Biotechnology社）により更に分離と精製を行うことで4-1BB-GST融合タンパク質を得た。

【0045】

1-2 免疫力

$20\text{ }\mu\text{g}$ の4-1BB-GST及び 0.1 ml のフロインド完全アジュバントを混合し、生後4～8週間のBalb/cマウスの腹腔に投与し、最小限の免疫反応を誘発させた。

$20\text{ }\mu\text{g}$ の4-1BB-GST及びフロインド不完全アジュバントの混合物をBalb/c

50

cマウスの腹腔に3週間間隔で2回投与し、免疫を誘発させた。

【0046】

免疫誘発終了3日後、酵素免疫測定法（EIA）に沿って少量の血液サンプルを尾部から採取することで抗体価を求め、免疫値が特定のレベルに達した際、取り出した脾臓の脾臓細胞を用いて細胞融合を行った。

【0047】

1-3 細胞融合

免疫を与えられたマウスから得た脾臓細胞をSP2/O-Ag14骨髓腫細胞（ATCC CRL 1581）と混合比1：2で混合し、ポリエチレングリコール4000（Gibco社）により融合させた。以下の実験は文献（Mishell and Shiigi, Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman Company, 1980）に開示の手順により行った。

【0048】

ハイブリドーマ細胞を選択するために、融合細胞混合物をHAT培地、つまり15%ウシ胎仔血清、0.1mMヒポキサンチン、0.4μMアミノプテリジン及び16μMチミジンを添加したRPMI培地に懸濁させ、濃度 3×10^7 細胞/mlで96ウェルマイクロ培養トレイに注入し、5%CO₂ガスを供給して37℃で細胞培養物を培養した。骨髓腫細胞及びその他の非融合脾臓細胞は共にHAT培地では成長しなかったため、すでに融合した細胞のみをHAT培地で成長したと見なした。6、7、8日後にそれぞれ、培地の半分を新しい培地と入れ替えた。逆相顕微鏡で観察し細胞が十分成長した時点で抗体を含有する上清液を96ウェルマイクロ培養プレートから回収し、ELISA法を行った。

【0049】

1-4 ハイブリドーマ細胞株の選択

炭酸塩緩衝液（pH9.6）で希釈することで4-1BB-GST濃度を200ng/0.1mlに調節し、ELISAプレート上にコーティングした。完全にコーティングしたプレートをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、PBS含有1%FBSアルブミンを添加して、1時間放置した。プレートをPBSで数回洗浄し、実施例1-3で調製した上清液を1時間に亘って培養した。培養後、プレートをPBSで数回洗浄し、0.1mlの希釈したアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン（x1000、Southern Biotech社）を添加した。一時間後、プレートをPBSで数回洗浄し、p-ニトロフェニルリン酸ナトリウムを炭酸塩緩衝液に1mg/ml（pH9.6）で溶解することで調製した0.1mlの基質液を添加して、室温で10分間保存した。オートマイクロプレートリーダーを用いて反応を求めることで、4-1BB特異性結合抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を選択した。以下、BBK-4とする。

【0050】

1-5 ハイブリドーマ細胞株を用いた抗体の調製

実施例1-4で調製したBBK-4細胞株（ 1×10^7 ）を培地で増殖させ、0.5mlのプリスタン（2,6,10,14-tetramethylpentadecane、シグマ社）で前処理したBalb/cマウスに腹腔投与し、腹水を採取した。腹水をプロテインGセファロースカラム（Pharmacia社）での親和カラムクロマトグラフィに供し、本発明のモノクローナル抗体を単離した。その抗体産生速度は1mg/ml腹水である。

【0051】

抗体分析キットによる分析結果により、本発明の抗体はカップ軽鎖のアイソタイプを有するIgG1であると確定された。

【実施例2】

【0052】

アゴニスト性抗ヒト4-1BB（BBK4）の遺伝子クローニング

2-1 BBK-4クロンのmRNA

完全長RNAを 2×10^8 細胞数のBBK-4クロンから抽出した。細胞ペレットをTriPure単離試薬（TriPure Isolation Reagent、Sigma社）で処理し、フェノール/クロロホルムでの一回の抽出に供した。上清をイソプロパノールで処理してRNAを沈殿

させた。RNAを75%エタノールで二回洗浄し、DEPC処理水に溶解させ、完全長RNAを得た。mRNAの抽出はダイナルビーズmRNA精製キット (Dynalbeads mRNA purification kit、DYNAL社)で行った。

【0053】

2-2 BBK-4クローンのcDNAライブラリの作製

ZAP-cDNA合成キット及びZAP-cDNAギガパックIIIゴールドクロニング (STRATAGENE社)を用いてBBK-4のcDNAライブラリを作製した。

【0054】

2-2-1 ファーストストランド合成

実施例2-1で調製した抽出mRNAを用いてBBK4のファーストストランドを合成した。5µgのmRNA、リンカープライマー、リボヌクレアーゼHリバーストランスクリプターゼ、メチルヌクレオチド混合液、及びリボヌクレアーゼ阻害剤の混合物を1時間に亘って37℃で反応させた。リンカープライマーはXhoIサイトとSEQ ID NO. 1の配列を有していた。

10

【0055】

2-2-2 セカンドストランド合成

リボヌクレアーゼH及びDNAポリメラーゼIを用いてセカンドストランドを合成し、混合物を16℃で2.5時間に亘って反応させた。反応後、反応物をフェノール/クロロホルム抽出に供し、エタノールを用いて濃縮した。濃縮物を70%エタノールで洗浄し、水に溶解させ、タンパク質をウルトラフリー・プロバインド・フィルタ (Utrafree-probind filter、Sigma社)で除去した。

20

【0056】

2-2-3 cDNA末端の平滑化

cDNAの3'末端及び5'末端の双方をクレノウ断片とdNTPを用いて平滑化した。タンパク質はウルトラフリー・プロバインドフィルタ (Sigma社)で除去した。

【0057】

2-2-4 EcoRIアダプタのライゲーション

rATP及びT4DNAリガーゼの双方を添加した。溶液を4℃で12時間に亘って反応させ、70℃で30分に亘って加熱することで酵素を不活性化させた。

【0058】

2-2-5 EcoRI末端のキナーゼ化

rATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼの双方を添加した。溶液を37℃で30分に亘って反応させ、70℃で30分に亘って加熱することで酵素を不活性化させた。

30

【0059】

2-2-6 XhoI消化

消化はXhoIを用いて行われ、タンパク質はウルトラフリー・プロバインド・フィルタ (Sigma社)により除去された。

【0060】

2-2-7 cDNAのUni-ZAP XRベクターアームへのライゲーション

調製したcDNAの量をエチジウムブロマイドを用いて測定した。100ngのcDNA及び125µgのUni-ZAP XRベクターの混合物を、rATP及びT4DNAリガーゼを用いて12℃で12時間に亘って反応させた。

40

【0061】

2-2-8 パッケージング

-80℃で保存されたパッケージング抽出物の融解開始時に、2µgのライゲートしたDNAを泡を生じさせないようにピペットで慎重に添加し、混合した。溶液を2時間に亘って反応させ、100mMのNaCl、10mMのMgSO₄・7H₂O、50mMのトリス-HCl (pH7.5)、0.01%のゼラチン及び20µlのクロロホルムを含有する500µgのSM緩衝液と混合した。溶液を遠心分離し、上清を別のチューブに移した。

50

【0062】

2-2-9 ライブラリの力価測定

X L-1 ブルーMRF' を宿主細胞として用い、L B/テトラサイクリンプレート (60 μ g/ml) 上に接種することで得た単一コロニーを10 mMのMgSO₄と0.2%のマルトースを含有するL B培地に接種した。37℃でOD₆₀₀1.0を越えないようにコロニーを速度200 rpmの振動を与えながら培養した。培養物を速度500 x gで10分間に亘って遠心分離に供することで培地を分離し、10 mMのMgSO₄・7H₂OをOD₆₀₀が0.5になるまで細胞ペレットに添加した。調製した宿主細胞を4℃で保存し、48時間に亘って生存させた。1 μ lの1/10まで希釈したパッケージング反応物を200 μ lの宿主細胞に添加し、宿主細胞に37℃、15分で取り付けた。3 mlの48℃の冷却した上層寒天部を添加し、ボルテックスに供し、予熱したL B寒天プレートに注いだ。細胞を37℃で10時間に亘って成長させ、ブランクの数をカウントすることで細胞数を計算した (p f u/ml)。最終的にカウントされた細胞数が1.9 x 10⁶ p f uであることが確認された。

10

【0063】

2-3 重鎖遺伝子及びカップ鎖遺伝子のスクリーニング

上記の細胞をプレーティングに供し、100 mmあたり約200から300のブランクを形成し、ナイロン膜に移してUV架橋した。膜を用いてハイブリダイゼーションを行った。PCRによりクローニングされた完成した各断片を重鎖とカップ鎖のスクリーニング用のプローブとして使用した。ECL直接核酸標識・検出キットを用いてハイブリダイゼーションを行った。クローンはExa s s i t/SOLRを用いた生体内除去システムを通してプラスミドに形質転換され、配列を配列決定法により求めた。

20

【実施例3】

【0064】

アゴニスト性抗ヒト4-1 BB抗体 (BBK4) のVH及びVLヒト化

3-1 BBK-4クローンのヒトホモログVH及びVLの選択

クローンBBK-4コードマウスタンパク質のV領域配列に似たヒト抗体遺伝子をデータベースサーチシステムを通して選択した。BBK-4と似た配列を用いてコンビナトリアル抗体ライブラリを構築するに必要なPCRテンプレートとプライマーを調製した。

【0065】

30

3-2 BBK-4遺伝子のヒト化設計

BBK-4の重鎖及び軽鎖のCDR及びFR部領域を見つけ出し、表1に開示のルールに準拠して、領域がヒトアミノ酸残基に変化したか否かを求めるスタンダードに従った。

【0066】

CDR領域、つまりH及びL鎖の多数の部分配列中で抗原と直接的に連結する領域をマウス配列に用い、カノニカル領域をマウス配列に用いた。FR領域に存在するものの、HとL鎖とのインターフェースに位置された配列をマウス配列に使用し、特定の配列をヒト配列に用いた。溶媒に露出した残基をマウス配列に用い、ヒト化ヌクレオチド配列をプロトコールに基づいて決定した (図1を参照のこと)。

【0067】

40

【表 1】

マウス残基	コメント	決定
CDR	Ig Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)に準拠	マウス
カノニカル残基	Chothia canonical assignment (http://www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/)	マウス
鎖間パッキング残基		マウス
N-グリコシル化サイト		ヒト
異常フレームワーク残基	CDR残基の5-6 Å ² 内残基	マウス
	その他全ての残基	ヒト
溶媒露出残基	CDR、カノニカル、鎖間のいずれの残基	マウス
	その他全ての残基(http://imgt.cine-s.fr:8104/textes/IMGTrepertoire.html)	ヒト

10

20

【0068】

3-3 コンビナトリアル抗体ライブラリを作製するためのプライマー調製

コンビナトリアル抗体ライブラリ作製に向けインサートを調製するために、BBK-4 クローンの重鎖と軽鎖配列とヒト・テンプレートの比較により得られたアミノ酸配列に基づいて、コンビナトリアル・プライマーを調製した。プライマー配列は表2においてSEQ ID NO.2からSEQ ID NO.18で示されている。

【0069】

【表 2】

プライマー	配列
HBBK4-1U	5'-actgcggcccccagccggcccatggccaggtgcagctgcagcagctctggggctgaagtarwaaagcctggggc-3'
HBBK4-1D	5'-agtagctgctgaagggttagccagaagccctgcaggaaascctcactgaagccccaggctttwytacttc-3'
HBBK4-2U	5'-tacaccttcagcagcactggaatgcactgggtgargcagcaccctggacaaggcccttgatggattggag-3'
HBBK4-3D	5'-tgctctgaactctcattgtagttagtatgaccgttgccaggattaatctctccaatccactcaaggcc-3'
HBBK4-3U	5'-aatgagaagttcaagagcarggyaactmtgactskggacacctctacaagcacagyatacatgsaactca-3'
HBBK4-3D	5'-taaaagatcttcacagtaatagaccggcgwgtcctcagaccgcaggtgctgtagtscatgtatctgt-3'
HBBK4-4U	5'-tactgtcaagatctttactacggcacgggcgttgcttactggggccaggagacccctgtgaccgtct-3'
HBBK4-4D	5'-ctgagccggccggccctgagccggccggccctgagccggccggccctgaggagacggcacaggaggtccc-3'
HBBK4-5U	5'-tcaggcggcggcggtcagacrttgatgactcagctctcagccttctatctgtgactccaggagaga-3'
HBBK4-5D	5'-agtgaagtgtcgctaatagtctggctggccctgcaagtaakagtcacttctctcctggagtcacaga-3'
HBBK4-6U	5'-attagcgactacttacactggtatcaacaaaaaccgataaactctccaaacttctcatcaaatatgctt-3'
HBBK4-6D	5'-tccctgatccactgcccactgaacctggagggaaycccagagatggatgggaagcatattgatgagaag-3'
HBBK4-7U	5'-agtggcagtgatcagggactgattcactyttastatctcgtcgtcggagcagaagatgytgsgrgt-3'
HBBK4-7D	5'-tagttccttgaccgaaagttgggggaaagctgtgaccatcttgacagtaatacryscarcactcttctgc-3'
HBBK4-8D	5'-gagtcattctcgactgcggccgcttgatctcgagtttagttccttgaccgaaagt-3'
HBBK4-SfiI-U	5'-actgcggcccccagccggcccat-3'
HBBK4-NotI-D	5'-ttagttccttgaccgaaagt-3'

10

20

【0070】

ScFv領域増幅のためのPCRを表2に従って調製したプライマーを用いて行った。PCRは以下のように行った。94℃での5分間に亘る予備変性と、94℃での30秒間の変性、59℃での1分に亘るアニーリング、72℃での30秒に亘る伸長から成る1サイクルとを35回繰り返し、後伸長を72℃で7分に亘って行った。得られたPCR生成物をQIAGENゲル抽出キットで単離した。

30

【0071】

3-4 ライゲーションScFvへの制限酵素サイトの追加

制限酵素サイトが表3にSQ.ID NO.19からSEQ.ID NO.20として示されている。

【0072】

【表 3】

	制限酵素サイト
HBBK4 SfiI-U	5'-actgcggcccccagccggcccat-3'
HBBK4 NotI-D	5'-ttagttccttgaccgaaagt-3'

40

【0073】

酵素サイトはHBBK-4SfiI-U及びHBBK4NotI-Dを用いてPCR法を通してScFvの5'-及び3'末端に追加され、得られたPCR生成物はQIAGENゲル抽出キットにより単離された。

【0074】

3-5 インサートの消化および精製

SfiI消化反応を行うために、8.5μlの10xの緩衝液(Roche社)、2μlのSfiI(10U/μl、Roche社)、適当な体積の精製ScFv生成物(1μg)及び蒸留水を含む85μlの混合液を85μlの鉱物油に添加し、共に50℃で4時間に亘

50

って反応させた。

【0075】

N o t I 消化反応を行うために、3.6 μ l の3MのN a C l、1.5 μ l の10xの緩衝液（Roche社）、4 μ l のN o t I（10U/ μ l、Roche社）、適当な体積の蒸留水を含む15 μ lの混合液を完全に混合し37℃で4時間に亘って反応させた。反応溶液をフェノール／クロロホルム抽出とスピンカラム精製法での単離に供した。

【0076】

3-6 S c F vの定量化とp C A N T A B 5 Eベクターへのライゲーション

S c F vの量を電気泳動により測定した。25 ngの単離したS c F vを12.5 ngと25 ngのS c F vマーカー双方と共に電気泳動に供し、幅0.75 cmの1%アガロースゲル上で展開し、比較した。

10

【0077】

更なるライゲーション処理でインサートを用い、5 μ l の10xのO P A緩衝液、5 μ l のp C A N T A B 5 E（50 ng/ μ l）、5 μ l の10mMのA T P、2 μ l のT 4 D N Aリガーゼ（4U/ μ l）、50 μ lの蒸留水、及び適当な体積のB B K-4 S c F v遺伝子断片（150 ng）を含む50 μ lのライゲーション混合物を共に16℃で1時間に亘って反応させた。次に溶液を70℃で10分間に亘り反応させて、リガーゼを不活性化し、5分間に亘って氷冷した。

【0078】

3-7 形質転換とライブラリのサイズの確認

上記記載のライゲーション反応物において調製された生成物を1 mlの適切なT G 1細胞に添加し、水中に45分間に亘って放置した。混合物を42℃で2分に亘って培養し、氷冷した。900 μ lのL B Gを100 μ lの冷却液に添加し、速度250 rpmでの懸濁培養に供した。これらの形質転換細胞を希釈とプレーティングに供し、 6×10^6 c f uの細胞ライブラリを得た。

20

【0079】

3-8 B B K-4組み換えファージ抗体ライブラリへの形質転換

上記記載の工程で調製した900 μ lの細胞ライブラリを9.1 mlの2xのY T-G培地に添加し、速度250 rpm、温度37℃での1時間に亘る懸濁培養に供した。速度1000 x g、10分間に亘る遠心分離により上清を除去し、細胞を沈殿させた。10 mlの2xのY T-A K培地を沈殿した細胞に添加し、速度250 rpm、温度37℃で一晩、懸濁培養した。懸濁物を速度1000 x gで20分に亘り遠心分離し、細胞を再度沈殿させた。上清を0.45 μ mの濾紙で濾過し、50 mlの滅菌コンカルチューブに移し、パニングに供するまで4℃で保存した。

30

【0080】

3-9 組み換えファージのP E G沈殿

2 mlのP E G/N a C lをB B K-4組み換えファージ抗体ライブラリに添加し、完全に混合し、水中で60分に亘って培養した。懸濁物を速度1000 x g、温度4℃での遠心分離に20分間に亘って供し、細胞を沈殿させ、上清を除去した。16 mlの2xのY T培地を沈殿物に添加し、混合した。上清を0.45 μ mの濾紙で濾過してパニングに供した。

40

【0081】

3-10 抗体陽性組み換えファージ抗体を選択するためのパニング

4-1 B Bを0.05 Mの炭酸塩緩衝液（pH 9.6）を用いて10 μ g/mlに希釈し、溶液を室温で1又は2時間に亘って25個のフラスコにコーティングした。フラスコをP B S溶液で3回洗浄し、ブロッキング緩衝液を充填し、室温で1時間に亘って保存し、P B Sで再度、3回洗浄した。P E Gで沈殿した組み換えファージ16 mlを0.01%のアジ化ナトリウムを含む14 mlのブロッキング緩衝液で希釈し、室温で15分に亘って反応させた。20 mlの希釈組み換えファージをフラスコに注ぎ、37℃で2時間に亘って反応させた。フラスコを50 mlのP B S溶液で20回洗浄し、再度、50 ml

50

の 0.1% PBS-T 溶液で 20 回洗浄した。

【0082】

10 ml の成長段階 TG1 細胞をフラスコに注ぎ、37℃で1時間に亘って培養した。100 µl の培養物を様々な濃度、つまり 1:10、1:100、1:1000 に希釈し、プレートあたり 100 µl で SOBA G プレートにプレーティングした。フラスコを 30℃で一晩の培養に供し、各プレートの cfu を概算した。ライブラリサイズは 9×10^4 cfu と確認された。

【0083】

3-11 スクリーニング用のモノクローン選択

パニング後に得られた 880 個のコロニーを 200 µl の 2X の YT-A G 培地を含有する 96 ウェルプレートに接種し、速度 250 rpm、温度 30℃で一晩培養した。M13 K07 (2.5×10^{10} pfu) を含有する 50 ml の 2x の YT-A G を別の 96 ウェルプレートに 200 µl / ウェルプレートで分配した。一晩培養したものをプレートに 40 µl / プレートで接種した。接種したプレートを速度 250 rpm、温度 37℃での懸濁培養と速度 1500 x g の 20 分間に亘る遠心分離に供した。上清を更に ELISA 法でスクリーニングした。

【0084】

3-12 ELISA 法によるスクリーニング

4-1 BB を 0.05 M の炭酸塩緩衝液 (pH 9.6) で 2 µg / ml まで希釈し、室温で 1 から 2 時間に亘って 100 µl / プレートで ELISA プレート上にコートした。プレートを 0.01% を含有する PBS で 3 回洗浄した。それぞれ 200 µl のブロッキング緩衝液を各ウェルに加え、室温で 1 時間に亘って反応させ、プレートを PBS-T 緩衝液で 3 回洗浄した。100 µl の組み換えファージ抗体の上清を準備したプレートに加え、同量のブロッキング緩衝液を混合し、室温で 30 分に亘って反応させた。200 µl の希釈したファージ抗体の上清を抗原をコートしたウェルに加え、室温で 1 時間に亘って反応させた。反応後、プレートを 0.01% PBS-T 溶液で 5 回洗浄し、HRP / 抗 M13 モノクローナル複合体 (HRP/anti-M13 monoclonal conjugate) をブロッキング緩衝液で 1:5000 に 200 µl / ウェルで希釈し、室温で 1 時間に亘って反応させた。プレートを 0.01% PBS-T 溶液で 6 回洗浄し、1X の ABTS 溶液を各ウェルに 200 µl / ウェルで添加し、室温で 20 分に亘って反応させた。0.5 より高い吸光度を示すクローンは 405 nm での吸光度測定テストを通して陽性クローンとみなした。

【0085】

スクリーニングの結果、162 個の陽性クローンが得られ、各クローンのヌクレオチド配列は配列解析により同定された。配列中の重複した配列を調べることで、配列を異なる配列を有する 54 のグループに分割した。

【実施例 4】

【0086】

ヒト化 BBK4 (HBK4) ScFv の機能解析による HBK4 クローンの選択

【0087】

4-1 BBK4 ScFv の精製

各 ScFv を抗 E-Taq セファロースカラムを用いて精製し、結果を図 3 に示した。

【0088】

4-2 HBK4 ScFv を用いたフローサイトメトリ

ELISA スクリーニングにより求められた HBK4 ScFv クローン後、クローンをヒト 4-1 BB を発現する Jurkat 8-1 で処理しフローサイトメトリを分析し HBK4 のヒト 4-1 BB との結合親和性を特定した。2 µg の HBK4 を 2×10^5 の Jurkat 8-1 細胞に添加し、4℃で 30 分間に亘り保存し、0.1% の BSA を含有する PBS 溶液で洗浄した。抗ヒト IgG-FITC を二次抗体で処理し、HBK4 を検出した。染色した細胞をフローサイトメトリ分析装置 (FACScan、BD Bioscience 社) で分析した。図 4 は HBK4 クローン中の一部のクローンがマウス BBK に似たヒト 4

10

20

30

40

50

－１ＢＢを認識することを示す。

【００８９】

４－３ 競合ＥＬＩＳＡ

各クローンがマウスＢＢＫ４等の元のエピトープを有することを同定するために以下の競合ＥＬＩＳＡは抗原として４－１ＢＢ－ＧＳＴを選択し、ヒト化前の濃度の向上したマウスＢＢＫ４抗体とのＨＢＢＫ４ＳｃＦｖ結合親和性の比率の低下は以下の数式１によって表される阻害％によって示される。

【００９０】

（数１）

阻害比率（％）＝１００×（非競合ＯＤ₄₀₅－競合ＯＤ₄₀₅）／非競合ＯＤ₄₀₅

10

【００９１】

図５に示されるように、阻害比率（％）はマウスＢＢＫ４の濃度と共に用量依存的に上昇することから、ＨＢＢＫ４ＳｃＦｖが元来の抗原と似たエピトープを有することが証明され、これはＨＢＢＫ４ＳｃＦｖがマウスＢＢＫ４のそれと同様の生物学的効果を有することを強く示唆している。

【００９２】

４－４ ヒト化ＳｃＦｖの定常領域への連結

ＨＢＢＫ４ＳｃＦｖは連結されたＶＨ、リンカー及びＶＬ領域を有する。ＨＢＢＫ４ＳｃＦｖを抗体の元の構造、つまりＨ２Ｌ２構造に再構成するために、リーダー配列をＢＢＫ４のＶＨ領域に連結し、ヒトＩｇＧ１又ＩｇＧ４の定常領域をそれにそれぞれ連結した。リーダー配列及びヒト・カッパ鎖配列は共にカッパ鎖に連結され、各断片の連結はＰＣＲ法により行った。

20

【００９３】

４－５ Ｈ２Ｌ２を用いたＥＬＩＳＡ

定常領域へ続く完全にヒト化された配列は真核生物発現ベクターであるｐｃＤＮＡにサブクローンされ、２９３ＥＢＮＡ細胞にトランスフェクトされ、連続分析、つまりＥＬＩＳＡ及びウェスタンブロッティング分析を細胞培地を用いて行った。４－１ＢＢ－ＧＳＴをＥＬＩＳＡについて抗原として用い、各５０個のトランスフェクタント培地を用いた。表４のＥＬＩＳＡ法の結果から見て取れるように、ネガティブコントロールのそれよりも約１５倍高い発現率を示した５０個のクローン中、クローン７５が最も高い発現率を示したことが確認された。

30

【００９４】

【表４】

サンプル	吸光度
ＨＢＢＫ４－７５／ｐｃＤＮＡ導入２９３ＥＢＮＡ培養上清	１．９３５
２９３ＥＢＮＡ培養上清	０．１２６

【００９５】

選択したクローン７５により産生した抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、完全にヒト化された抗体ＨＢＢＫ４－７５クローンが、図６に示されるように、ヒト４－１ＢＢと強力な親和性を示すことが確認された。

40

【実施例５】

【００９６】

アゴニスト性抗ヒト４－１ＢＢ（ＢＢＫ４）のヒト化

アゴニスト性抗４－１ＢＢ抗体を用いて人体に癌治療法を適用するためには、抗体それ自体の負の活性を最小限とするヒト化抗体が必要である。マウスＢＢＫ４クロノンの重鎖／軽鎖アミノ酸配列にかなり似たヒト抗体、すなわちアゴニスト性抗ヒト４－１ＢＢ抗体がスクリーニングされ、ヒト化のために比較された。最終的に選択したヒト化アゴニスト性抗ヒト４－１ＢＢ抗体（ＨＢＢＫ４）は２種類の定常領域、つまりヒトＩｇＧ又はＩｇＧ

50

4と融合され、HBBK-4-75G1とHBBK4-75G4とそれぞれ称した。最終的に合成されたHBBK4抗体のヌクレオチド配列とアミノ酸配列が図7から図12のSEQ.ID NO.59からSEQ.ID NO.64に図示されている。

【参考例1】

【0097】

アゴニスト性抗マウス4-1BB抗体を用いた動物モデル試験

1-1 抗体

アゴニスト性抗ラット4-1BB及びアンタゴニスト性抗CTLA-4抗体の双方をプロテインGカラムを用いてラットの腹水から単離した。ポジティブコントロールとして用いたラットIgGはSigma社から購入し、サイトメトリ解析で使用したその他の抗体、つまり抗CD8-PE(53-6.7)、抗CD4-FITC(GK1.5)、抗CD8-FITC(53-6.7)、抗IFN- γ -PE(XMG1.2)、抗CD11c-PE(HL3)、抗NK1.1-PE(PK136)はBD PharMingen社から購入した。

10

【0098】

1-2 動物モデル及び抗体治療

Hartにより最初に報告されたB16黒色腫突然変異であるB16-F10黒色腫癌細胞株の抗原性は低い(Francia G et al., Cancer Res. 56, 3855-3858, 1996)。4x10⁵のB16-F10黒色腫細胞をマウスの背中に皮下注射し、腫瘍を起こさせた。200 μ gの各アゴニスト性抗4-1BB(3H3クローン)及びアンタゴニスト性抗CTLA-4-抗体(9H10クローン)を腹腔内への癌細胞株投与と共に4日ごとに5回、同時又はそれぞれでラットに注入した。腫瘍のサイズを以下の数式2に沿って4日ごとに求め、腫瘍形成マウスの生存率を毎日観察した。

20

【0099】

(数2)

腫瘍サイズ = (幅 x 長さ x 高さ) x (π / 6)

【0100】

1-3 浸透した免疫細胞の腫瘍組織からの単離

腫瘍組織をアゴニスト性抗4-1BB、アンタゴニスト性抗CTLA-4又はラットIgG治療マウスから治療18日後に単離した。単離した腫瘍組織をHBSSと混合し単一の細胞懸濁液を形成し、63%/36%のパーコール勾配の上層上に載せることによる、速度500xg、45分間の遠心分離に供した。遠心分離後、63%と36%パーコールの間の白色の免疫細胞が回収され、RPMI1640で2度洗浄し、以下の実験で使用した。

30

【0101】

1-4 フローサイトメトリのための細胞染色

1 μ gの2.4G2Fcブロッカーを流入領域リンパ節又は腫瘍組織から単離した免疫細胞に添加し、4℃で10分間保存した。細胞を抗CD4-FITC+抗CD8-PE及び抗CD8-FITC+抗CD11c-PEで染色し、0.1%BSAを含有するPBSで洗浄し、FACScan(BD Bioscience社)で分析した。細胞を抗CD8-FITCで30分間表面染色し、500 μ lのCytolfix/Perm(BD PharMingen社)を用いて室温で20分間、固定、透過処理し、サポニンを含有するパームウォッシュ緩衝液(Perm Wash buffer、BD PharMingen社)で洗浄した。上記の細胞を抗IFN- γ -PEで30分間に亘り細胞内染色し、FACScan(BD Bioscience社)を用いて分析した。

40

【0102】

1-5 腫瘍組織中の浸透したCD4+及びCD8+T細胞数のカウント

上述したように、腫瘍組織中の浸透した免疫細胞をパーコールを用いて単離し、細胞数を血球測定器を用いてカウントした。腫瘍組織に浸透したCD4+及びCD8+T細胞の数は以下の数式3により計算した。

【0103】

(数3)

50

腫瘍組織中のCD4+及びCD8+T細胞の数＝（腫瘍細胞中に浸透した総免疫細胞数）
× CD4+又はCD8+T細胞の比率（％）／100

【0104】

1-6 CD8c+CD11c+T細胞の単離

CD8+T細胞及びCD11c+CD8+T細胞をアゴニスト性抗4-1BB又はラットIgGでそれぞれ治療した関節炎誘発マウスから取り出した流入領域リンパ節から単離し、細胞はMACS磁気分離システムにより単離した。細胞を適切なマイクロビーズ複合抗体と培養し、CD4+、F4/80+、CD40+、B220+、及びDX5+を除去し、更にCD8-マイクロビーズと培養してCD8+T細胞を単離した。単離したCD8+T細胞をCD11c-マイクロビーズで処理し、CD8+CD11c+及びCD8+CD11c-の双方をLS単離カラム（Miltenyi Biotech社）を用いて更に単離した。単離した各細胞は96～98%の高い純度を示した。

10

【0105】

1-7 マイクロアレイ及びRT-PCR

CD8+T、CD11c+CD8+T、及びCD11c+CD8+T細胞を、腫瘍注入から15日後にB16-F10腫瘍モデルのリンパ節から単離し、完全長RNAを各細胞から抽出した。

【0106】

試験管内で、逆転写酵素を用いて抽出したRNAをcDNAに合成し、各0.5μMプライマーについて0.5μlのcDNAを用いてPCRを行った。各遺伝子の発現レベルを表5に開示の遺伝子特異型プライマーとSEQ.ID 21からSEQ.ID 58を用いて比較した。

20

【0107】

【表 5】

名前	方向	プライマー	名前	方向	プライマー
AnnexinA4	センス	aatcaaccagacataccagc	Tim-3	センス	atccagcagataccagctaa
	アンチセンス	tcttcaaagcttccagatgt		アンチセンス	tccattgttattatggagg
Klrg1	センス	cttgcaatgggtgcttt	IL-4 ig 1	センス	gtatcttcactttccgggat
	アンチセンス	ctccagccatcaatgttc		アンチセンス	gaggtagaagaagccctcc
CD68Ag	センス	gcatactctgttttgaatccc	pleckstrin	センス	actgaatctggagaaggaca
	アンチセンス	ccttagagagagcagggtcaa		アンチセンス	ttcagtaaacatccctgctt
THRI13	センス	gtgatgaccaccgtactctt	TIP2	センス	aaagcaaagcaaatgaagag
	アンチセンス	gcattgaactactcggatagc		アンチセンス	tcagtggagggaatggtaatc
NKG2	センス	cgattcaccccttaacacatt	LAG3	センス	gtctccatcacgtacaaacct
	アンチセンス	gctggaattttgagacaaac		アンチセンス	cacaatctttcctttccag
TGF- β 1	センス	ttgacgtcactggagttgta	Klrg2-A1	センス	tcctccagagaaactcattg
	アンチセンス	aatagttggtatccagggtct		アンチセンス	tacagtttttggaatgcag
PRP1	センス	cagcattaccacaagaatga	CD27	センス	gctgaatctcacagttcctc
	アンチセンス	ccacattccagaagattta		アンチセンス	ccagtgtcacctggataatg
IL-1RII	センス	cgaatgcaggctattacagat	Perforin	センス	gtcacgtcgaagtacttg
	アンチセンス	atcaaaaatcagcgacactt		アンチセンス	atggctgatagcctgtct
Granzyme B	センス	cccaggcgcaatgctaatt	IFN- γ	センス	aacgctacacactgcac
	アンチセンス	ccaggataagaaactcga		アンチセンス	gccgtggcagtaacagcc
GAPDH	センス	gaaagggaagcttgtcat			
	アンチセンス	ctaagcagttggtgtgctc			

10

20

30

40

50

【実験例 1】

【0108】

ヒト化アゴニスト性抗ヒト 4-1BB (HBBK4) の特性

HBBK4 抗体の特性を明らかにするため、T細胞をヒト末梢血から単離した。単離した細胞を抗CD3mAb (OKT3) で処理し、T細胞活性化とヒト化抗 4-1BB 抗体 (HBBK4-75) を用量依存的に誘発し、細胞の増殖速度を求めた。OKT3 により誘発された T細胞の活性は用量依存的に増大したが、HBBK4-75 又は抗CD28 抗体

で処理したグループのみがT細胞活性を誘発しなかった（図7）。

【0109】

従って、最終的に調製されたヒト化抗ヒト4-1BB抗体、HB BK 4-75はアゴニスト性抗体としてヒト4-1BBを共刺激するのみならず認識することが確認された。

【実験例2】

【0110】

アゴニスト性抗4-1BB及びアンタゴニスト性抗CTLA-4抗体を用いた併用癌療法臨床研究におけるアゴニスト性HB BK 4の治療活性を予測するために、B16-F10黒色腫瘍細胞注入動物モデルを用いた動物モデル試験を、ラットアゴニスト性抗4-1BB抗体を、強力な抗癌作用を示し、その治療有効性を最大化し、T細胞反応を強化すると周知のアンタゴニスト性抗CTLA-4抗体と共に用いて行った。

10

【0111】

アゴニスト性抗4-1BB及び／又はアンタゴニスト性抗CTLA-4抗体の各自及び複合的な抗癌治療活性を求めるために、 4×10^5 のB16-F10黒色腫細胞を各抗体を200 μ gで生後6週間のC57BL/6マウスに4日ごとに5回皮下注射し、ラットIgG抗体をコントロールグループとして処理した。アゴニスト性抗4-1BB抗体だけの治療グループにおける腫瘍サイズはコントロールグループよりかなり小さく、アンタゴニスト性抗CTLA-4抗体だけの治療グループにおける腫瘍サイズはコントロールグループのものと同様であった。それとは逆に、この両方で治療したグループの試験後20日目までの癌成長速度は緩慢であり、腫瘍サイズはその後、緩やかに縮小していった（図14）。

20

【実験例3】

【0112】

4-1BBの刺激によるCD8+T細胞増大及びCD11c+CD8+T細胞産生アゴニスト性抗4-1BB及びアンタゴニスト性抗CTLA-4抗体の複合的な治療活性を分析するために鼠径リンパ節、つまり流入領域リンパ節を各グループのマウスから切除して各細胞集団の割合を調査した。アゴニスト性抗4-1BB抗体を処置した場合、腫瘍細胞を除去するのに必要なCD8+T細胞の比率は2倍に増大し、CD8+T細胞のIFN- γ 発現率は5倍を越えて増大した（図16及び17）。アンタゴニスト性抗CTLA-4抗体を処置した場合、CD8+T細胞の比率及びIFN- γ 発現率にコントロールグループとの有意差は見られなかったが、CD4+及びCD8+T細胞は双方共に増加傾向を示した（図16及び図17）。両方で治療した治療グループにおけるCD8+T細胞の数は抗4-1BBでの治療グループにおけるものと同様に増大したが、CD8+T細胞のIFN- γ 発現率は総CD8+T細胞の約30%がIFN- γ を発現するほどに急激に増大した（図16及び17）。

30

【0113】

アゴニスト性抗4-1BB抗体の投与がマウスのコラーゲン誘導関節炎（CIA）を治療及び阻害し得ることが報告されており、その活性はCD11c+CD8+T細胞によって媒介される（Seo SK et al., Nat. Med., 10, pp1088-1094, 2004）。これらの結果に基づき、本発明者はアゴニスト性抗4-1BB抗体による癌細胞治療が同一の細胞集団を産生するか否かを確認するために研究し、ついに蛍光複合抗CD11c及び抗CD8抗体で染色した流入領域リンパ節から単離した細胞によりCD11c+CD8+T細胞の存在を確認した。同一細胞グループは、抗4-1BB抗体を動物腫瘍モデル内に投与した場合に形成され、36%のCD8+細胞がCD11c+CD8+T細胞であった。同一細胞グループの比率は、併用治療の場合、50%のCD8+T細胞がCD11cを発現するまでに更に増大した（図18）。

40

【0114】

50

これらの結果は、アゴニスト性抗 4-1 BB 抗体の治療により CD 8 + T 細胞の数及び IFN- γ の発現が増大し、同様に抗 CTLA-4 抗体がこれらの活性をより最大限に引き出すことを示した。これに加え、CD 11c + CD 8 + T 細胞が抗 4-1 BB 抗体を用いた癌治療に関係することを示唆した。

【実験例 4】

【0115】

アゴニスト性抗 4-1 BB による CD 11c + CD 8 + T 細胞の腫瘍への浸透
CD 11c + CD 8 + T 細胞の形成のみならず CD 8 + T 細胞及び IFN- γ の上昇が癌細胞の増殖に直接的に関わっているか否かを確認するために、各細胞グループの割合と特性を腫瘍から免疫細胞を単離することで分析した。B16-F10 黒色腫細胞を 200 μ g の各抗体、つまりラット IgG、抗 4-1 BB、抗 CTLA-4 又は抗 4-1 BB + 抗 CTLA-4 と共にラットに 4 日ごとに皮下投与した。癌細胞の注入後 18 日目に単離された腫瘍を 36% / 63% パーコールで遠心分離した。細胞中の CD 4 + / CD 8 + T 細胞の比を調べた後、ラット IgG でのみ治療したコントロールグループにおける CD 4 + / CD 8 + T 細胞は 5% 未満だったのに対し、抗 4-1 BB で治療した試験グループにおける CD 8 + T 細胞と CD 4 + T 細胞の浸透率は 62% と 13% に上昇した。アンタゴニスト性抗 CTLA-4 抗体で治療した治療グループはコントロールグループと同様のレベルを示し、両者で治療した治療グループは抗 4-1 BB 抗体で治療した治療グループと同等のレベルを示した（図 19）。流入領域リンパ節で見られた CD 11c + CD 8 + T 細胞が腫瘍にも見られ、腫瘍に浸透した CD 8 + T 細胞の 90% を越える割合が CD 11c + CD 8 + T 細胞であった（図 20）。NK 細胞も癌細胞除去に関与していた。

【0116】

加えて、研究により腫瘍中の NK 細胞の比率を求め、これらの細胞グループがアゴニスト性抗 4-1 BB 抗体による癌阻害過程に関与しているのか否かを確認し、又、どの試験グループでも NK 細胞の増加は見られないことを発見した（図 21）。

【0117】

アゴニスト性 4-1 BB、及び両者で治療した治療グループにおける腫瘍に浸透した細胞の数はそれぞれ約 2 倍及び 2.5 倍に増加した（図 22）。抗 4-1 BB、及び両者で治療した治療グループにおける CD 8 + T 細胞の数は、腫瘍中の CD 4 + / CD 8 + T 細胞の数をフローサイトメトリ解析で計算した場合、約 10 倍と 15 倍にそれぞれ増大した。抗 4-1 BB での治療グループにおける CD 4 + T 細胞の数はどちらかといえば増大したもの、両者で処理した治療グループにおける CD 4 + T 細胞は 4 倍に増大した（図 22）。

【0118】

これらの結果は、アゴニスト性抗 4-1 BB 抗体での治療は CD 11c + CD 8 + T 細胞の分化と増殖につながり、細胞が腫瘍に浸透し、癌細胞の増殖を阻害したことを示唆する。抗 CTLA-4 抗体は抗 4-1 BB 抗体の抗癌効果を最大限にひきだし、NK 細胞はこれらの過程に関与しなかった。

【実験例 5】

【0119】

CD 11c + CD 8 + T 細胞の遺伝子発現分布

アゴニスト性抗 4-1 BB 抗体により形成された CD 11c + CD 8 の特性を分析し、どの遺伝子発現が癌細胞増殖に影響するかを確認するために、抗 4-1 BB 又はラット IgG 治療マウスの CD 11c + CD 8 + T 細胞及び CD 8 + T 細胞を比較した。アゴニスト性抗 4-1 BB の治療により自己免疫疾患が阻害され、治療活性は CD 11c + CD 8 + T 細胞により媒介されることが報告されている。従って、CIA（コラーゲン誘導関節炎）モデルから単離した細胞、つまり抗 4-1 BB 治療マウスにおける CD 11c + CD 8 + T 細胞と、ラット IgG 治療マウスにおける CD 8 + T 細胞を用いて DNA アレイを行い、癌モデルで生成された CD 11c + CD 8 + T 細胞の発現をこういった結果に基づいて求めた。

【0120】

コラーゲンをマウスに投与し関節炎を誘発させ、それぞれ200 μgのラットIgG又は抗4-1BB抗体を2日ごとに5回、同時に腹腔内注射した。抗体の最終投与から14日目に、各マウスの流入領域リンパ節、つまり鼠径部及び腸骨リンパ節を取り出し、抗4-1BB抗体治療マウスにおけるCD11c+CD8+T細胞及びラットIgG治療マウスのCD8+T細胞を単離した。RNAをこういった細胞から抽出し、2つの細胞間での遺伝子発現差をアフィマトリックス・マイクロアレイシステムを用いて分析した。4-1BB刺激により生成されたCD11c+CD8+T細胞は約220遺伝子で高い発現を示し、T細胞エフェクタ機能、アポトーシス、抗アポトーシス、及びCD11c+CD8+T細胞における細胞接着及び細胞移動に関連した遺伝子発現は表6に示されるように上昇した。

10

【0121】

コラーゲンをラットに投与し関節炎を誘発させ、それぞれ200 μgのラットIgG又は抗4-1BB抗体を2日ごとに5回、同時に腹腔内注射した。コラーゲン免疫付与から12日後、各ラットの流入領域リンパ節、つまり鼠径部及び腸骨リンパ節を取り出し、抗4-1BB抗体治療ラットにおけるCD11c+CD8+T細胞及びラットIgG治療ラットのCD8+T細胞を単離した。RNAをこういった細胞から抽出し、2つの細胞間での遺伝子発現差をアフィマトリックス・マイクロアレイシステムを用いて分析した。T細胞エフェクタ機能、アポトーシス、抗アポトーシス、及びCD11c+CD8+T細胞における細胞接着及び細胞移動に関連した遺伝子発現の中で比較的高い遺伝子発現を示した遺伝子を表6に示した。

20

【0122】

【表6】

遺伝子	フォールド	遺伝子	フォールド
T細胞エフェクタ機能		ヒアルロナン受容体RHAMMV5	1.34
アネキシンA4	3.2	リンパ球活性化遺伝子3	1.25
インターロイキン4誘導遺伝子1	2.87	Bリンパ球誘導成熟化タンパク質	1.25
Scyb9	2.78	Mac-2抗原	1.2
小誘導性サイトカインA3	2.66	レクチン、ガラクトース結合ソルブル1	1.19
Klr g1	2.47	CD9抗原	1.16
インターロイキン10受容体アルファ	2.45	PHAMM	1.15
T細胞免疫グロブリンムチン-3	2.38	CD38抗原	1.13
ペプチドグリカン認識タンパク質	2.32	B細胞CLLリンパ腫7C	1.05
インターフェロンγ	2.3		
CD68抗原	2.3	アポトーシス	
ナチュラルキラー細胞タンパク質群2-A1	2.27	Fas抗原リガンド	3.03
プレクストリン	2.12	カルセニリン	2.76
アネキシンA2	2.07	グランザイムK	2.58
MHCクラスII抗原IEアルファ(H2-Ea)	2.05	グランザイムB	2.2

30

40

CD 27 L	2	カスパーゼ 3	1. 9 3
ナチュラルキラー細胞タンパク質群 2-A 2	1. 9 5	造血特異性早期反応タンパク質	1. 8 4
MHCクラスII H 2-I A-ベータ鎖	1. 9 4	ブラグラム細胞死 1	1. 5 3
NKG 2	1. 9 2	カスパーゼ 1	1. 4 2
C t l a 2 a	1. 8 8		
C l a 2 b	1. 8 7	抗アポトーシス	
MHCクラスII H 2-I A-ベータ鎖	1. 8 4	セリンプロテアーゼ阻害剤 1 2	2. 0 7
4-1 BB	1. 7 7	セリンプロテアーゼ阻害剤 6	1. 9 2
プレクストリン 1 小アイソフォーム	1. 7 6	バキュロウィルス I A P 繰り返し含有 5	1. 6 6
膜貫通 7 スーパーファミリーメンバー 1	1. 7 2	シスタチン C	1. 6 2
ニューロカルシンデルタ	1. 6 8		
メタロペプチダーゼ	1. 6 7	細胞接着及び遊走	
リンフォタクチン	1. 6	CD 11 c	2. 6 7
甲状腺ホルモン受容体インタラクタ 1 3	1. 5 5	MCP-1	2. 4 9
C l q c	1. 4 9	ケモカイン (C-C) 受容体 2	2. 3 8
インターロイキン 1 受容体 タイプ II	1. 4 4	C-Cケモカイン受容体 5	2. 0 7
CD 7 4	1. 4	MIP-1 アルファ受容体	2. 0 3
CD 3 8 抗原	1. 3 8	カテニンアルファ 1	1. 2 3
セリンセレオニンキナーゼ 5	1. 3 7	ケモカイン様ファクタースーパーファミリー 7	1. 0 9
B r c a 1	1. 3 5	CD 1 6 6	1. 0 7

10

20

30

【 0 1 2 3 】

B 1 6-F 1 6 黒色腫細胞株の注入と同時に、200 μ g の抗 4-1 BB 又はラット Ig G をマウスに 2 日ごとに 5 回注入し、各マウスの流入領域リンパ節、つまり鼠径部リンパ節を取り出して CD 11 c + CD 8 + T 細胞及び CD 8 + T 細胞を抗体の最終投与から 4 日目に単離した。RNA を単離した細胞から抽出して cDNA を合成し、表 6 に図示の増大した遺伝子発現を分析した。Tim 3、IL 4 i g 1、IL-1 RII、THRI 1 3、LAG 3、プレクストリン、TIP 2、K1 r g 2-A 1、PRP 1、アネキシン A 4、TGF- β 、K1 r g 1、CD 6 8 A g、NKG 2、IFN- γ 、パーフォリン、グランザイム B の遺伝子発現が RT-PCR により確定され、PRP 1 及びパーフォリンを除く遺伝子発現の大半が増大することが判明した (図 2 3)。これらの結果は、抗 4-1 BB 治療により形成された CD 11 c + CD 8 + T 細胞に自己免疫疾患モデルと癌モデルの間で有意差が認められなかったことを示している。癌モデルから単離された CD 11 c + CD 8 + T 細胞は癌細胞の除去に必要な IFN- γ 及びグランザイム B に関して高レベルの遺伝子発現を示し、これはこれらの細胞グループが癌細胞除去に効果的であることを表している。T 細胞増殖というよりも CTL エフェクタ機能により強化された分化状態を示す K1 r g 1 の発現は CD 11 c + CD 8 + T 細胞において高いレベルを示し、K1 r g 1 に加え、T 細胞、CD 2 7 及び THRI 1 3 の抗アポトーシスに関与するアネキシン A 4、T 細胞機能の調節に関与した T 細胞の共刺激分子、Tim-3 遺伝子及び LAG-3 遺伝子の発現が高く向上したことが判明した。これらの結果は CD 11 c + CD 8 + T 細胞

40

50

が単に C T L 機能を示すだけでなく、免疫反応を制御し得る細胞ことを示している。

【0124】

以下に、製剤方法と賦形剤の種類とを説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。代表的な製剤例は以下に記載のとおりである。

【0125】

注射剤の調製

H B B K 4	1 0 0 m g
メタ重亜硫酸ナトリウム	3 . 0 m g
メチルパラベン	0 . 8 m g
プロピルパラベン	0 . 1 m g

10

注射用蒸留水 最適量

注射剤は、慣用の注射剤調製法により有効成分を溶解し、p Hを約7 . 5に調整し、2 m l のアンプルに全成分を充填して殺菌することで調製した。

【0126】

粉剤の調製

H B B K 4	5 0 0 m g
コーンスターチ	1 0 0 m g
乳糖	1 0 0 m g
タルク	1 0 m g

上記成分を混合して密封容器に充填することで粉剤を調製した。

20

【0127】

錠剤の調製

H B B K 4	2 0 0 m g
コーンスターチ	1 0 0 m g
乳糖	1 0 0 m g
ステアリン酸マグネシウム	最適量

上記成分を混合、錠剤状にすることで錠剤を調製した。

【0128】

カプセルの調製

H B B K 4	1 0 0 m g
乳糖	5 0 m g
コーンスターチ	5 0 m g
タルク	2 m g
ステアリン酸マグネシウム	最適量

30

錠剤は、慣用のゼラチン調製方法で上記成分を混合し、ゼラチンカプセルに充填することで調製した。

【0129】

液剤の調製

H B B K 4	1 0 0 0 m g
糖	2 0 g
多糖	2 0 g
レモン風味着香料	2 0 g

40

液剤は、慣用の液剤調製法により有効成分を溶解し、次に全成分を1 0 0 0 m l のアンプルに充填し、殺菌することで調製した。

【0130】

本発明の記載より、様々な変更を加えうることは明白である。そういった変更は本発明の精神と範囲から外れるものとはみなされない。また、当業者に自明なそういった改良は全て、以下に述べる請求項の範囲に含まれるものとする。

【産業上の利用可能性】

【0131】

50

本発明に記載したように、本発明の独創的なHBBK4抗体を含む組成物はCD11c + CD8 + T細胞数とIFN- γ 発現の増大により癌細胞増殖の阻害効果を示した。従って、本発明は癌の予防又は治療、及び副作用なく癌の免疫療法を行うのに有用である。

【図面の簡単な説明】

【0132】

本発明の上記又はその他の目的、構成、及びその他の利点は、添付の図面と共に以下の詳細な記載からより明確に理解されるものである。

【図1】アゴニスト性抗4-1BB抗体のヒト化設計を示す。

【図2】BBK4のヒト化ScFvを産生するためのプライマー設計を示す。

【図3】抗Eタグセファロースを用いてヒト化BBK4 (HBBK4) ScFvを精製するための精製手順を示す。 10

【図4】HBBK4のフローサイトメトリ分析を示す。

【図5】競合ELISA法の結果を示す。

【図6】H2L2を用いたウェスタンブロット法の結果を示す（レーン1：HBBK4-75/p cDNAトランスフェクタント、レーン2：HBBK4-75/p D18トランスフェクタント、レーン3：293EBNA-ネガティブコントロール）。 20

【図7】HBBK4-75G1のヌクレオチド配列を示す。

【図8】HBBK4-75G1のアミノ酸配列を示す。

【図9】HBBK4-75G4のヌクレオチド配列を示す。

【図10】HBBK4-75G4のアミノ酸配列を示す。 20

【図11】HBBK4-75Lのヌクレオチド配列を示す。

【図12】HBBK4-75Lのアミノ酸配列を示す。

【図13】HBBKのT細胞増殖に対する増加作用を示す。

【図14】アゴニスト性抗4-1BBとアンタゴニスト性抗CTLA-4抗体の混合物による黒色腫の多剤併用療法における腫瘍サイズの変化を示す。

【図15】アゴニスト性抗4-1BB及びアンタゴニスト性抗CTLA-4抗体の混合物による黒色腫の多剤併用療法におけるラットの生存率の変化を示す。

【図16】抗CD4-FITC + 抗CD8-PEで染色したフローサイトメトリの分析を示す。 30

【図17】CD8-FITC + 抗IFN- γ -PEで染色したフローサイトメトリの分析を示す。 30

【図18】抗CD8-FITC + 抗CD11c-PEで染色したフローサイトメトリの分析を示す。

【図19】アゴニスト性抗4-1BBの投与によるCD11c + CD8 + T細胞の腫瘍組織への浸透を示し、細胞は抗CD4-FITC + 抗CD8 + PE染色される。

【図20】アゴニスト性抗4-1BBの投与によるCD11c + CD8 + T細胞の腫瘍組織への浸透を示し、細胞は抗CD8-FITC + 抗CD11c-PEで染色される。

【図21】アゴニスト性抗4-1BBの投与によるCD11c + CD8 + T細胞の腫瘍組織への浸透を示し、細胞は抗CD3-FITC + 抗NK1.1-PEで染色される。

【図22】フローサイトメトリ分析において各腫瘍組織から回収した細胞中のCD4 + / CD8 + T細胞の絶対数の計算結果を示す。 40

【図23】CD11c + CD8 + T細胞の遺伝子発現のレベルと分布を示す。

【0133】

(配列表)

SEQ. #1: 5'-CTCGAGTTTT TTTTTTTT-3' is Linker primer containing XhoI site,

SEQ. #2: 5'-CTG CAG CAC GGT ATA GGT GA-3' is HBBK4-1U which is BBK4 ScFv combinational primer,

SEQ. #3: 5'-AGTAGCTGCT GAAGGTGTAG CCAGAAGCCT TGCAGGAAAS CTTCACTGAA GCCCCAGGCT TT WYACTTC-3' is HBBK4-1D which is BBK4 ScFv combinational primer,

SEQ. #4: 5'-TACACCTTCA GCAGCTACTG GATGCACTGG GTGARGCAGG CACCTGGACA AGGCCTTGAG TG 50

GATTGGA-3' is HBBK4-2U which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #5: 5'-TGCTCTTGAA CTTCTCATTG TAGTTAGTAT GACCGTTGCC AGGATTAATC TCTCCAATCC AC
 TCAAGGCC-3' is HBBK4-2D which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #6: 5'-AATGAGAAGT TCAAGAGCAR GGYAACTMTG ACTSKGGACA CCTCTACAAAG CACAGYATAC AT
 GSAACTCA-3' is HBBK4-3U which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #7: 5'-TAAAAAGATCT TGCACAGTAA TAGACCGCGG WGTCTCAGA CCGCAGGCTG CTGAGTTSCA TG
 TATRCTGT-3' is HBBK4-3D which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #8: 5'-TACTGTGCAA GATCTTTTAC TACGGCACGG GCGTTTGCTT ACTGGGGCCA AGGGACCCTC GT
 GACCGTCT-3' is HBBK4-4U which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #9: 5'-CTGAGCCGCC GCCGCCTGAG CCGCCGCCGC CTGAGCCGCC GCCGCCTGAG GAGACGGTCA CG 10
 AGGGTCCC-3' is HBBK4-4D which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #10: 5'-TCAGGCGGCG GCGGCTCAGA CRTTGTGATG ACTCAGTCTC CAGCCTTCTT ATCTGTGACT C
 CAGGAGAG-3' is HBBK4-5U which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #11: 5'-AGTGTAAGTA GTCGTAATA GTCTGGCTGG CCCTGCAAGT AAKAGTCACT TTCTCTCCTG G
 AGTCACAGA-3' is HBBK4-5D which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #12: 5'-ATTAGCGACT ACTTACACTG GTATCAACAA AAACCCGATC AAKCTCCCAA ACTTCTCATC A
 AATATGCTT-3' is HBBK4-6U which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #13: 5'-TCCCTGATCC ACTGCCACTG AACCTGGAGG GAAYCCCAGA GATGGATTGG GAAGCATATT T
 GATGAGAAG-3' is HBBK4-6D which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #14: 5'-AGTGGCAGTG GATCAGGGAC TGATTTCACT YTTASTATCT CGTCGSTCGA GGCAGAAGAT G 20
 YTGSGRYGT-3' is HBBK4-7U which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #15: 5'-TAGTTCCTTG ACCGAAAGTT GGGGGAAAGC TGTGACCATC TTGACAGTAA TACRYCSCAR C
 ATCTTCTGC-3' is HBBK4-7D which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #16: 5'-GAGTCATTCT CGACTTGCGG CCGCTTTGAT CTCGAGTTTA GTTCCTTGAC CGAAAGT-3' i
 s HBBK4-8D which is BBK4 ScFv combinational primer, SEQ. #17: 5'-ACTGCGGCCC AGCC
 GGCCAT-3' is HBBK4 SfiI-U which is BBK4 ScFv combinational primer,
 SEQ. #18: 5'-TTAGTTCCTT GACCGAAAGT-3' is HBBK4 NotI-D which is BBK4 ScFv combin
 ational primer, SEQ. #19: 5'-ACTGCGGCCC AGCCGGCCAT-3' is recognition site for re
 striction enzyme SfiI, SEQ. #20: 5'-TTAGTTCCTT GACCGAAAGT-3' recognition site for
 resriction enzyme NotI, 30
 SEQ. #21: 5'-AATCAACCAG ACATACCAGC-3' is forward primer for Annexin4,
 SEQ. #22: 5'-TCTTCAAAGC TTCCAGATGT-3' is reverse primer for Annexin4,
 SEQ. #23: 5'-CTTTGCAATG GTGGCTTT-3' is forward primer for Klrg1,
 SEQ. #24: 5'-CTCCAGCCAT CAATGTT-3' is reverse primer for Klrg1,
 SEQ. #25: 5'-GCATATCTGT TTTGAATCC-3' is forward primer for CD68 Ag,
 SEQ. #26: 5'-CCTTAGAGAG AGCAGGTCA-3' is reverse primer for CD68 Ag,
 SEQ. #27: 5'-GTGATGACCA CCGTACTCTT-3' is forward primer for THRI13,
 SEQ. #28: 5'-GCATTGACTA CTCGATAGC-3' is reverse primer for THRI13,
 SEQ. #29: 5'-CGATTACCCC TTAACACATT-3' is forward primer for NKG2,
 SEQ. #30: 5'-GCTGGAATTT TGAGACAAAC-3' is reverse primer for NKG2, 40
 SEQ. #31: 5'-TTGACGTCAC TGGAGTTGTA-3' is forward primer for TGF-BETA1,
 SEQ. #32: 5'-AATAGTTGGT ATCCAGGGCT-3' is reverse primer for TGF-BETA1,
 SEQ. #33: 5'-CAGATTACC ACAAGAATGA-3' is forward primer for PRP1,
 SEQ. #34: 5'-CCCACATTCC AGAAGATTTA-3' is reverse primer for PRP1,
 SEQ. #35: 5'-CGATGCAGGC TATTACAGA-3' is forward primer for IL-1R II,
 SEQ. #36: 5'-ATCAAAAATC AGCGACACT-3' is reverse primer for IL-1R II,
 SEQ. #37: 5'-CCCAGGCGCA ATGCTAA-3' is forward primer for GRANZYME B,
 SEQ. #38: 5'-CCAGGATAAG AAACCTCG-3' is reverse primer for GRANZYME B,
 SEQ. #39: 5'-GAACGGGAAG CTTGTCA-3' is forward primer for GAPDH,
 SEQ. #40: 5'-CTAAGCAGTT GGTGGTGC-3' is reverse primer for GAPDH, 50

SEQ. #41: 5'-ATCCAGCAGA TACCAGCTA-3' is forward primer for TIM-3,
 SEQ. #42: 5'-TCCATTGTTA TTATGGAGG-3' is reverse primer for TIM-3,
 SEQ. #43: 5'-GTATCTTCAC TTTCCGGGA-3' is forward primer for IL-4 IG 1,
 SEQ. #44: 5'-GAGGTAGAAG AAGCCCTC-3' is reverse primer for IL-4 IG 1,
 SEQ. #45: 5'-ACTGAATCTG GAGAAGGAC-3' is forward primer for PLECKSTRIN,
 SEQ. #46: 5'-TTCAGTAAAC ATCCCTGCT-3' is reverse primer for PLECKSTRIN,
 SEQ. #47: 5'-AAAGCAAAGC AAATGAAGA-3' is forward primer for TIP2,
 SEQ. #48: 5'-TCAGTGGAGG AATGGTAAT-3' is reverse primer for TIP2,
 SEQ. #49: 5'-GTCTCCATCA CGTACAACC-3' is forward primer for LAG3,
 SEQ. #50: 5'-CACAAATCTT TCCTTTCCA-3' is reverse primer for LAG3, 10
 SEQ. #51: 5'-TCCTCCAGAG AAATCATT-3' is forward primer for KLRG2-A1,
 SEQ. #52: 5'-TACAGTTTTT GGAAATGCA-3' is reverse primer for KLRG2-A1,
 SEQ. #53: 5'-GCTGAATCTC ACAGTTCTC-3' is forward primer for CD27,
 SEQ. #54: 5'-CCAGTGTAC CTGGATAT-3' is reverse primer for CD27, SEQ. #55: 5'-GTC
 ACGTCGA AGTACTT-3' is forward primer for PERFORIN,
 SEQ. #56: 5'-ATGGCTGATA GCCTGTC-3' is reverse primer for PERFORIN,
 SEQ. #57: 5'-AACGCTACAC ACTGCAT-3' is forward primer for IFN-GAMMA,
 SEQ. #58: 5'-GCCGTGGCAG TAACAGC-3' is reverse primer for IFN-GAMMA,
 SEQ. #59: 5'-gatctcacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc tacaggtgtc c
 actcccagg tgcagctgca gcagctctggg gctgaagtaa taaagcctgg ggcttcagtg aagctttcct gcaa 20
 ggcttc tggctacacc ttcagcagct actggatgca ctgggtgagg caggcacctg gacaaggcct tgagtgg
 att ggagagatta atccttgcaa cgtcatact aactacaatg agaagttcaa gagcagggca actctgactg
 gggacacctc tacaagcaca gtatacatgg aactcagcag cctgcgggtct gaggacaccg cggctctatta ct
 gtgcaaga tcttttacta cggcacgggc gtttgcttac tggggccaag ggaccctcgt gaccgtctcc tcage
 ttcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa aagcacctct gggggcacag cggccctg
 gg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg tegtggaact caggcgccct gaccagcggc
 gtgcacacct tcccggctgt cctacagtc tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct cca
 gcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa aaaaag
 ttg agtcccaaat ctgtgacaa aactcact tggccgctg gcccggctcc ggaactcctg gggggaccg
 t cagtcttct ctcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt g 30
 gtgggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatg
 ccaaga caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcacca
 gga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc
 atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg gaggagatga cc
 aagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggcct ctatcccagc gacattgccg tggagtggga gagca
 atggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc ctctatag
 ca agtcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct
 gcacaaccac tacacgcaga agagcctct cctgtccccg ggtaaatga-3' is base sequence of HBB
 K4-75G1,
 SEQ. #60: 5'-DLTMGWSCH LFLVATATGV HSQVQLQQSG AEVIKPGASV KLSCKASGYT FSSYWMHWVR Q 40
 APGQGLEWI GEINPGNGHT NYNEKFKSRA TLTGDTSTST VYMELSSLRS EDTAVYYCAR SFTTARAFAY WGQG
 TLTVTS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGLV KDYFPEPVT SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSL
 SVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHPK SNTKVDKSL SPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR
 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KA
 LPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDS
 DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK-3' is amino acid sequence o
 f HBBK4-75G1,
 SEQ. #61: 5'-gatctcacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttcttgg tagcaacagc tacaggtgtc c
 actcccagg tgcagctgca gcagctctggg gctgaagtaa taaagcctgg ggcttcagtg aagctttcct gcaa 40
 ggcttc tggctacacc ttcagcagct actggatgca ctgggtgagg caggcacctg gacaaggcct tgagtgg

att ggagagatta atcctggcaa cggtcatact aactacaatg agaagttcaa gagcagggca actctgactg
 gggacacctc tacaagcaca gtatacatgg aactcagcag cctgcgggtct gaggacaccg cgggtctatta ct
 gtgcaaga tcttttacta cggcacgggc gtttgcttac tggggccaag ggaccctcgt gaccgtctcc tcage
 ttcca ccaagggccc atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag ccgcccgt
 gg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc
 gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct cca
 gcagctt gggcacgaag acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagt
 tgag tccaaaatag gtcccccatg cccatcatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca gtcttcctg
 t tcccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac cctgagggtc acgtgcgtgg tgggtggactg g
 agccaggaa gaccccagg tccagttcaa ctggtacgtg gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagc
 cgcggg aggagcagtt caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaa
 cgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa aggcctcccg tcttccatcg agaaaacat ctccaaagcc
 aaagggcagc cccgagagcc acagggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc aagaaccagg tc
 agcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccgg
 agaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggt ccttcttct ctacagcagg ctaaccgt
 gg acaagagcag gtggcaggag gggaatgtct tctcatgtct cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta
 cacacagaag agcctctccc tgtctctggg taaatga-3' is base sequence of HBBK4-75G4,

10

SEQ. #62: 5'-MGWSCIIILFL VATATGVHSQ VQLQQSGAEV IKPGASVKLS CKASGYTFSS YWMHWVRQAP G
 QGLEWIGEI NPGNGHTNYN EKFKSRATLT GDTSTSTVYM ELSSLRSEDV AVYYCARSFT TARAFAYWGQ GTLV
 TVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSKVHT FPAVLQSSGL YSLSSVV
 TVP SSSLGKTYT CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPSCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV
 VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKGLPSSI EK
 TISKAKGQ PREPQVYTLPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLY
 SRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL LSLGK-3' is amino acid sequence of HBBK4-
 75G4,

20

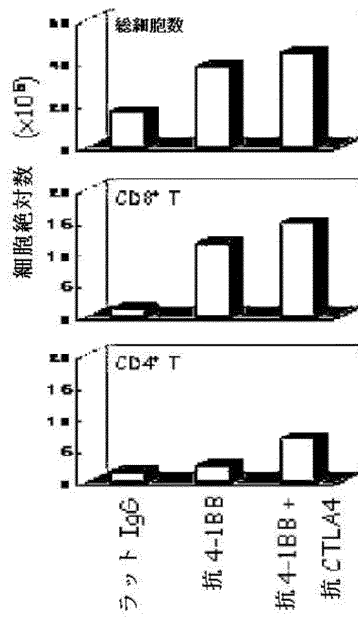
SEQ. #63: 5'-gcctggacat gatgagggtc tctgctcagt tcttgggtct cctgttgctc tgttttcaag g
 taccagatg tgacattgtg atgactcagt ctccagcctt cttatctgtg actccaggag agaaagtac tatt
 acttgc agggccagcc agactattag cgactactta cactgggtatc aacaaaaacc cgatcaagct cccaac
 ttc tcatcaaata tgcttcccaa tccatctctg ggattccctc caggttcagt ggcagtggat cagggactga
 ttacactttt actatctcgt cgctcgaggc agaagatgct ggcacgtatt actgtcaaga tggtcacagc tt
 tccccaa ctttcggta aggaactaaa ctcgagatca aaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tccc
 ccate tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagagg
 cc aaagtacagt ggaagggtga taacgcctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca
 gcaaggacag cacctacagc ctacagcagca cctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt cta
 cgctgc gaagtcacc atcagggcct gagtgcgcc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt tag-3'
 is base sequence of HBBK4-75L,

30

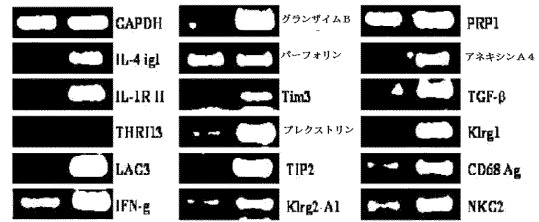
SEQ. #64: 5'-LDMMRFSAQF LGLLLLCFQG TRCDIVMTQS PAFLSVTPGE KVTITCRASQ TISDYLHWYQ Q
 KPDQAPKLL IKYASQSIG IPSRFSGSGS GTDFTFTISS LEAEDAATYY CQDGHSPFPT FGQGTKLEIK TVAA
 PSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSSST LTLSKAD
 YEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC-3' is amino acid sequence of HBBK4-75L.

40

【図 2 2】



【図 2 3】



【配列表】

[2008542261000001.xml](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2006/001963
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 39/395(2006.01)i</i>		
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) IPC 8 A61K 39/395		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patents and Applications for Inventions since 1975 Korean Utility Models and Applications for Utility Models since 1975 Japanese Utility Models and Applications for Utility Models since 1975		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS, WPI, USPTO, PAJ, NCBI, CAPLUS(STN), INSPECT "4-1BB, CPLK, cancer."		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SON JH et al. 'Humanization of agonistic anti-human 4-1BB monoclonal antibody using a phage-displayed combinatorial library' In: J. Immunol Methods 2004, Vol.286 No. 1-2, pp. 187-201 see abstract, Fig. 2, p. 192 right column	1, 10
X	MURILLO O et al. 'Potentiation of Therapeutic Immune Responses against Malignancies with Monoclonal Antibodies' In Clinical Cancer Research(Review) 2003, Vol.9, pp. 5454-5464 see abstract, pp. 5456-5457	2-9, 11
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 AUGUST 2006 (25.08.2006)		Date of mailing of the international search report 28 AUGUST 2006 (28.08.2006)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer LIM, Hea Joon Telephone No. 82-42-481-5600 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/KR2006/001963
--

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☒ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☒ contained in the international application as filed
☒ filed together with the international application in electronic form
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2006/001963

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
none			

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW